

Trabajo Fin de Máster  
Máster en Ciencias  
Analíticas y Bioanalíticas  
Julio, 2022

## **Estudio del perfil proteico de Fe, Cu y Zn en suero y exudado nasal mediante ensayos de tipo ELISA y HPLC-ICP-MS para el diagnóstico diferencial de ictus**

Study of the protein profile of Fe, Cu and Zn in serum and nasal exudate by ELISA assays and HPLC-ICP-MS for stroke differential diagnosis



Universidad de Oviedo

**Claudia García Revuelta**

# ÍNDICE

---

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>1.1 Ictus</b> .....	2
<b>1.2 Metaloproteínas</b> .....	3
<b>1.3 HPLC-ICP-MS</b> .....	4
1.3.1 Separación mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia con columna de exclusión por tamaño.....	4
1.3.2 ICP-MS .....	6
1.3.3 Análisis por dilución isotópica.....	8
<b>1.4 Ensayo inmunológico ELISA tipo sándwich con detección colorimétrica</b> ...10	
<b>2. Objetivos</b> .....	12
<b>3.Procedimiento experimental</b> .....	14
<b>3.1 Materiales y reactivos</b> .....	15
<b>3.2 Muestras</b> .....	15
<b>3.3 Instrumentación</b> .....	16
<b>3.4 Preparación de muestras</b> .....	18
<b>3.5 Metodología HPLC-ICP-MS</b> .....	18
3.5.1 Preparación de disoluciones .....	18
3.5.2 Condiciones experimentales HPLC.....	19
3.5.3 Condiciones experimentales en el ICP-MS .....	20
3.5.4 Protocolo seguido antes del análisis .....	21
<b>3.6 Ensayo ELISA para transferrina y lactoferrina</b> .....	21
3.6.1. Preparación de disoluciones .....	21
3.6.2. Protocolo experimental.....	23
<b>3.7 Cuantificación de BCA para la determinación de proteína total</b> .....	23
<b>4.Resultados y discusión</b> .....	26
<b>4.1. Optimización de las condiciones del HPLC</b> .....	27

<b>4.2. Resultados experimentales con HPLC-ICP-MS</b> .....	29
4.2.1 Optimización de las condiciones de medida.....	29
4.2.2 Análisis de las muestras de pacientes con ictus .....	32
4.2.3 Optimización de las condiciones para IDA .....	33
4.2.4 Medidas de muestras de pacientes con ictus mediante HPLC-ICP-MS y dilución isotópica post-columna.....	35
4.2.5 Normalización de áreas.....	37
<b>4.3. Ensayo ELISA tipo sándwich con detección colorimétrica</b> .....	38
4.3.1. Optimización de la dilución de muestra .....	39
4.3.2 Detección cuantitativa de las muestras de pacientes de ictus.....	40
<b>5. Conclusiones</b> .....	43
<b>6. Bibliografía</b> .....	45

# 1. Introducción

---

## 1.1 Ictus

El ictus se define como una enfermedad cerebrovascular que se produce cuando los vasos sanguíneos del área encefálica están afectados por un proceso patológico, ya sea forma transitoria o permanente [1]. El ictus, puede ser de tipo isquémico o hemorrágico. Ambos producen la disminución del flujo sanguíneo que llega al cerebro. En el caso de una obstrucción se habla de “ictus isquémico” (infarto cerebral), y en el caso de una rotura arterial de “ictus hemorrágico” (hemorragia cerebral).

Hoy en día la enfermedad del ictus es considerada como una de las principales causas de muerte y discapacidad [2]. Solo en España, según datos publicados por Simal *et al.* [3] en la revista española de salud pública, el ictus es la primera causa de discapacidad y muerte en mujeres y la segunda causa de muerte en hombres junto con la demencia.

El tiempo de demora desde el “despertar del ictus”, llamado así a los primeros síntomas leves, y la atención hospitalaria resulta un factor crítico. La atención del paciente en las primeras 6 horas es fundamental para reducir hasta un 30% las complicaciones [3].

Según Rodríguez García *et al.* [2], alrededor de un 60% de la mortalidad por ictus es de origen isquémico. El ictus hemorrágico, con síntomas de mayor gravedad, como el coma, lleva asociado un menor tiempo de atención hospitalaria (los pacientes acuden al hospital con anterioridad), factor clave para la supervivencia del paciente. A pesar de esto, tal y como se puede observar en la Fig.1, la mortalidad en los pacientes por debajo de los 60 años es hasta cuatro veces mayor para el ictus hemorrágico en comparación con el ictus de tipo isquémico.

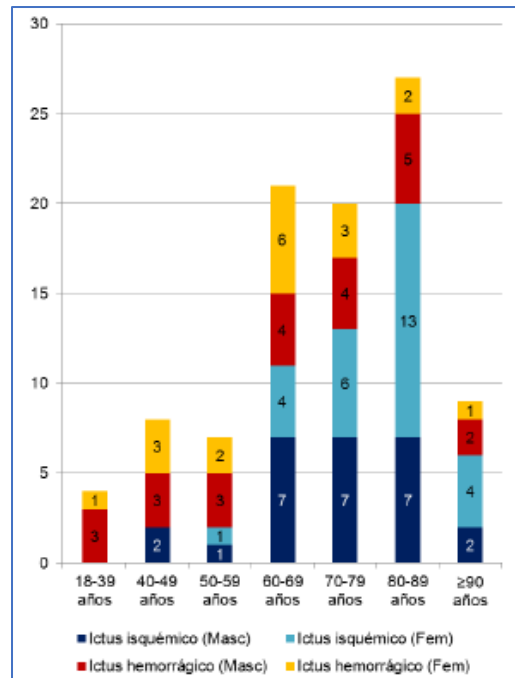


Figura 1. Diagrama de mortalidad Ictus. Número de fallecidos en función de la edad, tipo y sexo [2].

## 1.2 Metaloproteínas

Las proteínas son macromoléculas que intervienen en todos los procesos biológicos. Su plegamiento otorga la conformación tridimensional de la molécula, propiedad que, como se explicará más adelante se usará para su separación cromatográfica.

En ocasiones, los átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre pertenecientes a los aminoácidos se coordinan además con metales como hierro, cobre o zinc, constituyendo las denominadas “metaloproteínas”. Estas metaloproteínas realizan funciones esenciales en el organismo como: transportadores, enzimas, o sistemas de almacenamiento.

El hierro es un elemento esencial para los seres vivos, interviniendo en el transporte del oxígeno, en el transporte de electrones, y en la catálisis de reacciones biológicas. Muchas proteínas contienen este elemento. Entre las más abundantes descritas en suero hay que señalar: ferritina (440 kDa), lactoferrina (80 kDa), transferrina (79,6 kDa), hemoglobina (64,4 kDa), ferroportina (62,5 kDa) y hepcidina (2789 Da) [4].

Tras el hierro, el Cu es el segundo átomo metálico más abundante en el organismo actuando como cofactor [5]. Participa en diversas reacciones enzimáticas como la formación del tejido conectivo, homeostasis del hierro y la protección contra la acción de radicales libres. Entre las más abundantes en suero destaca la ceruloplasmina (132 kDa) [6].

El zinc por su parte es el elemento más importante de las metaloproteínas de la matriz participando en su remodelación [7]. Además de ello, el zinc actúa como neuromodulador, inmunoregulador o en la regulación de la presión sanguínea. Algunas de las metaloproteínas de zinc más abundantes son: anhidrasa carbónica (29 kDa) y fosfatasa alcalina (60kDa) [8].

## 1.3 HPLC-ICP-MS

### 1.3.1 Separación mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia con columna de exclusión por tamaño

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es en una de las técnicas de separación más importantes en la actualidad, en investigación, en análisis clínicos y medioambientales, y en la industria, entre otros campos de aplicación, debido a su versatilidad, su alto poder de resolución y sus tiempos relativamente cortos de análisis [9]. Se entiende como HPLC aquella cromatografía líquida cuyo tamaño de partícula se encuentra entre 2-10  $\mu\text{m}$ , y que requiere una presión de operación relativamente alta.

Los procesos de separación de mezclas proteicas más habituales se basan en cromatografía de líquidos. Las separaciones por HPLC se basan en la migración diferencial de los componentes de la muestra disueltos en una fase móvil al entrar en contacto con una fase estacionaria [10]. En la bibliografía se recogen numerosos métodos para la separación de proteínas mediante HPLC. Por ejemplo, Giraldo Zuñiga et al.[9], consiguieron buenas separaciones de proteínas en suero empleando columnas de exclusión por tamaño, intercambio aniónico y fase inversa.

En el caso de columnas de exclusión por tamaño (SEC) hay una fase estacionaria sólida compuesta por un material polimérico de alta porosidad con

cavidades de tamaño y distribución definidas, que permiten entrar a los analitos más pequeños. Esto conlleva que la separación depende del tamaño y el volumen hidrofóbico, que define el poder de la proteína de penetrar o no en los poros

Las moléculas de mayor peso molecular pasan a mayor velocidad a través de la columna eluyendo las primeras (Fig. 2), mientras que, las proteínas más pequeñas tienen mostrarán un mayor tiempo de retención (proporcional a las distintas cavidades que puedan atravesar).

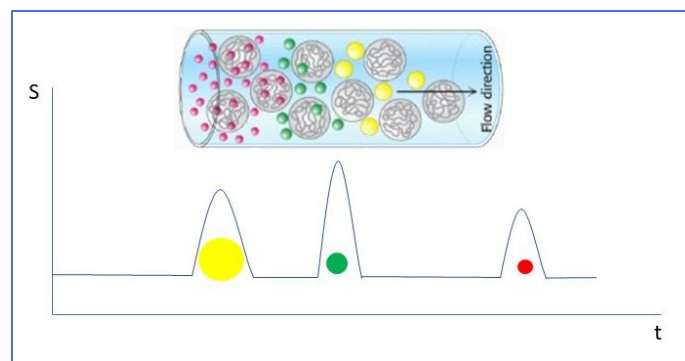


Figura 2. Esquema del funcionamiento de una columna de exclusión por tamaño

En contraste con otros tipos de cromatografía, la selectividad de una matriz de exclusión por tamaño no se puede ajustar cambiando la composición de la fase móvil. La única variable que se puede optimizar es la velocidad de flujo de la fase móvil, trabajándose siempre en modo isocrático requiriendo un único buffer o fase móvil. Otra ventaja aparente, además de la sencillez del método, es que las columnas SEC son compatibles con numerosas fases móviles acuosas, incluso en presencia de surfactantes, agentes reductores o agentes desnaturizantes [10].

Se pueden definir dos tipos de cromatografía de exclusión por tamaños: la utilizada para proteínas es la “filtración sobre geles” en la que la fase estacionaria es hidrofílica y la fase móvil acuosa, y la “permeación a través de geles” en la que la fase estacionaria es hidrofóbica y la fase móvil es un disolvente orgánico, usada mayoritariamente para la separación de polímeros.



### 1.3.2 ICP-MS

La espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es una técnica de análisis multielemental, rápida y con alta sensibilidad, que desempeña un papel importante en campos de la investigación y ciencia aplicada. La gran densidad de iones y las altas temperaturas del plasma producen la completa atomización e ionización de los elementos presentes en las muestras [11]. Además de lo ya mencionado, otras ventajas son sus bajos efecto matriz, la sencillez del espectro de masas resultante, el amplio rango dinámico y la posibilidad de análisis isotópico. Admite además todo tipo de muestras acuosas [12].

Las partes que componen el equipo ICP-MS que se ha utilizado en el presente Trabajo Fin de Máster se recogen en la Fig. 3.



Figura 3. Esquema ICP-MS [13]

En primer lugar, la muestra líquida se introduce mediante un nebulizador, formándose entonces un aerosol del cual únicamente las gotas más pequeñas llegan al plasma, para así, no apagarlo. El aerosol entra entonces en el plasma pasando a través de la cámara de nebulización.

Seguidamente, se encuentra la antorcha, como fuente de atomización e ionización. La antorcha consiste en 3 tubos concéntricos (Fig. 4) generalmente de vidrio. El plasma de argón, gas circulante en la antorcha, se forma por aplicación de un campo magnético de alta intensidad junto con una chispa de

alto voltaje a presión atmosférica. En el plasma se alcanzan temperaturas muy elevadas (6000-8000K).

El aerosol de muestra se introduce por el canal central de la antorcha y al llegar al plasma los átomos que componen la muestra se deshidratan, atomizan, excitan, ionizan y recombinan, tal y como muestra en dicha Figura 4.

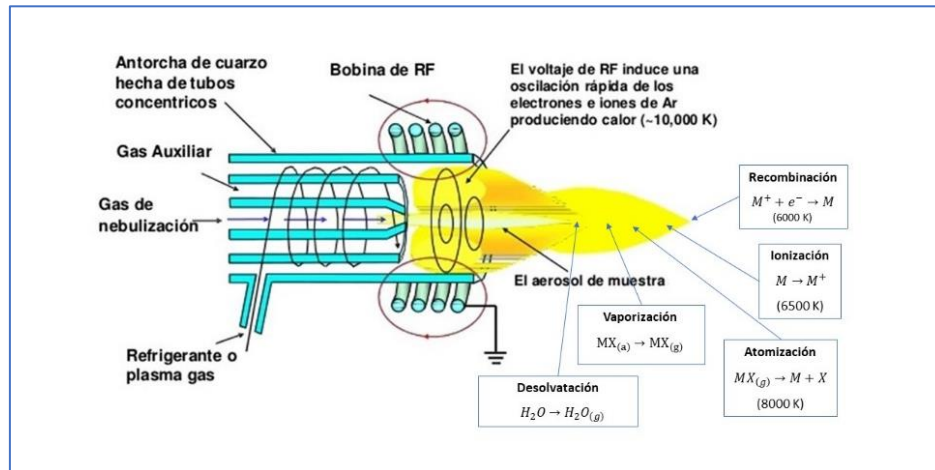


Figura 4. Esquema del funcionamiento de la antorcha del ICP-MS

Tras el plasma se encuentra la interfase, necesaria para facilitar el transporte de los iones desde el plasma (presión atmosférica) hasta el cuadrupolo (alto vacío). La interfase está formada por dos conos (sampler y skimmer), cada uno de los cuales tiene un orificio de entrada por donde se dirige el haz de iones hacia las lentes iónicas, encargadas de focalizar el haz de iones.

