

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales



**Desarrollo de tecnologías de sistemas de
detección in vitro para COVID-19,
enfermedad de Alzheimer y cáncer
colorrectal**

TESIS DOCTORAL

Presentada para optar al título de Doctor por:

Luis González Valle

Máster Universitario en Neurociencia

Madrid, 2024



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales

Doctorado en Ingeniería Mecánica

Desarrollo de tecnologías de sistemas de
detección in vitro para COVID-19,
enfermedad de Alzheimer y cáncer
colorrectal

TESIS DOCTORAL

Presentada para optar al título de Doctor por:

Luis González Valle

Máster Universitario en Neurociencia

Bajo la dirección de:
Dr. Miguel Holgado Bolaños
Dr. María Fe Laguna Heras

Madrid, 2024

Título: Desarrollo de tecnologías de sistemas de detección in vitro para COVID-19, enfermedad de Alzheimer y cáncer colorrectal

Autor: Luis González Valle

Programa de Doctorado: Ingeniería Mecánica

Dirección de tesis:

Dr. María Fe Laguna Heras, Profesor titular en el Departamento de Física Aplicada e Ingeniería de Materiales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Madrid (Codirector).

Dr. Miguel Holgado Bolaños, Catedrático en el Departamento de Física Aplicada e Ingeniería de Materiales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Madrid.

Revisores externos:

Tribunal de tesis:

Fecha de defensa:

Esta tesis ha sido parcialmente financiada por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) bajo el proyecto ADMARKERS con referencia IDI-20190800, por el programa de Investigación e Innovación de la Universidad Politécnica de Madrid bajo el proyecto con referencia: VIMPACTO20MHB y en el marco del proyecto COVIDTECH-CM de la Comunidad de Madrid (España), por Instituto de Salud Carlos III bajo los proyectos con referencia PT20_00074 y PT23_00167.

A Marce

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres su apoyo incondicional y su cariño, gracias a ellos he podido llegar hasta aquí y me han ayudado a que sea la persona que soy hoy día. También a mi hermanito Pablo, y al resto de mi familia, en especial a mi tía Carmen y mi primo Carlos que me acogieron en Madrid con los brazos abiertos.

Agradecer también a mis directores de tesis Miguel y Marifé, gracias a ellos he podido realizar esta tesis. También a la Universidad Politécnica de Madrid y al Centro de Tecnología Biomédica donde he pasado tanto tiempo en los últimos años.

Gracias a mis compañeros de grupo, tanto los que han estado, como los que están, que me han ayudado a continuar con la tesis y que me han acompañado en esas tardes de patatas bravas en las que me motivaban a seguir adelante.

También agradecer a mis compañeros del Hospital, que siempre han sido un apoyo y me han facilitado poder realizar esta tesis.

Gracias a mis amigos, por aguantar con paciencia mis inquietudes y ayudarme a romper la rutina. Esas conversaciones eran el ánimo y la motivación suficiente para progresar.

Y finalmente a la persona más importante, a mi compañera de vida, Sofía, gracias por realizar conmigo este camino, sin ti hubiese sido mucho más largo y duro. Seguiremos avanzando juntos, superando y disfrutando cada etapa que nos encontremos.

Abstract

Biomarker detection in clinical diagnostics has been a breakthrough in modern medicine. Thanks to these biomarkers, many diseases can be better understood, detect them earlier and study patient's evolution, allowing a more personalized and effective treatment. These markers are very heterogeneous, with many types, ranging from macromolecules such as proteins or oligonucleotides, to simple molecules. Due to this wide variety, it is possible to obtain information on multiple biological processes, pathological mechanisms or the response to a treatment.

This thesis has two main objectives, the first one is the development of in-vitro detection system technologies by improving diagnostic kits in order to detect biomarkers to study different diseases. These kits are composed by interferometric biosensors by means of which COVID-19 (Coronavirus disease 2019), Alzheimer's disease and colorectal cancer will be studied. In the colorectal cancer study, there is also a second objective, which is to carry out a continuous culture model using Organ-on-a-chip technology by manufacturing microfluidic chips.

For the first objective, the diagnostic kits used during the thesis evolution are based on cells that act as optical biosensors, these cells consist of Fabry-Pérot interferometers. Information about the binding between antibody and antigen is obtained through a process of vertical optical interrogation of the biosensor, called Interferometric Optical Detection Methodology (IODM), thus detecting the desired analyte. This interferometric signal can be optimized by using two types of nanoparticles in order to increase the biosensor sensitivity, specifically gold nanoparticles and magnetic iron oxide nanoparticles, which will be used in the immunoassays.