A continuación, se encuentra la denominada celda de colisión/reacción la cual suele consistir en un cuadrupolo, hexapolo u octapolo en el que se introduce un gas inerte, como He o H<sub>2</sub>. La celda de colisión/reacción es útil para la eliminación o reducción de interferencias poliatómicas ya sea mediante reacción del analito con el gas de la celda para dar una especie diferente o mediante la ruptura del poliatómico por colisión con el gas.

Por último, los iones pasarán al analizador de masas, un cuadrupolo consistente en cuatro barras paralelas dos a dos y equidistantes sometidas a voltajes positivos y negativos, que dejan pasar únicamente la relación masa/carga seleccionada al detector.

El sistema de detección, en el caso del equipo empleado en este trabajo, consiste en un multiplicador de iones secundarios. El haz de iones incide sobre un cátodo arrancando electrones (secundarios) y, seguidamente, unos dinodos colocados a potenciales cada vez más altos amplifican la corriente de electrones, convirtiendo el haz de iones en una señal eléctrica, que puede ser procesada y almacenada.

Los equipos de ICP-MS son fácilmente acoplables a otras técnicas analíticas como por ejemplo la ablación láser (para análisis de muestras sólidas) o sistemas cromatográficos. En el caso de acoplar el ICP-MS a una técnica de separación como es HPLC resulta sencillo: únicamente se debe unir la salida de la columna de cromatografía a la entrada del nebulizador. La combinación de HPLC e ICP-MS aporta a la detección la diferenciación de las distintas proteínas que conforman la muestra, siempre que se utilice un heteroátomo para la detección.

### 1.3.3 Análisis por dilución isotópica

El análisis con dilución isotópica (IDA) es una estrategia para análisis cuantitativo elemental que se basa en la medida de las relaciones isotópicas de uno (o varios) analito(s) en muestras cuya composición isotópica ha sido alterada mediante la adición de una cantidad conocida del mismo analito enriquecido isotópicamente (trazador), normalmente en un isótopo poco abundante de forma natural [14].

La relación isotópica es el cociente entre el isótopo menos abundante y el más abundante; en este caso el trazador se convierte en el más abundante. El principio de la metodología basada en dilución isotópica proviene de que, gracias a la relación isotópica de la mezcla (analito + trazador), es posible determinar la cantidad de analito en la muestra original (Fig. 5). Para ello, es necesario medir al menos dos isótopos estables del analito que estén libres de interferencias espectrales.

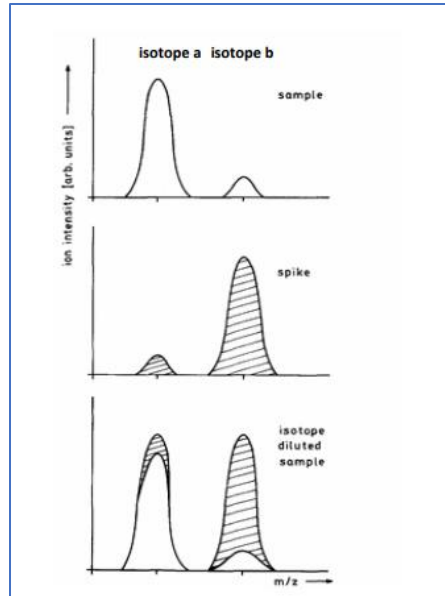


Figura 5. Principio de IDA [15]

De esta forma, midiendo la relación isotópica en ICP-MS (natural y trazador), y conociendo las abundancias naturales y del trazador así como la cantidad de trazador añadida a la mezcla, es posible calcular la cantidad de analito en la muestra original despejando  $n_m$  de la ecuación (Ec.1).

$$R = \frac{n_s * A_s^a + n_m * A_m^a}{n_s * A_s^b + n_m * A_m^b}$$

Ecuación 1. Relación isotópica donde  $n_s$ : moles de trazador,  $A_s$ : abundancia isotópica del trazador,  $n_m$ : moles de muestra original y  $A_m$ : abundancia isotópica natural.

La IDA también se puede utilizar en el caso del HPLC-ICP-MS, teniéndose IDA post-columna (inespecífica) cuando la adición del trazador se realiza a la salida de la columna cromatográfica tras la separación, a un flujo constante y optimizado. Esta forma de análisis es útil cuando el trazador no se encuentra en la misma estructura química que en la muestra, como es el caso de las proteínas. Para ello, la ionización debe ser independiente de la estructura, lo cual es posible con ICP. La desventaja de este método es que no corrige los posibles errores previos a la introducción del trazador, como las pérdidas de analito en la separación o durante las etapas de preparación de la muestra.

Adicionalmente, hay que tener en cuenta las diferencias físico-químicas de los isótopos debida a las diferencias de masa en el núcleo atómico (diferente número de neutrones). Esto conlleva a un efecto de discriminación de masas instrumental (factor K), debido a la transmisión preferencial dentro del ICP-MS de los iones más pesados respecto de los más ligeros. Se trata de un error sistemático que debe corregirse ya que daría lugar a errores en la determinación elemental.

#### **1.4 Ensayo inmunológico ELISA tipo sándwich con detección colorimétrica**

Los ensayos inmunológicos utilizan anticuerpos como reactivos enlazantes. En concreto, la técnica ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) es un ensayo heterogéneo que utiliza un enzima como marcador de la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Se basa en la detección de antígeno o anticuerpo inmovilizado en una superficie portadora mediante la adición de un anticuerpo o antígeno enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como por ejemplo un cambio de color [16]. De hecho, la colorimetría sigue siendo hoy en día el método más empleado para estos ensayos debido a la posibilidad de evaluación visual, instrumentación sencilla y mayor estabilidad de los productos formados [17]. Los ensayos basados en ELISA se caracterizan por su elevada sensibilidad, detectabilidad y especificidad a un precio relativamente bajo y de forma rápida y sencilla.

Estos ensayos utilizan enzimas como marcadores, lo que incrementa su versatilidad, pudiéndose utilizar una gran variedad de sustratos y cromógenos. Además, gracias a su alto poder catalítico, los enzimas convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas que favorece una elevada sensibilidad y unos bajos límites de detección.

Los ensayos basados en ELISA, pueden ser de tipo competitivo (sándwich) y no competitivo. En los ensayos tipo sándwich utilizados en el presente trabajo hay un primer anticuerpo de captura que se une al antígeno de la muestra y al anti-anticuerpo anclado al soporte. El antígeno anclado es detectado por el conjugado

anticuerpo-enzima y, tras la adición de sustrato, la enzima formará un producto coloreado (Fig. 6). La señal es por tanto proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

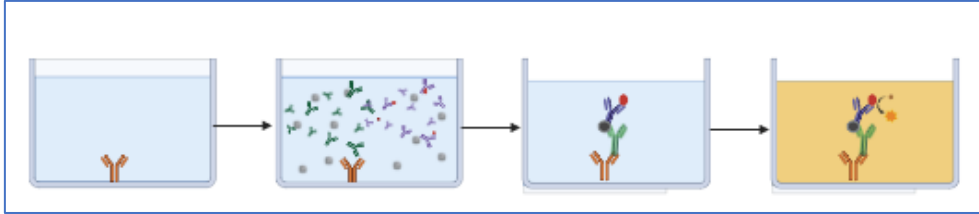


Figura 6. Esquema del ensayo ELISA tipo sándwich con detección colorimétrica.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el ensayo tipo sándwich es rápido debido a que es posible añadir simultáneamente las muestras y los anticuerpos, aunque puede haber interferencias del conjugado a elevadas concentraciones de antígeno o anticuerpo en la muestra [17].

Una vez incubado los anticuerpos con la muestra, debe añadirse un sustrato que dará el cambio de color proporcional a la concentración de analito en la muestra. Uno de los sustratos más utilizados debido a su bajo fondo es la tetrametilbencidina (TMB) [18], que se reduce mediante una peroxidasa, como muestra la Fig.7.

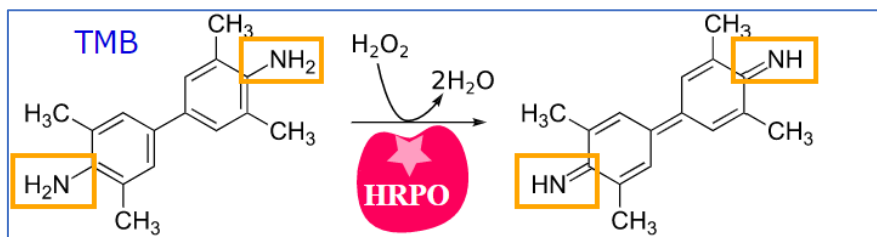


Figura 7. Reducción de TMB por la enzima peroxidasa

## **2. Objetivos**

---

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster ha sido el estudio del perfil proteico, tanto de suero como de exudado nasal, para el diagnóstico diferencial del ictus. Concretamente, y a partir de muestras recogidas de pacientes diagnosticados con ictus hemorrágico e isquémico se persiguió la búsqueda de diferencias cualitativas o cuantitativas entre ambos.

Para abordar dicho objetivo, inicialmente se pondrá a punto un método SEC-HPLC para la separación de proteínas, empleando un sistema de detección UV-VIS.

A continuación, se analizarán y compararán los perfiles proteicos de cobre, hierro y zinc mediante HPLC-ICP-MS en ambas patologías. Además, se intentará llevar a cabo análisis cuantitativo (para Fe y Cu) mediante dilución isotópica post-columna.

Por otro lado y dado que se pretende buscar diferencias cuantitativas entre ambos tipos de ictus, se realizaron ensayos ELISA para lactoferrina y transferrina, tanto en suero como en exudado nasal. En ambos casos, los resultados cuantitativos para dichas proteínas fueron normalizados con el valor de proteína total.



# **3.Procedimiento experimental**

---

### 3.1 Materiales y reactivos

La balanza analítica utilizada durante el trabajo experimental fue el modelo Mettler ME 104. El sistema de suministro de agua ultrapura fue el de ELGA LabWater PureLab Flex, y el medidor de pH fue el modelo Mettler Toledo FiveEasy. La estufa para controlar la temperatura fue de la casa Memmert,

Para la inyección de muestra en el cromatógrafo se empleó una jeringa Hamilton de 100  $\mu$ L. Previa inyección en el ICP-MS todas las muestras se pasaron a través de filtros de jeringa Olim Peak de 0,45  $\mu$ m. Para esta operación las muestras fueron manipuladas empleando una jeringa Braun Injekt de capacidad 5 mL.

En cuanto a reactivos se utilizaron los siguientes:

Para la preparación de la fase móvil para la separación cromatográfica, Tris 0,01 M a pH = 7, se empleó tris(hidroximetil) aminometano (TRIS) de la marca comercial J.T. Baker Avantor y ácido clorhídrico (37%, Labkem).

Las proteínas patrón fueron de la casa comercial Sigma-Aldrich: A diferencia de la transferrina, la albumina de suero bovino (BSA), la tiroglobulina y la lactoglobulina que se encontraban en estado sólido, la ferritina venía en disolución con una concentración de 125 mg/mL.

Por último, para la preparación de la disolución amortiguadora de fosfato salino (PBS), utilizada para la determinación de proteína tal, se necesitó NaCl (Scharlau), KCl (Scharlau),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Acros Organics) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich).

Para la determinación de lactoferrina y transferrina, se utilizaron kits comerciales ELISA de Abcam (ab288174 para la transferrina y ab200015 para el de lactoferrina) y para el ensayo de cuantificación de BCA un kit de Sigma-Aldrich.

### 3.2 Muestras

Se contó con muestras de exudado nasal y suero extraído de 9 pacientes diagnosticados con ictus isquémico (4) e ictus hemorrágico (4), todas ellas tomadas por la Dra. Carmen García Cabo neuróloga del Hospital Universitario

Central de Asturias (HUCA). Las muestras se conservaron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en el caso del exudado nasal se congeló el hisopo usado para la extracción de la muestra. A lo largo de este trabajo se referirá a las muestras por el número de paciente y el tipo de ictus, de forma que el paciente número 1 está asociado a un suero (SH1) y un exudado (EH1). En total las muestras de pacientes con ictus hemorrágico serán: SH1, SH2, SH3, SH4, EH1, EH2, EH3, EH4, EH5, y las muestras de pacientes que sufrieron un ictus isquémico: SI6, SI7, SI8, SI9, EI6, EI7, EI8.

Adicionalmente, se disponía de un suero control (donante voluntario) y exudado control (sin patología), en este caso, una muestra propia con un hisopo Nest que se congeló de la misma manera que las muestras aportadas por el HUCA.

### 3.3 Instrumentación

La columna SEC utilizada para la separación cromatográfica fue la Superdex 200 10/300GL, cuyas características comerciales se encuentran recogidas en la Tabla 1:

*Tabla 1. Características columna SEC Superdex 200 10/300GL*

Matriz	Agarosa-dextrano
Presión máxima	30 bar
Dimensiones (LxDi)	30 cm x 10 mm
Tamaño medio de poro	13 $\mu\text{m}$
Lecho Volumen	24 mL
Rango pH	3-12

La introducción de muestra en el sistema cromatográfico se realizó con la ayuda de una válvula de seis vías Rheodyne y un bucle de inyección de 20  $\mu\text{L}$ . Las conexiones de la válvula eran: 1 y 4 para el bucle, 5 y 6 para el desecho, 3 entrada de la fase móvil y 2 salida hacia la columna.