For the second objective, biopsies cultures are performed, obtained from patients suffering from colon cancer, both from affected and unaffected tissue. Organoids derived from these biopsies are then developed and cultured on both plate and microfluidic chip. Once the organoids are generated, a way to characterize them is proposed; in addition, a competitive assay is proposed to detect the tumor biomarker presence in the culture medium.

In short, in this thesis, three different diseases studies are carried out, in which several biomarkers characteristic of these pathologies are analyzed. The diseases studied are COVID-19, detecting specific antibodies against SARS-CoV-2; Alzheimer's disease, detecting Tau and Lactoferrin proteins; and colon cancer, detecting a possible biomarker, the protein IGFBP2 (Insulin-like growth factor-binding protein 2).

Resumen

La detección de marcadores biológicos en el campo de la clínica ha significado un gran avance en la medicina moderna. Gracias a estos biomarcadores, se pueden comprender mejor numerosas enfermedades, detectarlas de manera más temprana y estudiar la evolución de la enfermedad, permitiendo una medicina más personalizada y un tratamiento más efectivo. Estos marcadores son muy heterogéneos, existiendo multitud de tipos, desde macromoléculas como proteínas u oligonucleótidos, hasta moléculas simples. Gracias a esta gran variedad se puede obtener información de múltiples procesos biológicos, de mecanismos patológicos o de la respuesta a un tratamiento.

Esta tesis tiene dos objetivos principales, el primero es el desarrollo de tecnologías de sistemas de detección *in vitro* mediante la mejora de kits de diagnóstico con el fin de detectar biomarcadores que permitan estudiar diferentes enfermedades. Estos kits están formados por biosensores interferométricos mediante los cuales se estudiarán la COVID-19, la enfermedad de Alzheimer, así como el cáncer de colon. En esta última enfermedad, además, existe un segundo objetivo, que consiste en realizar un modelo de cultivo en continuo empleando la tecnología *Organ-on-a-chip* mediante la fabricación de chips microfluídicos.

Para el primer objetivo, los kits de diagnóstico utilizados durante el desarrollo de la tesis están basados en celdas que actúan como biosensores ópticos, dichas celdas consisten en interferómetros Fabry-Pérot. Mediante un proceso de interrogación óptica vertical del biosensor, denominado Metodología de Detección Óptica Interferométrica (IODM por sus siglas en inglés), se obtiene información de la unión entre anticuerpo y antígeno, detectando así el analito deseado. Esta señal interferométrica puede ser optimizada mediante el empleo de dos tipos de nanopartículas con el fin de aumentar la sensibilidad del biosensor, en concreto, nanopartículas de oro y nanopartículas magnéticas de óxido de hierro serán usadas en los inmunoensayos.

Para el segundo objetivo, se realizan cultivos de biopsias obtenidas de pacientes que padecen cáncer de colon, tanto de tejido afectado como no afectado. Seguidamente, se desarrollan organoides derivados de estas biopsias, los cuales se cultivan tanto en placa como en chip microfluídico. Una vez generados los organoides, se propone una forma de caracterizarlos; además se plantea un ensayo competitivo con el cual detectar la presencia de un biomarcador tumoral en el medio de cultivo.

En definitiva, en esta tesis se llevan a cabo estudios de tres enfermedades diferentes, en ellos se analizan diversos biomarcadores característicos de estas patologías. Las enfermedades estudiadas son la COVID-19, detectando anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2; la enfermedad de Alzheimer, detectando las proteínas Tau y Lactoferrina; y el cáncer de colon, detectando un posible marcador, la proteína IGFBP2 (siglas del nombre en inglés *Insulin-like growth factor-binding protein 2*).

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS.....	3
1.2. ESTRUCTURA GENERAL.....	4
2. ESTADO DE LA CUESTIÓN	5
2.1. BIOSENSORES	5
2.1.1. Tipos de biosensores	7
2.1.2. Biosensores Ópticos	8
2.1.2.1. Biosensores basados en el Plasmón de Resonancia Superficial.....	8
2.1.2.2. Biosensores basados en fibra óptica	9
2.1.2.3. Biosensores interferométricos.....	10
2.1.2.3.1 Fabry-Pérot	11
2.1.2.3.2 BICELLS.....	12
2.1.3. Inmunoensayos	13
2.1.3.1. Tipos de Inmunoensayos.....	13
2.1.3.2. Anticuerpos	15
2.1.3.3. Interacción anticuerpo-antígeno.....	17
2.2. NANOPARTÍCULAS.....	19
2.2.1. Tipos de nanopartículas.....	19
2.2.2. Empleo de nanopartículas en biosensores.....	20
2.2.3. Caracterización de nanopartículas.....	21
2.2.3.1. Microscopía electrónica de barrido	21
2.2.3.2. Dispersión Dinámica de Luz.....	22
2.2.3.3. Potencial Zeta.....	24
2.2.3.4. Espectroscopía de absorción.....	26
2.3. MODELOS DE ENFERMEDAD	28
2.3.1. Tipos de modelos de enfermedades	29
2.3.1.1. Modelos <i>in vivo</i>	29
2.3.1.2. Modelos <i>in vitro</i>	30
2.3.2. Tecnología <i>Organ-on-a-chip</i>	31
3. MATERIAL Y MÉTODOS	33
3.1. BIOSENSORES ÓPTICOS	33
3.1.1. Fabricación de kits de diagnóstico.....	33
3.1.1.1. Tipos de kits de diagnóstico	35

3.1.2.	Método de lectura	37
3.2.	NANOPARTÍCULAS.....	41
3.2.1.	Nanopartículas magnéticas.....	41
3.2.2.	Nanopartículas de oro.....	41
3.2.2.1.	Síntesis de nanopartículas de oro.....	42
3.2.2.2.	Funcionalización de nanopartículas de oro	43
3.2.3.	Caracterización de nanopartículas.....	44
3.2.3.1.	Microscopio Electrónico de Barrido	44
3.2.3.2.	Dispersión Dinámica de Luz.....	44
3.2.3.3.	Potencial zeta	46
3.2.3.4.	Espectroscopía de absorción.....	48
3.2.4.	Biofuncionalización de nanopartículas.....	49
3.3.	MODELOS DE ENFERMEDAD ANALIZADOS	52
3.3.1.	Medición de Igs específicas como marcadores de la COVID-19.....	52
3.3.1.1.	Ensayo de detección de biomarcadores en sueros de pacientes que padecen COVID-19.....	53
3.3.1.1.1	Condiciones del ensayo de biomarcadores en sueros.....	54
3.3.1.1.2	Análisis del ensayo de biomarcadores en sueros	56
3.3.1.2.	Ensayo piloto de detección de IgAs frente a SARS-CoV-2 en salivas .	56
3.3.1.2.1	Condiciones del ensayo piloto	58
3.3.1.2.2	Análisis del ensayo piloto.....	60
3.3.2.	Detección de biomarcadores relacionados con la Enfermedad de Alzheimer.	64
3.3.2.1.	Detección de Tau	68
3.3.2.2.	Detección de Lactoferrina	69
3.3.3.	Diseño de un sistema de detección in vitro para cáncer colorrectal.....	72
3.3.3.1.	Fabricación de chips microfluídicos.....	73
3.3.3.1.1	Fabricación de chips microfluídicos de vinilo	74
3.3.3.1.2	Fabricación de chips microfluídicos de PDMS.....	79
3.3.3.2.	Cultivo de biopsias	82
3.3.3.3.	Desarrollo de organoides.....	85
3.3.3.3.1	Caracterización de organoides.....	90
4.	RESULTADOS.....	95
4.1.	MEDICIÓN DE IGS ESPECÍFICAS COMO MARCADORES DE LA COVID-19	95
4.1.1.	Ensayo de detección de biomarcadores en sueros de pacientes que padecen COVID-19.....	95
4.1.2.	Ensayo piloto de detección de IgAs frente a SARS-CoV-2 en salivas	102
4.2.	DETECCIÓN DE BIOMARCADORES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	116
4.2.1.	Ensayos de detección de péptidos de Tau.....	117

4.2.1.1.	Evaluación de la inmovilización de péptidos de Tau modificada y de anticuerpos que los detectan.....	118
4.2.1.2.	Estudio de especificidad de anti-PTau por PTau	118
4.2.1.3.	Estudio de especificidad de anti-PTau por 3PTau	119
4.2.2.	Ensayos con un fragmento recombinante de Tau y un anticuerpo anti-Tau unido a NPs Magnéticas	125
4.2.2.1.	Evaluación de la inmovilización del fragmento recombinante de Tau	125
4.2.2.2.	Estudio de especificidad de anti-Tau por Tau	125
4.2.2.3.	Evaluación de la señal de las nanopartículas magnéticas en un sensor interferométrico.....	127
4.2.2.4.	Funcionalización de nanopartículas magnéticas con proteína G	128
4.2.2.5.	Estudio de especificidad de nanopartículas magnéticas con anti-Tau por Tau	130
4.2.2.6.	Ensayo competitivo con nanopartículas magnéticas con anti-Tau ...	136
4.2.3.	Ensayos con Lactoferrina y un anticuerpo anti-LF unido a NPs de oro...	138
4.2.3.1.	Síntesis y caracterización de AuNPs	138
4.2.3.2.	Evaluación de la señal de las nanopartículas de oro en un sensor interferométrico.....	140
4.2.3.3.	Funcionalización de nanopartículas de oro con biotina	140
4.2.3.4.	Estudio de especificidad de AuNPs con biotina por STV	141
4.2.3.5.	Ensayo competitivo con AuNPs con biotina y STV	146
4.2.3.6.	Evaluación de la inmovilización de la proteína Lactoferrina.....	147
4.2.3.7.	Funcionalización de nanopartículas de oro con proteína G	150
4.2.3.8.	Estudio de especificidad de AuNPs con anti-LF por Lactoferrina ...	152
4.2.3.9.	Cálculo del LoD de Lactoferrina en un ensayo tipo Sándwich.....	157
4.3.	TECNOLOGÍA <i>ORGAN-ON-A-CHIP</i> COMO MODELO DE CÁNCER DE COLON	165
4.3.1.	Ensayos con Biopsias en Chips microfluídicos.....	165
4.3.2.	Ensayos de Organoides.....	169
4.3.2.1.	Caracterización de los organoides derivados de cáncer colorrectal ..	177
4.3.2.2.	Detección de Biomarcadores en organoides derivados de cáncer colorrectal mediante AuNPs	181
4.3.2.2.1	Evaluación de la inmovilización de la proteína IGFBP2	181
4.3.2.2.2	Estudio de especificidad de AuNPs con anti-IGFBP2 por IGFBP2.....	183
4.3.2.2.3	Ensayo competitivo para la detección de IGFBP2 en medio de cultivo	185
5.	CONCLUSIONES	189
6.	FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	193
7.	ARTÍCULOS PUBLICADOS POR EL AUTOR	195
8.	REFERENCIAS	197