Para la optimización de la separación cromatográfica se utilizó el equipo Perkin-Elmer Flexar con sistema de detección UV-VIS. Para el montaje se utilizó una

conexión en “T” para facilitar el acople de la columna a la válvula y al sistema de detección (Fig.8).



Figura 8. Montaje experimental equipo HPLC Perkin Elmer

Los análisis mediante ICP-MS se realizaron en un equipo Agilent 7900 de tipo cuadrupolo provisto de una celda de colisión/reacción. Para los análisis HPLC-ICP-MS, el ICP-MS se acopló a un sistema HPLC de Thermo Scientific Funnigan Surveyor. Además, a la salida de la bomba, y antes de la columna SEC, se incorporó una pre-columna recubierta con la resina Chelex 100 para la reducción de los niveles de fondo (fundamentalmente Fe) de la fase móvil. La pre-columna se conectó a la bomba peristáltica a través de la conexión de entrada de la fase móvil.

Para las medidas con por dilución isotópica, se incorporó con una conexión en T a la salida de la columna SEC, para la introducción de la disolución trazadora con la ayuda de una bomba peristáltica Gilson Miniplus 3. Todo el montaje realizado se ve reflejado en la Fig. 9, en la parte izquierda el montaje esencial y a la derecha la conexión a la bomba peristáltica para IDA.

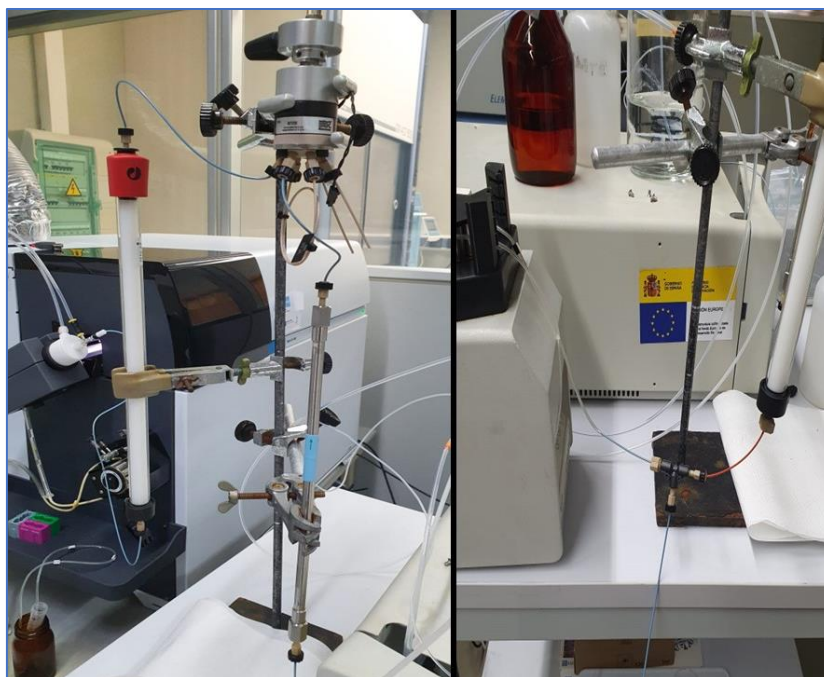


Figura 9. Montaje experimental HPLC-ICP-MS

Por último, para la medición colorimétrica de los ELISA se utilizó un lector de placas de la casa comercial Biotek.

### 3.4 Preparación de muestras

Las muestras se descongelaron en hielo el mismo día de su análisis.

Para las muestras de exudado nasal, una vez descongelado el hisopo, se extrajo su contenido en 300  $\mu$ L de TRIS-HCl 0,01M (pH=7).

Tanto el suero como el exudado nasal fueron pasados a través de un filtro de jeringa de 0,45  $\mu$ m para eliminar partículas que puedan obstruir la columna cromatográfica.

### 3.5 Metodología HPLC-ICP-MS

#### 3.5.1 Preparación de disoluciones

Como fase móvil, tras revisar la bibliografía [19]–[23], se utilizó TRIS-HCl 0,01 M a pH 7. Para su preparación se pesaron 1,2114 g de TRIS y se llevó a 1 L con agua ultrapura, ajustando el pH con ácido clorhídrico.

Para la preparación de los patrones individuales de proteínas, se preparó una primera disolución *stock* de 10 mg/mL de cada proteína para posteriormente preparar disoluciones individuales de proteínas con concentración 1 mg/mL, utilizando en todos los casos TRIS-HCl (fase móvil) como disolvente. Todos los patrones se pasaron por un filtro de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  antes de su inyección en el HPLC. Además, se preparó una mezcla de patrones de proteína de concentración 1 mg/mL, de la misma forma que los patrones individuales, para optimizar las condiciones de separación (flujo de fase móvil).

Para la disolución trazadora se partió de unas disoluciones ya preparadas de 10,9378 ppm de  $^{54}\text{Fe}$  y 9,6425 ppm de  $^{65}\text{Cu}$ . A partir de estas se preparó una disolución *stock* de 1 ppm para  $^{54}\text{Fe}$  y de 0,5 ppm para  $^{65}\text{Cu}$ .

La concentración optimizada fue de 5 ppb para ambos isótopos. Para ello, se pipeteó 250  $\mu\text{L}$  de la disolución *stock*  $^{54}\text{Fe}$  y 500  $\mu\text{L}$   $^{65}\text{Cu}$ , y se llevó a un volumen final de 50 mL con agua ultrapura.

Para la disolución de abundancia isotópica natural empleada para calcular el factor K, se partió de disoluciones patrón de 1000 ppm de Cu y Fe. A partir de ellas, usando ácido nítrico, se realizaron dos disoluciones madre de 2 ppm para el hierro y 1 ppm para el cobre. La disolución final se preparó con 50  $\mu\text{L}$  de cada disolución madre y 4900  $\mu\text{L}$  de ácido nítrico consiguiendo de esta forma una concentración de 10 ppb de Cu y 20 ppb de Fe.

#### 3.5.2 Condiciones experimentales HPLC

Para el montaje de ambos equipos utilizados se intentó mantener la posición vertical de la columna, esto es importante por dos motivos. Primeramente, para controlar la presión facilitando por gravedad la elución y por lo tanto disminuyéndola y, por otra parte, para aumentar la durabilidad de la columna disminuyendo su desgaste al usar menor presión.

Se purgó el sistema HPLC antes de cada uso y tras cada cambio de la fase móvil para evitar la entrada de burbujas en la columna, aumentando la presión indeseablemente.

Cada día de medida se acondicionó la columna con la fase móvil, aumentando el flujo de manera gradual para evitar sobrepresiones hasta el flujo óptimo de 0,6 mL/min.

La presión es un parámetro crítico para la vida útil de la columna, por lo que se controló en todo momento. El rango de presiones con las que se trabajó fue desde 12 hasta 16 bar.

### 3.5.3 Condiciones experimentales en el ICP-MS

Cada día de medida se comenzó pasando una disolución de ácido nítrico 2% para limpiar el equipo. Seguidamente se introdujo el método con los parámetros optimizados (Tabla 2) y se realizó un *tunning*.

Tabla 2. Parámetros instrumentales ICP-MS

<b>Flujos</b>	
Flujo de gas nebulizador	1,21 L/min
Flujo de gas auxiliar	0,9 L/min
Flujo gas plasma	15 L/min
<b>Lentes</b>	
<i>Cell entrance</i>	-40 V
<i>Cell exit</i>	-60 V
<i>Plate bias</i>	-45 V
<b>Celda de colisión</b>	
<i>Octa P Bias</i>	-18 V
Flujo gas (H <sub>2</sub> )	4 mL/min

En el informe diario se comprobó la sensibilidad y el poder de resolución de masas del equipo midiendo las masas 7 (litio), 89 (itrio) y 205 (talio) que cubren todo el rango de masas inorgánico, y comparándolas con informes anteriores. Además, se comprobó la eficacia de la ionización y el correcto posicionamiento

de la antorcha midiendo la relación de óxidos 156/140 (óxido de cerio/cerio) y la relación de dobles cargados 70/140 ( $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^{+}$ ); ambos deben ser menor de un 3% para poder comenzar las medidas. La celda de colisión, como ya se ha descrito anteriormente, sirve para eliminar interferencias poliatómicas, las más importantes son las formadas por la colisión con el gas auxiliar (Ar) como  $\text{ArO}^{+}$  interfiriendo con  $^{56}\text{Fe}$ ,  $\text{ArNa}^{+}$  para el caso del  $^{63}\text{Cu}$ , o  $\text{ArN}^{+}$  para el  $^{54}\text{Fe}$  entre otros.

#### 3.5.4 Protocolo seguido antes del análisis

Cada día, antes de analizar las muestras, se inyectó por duplicado TRIS comprobando de esta forma que la columna estuviese bien limpia y los fondos eran buenos para el análisis.

Seguidamente se inyectó el suero control. De esta forma, se comparó el perfil proteico obtenido, con los realizados anteriormente a fin de asegurar que el equipo estaba en perfectas condiciones para analizar las muestras.

Al finalizar los análisis, se limpió la columna con agua ultrapura.

### 3.6 Ensayo ELISA para transferrina y lactoferrina

#### 3.6.1. Preparación de disoluciones

En primer lugar, se prepararon los patrones indicados (Tablas 3 y 4) para la recta de calibrado por dilución seriada. Tanto la lactoferrina como la transferrina patrón venían en el kit liofilizadas. Antes de su uso se reconstituyeron con 500  $\mu\text{L}$  del diluyente de muestra.

Para el patrón más concentrado en el ensayo de lactoferrina se utilizó 358,3  $\mu\text{L}$  de la proteína patrón reconstituida y se diluyó con 150  $\mu\text{L}$  del diluyente de muestra (punto del calibrado 1). Para el ensayo de transferrina se diluyeron 10  $\mu\text{L}$  de la proteína reconstituida en 390  $\mu\text{L}$  del diluyente.

Los demás puntos del calibrado se realizaron mediante dilución seriada utilizando 150  $\mu\text{L}$  de la disolución patrón anterior y otros 150  $\mu\text{L}$  del diluyente de muestra.



Tabla 3. Patrones calibrado ensayo ELISA transferrina

Patrón	0	1	2	3	4	5	6	7
[transferrina] pg/mL	N/A	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63

Tabla 4.. Patrones calibrado ensayo ELISA lactoferrina

Patrón	0	1	2	3	4	5	6	7
[lactoferrina] pg/mL	N/A	10000	5000	2500	1250	625	312,5	156,3

Por otro lado, se prepararon diluciones para las muestras de exudado nasal y suero que entrasen en la recta de calibrado. La Tabla 5 recoge todas las disoluciones intermedias preparadas para llegar a la disolución final con la que se realizó el ELISA. En todos los casos se utilizó TRIS-HCl (pH=7) y se partió de la intermedia anterior.

Tabla 5. Disoluciones intermedias realizadas en los ensayos ELISA

Suero intermedio	Dilución	Exudado intermedio	Dilución
SI <sub>1</sub>	1:20	EI <sub>1</sub>	1:20
SI <sub>2</sub>	1:1333	EI <sub>2</sub>	1:1000
SI <sub>3</sub>	1:89474	EI <sub>3</sub>	1:66667

Para la cuantificación de lactoferrina se prepararon diluciones de las muestras de suero 1:1000. Para ello, se usó para su preparación 15 µL de disolución intermedia SI<sub>1</sub> y 735 µL de diluyente de muestra. Para el caso del exudado, las muestras se diluyeron 1:10000 necesitando para ello 15 µL de EI<sub>2</sub> y 135 µL de diluyente.

Para el caso de la transferrina, al tratarse de una proteína abundante tuvo que diluirse en mayor proporción para entrar en el calibrado realizado. Las diluciones optimizadas fueron de 1:3400000 tanto para el suero como para el exudado. Para llegar a esta dilución se realizó se utilizaron 10µL de EI<sub>3</sub> y SI<sub>3</sub> y llevándolo a 510 µL en el caso del exudado y 380 µL en el caso del suero, con diluyente de muestra del kit comercial.

La mezcla de anticuerpos se preparó calculando previamente la cantidad necesaria para todas las muestras. En el caso de la lactoferrina se necesitaron 1300  $\mu\text{L}$  (26 pocillos: 8 patrones + 18 muestras) y para la transferrina 1600  $\mu\text{L}$  (32 pocillos: 8 patrones + 22 muestras) ya que se prepararon los controles por triplicado. Siguiendo el protocolo del kit comercial, se preparó en una dilución 1:10 de ambos anticuerpos usando como diluyente una disolución *stock* procedente del kit.

La disolución de lavado, al igual que en el caso anterior, se preparó calculando la cantidad necesaria siguiendo las instrucciones del kit. En el caso de la lactoferrina se preparó 28 mL añadiendo 2,8 mL de la disolución de lavado *stock* a 25,2 mL de agua ultrapura. Para la transferrina se necesitaron 32 mL para los que se usó 3,2 mL de disolución de lavado *stock* y 28,8 mL de agua ultrapura.

#### 3.6.2. Protocolo experimental

Durante la preparación del ensayo ELISA y al tratarse de proteínas, se conservaron todos los reactivos, patrones y muestras en hielo a fin de evitar su degradación.

Sobre el propio hielo se añadió en los pocillos de reacción 50  $\mu\text{L}$  de las diluciones muestra o patrón y 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de anticuerpos preparada con anterioridad. Se agitó manualmente y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente sellando los pocillos con un adhesivo de protección.

Tras la hora de incubación, se realizaron tres lavados para eliminar interferentes con la disolución de lavado preparada previamente.