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema de las diferentes partes de un biosensor.....	6
Figura 2. Esquema de un biosensor SPR.....	9
Figura 3. Esquema de un biosensor basado en fibra.....	10
Figura 4. Biosensor interferométrico interrogado horizontalmente. Se observa ampliado la zona donde se encuentra la muestra y los biorreceptores.....	11
Figura 5. Interferómetro de Fabry-Pérot.....	12
Figura 6. Tipos de inmunoensayos según su configuración. En la parte superior se pueden observar tres tipos de ensayos no competitivos: directo, indirecto y tipo Sándwich. En la parte inferior se muestra un ensayo competitivo.....	14
Figura 7. Estructura de una inmunoglobulina.....	16
Figura 8. Ejemplos de nanopartículas orgánicas e inorgánicas metálicas, de óxido de hierro y mesoporosas.....	20
Figura 9. Tipos de emisiones detectadas por SEM. A la izquierda se puede observar cómo se genera un SE. En el centro se observa la reflexión de un BSE. En la derecha puede observarse la generación de rayos X.....	22
Figura 10. Análisis de la Dispersión Dinámica de Luz. A la izquierda se puede observar las gráficas que registran los cambios en la intensidad a lo largo del tiempo, a la derecha se puede observar el tamaño de la NP a la que corresponden estas gráficas.....	23
Figura 11. Capas iónicas de una nanopartícula. A la izquierda pueden observarse las diferentes capas que existen en la interacción nanopartícula-solución. A la derecha se encuentra una representación de como el potencial decae según se aleja de la superficie de la nanopartícula.....	24
Figura 12. A) Relación fuerzas de atracción y fuerzas de repulsión de una solución estable, en sombreado se observa la barrera energética. B) Relación fuerzas de atracción y fuerzas de repulsión de una solución inestable.....	25
Figura 13. Variación del color de una solución de AuNPs en función de la concentración.....	26

Figura 14. Espectro de absorción de una nanopartícula de Oro. Se señalan la absorbancia a 400 nm y a 450 nm, además del pico de absorbancia (adaptada de Valle et al., 2023).	27
Figura 15. Ejemplos de modelos <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> 2D e <i>in vitro</i> 3D.	29
Figura 16. Sistema de cultivo <i>Organ-on-a-chip</i> en el que se pueden recrear las condiciones fisiológicas de diversos órganos y estudiar la interacción entre diferentes tejidos.	31
Figura 17. Esquema de fabricación de un kit de diagnóstico.....	34
Figura 18: Representaciones gráficas no a escala de un kit con dos BICELLS y un kit con dos BIWELLS.....	35
Figura 19. Tipos de kits de diagnóstico empleados. A) Kit de 65 BIWELLS B) Kit de 16 BICELLS. C) Kit de 65 BICELLS. D) Kit de 64 BICELLS.	36
Figura 20. Cálculo de la reflectividad en función de la longitud de onda para el interferómetro de referencia y para el interferómetro de medida. A es el área definida por el perfil interferométrico de referencia. C es el área definida por el perfil interferométrico de medida cuando el espesor es de 0 nm. B representa el área definida por el interferómetro de medida para un espesor de 40 nm (adapta de Holgado et al., 2016).....	38
Figura 21. Esquema de la obtención de \square IROP.....	39
Figura 22. Imagen de la plataforma de lectura MOX.	40
Figura 23. Esquema del proceso de funcionalización de MNPs.....	41
Figura 24. Esquema de la síntesis química de nanopartículas de oro.....	42
Figura 25. Proceso de síntesis de nanopartículas de oro en el laboratorio.....	43
Figura 26. Esquema del proceso de funcionalización de AuNPs.....	44
Figura 27. Transformación de la variación de la intensidad con el tiempo en una función de correlación por medio de Zetasizer.....	45
Figura 28. Disposición de los tres detectores (azul) a diferentes ángulos en el equipo Zetasizer.	46
Figura 29. Cubeta del equipo Zetasizer para la medida del potencial zeta.....	47
Figura 30. Esquema de la absorción de luz por parte de una muestra colocada en una cubeta dentro de un espectrómetro.	49
Figura 31. Esquema de la reacción mediada por la carbodiimida EDC.	50