Seguidamente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del sustrato TMB y se incubó durante 10 minutos en la oscuridad, cubriendo los pocillos para ello con papel de aluminio. Por último, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de parada y se midió en el lector de placas a una longitud de onda de 450 nm.

### 3.7 Cuantificación de BCA para la determinación de proteína total

El método BCA combina la reducción del  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  en medio alcalino (método de Biuret) con la detección selectiva del catión  $\text{Cu}^{+1}$  utilizando el ácido

bicinconínico. El producto de la reacción tiene un color púrpura formado por el complejo de BCA con un ion  $\text{Cu}^{+1}$ .

Al igual que para los ensayos previos, se conservaron todos los reactivos, patrones y muestras en hielo.

Para todas las diluciones se utilizó PBS (disolución amortiguadora de fosfato salino). Para preparar el PBS se partió de una disolución *stock* 10x utilizando 40 g de NaCl, 1 g KCl, 7,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 1,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y que fueron llevados a 500 mL con agua ultrapura, comprobando su pH. De esta disolución se prepararon 50 mL de PBS 1x tomando 5 mL de la disolución *stock* y utilizando agua ultrapura.

Primeramente, se prepararon las disoluciones patrón para el calibrado. Para ello se utilizó la proteína patrón incorporada en el kit en una ampolla líquida de concentración 1 mg/mL. Se diluyó 1:10 para la preparación de los patrones, necesitando 300  $\mu\text{L}$  para realizar el ensayo completo, por lo que se utilizó 30  $\mu\text{L}$  de proteína original y se diluyó con 270  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura, teniéndose una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los patrones se prepararon tal y como muestra la Tabla 6.

Tabla 6. Patrones de calibrado ensayo proteína total

	Concentración (mg/mL)	Proteína BSA ( $\mu\text{L}$ )	PBS ( $\mu\text{L}$ )
0	0	0	125
1	0,5	1,25	123,75
2	1	2,5	122,5
3	5	12,5	112,5
4	10	25	100
5	20	50	75
6	30	75	50

A continuación, se prepararon las muestras a partir de las disoluciones intermedias preparadas para los ensayos de transferrina y lactoferrina.

Las muestras de suero se prepararon mediante la disolución intermedia  $S_2$  tomando 40  $\mu\text{L}$  y llevándolo a un volumen final de 880  $\mu\text{L}$  con PBS.

Para el exudado se partió de 85  $\mu\text{L}$  de la disolución intermedia  $E_1$  y se llevó a 881  $\mu\text{L}$  con disolución amortiguadora PBS.

Por último, se preparó la disolución *QuantiPro* comercial utilizando la mezcla de las disoluciones comerciales QA, QB y QC (sulfato de cobre pentahidratado). Se prepararon un total de 8 mL para el ensayo completo (3920  $\mu\text{L}$  QA, 3920  $\mu\text{L}$  QB y 160  $\mu\text{L}$  QC).

En los pocillos de reacción se echó un volumen equivalente de disolución *QuantiPro* y disolución muestra o patrón (125  $\mu\text{L}$ ). Se incubó durante 1 h a una temperatura de 60 °C y se midió la densidad óptica con ayuda de un lector de placa a una longitud de onda de 562 nm.

# 4.Resultados y discusión

---

#### 4.1. Optimización de las condiciones del HPLC

Inicialmente, se optimizaron las condiciones de la separación cromatográfica. En lugar de optimizar la cromatografía directamente en el equipo de HPLC acoplado al ICP-MS, al únicamente disponer en aquel momento de una sola metaloproteína con hierro, el estudio se realizó en un equipo de HPLC Perkin-Elmer con detección UV, empleando una mezcla de proteínas patrón.

La columna utilizada, mencionada con anterioridad (Superdex 200), tiene un rango de separación entre 10-600 kDa. Se eligió por tanto una mezcla de proteínas que cubriera dicho rango de las disponibles en el laboratorio: lactoglobulina (18 kDa), BSA (66 kDa), transferrina (80 kDa) y tiroglobulina (660 kDa).

Al tratarse de una columna de exclusión por tamaño, para mejorar la separación de picos únicamente se podría optimizar la temperatura, la selección de fase móvil incluyendo el pH de trabajo y la velocidad de flujo.

En nuestro caso, al tratarse de proteínas, es necesario que el pH esté próximo al punto isoeléctrico para que no se desnaturalice. Además, el equipo Perkin-Elmer usado para la optimización no cuenta con control de temperatura. Por ello, únicamente se optimizó el flujo, empleándose como fase móvil Tris 0,01 M a pH =7.

Para ello, tras la estabilización de la columna con la fase móvil, se ensayaron distintos flujos de la misma y se observaron los resultados en el cromatograma de la mezcla de patrones proteínas. Los flujos utilizados fueron: 0,25; 0,35; 0,45; 0,6 y 0,8 mL /min. Así mismo, se inyectaron los patrones de proteínas por separado, con el objetivo de identificar los picos mediante el tiempo de retención. El resultado se encuentra recogido en la Fig.10.

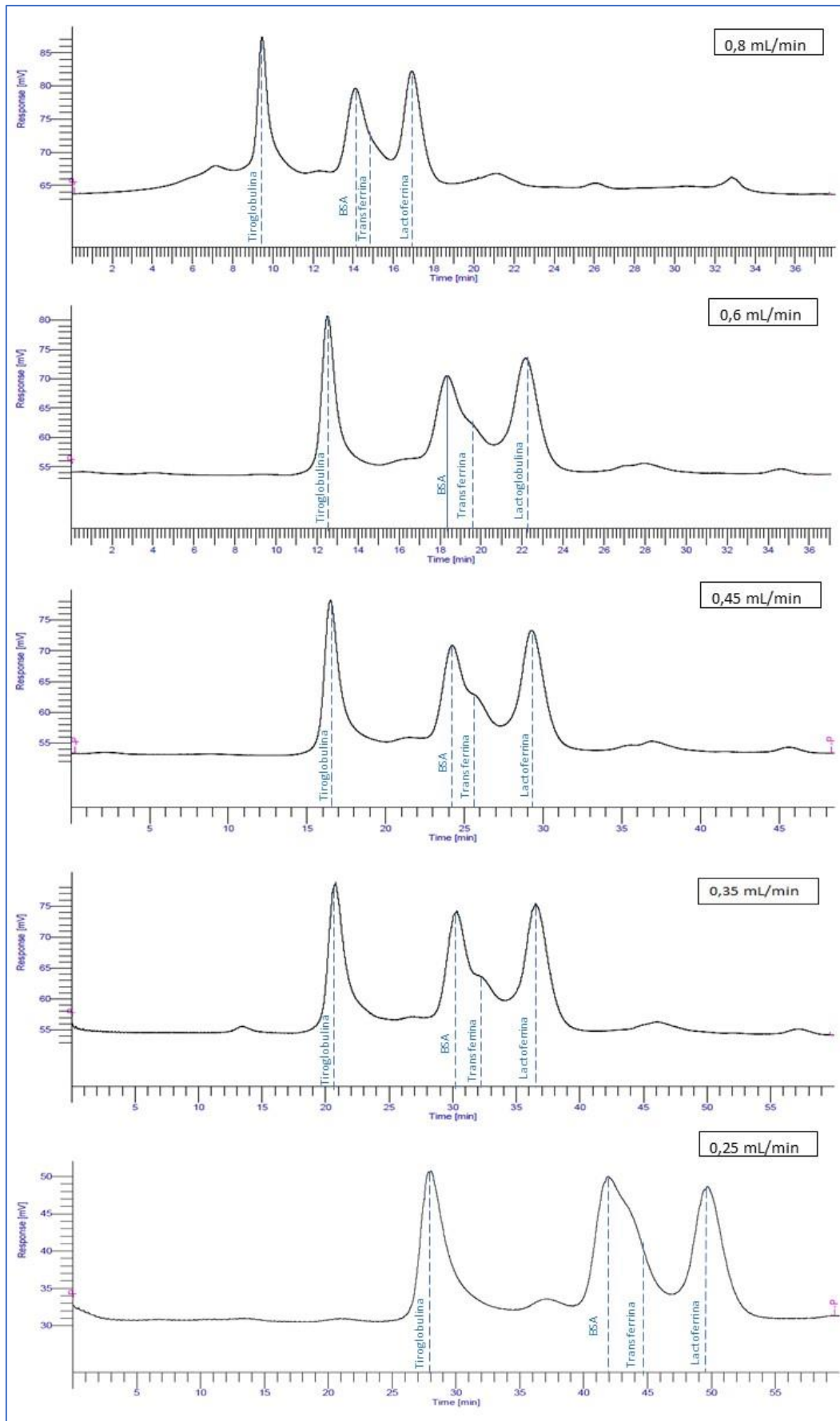


Figura 10. Cromatogramas obtenidos en la optimización a flujos de 0,8; 0,6; 0,45; 0,35 y 0,25 mL/min

Como se puede observar en la Fig. 10, independientemente del flujo empleado no es posible resolver los picos solapados identificados como BSA y transferrina. A la vista de los resultados obtenidos se decidió fijar un flujo de 0,6 mL/min, ya que de esta forma se obtiene un tiempo de análisis cromatográfico razonable. En base a esto, de las proteínas de hierro más importantes comentadas con anterioridad, transferrina (80 kDa), lactoferrina (78 kDa), y ferroportina (62,5 kDa), van a coeluir en una misma fracción, no pudiendo ser resueltas. Sin embargo, sí que se consigue una buena separación de la tiroglobulina, del grupo BSA-transferrina y lactoferrina.

## 4.2. Resultados experimentales con HPLC-ICP-MS

### 4.2.1 Optimización de las condiciones de medida

Antes de medir las muestras, se optimizaron las condiciones de medida con una mezcla de transferrina y ferritina (0,5 ppm de ferritina y 250 ppm de transferrina), midiendo los patrones por separado para poder identificar los picos obtenidos. Aunque en esta etapa se usaron proteínas con hierro únicamente, se midió tanto el cobre como el zinc ya que tanto para las muestras de suero como para el exudado nasal el objetivo es identificar el perfil proteico de moléculas que contengan dichos elementos. Por lo tanto, al optimizar las condiciones de medida, es importante que los fondos de todos los analitos sean correctos. Al tratarse de proteínas, además del cobre, el zinc y el hierro, se decidió medir el azufre ya que forma parte de muchos aminoácidos esenciales. Los isótopos que se midieron fueron:  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{54}\text{Fe}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  y  $^{64}\text{Zn}$ . Para las medidas experimentales se empleó hidrógeno en la celda de colisión. A continuación (Fig.11) se muestra el cromatograma obtenido tras la inyección de la mezcla ferritina y transferrina. Como velocidad de flujo se empleó la seleccionada en los experimentos HPLC-UV/VIS.



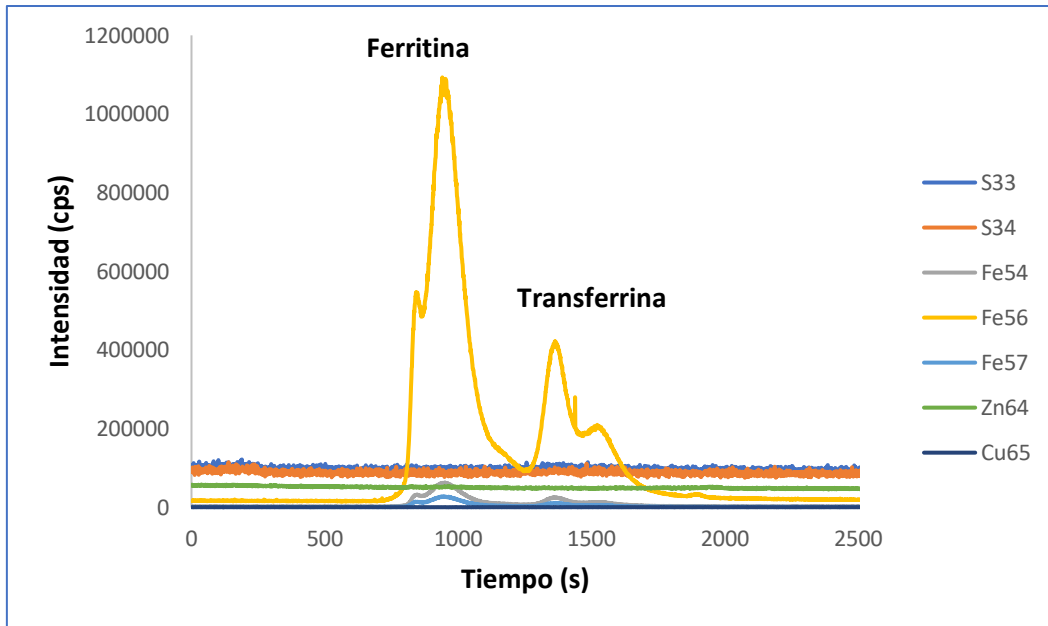


Figura 11. Cromatograma Ferritina 0,5 ppm + Transferrina 250 ppm mediante HPLC-ICP-MS

Tras comprobar los fondos y asegurar el correcto acoplamiento con el ICP-MS y siempre antes de inyectar muestras en el equipo, se comprobaron los fondos y la correcta limpieza de todo el sistema inyectando únicamente fase móvil (TRIS). Por último, se comprobó que las muestras se pueden inyectar sin producir una saturación del detector, se inyectó tanto una muestra de exudado nasal y suero control. (Fig.12).