Figura 32. Esquema del proceso de funcionalización y biofuncionalización con biotina-hidrazida y su unión a la estreptavidina a la izquierda, y de la proteína G y su unión a un anticuerpo a la derecha.	51
Figura 33. Esquema de la infección del virus SARS-COV-2 a una célula humana.	53
Figura 34. Plataforma dispensadora de gotas Biodot.....	55
Figura 35. Esquema de los pasos a seguir para la detección de biomarcadores en un kit de diagnóstico. 1) Inmovilización de los biorreceptores y del CN (BSA). 2) Incubación de los sueros para el reconocimiento directo de los biomarcadores IgTs, FER y CRP. 3) Incubación de anticuerpos secundarios frente a IgGs, IgMs y IgAs (adapta de Murillo et al., 2022).....	55
Figura 36. Esquema de los pasos seguidos para el análisis estadístico de los biomarcadores en sueros.....	56
Figura 37. Incubación de un kit de diagnóstico en una cámara húmeda dentro de un incubador a 37 °C.	59
Figura 38. Esquema de los pasos a seguir para la detección de IgAs en un kit de diagnóstico. 1) Inmovilización de rS1 y del CN (BSA). 2) Incubación de las salivas de los voluntarios. 3) Incubación de anticuerpos secundarios frente a IgAs.....	60
Figura 39. Esquema del cálculo de IgT (%).	61
Figura 40. Análisis en cascada de las muestras de saliva.	62
Figura 41. Clasificación de las diferentes pruebas en coherentes o incoherentes.	63
Figura 42. Principales diferencias entre un cerebro sano y un cerebro afectado por la enfermedad de Alzheimer.	65
Figura 43. Principales áreas de la corteza afectadas durante la enfermedad de Alzheimer.	66
Figura 44. En la parte superior se representa un esquema de la producción del péptido β -Amiloide. En la parte inferior se observa un caso no citotóxico.....	68
Figura 45. Esquema de la pérdida de función de la proteína Tau en la EA. En rojo la proteína Tau actúa como estabilizadora en una neurona sana, mientras en la EA forma ovillos neurofibrilares.	69
Figura 46. Cascada de señalización para la inhibición de la apoptosis por parte de la Lactoferrina.	71

Figura 47. Esquema de las diferentes partes que conforman el colon.....	72
Figura 48. En el diseño superior se observan las dimensiones de la parte superior del chip microfluídico de vinilo . En el diseño inferior se visualizan las dimensiones de la parte inferior del chip.....	75
Figura 49. Material utilizado para el desarrollo de los chips microfluídicos de vinilo. A) montador. B) Vinilo. C) Vinilo de doble cara. D) Molde de PDMS.....	77
Figura 50. Pasos en el montaje de un chip de vinilo.	78
Figura 51. En el diseño superior se observan las dimensiones de la parte superior del chip microfluídico de PDMS . En el diseño inferior se visualizan las dimensiones de la parte inferior del chip.....	80
Figura 52. Molde para la fabricación de piezas de PDMS.....	81
Figura 53. Montaje de un chip microfluídico de PDMS.....	81
Figura 54. Chip microfluídico con tapa. Se puede observar la escisión por la que puede depositar la muestra, y en la parte superior la tapa que se emplea para cerrar el sistema.....	82
Figura 55. Esquema de la inserción de una biopsia en un chip de vinilo.....	83
Figura 56. Imagen de una de las bombas que suministran medio de cultivo dentro del incubador.	84
Figura 57. Imagen de una de las bombas que suministra un colorante a través de un chip de PDMS.....	84
Figura 58. Rutas de señalización de los factores de crecimiento más empleados en el cultivo de organoides para inducir la proliferación. Con una estrella roja se señala aquellos factores que se emplean en la bibliografía, y con una estrella morada se muestra aquellos propuestos en algunos artículos.....	85
Figura 59. Esquema de la obtención de criptas en una matriz 3D.....	87
Figura 60. Esquema de la inclusión de la solución de criptas y matriz 3D en chips microfluídicos (parte superior) y en los pocillos de una placa de cultivo (parte inferior).....	88
Figura 61. Empleo de una bomba para el suministro de medio de cultivo y recolección del medio eluyente.	89
Figura 62. Visualización de la formación de organoides cada dos días.	89