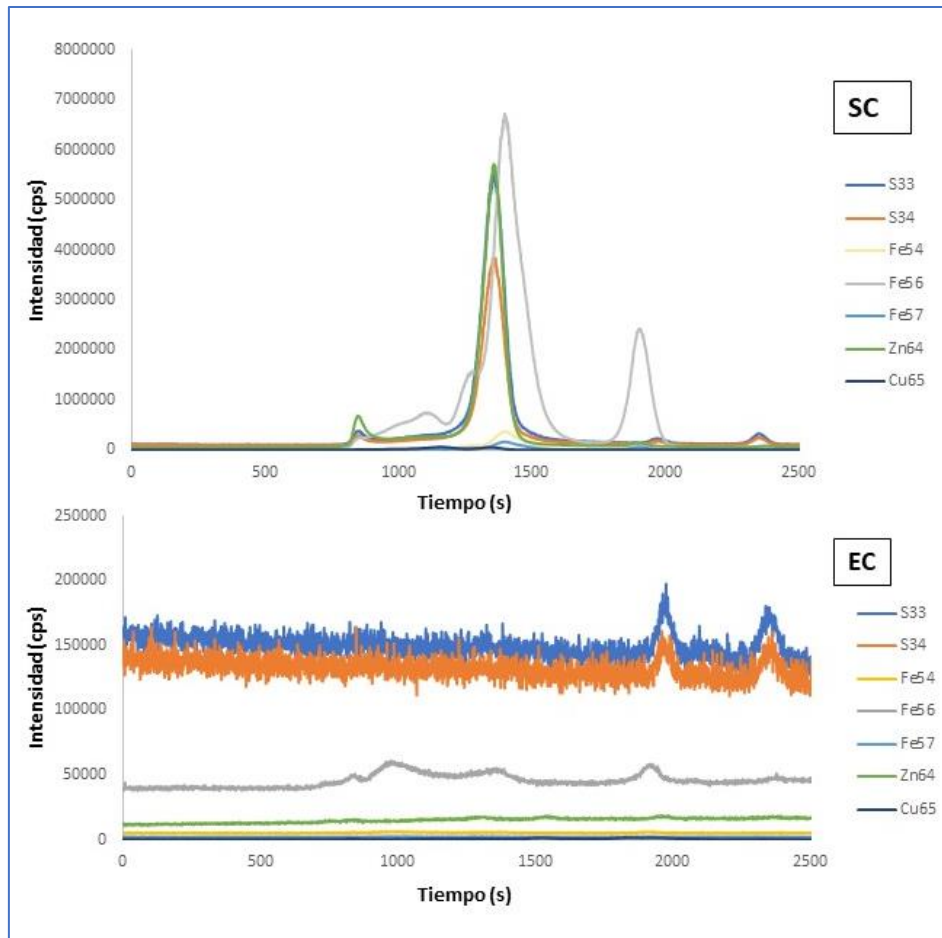


Figura 12. Muestra de exudado control (EC) y suero control (SC)

A diferencia del suero sanguíneo que no se diluye, sino que únicamente se filtra antes de inyectar en el HPLC-ICP-MS, para la extracción de la muestra de exudado nasal del hisopo se utilizó TRIS. Esto conlleva a una dilución de la muestra, de ahí que los cromatogramas obtenidos muestren una menor intensidad de picos (Fig.12).

Por un lado, el suero control con mayor intensidad, no se ve afectado por los fondos altos. Sin embargo, el exudado tiene mucha menos intensidad debido a la dilución, y aunque los picos se pueden identificar bien, podría verse interferida por los fondos de los que se parte.

Visto que para el suero se consiguen señales con intensidad suficiente (millones de cps) y teniendo en cuenta que la cantidad de muestra de exudado nasal disponible no permite más que una inyección, se decidió comenzar el ensayo

con los sueros y utilizar los exudados en etapas posteriores, en función de los resultados obtenidos en el suero.

#### 4.2.2 Análisis de las muestras de pacientes con ictus

Con el método de medida a punto, se procedió a inyectar dos muestras de suero isquémico y otras dos de suero hemorrágico. Previamente, y siguiendo el protocolo descrito en apartados anteriores, tras el montaje del HPLC-ICP-MS se inyectó primeramente por duplicado TRIS-HCl comprobando que la columna está limpia y seguidamente un suero control comprobando que se obtiene el mismo perfil que días anteriores.

Una vez asegurado que el equipo está listo para los análisis, se inyectó el suero hemorrágico *SH1* y *SH2*, y los sueros isquémicos *SI6* y *SI8*. A la vista de los perfiles de ambos grupos se muestran diferencias en los cromatogramas obtenidos para el Cu (Fig. 13): concretamente, se puede observar como el pico que aparece a un tiempo de retención de aproximadamente 900 s, la intensidad de señal obtenida en el caso de los pacientes isquémicos fue superior a la de los pacientes de tipo hemorrágico.

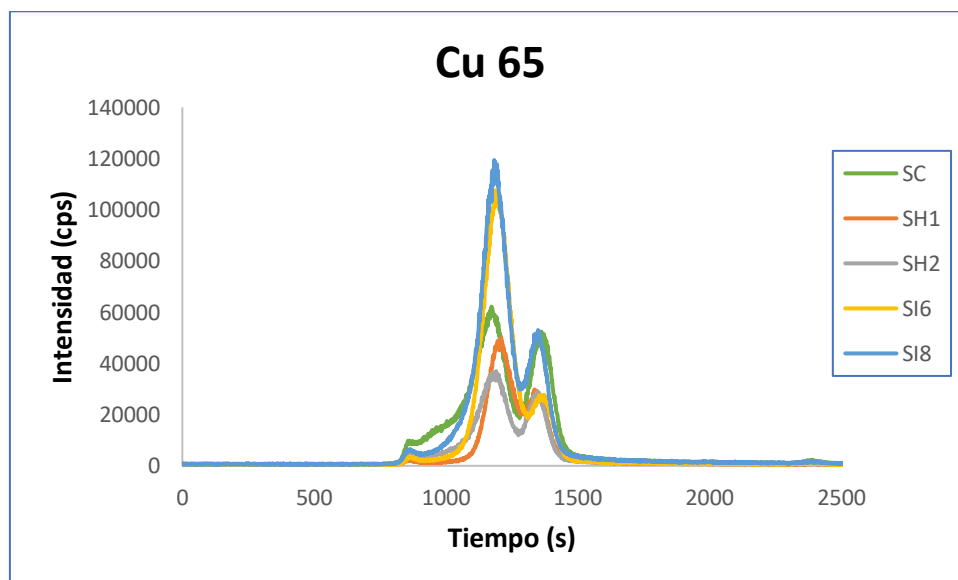


Figura 13. Cromatogramas superpuestos de  $^{65}\text{Cu}$  de las muestras SC, SH1, SH2, SI6 y SI8

Además, se encontraron las mismas diferencias entre ambos grupos para los isótopos de hierro en el pico con tiempo de retención aproximado de 1900 s (Fig.14).

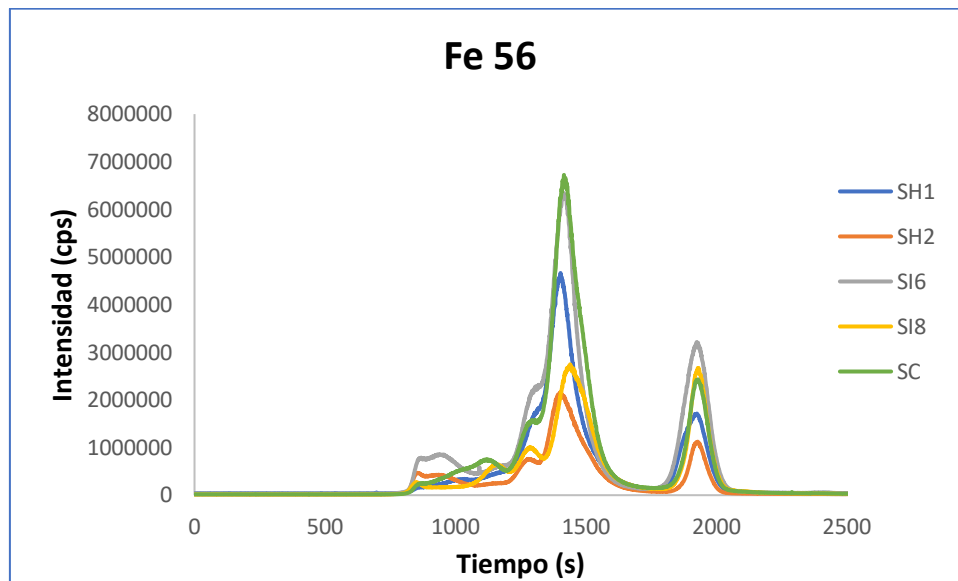


Figura 14. Cromatogramas superpuestos de  $^{56}\text{Fe}$  de las muestras SC, SH1, SH2, SI6 y SI8

No se encontraron diferencias en el zinc superponiendo de igual forma todas las muestras medidas. La comparación de zinc junto al resto de isótopos de hierro puede verse en el **Anexo I**.

Con estos resultados se decidió recurrir por un lado al método de normalización de áreas y por otro a la cuantificación por dilución isotópica (IDA) para los siguientes análisis, a fin de determinar si efectivamente se observan diferencias según el tipo de ictus, a las condiciones experimentales ensayadas.

#### 4.2.3 Optimización de las condiciones para IDA

Como punto de partida, se optimizó el flujo de la bomba peristáltica utilizada a la salida de la columna cromatográfica teniendo cuenta que el flujo máximo de entrada de disolución trazadora es 0,1 mL/min. La velocidad máxima que se pudo poner sin superar dicho límite fue la utilizada para la entrada de la disolución trazadora (Tabla 7) siendo el flujo de 0,0945 mL/min.

Tabla 7. Optimización flujo de la bomba peristáltica

Velocidad (rpm)	Flujo (mL/min)	Replica 2	Replica 3	Promedio
0,8	0,0406			
0,9	0,0584			
1,1	0,0710			
1,3	0,0952	0,0950	0,0932	0,0945
1,5	0,1180			

El siguiente paso fue la optimización de la concentración de la disolución *spike* o trazadora. Para ello y partiendo de una disolución trazadora inicial de 10 ppb  $^{54}\text{Fe}$  y 5 ppb  $^{65}\text{Cu}$ , se inyectó una primera vez con suero control. En función de la señal obtenida del trazador en comparación con el isótopo no enriquecido, se ensayaron otras concentraciones hasta conseguir señales comparables de isótopo natural y enriquecido. Se consideró oportuno que la señal del trazador ( $^{54}\text{Fe}$  y  $^{65}\text{Cu}$ ) quedara aproximadamente a un cuarto de la intensidad del pico de elución mayor (medido con el isótopo natural), de esta forma se seleccionó una concentración de *spike* de 5ppb para ambos isótopos.

Para análisis cuantitativo se empleó el isótopo natural de masa 57 del hierro, aunque también se comprobó el isótopo 56.

La señal obtenida con la disolución trazadora de 5 ppb para los isótopos seleccionados se muestran a continuación (Fig.15), tras la elución del suero control.

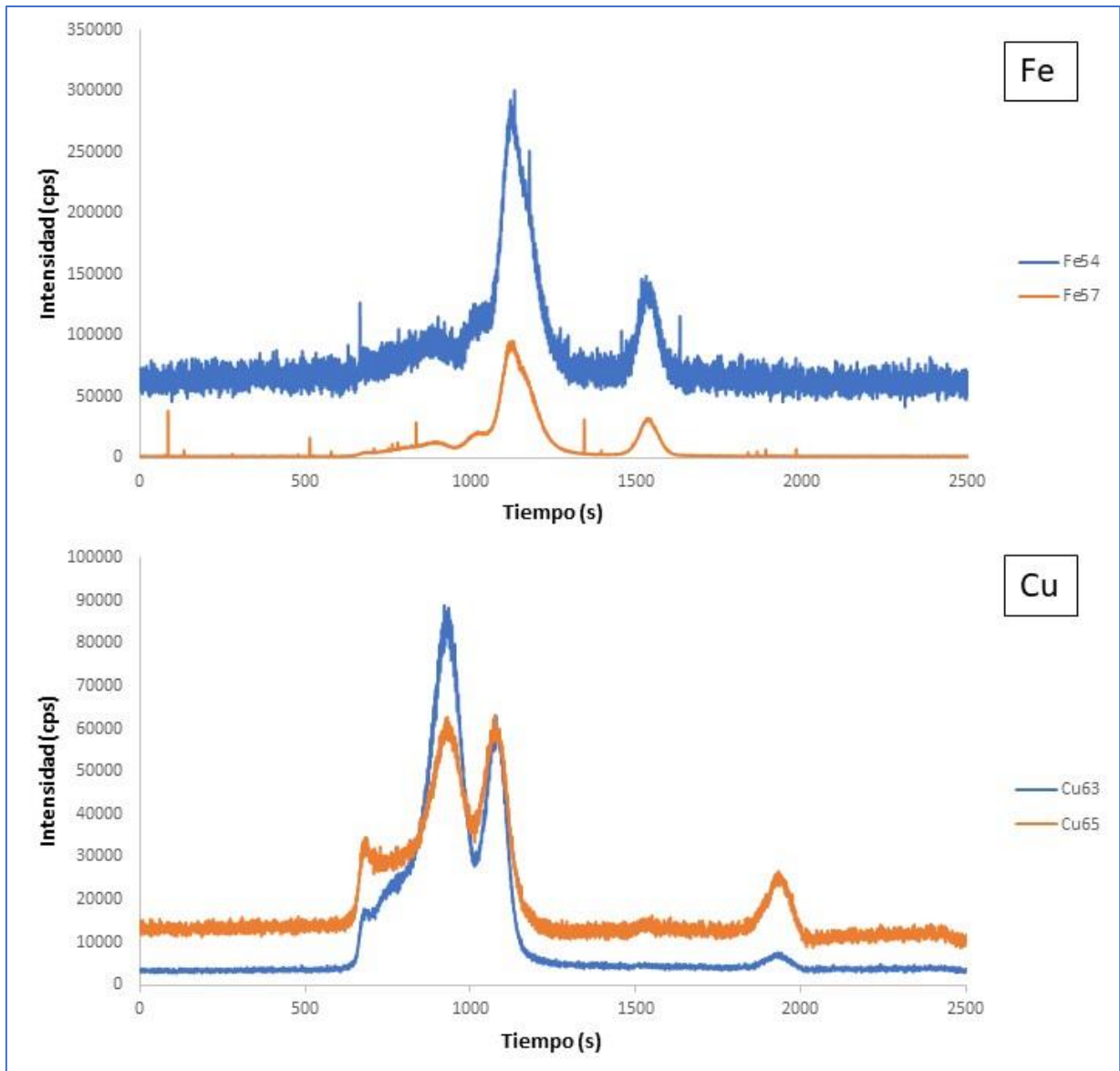


Figura 15. Optimización concentración de la disolución trazadora

#### 4.2.4 Medidas de muestras de pacientes con ictus mediante HPLC-ICP-MS y dilución isotópica post-columna

Utilizando IDA se analizaron dos sueros hemorrágicos (SH3 y SH4) y dos sueros isquémicos (SI7 y SI9). A diferencia de las medidas previas, se añadió el isótopo  $^{63}\text{Cu}$  como isótopo natural para IDA. Se utilizó la dilución trazadora optimizada, que mediante la bomba peristáltica se mezcló con las fracciones de muestra salientes de la columna cromatográfica antes de la entrada al ICP-MS.

Además de las medidas de la muestra, tal y como se comentó anteriormente, se midió una disolución preparada para calcular el factor de discriminación o factor

K. Dicha disolución consta de concentraciones conocidas de hierro y cobre natural, que en este caso fueron de 20 ppb para el hierro y 10 ppb para el cobre. El factor K se calcula como la pendiente de la recta resultante de representar el incremento de masa (Isotopo más abundante – isótopo<sub>i</sub>) frente al error de relaciones isotópicas ( $\ln(R_{\text{experimental}}/R_{\text{teórica}})$ ) (Tabla 8).

Tabla 8. Factor de discriminación para el hierro y el cobre

	Fe	Cu
Factor K	-0,0514	-0,0571

Con estos resultados se calcula la relación isotópica corregida y con ella el error relativo de las relaciones entre cada uno de los isótopos con el mayoritario. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la Tabla 9.

Tabla 9. Error de las relaciones isotópicas reales y experimentales tras la corrección

	Rcorregida	Error relativo	Er (%)
<b>Fe</b>			
54/56	0,104	0,625	62,51
56/56	1,000	0,000	0,00
57/56	0,040	0,711	71,05
58/56	0,005	0,481	48,06
<b>Cu</b>			
63/63	1,000	0,000	0,00
65/63	0,560	0,257	25,67

Desafortunadamente, los porcentajes de error obtenidos son muy altos para poder aplicar la dilución isotópica. Por tanto, no se puede determinar la concentración ya que habría mucha incertidumbre en la determinación. Esto puede deberse a que la celda de colisión no esté eliminando bien las interferencias espectrales existentes.

#### 4.2.5 Normalización de áreas

Como no se pudo determinar las concentraciones por IDA, se aprovecharon los cromatogramas obtenidos en los experimentos previos, incluyéndose todos los sueros de los que se dispone (SC, SH1, SH2, SH3, SH4, SI6, SI7, SI8, SI9).

En nuestro estudio, se normalizó el área de los picos con respecto al área total del perfil proteico para todos los isótopos medidos. De esta forma, es posible comparar todas las muestras de suero medidas, expresando los resultados en porcentaje de área de cada pico. Para esto, se sustrajo primeramente la línea base. En cada cromatograma de medida se determinó los intervalos de integración para los picos registrados en el cromatograma, y se integró además el área total donde se comprendían dichos picos.

Tomando como ejemplo el hierro, a continuación, se muestran los intervalos de integración para cada pico (1, 2 y 3) en una muestra de suero control, isquémico y hemorrágico (Fig.16).

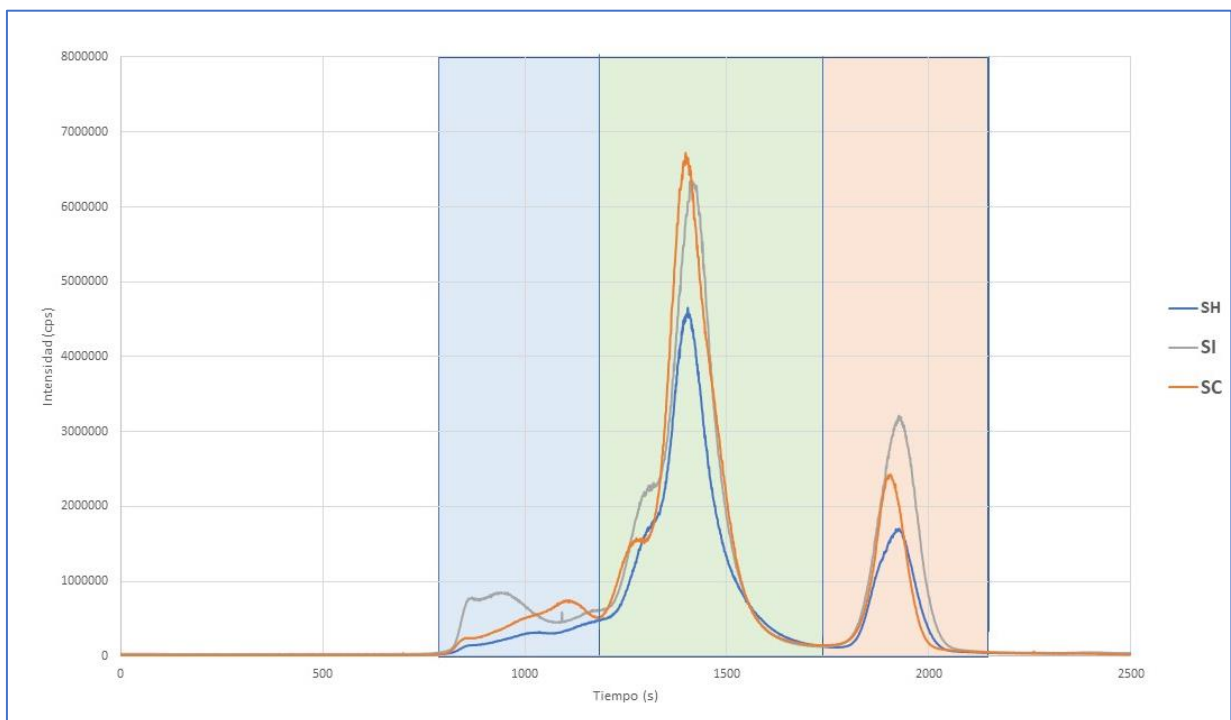


Figura 16. Modelo de integración para la normalización de áreas

Mediante el método de normalización de áreas se llevó a cabo utilizando el programa informático Origin. Tanto para el perfil proteico de hierro como de cobre, se observaron diferencias entre los grupos de pacientes con ictus



isquémico y hemorrágico (Tabla 10). En cambio, para el zinc no se encontró ningún indicio de diferencia en el perfil proteico con el tipo de ictus.

Tabla 10. Porcentaje de área de cada pico para el  $^{65}\text{Cu}$  y  $^{56}\text{Fe}$  para cada muestra

	Pico 1		Pico 2		Pico 3	
	% $^{65}\text{Cu}$	% $^{56}\text{Fe}$	% $^{65}\text{Cu}$	% $^{56}\text{Fe}$	% $^{65}\text{Cu}$	% $^{56}\text{Fe}$
SC	11,16	17,58	63,33	67,41	26,46	11,89
SC	7,87	19,67	84,40	62,65	41,72	17,54
SH1	9,45	9,38	71,47	69,48	19,20	18,52
SH2	4,61	13,40	63,71	68,70	27,56	15,62
SH3	8,01	11,72	67,97	71,56	17,17	15,53
SH4	11,00	19,92	62,03	71,20	21,17	9,29
SI6	1,49	13,88	76,89	61,95	17,35	23,63
SI7	9,82	24,70	73,64	66,44	18,80	8,30
SI8	2,89	12,75	68,72	57,81	21,41	27,57
SI9	9,63	15,43	70,47	67,47	16,54	16,13

Como se puede observar, para ambos elementos en el pico 2 hay un mayor porcentaje de áreas para el grupo de ictus isquémico que para los de ictus hemorrágico. Esto concuerda con las diferencias que se veían en el cromatograma inicial del cobre (Fig.13) para dos muestras de cada tipo de accidente cerebrovascular.

La Tabla 10 muestra el isótopo de hierro 56 como ejemplo, pero los tres isótopos medidos (54, 57 y 56) se obtuvo el mismo resultado. Los resultados obtenidos de la integración de todos los isótopos medidos se encuentran recogidos en el **Anexo II**.

### 4.3. Ensayo ELISA tipo sándwich con detección colorimétrica

Se realizaron ensayos cuantitativos ELISA para dos metaloproteínas de hierro como son la lactoferrina (80 kDa) y la transferrina (79,6 kDa). Debido a su similitud de peso molecular, estas proteínas no pudieron ser separadas por la columna cromatográfica utilizada. Como los resultados obtenidos en el ICP-MS sugieren una diferencia entre sueros isquémicos y hemorrágicos en esta fracción de peso molecular, se cuantificó dichas proteínas con kits comerciales ELISA para estudiar alteraciones en sus niveles con el tipo de ictus.

Para estos ensayos, se analizaron todas las muestras disponibles, tanto de suero (SC, SH1, SH2, SH3, SH4, SI6, SI7, SI8, SI9) como de exudado nasal (EC, EH1, EH2, EH3, EH4, EH5, EI6, EI7, EI8).

#### 4.3.1. Optimización de la dilución de muestra

Tanto para la transferrina como para la lactoferrina, se llevó a cabo el mismo tipo de ensayo ELISA. Primeramente, se realizó una prueba con el objetivo de optimizar la dilución de las muestras tanto de exudado nasal como de suero comprobando que caen dentro de la recta de calibrada propuesta por la casa comercial (0-10000 pg/mL). Para ello, se partió de datos de referencia bibliográficos para ambas proteínas en suero: transferrina  $3,4 \times 10^{-9}$  pg/mL [24] y lactoferrina 2000-7000 ng/mL [25].

Para el ensayo inicial se utilizaron tres puntos del calibrado, el más alto (7), el más bajo (1) y uno medio (4), además del punto 0 (véase Tabla 1); y se evaluaron dos diluciones del suero control. Al no tener datos de referencia para el exudado nasal, se probaron las mismas diluciones que con el suero.

Para el caso de la lactoferrina, se probaron dos disoluciones finales de 1:700 y 1:1000. Para el suero ambas entraron dentro del calibrado, sin embargo, en el caso del exudado ambas diluciones saturaban la señal del detector. Con estos resultados, las diluciones elegidas como óptimas para la parte experimental fueron de 1:1000 para el suero y 1:10000 para el exudado.

Para la transferrina, se probaron dos diluciones al igual que en el ensayo anterior; concretamente 1:3400000 y 1:4857100. Tras la experiencia del ensayo previo se utilizaron para el exudado nasal diluciones de 1:3400000 y 1:34000000. En estas condiciones, todas las disoluciones preparadas entraron en la recta de calibrado, por lo que se eligieron los puntos que caían en la parte central del calibrado y así evitar que alguna muestra pudiera salirse en los experimentos con las muestras reales. Estas fueron para ambos tipos de muestra las diluciones 1:3400000.

Para el estudio de optimización se utilizaron distintas disoluciones intermedias necesarias para unos volúmenes de dilución razonables detalladas en el apartado anterior (Véase 3.4.1).

En conclusión, las diluciones finales seleccionadas que se usarán para los ensayos con muestras reales fueron: 1:1000 para la lactoferrina en suero,

1:100000 para la lactoferrina en exudado y 1:3400000 para los ensayos de transferrina.

#### 4.3.2 Detección cuantitativa de las muestras de pacientes de ictus

Siguiendo el protocolo descrito previamente, y utilizando las diluciones optimizadas, se llevaron a cabo ensayos con ambos kits ELISA obteniendo las rectas de calibrado que se muestran en la Fig.17, obteniéndose coeficientes de determinación de 0,9986 para la transferrina y 0,9980 para la lactoferrina.