Figura 63. A. En verde el espectro de absorción de una muestra fluorescente, en rojo el espectro de emisión de esta misma muestra. B. Esquema de los componentes de un microscopio de fluorescencia. C. Esquema de los componentes de un microscopio confocal de fluorescencia.	91
Figura 64. Diseño de la caracterización de organoides mediante inmunofluorescencia.	93
Figura 65. Resultados de la señal de lectura correspondientes a los diferentes biomarcadores en las muestras de pacientes con síntomas graves . El sombreado corresponde a la señal de fondo en cada gráfica (adapta de Murillo et al., 2022).	96
Figura 66. Resultados de la señal de lectura correspondientes a los diferentes biomarcadores en las muestras de pacientes con síntomas moderados . El sombreado corresponde a la señal de fondo en cada gráfica (adapta de Murillo et al., 2022).	97
Figura 67. Resultados de la señal de lectura correspondientes a los diferentes biomarcadores en las muestras de pacientes con síntomas leves . El sombreado corresponde a la señal de fondo en cada gráfica (adapta de Murillo et al., 2022).	98
Figura 68. A. Comparación cualitativa del porcentaje de positivos para cada biomarcador en función del grado de gravedad. B. Clasificación del porcentaje de positivos para cada biomarcador en los tres grupos de gravedad (adapta de Murillo et al., 2022).....	99
Figura 69. Resultados de la señal de lectura correspondientes a los diferentes biomarcadores en las muestras de donantes asintomáticos . El sombreado corresponde a la señal de fondo en cada gráfica (adapta de Murillo et al., 2022).	100
Figura 70. Matriz de correlación, en la cual cuanto mayor es el tamaño del círculo, mayor es el nivel de correlación indicado en la barra a la derecha de la figura (adapta de Murillo et al., 2022).	101
Figura 71. Gráfico de la clasificación de voluntarios: sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).....	103
Figura 72. Distribución de las IgAs desde el comienzo del estudio (octubre de 2020) hasta el final (diciembre de 2020).	104

Figura 73. A la izquierda gráfico temporal del porcentaje de positivos y negativos. A la derecha gráfico temporal de casos notificados de la COVID-19 en la Comunidad de Madrid.	105
Figura 74. Distribución de los voluntarios por semana.	106
Figura 75. Relación entre el sexo y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2. Voluntarios sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).....	107
Figura 76. Clasificación de los voluntarios según la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2 en los distintos rangos de edades. Voluntarios sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).....	109
Figura 77. Clasificación de los voluntarios según la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2 en los distintos grupos de trabajo. Voluntarios sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).....	111
Figura 78. Clasificación de los voluntarios según la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2 en los distintos grupos de medio de transporte utilizado. Voluntarios sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).....	112
Figura 79. Relación entre los tests realizados previos al estudio y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2. Voluntarios sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).....	114
Figura 80. Inmovilización de anticuerpos específicos y péptidos de Tau modificados postraduccionalmente.....	118
Figura 81. Señales del reconocimiento de concentraciones crecientes de anti-PTau sobre un kit tapizado con PTau (rojo).....	119
Figura 82. Esquema de la disposición de las gotas sobre el kit de diagnóstico en la inmovilización de 3PTau y en el reconocimiento con anti-PTau.....	120

Figura 83. Señales de la inmovilización de 3PTau (en verde) y del reconocimiento por parte de anti-PTau (en azul) sobre ese mismo kit.....	120
Figura 84. Señales de la inmovilización de anti-PTau y del reconocimiento de 3PTau sobre ese mismo kit.....	121
Figura 85. Curva de reconocimiento del anticuerpo anti-PTau a diferentes concentraciones sobre una superficie tapizada con el péptido 3PTau. Se realiza un ajuste sigmoïdal ("Logistic fit") de las señales obtenidas utilizando el software Origin, obteniendo un R ² de 0.99935 en el ajuste de la curva (en rojo).....	123
Figura 86. A) Cinética del ensayo ELISA. B) Señales del ensayo ELISA a los 10 minutos, se realiza un ajuste sigmoïdal ("Hill1 fit") de las señales obtenidas a los 10 minutos utilizando el software Origin, obteniéndose un R ² de 0.99868 en el ajuste de la curva (en rojo).....	124
Figura 87. Incubación de la proteína Tau a diferentes concentraciones. Se realiza un ajuste sigmoïdal ("Hill1 fit") mediante el software Origin, obteniendo un R ² de 0.99935 en el ajuste de la curva (en rojo).....	125
Figura 88. Curva de reconocimiento del anticuerpo anti-Tau a diferentes concentraciones sobre una superficie tapizada con Tau. Se realiza un ajuste sigmoïdal ("Hill1 fit") mediante el software Origin, obteniendo un R ² de 0.99997 en el ajuste de la curva (en rojo).....	126
Figura 89. Curva de reconocimiento de Tau por parte del anticuerpo anti-Tau que tapiza el kit de diagnóstico. Se realiza un ajuste sigmoïdal ("Boltzmann fit") mediante el software Origin, obteniendo un R ² de 0.99967 en el ajuste de la curva (en rojo).....	127
Figura 90. Gráfico de la incubación de MNPs sobre kits de nitrocelulosa. Se realiza un ajuste sigmoïdal ("Boltzmann fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R ² de 0.99818 en el ajuste de la curva (en rojo).	128
Figura 91. Biofuncionalización de MNPs con proteína G.....	129
Figura 92. Ensayo de reconocimiento directo de MNPs con PG sobre anticuerpos.	129
Figura 93. Unión de un anticuerpo a las MNPs biofuncionalizadas con proteína G.....	130
Figura 94. Ensayo de reconocimiento directo de MNPs con anti-Tau sobre Tau empleando como control negativo FBS.	130

Figura 95. Ensayo de reconocimiento directo de MNPs con anti-Tau sobre Tau empleando como control negativo BSA.	131
Figura 96. Distribución de las poblaciones de MNPs de mayor tamaño mediante DLS.	132
Figura 97. Ensayo de reconocimiento directo de MNPs con anti-Tau sobre Tau. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R ² de 0.9000 en el ajuste de la curva (en rojo).	133
Figura 98. Ensayo de reconocimiento directo de MNPs con anti-Tau sobre Tau. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R ² de 0.98643 en el ajuste de la curva (en rojo).	133
Figura 99. Imágenes del reconocimiento directo de MNPs incubadas en nevera con anti-Tau sobre Tau.	134
Figura 100. Imágenes del reconocimiento directo de MNPs sonicadas con anti-Tau sobre Tau.	135
Figura 101. Imagen tomada por SEM de MNPs con anti-Tau a 6.46×10^{10} NPs/ μ L sobre un kit funcionalizado con Tau.	136
Figura 102. Ensayo competitivo de MNPs con anti-Tau sobre Tau.	137
Figura 103. Caracterización del tamaño de las AuNPs sintetizadas mediante SEM.	139
Figura 104. Gráfico de la incubación de AuNPs sobre Kits de nitrocelulosa. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R ² de 0.99883 en el ajuste de la curva (en rojo).	140
Figura 105. Biofuncionalización de AuNPs con Biotina-Hidrazida.	141
Figura 106. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con biotina sobre STV.	141
Figura 107. Imagen de un kit de diagnóstico en el que se están incubando diferentes concentraciones de AuNPs durante 4 horas, no existe evaporación.	142
Figura 108. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con biotina sobre STV.	143
Figura 109. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con biotina sobre STV. Se realizan ajustes sigmoideales ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R ² de 0.99702 en el ajuste de la curva de 2 horas (en rojo), de 0.93383 en el ajuste de la curva de 4 horas (en amarillo), de 0.97924 en el ajuste	

de la curva de 6 horas (en verde claro), y de 0.96893 en el ajuste de la curva de 8 horas (en azul).....	143
Figura 110. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con biotina sobre STV.	144
Figura 111. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con biotina sobre STV. Se realizan ajustes sigmoidales ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.9874 en el ajuste de la curva de 2 horas (en rojo), y de 0.94254 en el ajuste de la curva de 3 horas (en verde oscuro).	145
Figura 112. Ensayo de amplificación de la señal de distintas concentraciones de STV mediante el empleo de AuNPs.....	145
Figura 113. Ensayo competitivo para la detección de STV. En rojo se señala la banda de confianza.....	146
Figura 114. Incubación de Lactoferrina. Se realiza un ajuste sigmoidal ("Boltzman fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99978 en el ajuste de la curva (en rojo).....	148
Figura 115. Ensayo de reconocimiento de Lactoferrina. Se realiza un ajuste sigmoidal ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99898 en el ajuste de la curva (en rojo).....	149
Figura 116. Curva de reconocimiento de Lactoferrina por parte del anticuerpo anti-LF que tapiza el kit de diagnóstico. Se realiza un ajuste sigmoidal ("Hill1 fit") mediante el software Origin, obteniendo un R^2 de 0.99999 en el ajuste de la curva (en rojo).....	149
Figura 117. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF.....	151
Figura 118. Biofuncionalización de AuNPs con proteína G, y unión de un anticuerpo a estas nanopartículas.....	151
Figura 119. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF.....	152
Figura 120. Distribución de tamaños observada por el DLS durante la biofuncionalización de AuNPs (adapta de Valle et al., 2023).....	153
Figura 121. Nanopartículas aglomeradas durante una centrifugación.....	154
Figura 122. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF. Se realizan ajustes sigmoidales ("Logistic fit") utilizando el software Origin,	