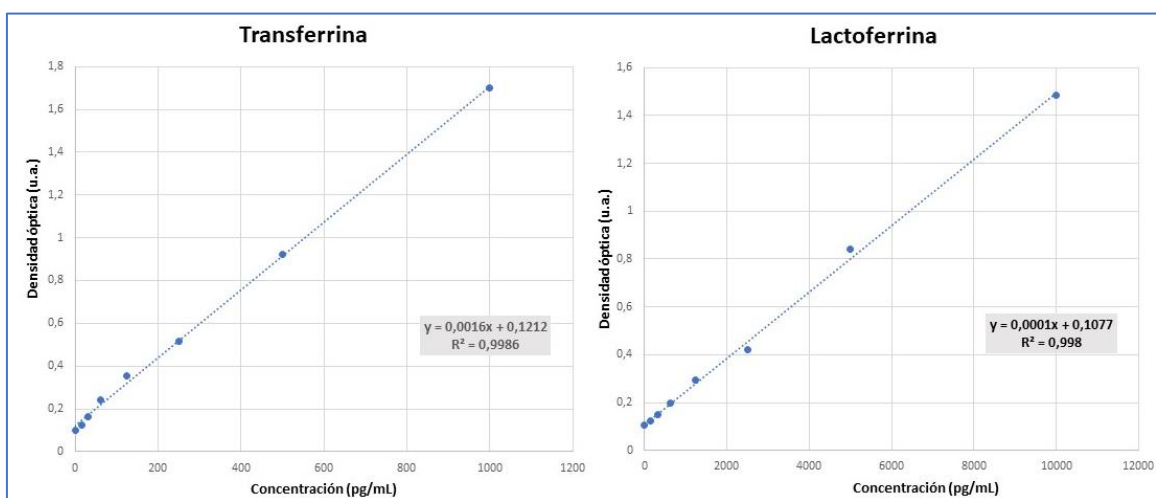


Figura 17. Rectas de calibrado de los ensayos ELISA de transferrina y lactoferrina

Adicionalmente, se realizó el ensayo de proteína total BCA para normalizar las concentraciones de proteína obtenidas, siguiendo el protocolo descrito previamente. El coeficiente de correlación lineal conseguido para este ensayo fue algo inferior que para los ensayos previos (0,9971), pero aun consiguiéndose una buena linealidad (Fig.18)

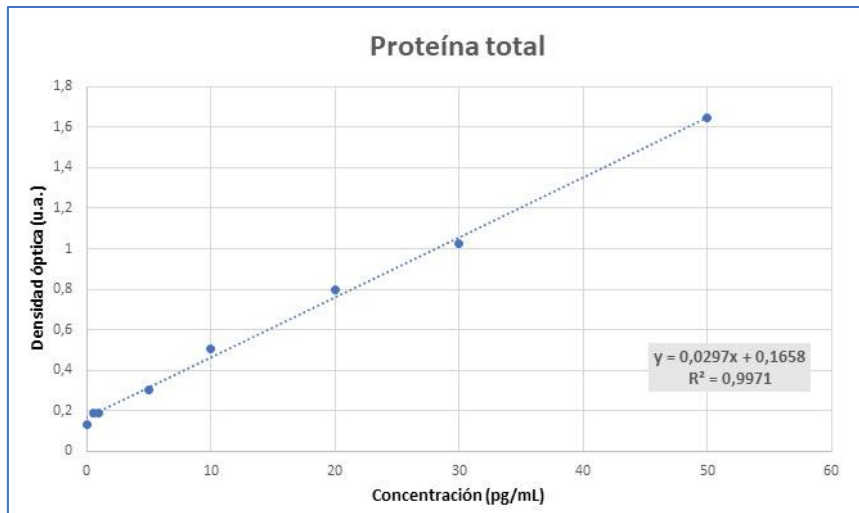


Figura 18. Recta de calibrado de la proteína total

Con los datos de la proteína total para todas las muestras de suero y exudado, se normalizó los resultados de transferrina y lactoferrina. Los resultados obtenidos tras la normalización con BCA se muestran en la Figura 19.

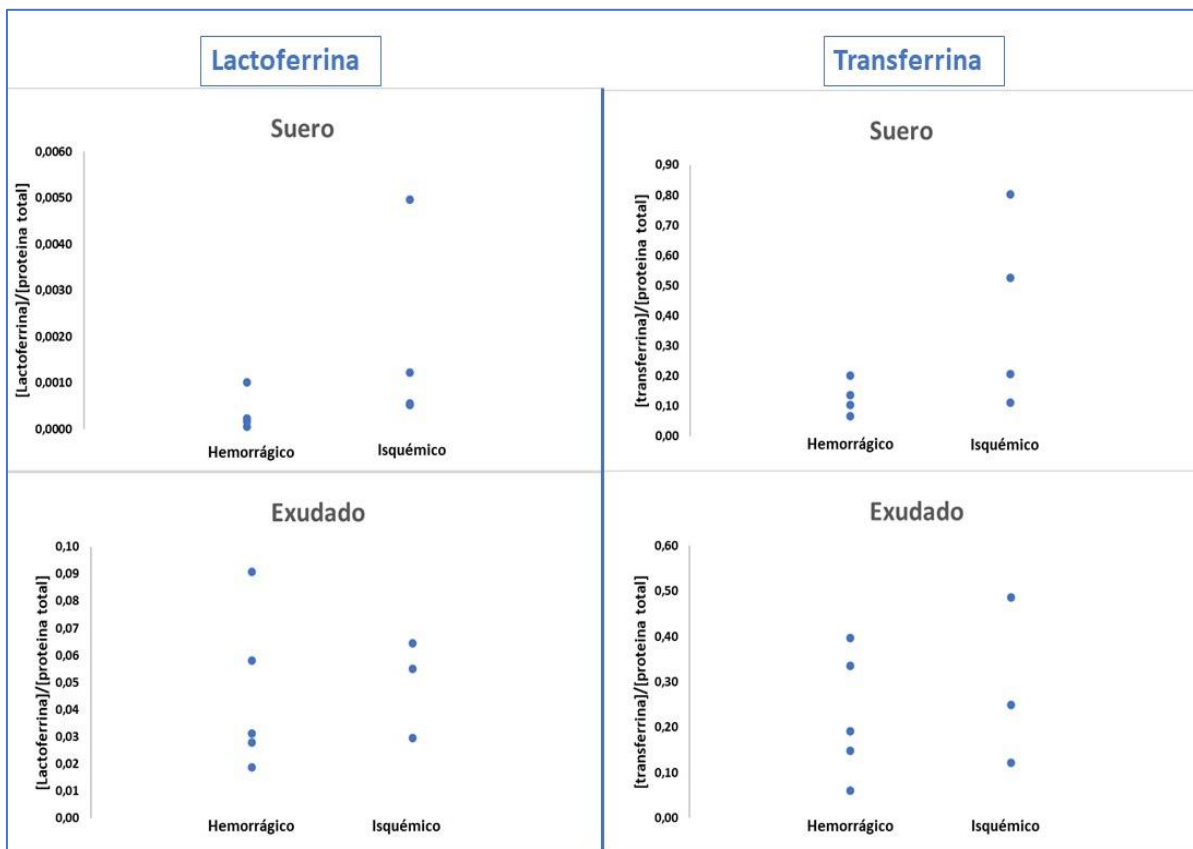


Figura 19. Representación gráfica de los resultados ELISA normalizado con proteína total

Los resultados, tanto para transferrina como para lactoferrina en suero y exudado nasal, muestran una tendencia a concentraciones mayores de proteína para las muestras de pacientes con ictus de tipo isquémico. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el ICP-MS para el Fe. No se realizó análisis estadístico de los resultados por ser la población muy limitada: de n=4 para sueros, n=5 para exudados hemorrágicos y n=3 para exudados isquémicos.

# 5. Conclusiones

---

A partir de los resultados experimentales obtenidos de este Trabajo de Fin de Máster, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. El perfil proteico de metaloproteínas de Cu y Fe mediante análisis por ICP-MS presenta diferencias cualitativas al comparar suero procedente de pacientes diagnosticados con ictus isquémico y hemorrágico.
2. El análisis por dilución isotópica necesita ser optimizado y repetido, no se consiguieron resultados fiables debido a que el factor k no resultó adecuado.
3. El método de normalización de áreas de los perfiles proteicos permitió encontrar diferencias entre el suero de pacientes con ictus hemorrágico e ictus isquémico, tanto en los isótopos de cobre como de hierro. No se encontraron diferencias para el zinc.
4. Los análisis de ELISA parecieron mostrar una tendencia en las muestras (suero y exudado) de ictus isquémicos a una mayor concentración proteica, para lactoferrina y transferrina. Este análisis está limitado por el número reducido de muestras analizadas, por lo que no se puede apoyar esta afirmación empleando tratamiento estadístico.
5. Las muestras de exudado nasal no pudieron medirse mediante HPLC-ICP-MS por falta de tiempo, por tanto, no fue posible determinar si las diferencias observadas en suero entre los dos tipos de ictus serían también observables (con perfil proteico diferente) en una muestra cuya recogida es de tipo no invasivo.

# 6. Bibliografía

---

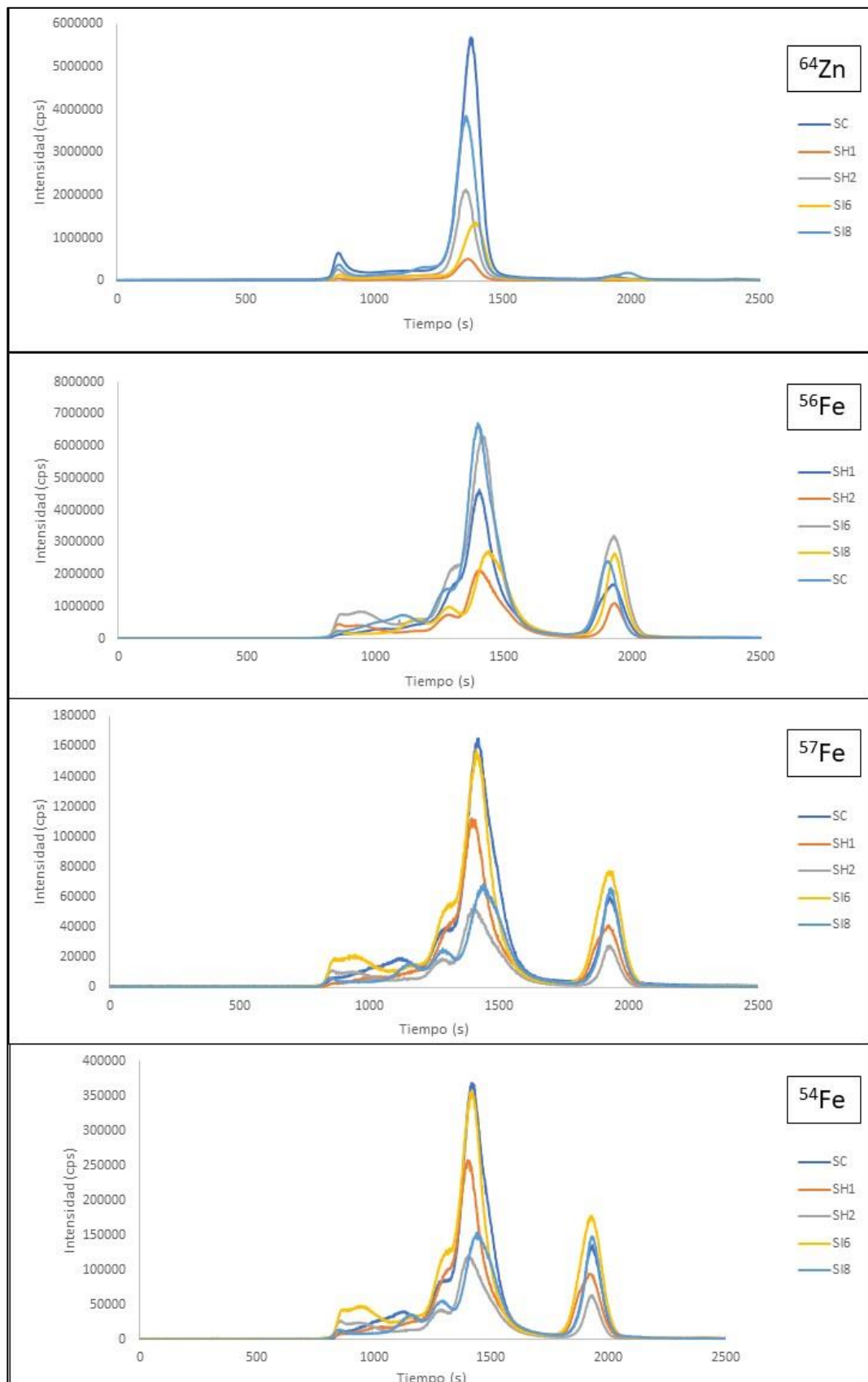


- [1] C. García-Cabo Fernández, "Utilidad del exudado nasal como método para la medición de biomarcadores en el diagnóstico diferencial del ictus agudo," Programa de doctorado en ciencias de la salud, Universidad de Oviedo, Oviedo, 2019.
- [2] L. P. García Rodríguez, A. Hernández Chávez, "Rasgos diferenciales de la mortalidad hospitalaria por ictus isquémico y hemorrágico," *Rev Cubana Neurología y Neurocirugía*, vol. 4, no. 1, pp. 14–24, 2014.
- [3] P. Simal Hernández, J. Matías Guiu-Guía, T. Hernández Meléndez, P. Pilar Aparicio Azcárraga, "Logros y retos en la atención del ictus en España: desde la estrategia del sistema nacional de salud al plan de acción europeo 2018-2030," *Revista Española de Salud Pública*, vol. 95, pp. 187-192, 2021.
- [4] D. Pérez Surribas, "Proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro," *Química Clínica*, vol. 24, no. 1, pp. 5–40, 2005.
- [5] U. A. Zitare, "Mecanismos regulatorios y manipulación de las propiedades de transferencia electrónica en metaloproteínas de cobre," Programa de doctorado, INQUIMAE, Buenos Aires, 2016.
- [6] S. Miraval Quispe, E. Quispe Mamani, "Importancia del cobre en el organismo," *Revista de Investigación Apuntes Científicos Estudiantiles de Nutrición Humana*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2017.
- [7] A. Díaz Caballero, D. Méndez Cuadro, E. Martínez Serrano, D. Jennifer Orozco Páez, L. Margarita Rosa Velásquez, "Metaloproteinasas de la matriz en Odontología y sus consideraciones desde el campo de la química computacional," *Revista Cubana de Estomatología*, vol. 51, no. 1, pp. 80–92, 2014.
- [8] C. Rubio, D. González, R. E. Martín-Izquierdo, C. Revert, I. Rodríguez, A. Hardisson, "Alimentos funcionales El zinc: oligoelemento esencial," *Nutrición Hospitalaria*, vol. 22, pp. 101–107, 2007.
- [9] A. D. Giraldo Zuñiga, E. E. García Rojas, J. S. R. Coimbra, W. E. Luera Peña, "Separación de proteínas de suero de leche por cromatografía líquida," *Scientia Agropecuaria*, vol. 1, pp. 21–26, 2010.
- [10] K. Mayolo-Deloisa, L. M. Martínez, K. Rito-Palomares, "Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas," *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 11, no. 3, pp. 415–429, 2012.

- [11] A. A. Ammann, "Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): A versatile tool," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 42, no. 4. pp. 419–427, 2007. doi: 10.1002/jms.1206.
- [12] M. Wang, W. Feng, W. Lu, B. Li, B. Wang, M. Zhu, Y. Wang, H. Yuan, Y. Zhao, Z. Chai, "Quantitative analysis of proteins via sulfur determination by HPLC coupled to isotope dilution ICPMS with a hexapole collision cell," *Analytical Chemistry*, vol. 79, no. 23, pp. 9128–9134, Dec. 2007, doi: 10.1021/ac071483t.
- [13] Servicios Científico-Técnicos Universidad de Oviedo, "Unidad de Espectrometría de Masas". <https://www.sct.uniovi.es/>, Accedido: 09/07/2022
- [14] P. Rodríguez-González, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel, "Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review," *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, vol. 60, no. 2. pp. 151–207, 2005. doi: 10.1016/j.sab.2005.01.005.
- [15] Klaus G. Heumann, "Isotope dilution mass spectrometry," *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, vol. 118–119, pp. 557–592, 1992.
- [16] E. Guzmán-Vázquez, "Las pruebas de Elisa," *Gaceta Médica México*, vol. 140, no. 3, pp. 48–49, 2004.
- [17] F. R. Ochoa Azze, "Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos", Finlay Ediciones. La Habana, 2012. ISBN: 978-9597076476.
- [18] B. F. Michael Clark, R. M. Lister, M. Bar-joseph, "Methods in Enzimology", Academic Press Inc., vol. 118. 1986. ISBN: 978-0121822200
- [19] P. Mengyun, F. Liuxing, L. Hongmei, "Absolute Quantification of Haemoglobin in Whole Blood by Species-unspecific Isotope-dilution Liquid Chromatography-inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry," *Revista Química de las universidades chinas*, vol. 41, no. 9, pp. 1983-1988, 2020, doi: 10.7503/cjcu20200321
- [20] B. Michalke, A. Berthele, V. Venkataramani, "Simultaneous quantification and speciation of trace metals in paired serum and CSF samples by size exclusion chromatography–inductively coupled plasma–dynamic reaction cell–mass spectrometry (SEC-DRC-ICP-MS)," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 16, 2021, doi: 10.3390/ijms22168892.

- [21] M. E. del Castillo Busto, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, J. Meija, A. Sanz-Medel, "Strategies to study human serum transferrin isoforms using integrated liquid chromatography ICPMS, MALDI-TOF, and ESI-Q-TOF detection: Application to chronic alcohol abuse," *Analytical Chemistry*, vol. 77, no. 17, pp. 5615–5621, 2005, doi: 10.1021/ac050574s.
- [22] K. Gellein, P. Roos, L. Evje, O. Vesterberg, T. Flaten, M. Nordberg and T. Syversen, "Separation of proteins including metallothionein in cerebrospinal fluid by size exclusion HPLC and determination of trace elements by HR-ICP-MS," *Brain Research*, vol. 1174, no. 1, pp. 136–142, 2007, doi: 10.1016/j.brainres.2007.08.004.
- [23] Y. Zhang, J. F. Clark, G. Pyne-Geithman, J. Caruso, "Metallomics study in CSF for putative biomarkers to predict cerebral vasospasm," *Metallomics*, vol. 2, no. 9, pp. 628–637, 2010, doi: 10.1039/c0mt00005a.
- [24] E. Escobar Carmona, "Valores de referencia del Laboratorio Clínico más empleados en Cuba," *Gaceta Médica Espirituana*, vol. 13, no. 2, pp. 1609–8921, 2011.
- [25] D. Naot, A. Grey, I. R. Reid, J. Cornish, "Lactoferrin-A Novel Bone Growth Factor," *Clinical Medicine & Research*, vol. 3, no. 2, pp. 93–101, 2004.

## Comparación cromatogramas



## Porcentaje de área para cada pico

<sup>54</sup> Fe	1	%	2	%	3	%	Area Total
SC 24	1,40E+07	<b>22,30</b>	3,67E+07	<b>58,40</b>	1,15E+07	<b>18,35</b>	6,29E+07
SC 5	1,78E+07	<b>21,19</b>	5,16E+07	<b>61,30</b>	1,47E+07	<b>17,50</b>	8,41E+07
SH1	4,16E+06	<b>8,49</b>	3,52E+07	<b>71,89</b>	9,63E+06	<b>19,67</b>	4,90E+07
SH2	3,80E+06	<b>13,29</b>	2,01E+07	<b>70,11</b>	4,59E+06	<b>16,05</b>	2,86E+07
SH3	2,58E+06	<b>7,97</b>	2,55E+07	<b>78,50</b>	5,27E+06	<b>16,26</b>	3,24E+07
SH4	1,25E+06	<b>8,08</b>	1,34E+07	<b>86,29</b>	2,35E+06	<b>15,17</b>	1,55E+07
SI6	9,24E+06	<b>12,67</b>	4,60E+07	<b>63,11</b>	1,73E+07	<b>23,72</b>	7,30E+07
SI7	5,80E+06	<b>15,38</b>	2,18E+07	<b>57,79</b>	8,53E+06	<b>22,62</b>	3,77E+07
SI8	5,33E+06	<b>12,95</b>	2,44E+07	<b>59,42</b>	1,15E+07	<b>28,01</b>	4,11E+07
SI9	5,78E+06	<b>13,34</b>	2,67E+07	<b>61,73</b>	1,03E+07	<b>23,86</b>	4,33E+07

<sup>56</sup> Fe	1	%	2	%	3	%	Area Total
SC 24	1,14E+08	<b>17,58</b>	4,37E+08	<b>67,41</b>	7,71E+07	<b>11,89</b>	6,48E+08
SC 5	2,91E+08	<b>19,67</b>	9,28E+08	<b>62,65</b>	2,60E+08	<b>17,54</b>	1,48E+09
SH1	1,02E+08	<b>9,38</b>	7,55E+08	<b>69,48</b>	2,01E+08	<b>18,52</b>	1,09E+09
SH2	8,57E+07	<b>13,40</b>	4,39E+08	<b>68,70</b>	9,99E+07	<b>15,62</b>	6,39E+08
SH3	7,89E+07	<b>11,72</b>	4,82E+08	<b>71,56</b>	1,05E+08	<b>15,53</b>	6,73E+08
SH4	7,73E+07	<b>19,92</b>	2,76E+08	<b>71,20</b>	3,61E+07	<b>9,29</b>	3,88E+08
SI6	2,23E+08	<b>13,88</b>	9,97E+08	<b>61,95</b>	3,80E+08	<b>23,63</b>	1,61E+09
SI7	8,14E+07	<b>24,70</b>	2,19E+08	<b>66,44</b>	2,74E+07	<b>8,30</b>	3,30E+08
SI8	1,19E+08	<b>12,75</b>	5,39E+08	<b>57,81</b>	2,57E+08	<b>27,57</b>	9,32E+08
SI9	7,48E+07	<b>15,43</b>	3,27E+08	<b>67,47</b>	7,82E+07	<b>16,13</b>	4,85E+08

<sup>57</sup> Fe	1	%	2	%	3	%	Area Total
SC	3,38E+06	<b>21,17</b>	1,06E+07	<b>66,06</b>	2,12E+06	<b>13,26</b>	1,60E+07
SC	7,32E+06	<b>19,94</b>	2,28E+07	<b>62,12</b>	6,42E+06	<b>17,48</b>	3,67E+07
SH1	2,28E+06	<b>10,64</b>	1,50E+07	<b>70,29</b>	4,11E+06	<b>19,21</b>	2,14E+07
SH2	2,62E+06	<b>12,13</b>	1,05E+07	<b>67,34</b>	2,58E+06	<b>15,68</b>	1,57E+07
SH3	2,00E+06	<b>20,51</b>	1,18E+07	<b>71,24</b>	2,59E+06	<b>11,05</b>	1,65E+07
SH4	2,06E+06	<b>20,51</b>	6,90E+06	<b>68,60</b>	1,11E+06	<b>11,05</b>	1,01E+07
SI6	5,91E+06	<b>14,80</b>	2,46E+07	<b>61,59</b>	9,39E+06	<b>23,53</b>	3,99E+07
SI7	2,06E+06	<b>24,38</b>	5,50E+06	<b>64,97</b>	7,40E+05	<b>8,75</b>	8,46E+06
SI8	2,86E+06	<b>12,49</b>	1,34E+07	<b>58,33</b>	6,45E+06	<b>28,16</b>	2,29E+07
SI9	1,93E+06	<b>15,37</b>	8,46E+06	<b>67,58</b>	1,97E+06	<b>15,73</b>	1,25E+07

<sup>65</sup> Cu	1	%	2	%	3	%	Area Total
SC 24	1,19E+06	<b>11,16</b>	6,75E+06	<b>63,33</b>	2,82E+06	<b>26,46</b>	1,07E+07
SC 5	8,18E+05	<b>7,87</b>	8,78E+06	<b>84,40</b>	4,34E+06	<b>41,72</b>	1,04E+07
SH1	2,53E+06	<b>9,45</b>	1,91E+07	<b>71,47</b>	5,13E+06	<b>19,20</b>	2,67E+07
SH2	3,30E+05	<b>4,61</b>	4,55E+06	<b>63,71</b>	1,97E+06	<b>27,56</b>	7,14E+06
SH3	2,09E+06	<b>8,01</b>	1,78E+07	<b>67,97</b>	4,48E+06	<b>17,17</b>	2,61E+07
SH4	1,91E+06	<b>11,00</b>	1,07E+07	<b>62,03</b>	3,67E+06	<b>21,17</b>	1,73E+07
SI6	2,09E+05	<b>1,49</b>	1,08E+07	<b>76,89</b>	2,44E+06	<b>17,35</b>	1,40E+07
SI7	1,84E+06	<b>9,82</b>	1,38E+07	<b>73,64</b>	3,53E+06	<b>18,80</b>	1,88E+07
SI8	5,48E+05	<b>2,89</b>	1,30E+07	<b>68,72</b>	4,05E+06	<b>21,41</b>	1,89E+07
SI9	2,19E+06	<b>9,63</b>	1,60E+07	<b>70,47</b>	3,76E+06	<b>16,54</b>	2,28E+07

<sup>64</sup> Zn	1	%	2	%	3	%	Area Total
SC 24	2,03E+07	<b>17,02</b>	8,78E+07	<b>73,67</b>	3,83E+06	<b>3,22</b>	1,19E+08
SC 5	1,76E+07	<b>15,44</b>	8,30E+07	<b>72,97</b>	3,35E+05	<b>0,29</b>	1,14E+08
SH1	8,73E+06	<b>14,37</b>	4,57E+07	<b>75,22</b>	2,72E+06	<b>4,48</b>	6,08E+07
SH2	3,18E+07	<b>14,63</b>	1,69E+08	<b>77,58</b>	7,19E+06	<b>3,30</b>	2,18E+08
SH3	2,14E+07	<b>19,98</b>	7,69E+07	<b>71,78</b>	6,63E+06	<b>6,19</b>	1,07E+08
SH4	2,04E+07	<b>26,15</b>	4,74E+07	<b>60,87</b>	6,98E+06	<b>8,98</b>	7,78E+07
SI6	2,18E+07	<b>13,68</b>	1,25E+08	<b>78,65</b>	9,69E+06	<b>6,08</b>	1,59E+08
SI7	1,61E+07	<b>21,91</b>	4,60E+07	<b>62,71</b>	7,93E+06	<b>10,82</b>	7,33E+07
SI8	4,79E+07	<b>11,95</b>	3,25E+08	<b>81,07</b>	2,40E+07	<b>6,00</b>	4,00E+08
SI9	1,66E+07	<b>15,40</b>	5,29E+07	<b>49,25</b>	1,90E+06	<b>1,77</b>	1,07E+08

<sup>33</sup> S	1	%	2	%	3	%	4	%	Area Total
SC 24	2,17E+07	<b>5,50</b>	3,33E+08	<b>84,45</b>	1,31E+07	<b>3,32</b>	1,30E+07	<b>3,30</b>	3,95E+08
SC 5	2,92E+07	<b>3,74</b>	6,56E+08	<b>83,96</b>	2,43E+07	<b>3,11</b>	3,07E+07	<b>3,93</b>	7,81E+08
SH1	1,41E+07	<b>3,27</b>	3,57E+08	<b>82,44</b>	1,93E+07	<b>4,45</b>	1,82E+07	<b>4,22</b>	4,32E+08
SH2	1,51E+07	<b>5,62</b>	2,28E+08	<b>84,80</b>	8,09E+06	<b>3,01</b>	6,53E+06	<b>2,43</b>	2,69E+08
SH3	2,64E+07	<b>4,71</b>	4,47E+08	<b>79,70</b>	2,69E+07	<b>4,80</b>	3,32E+07	<b>5,92</b>	5,61E+08
SH4	3,44E+07	<b>6,85</b>	4,14E+08	<b>82,27</b>	1,68E+07	<b>3,34</b>	2,39E+07	<b>4,76</b>	5,03E+08
SI6	2,28E+07	<b>3,50</b>	5,58E+08	<b>85,58</b>	1,53E+07	<b>2,35</b>	2,61E+07	<b>4,01</b>	6,52E+08
SI7	2,65E+07	<b>6,04</b>	3,63E+08	<b>82,83</b>	1,47E+07	<b>3,36</b>	1,98E+07	<b>4,52</b>	4,38E+08
SI8	3,28E+07	<b>6,05</b>	4,47E+08	<b>82,34</b>	3,84E+07	<b>7,08</b>	3,00E+07	<b>5,54</b>	5,43E+08
SI9	2,77E+07	<b>5,76</b>	3,96E+08	<b>82,22</b>	1,76E+07	<b>3,65</b>	2,03E+07	<b>4,21</b>	4,81E+08