obteniéndose un R^2 de 0.99977 en el ajuste de la curva de 45 min (en rojo), y de 0.99405 en el ajuste de la curva de 90 min (en azul) (adapta de Valle et al., 2023).	154
Figura 123. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF.....	155
Figura 124. Imágenes del reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF (adapta de Valle et al., 2023).	156
Figura 125. Comparación y correlación del análisis de las imágenes con la señal obtenida mediante interferometría. Se realiza un ajuste lineal utilizando Origin, obteniendo un R^2 de 0.99472 (adapta de Valle et al., 2023).....	157
Figura 126. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF.....	158
Figura 127. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF.....	158
Figura 128. A la izquierda, ensayo tipo Sándwich de AuNPs con anti-LF sobre LF, se realizan ajustes sigmoidales ("Hill1") utilizando Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99772 en el ajuste de la curva ELISA (en rojo), y de 0.99795 en el ajuste de la curva IODM (en negro). A la derecha, correlación entre los dos ensayos, se realiza un ajuste lineal utilizando Origin, obteniendo un R^2 de 0.93225 (adapta de Valle et al., 2023).....	160
Figura 129. Imágenes del ensayo tipo Sándwich de AuNPs con anti-LF sobre LF (adapta de Valle et al., 2023).	161
Figura 130. Comparación del análisis de las imágenes con la señal obtenida mediante interferometría.	162
Figura 131. Preparación del primer ensayo con biopsias.....	166
Figura 132. Preparación del segundo ensayo con biopsias.....	168
Figura 133. Inclusión de una gota de 50 μ L de Matrigel en un chip microfluídico.	170
Figura 134. Proceso de ensamblaje de los dos tipos de chips microfluídicos de PDMS.....	171
Figura 135. En la parte superior se puede observar dos chips microfluídicos con tapa. En la parte inferior se puede observar dos chips microfluídicos sin tapa.	172

Figura 136. Organoides cultivados en chips microfluídicos. A y B corresponden a organoides derivados de tejido tumoral, C y D derivados de tejido no tumoral.	173
Figura 137. Organoides cultivados en placa. A, B y C corresponden a organoides derivados de tejido no tumoral, D, E y F derivados de tejido tumoral.	174
Figura 138. Organoides tumorales con una estructura aparentemente más compleja.	176
Figura 139. Imagen de fluorescencia de organoides cultivados en chips microfluídicos. A y C corresponden a organoides derivados de tejido no tumoral, B y D derivados de tejido tumoral.	177
Figura 140. Imagen de fluorescencia de organoides cultivados en placa. A, B y C corresponden a organoides no tumorales, D, E y F a organoides tumorales.	178
Figura 141. Imágenes de un organoide no tumoral tomadas con un microscopio confocal. La distancia entre secciones es de 1.06 μm . La escala gris es de 10 μm	179
Figura 142. Imágenes de un organoide tumoral tomadas con un microscopio confocal. La distancia entre secciones es de 1.06 μm . La escala gris es de 10 μm	180
Figura 143. Incubación de la proteína IGFBP2. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0. 99307.	182
Figura 144. Reconocimiento de la proteína IGFBP2. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Logistic5 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0. 99883.	182
Figura 145. Comprobación de la afinidad de la PG por el anti-IGFBP2.	184
Figura 146. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-IGFBP2 sobre IGFBP2. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Logistic5 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0. 99514 en el ajuste de la curva (en rojo).	185
Figura 147. Ensayo competitivo para la detección de IGFBP2 en medio de cultivo.	186
Figura 148. Curva de calibrado del ensayo competitivo con AuNPs tapizadas con anti-IGFBP2 capturando IGFBP2. Se realiza un ajuste lineal utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99999 en el ajuste de la curva (en rojo).	187

Figura 149. Señal de las AuNPs incubadas con el medio de cultivo de organoides tumorales (rosa) y no tumorales (azul).	187
Figura 150. Último diseño de chip microfluídico, en el cual se puede observar una parte inferior de vidrio y una parte superior de PDMS.	193

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los diferentes tipos y subtipos de chips microfluídicos empleados.	74
Tabla 2. Valores de p obtenidos en el modelo de regresión lineal simple. Para valores inferiores a 0.05 se considera un biomarcador relacionado con las IgTs (adapta de Murillo et al., 2022).	101
Tabla 3. Correlación entre el sexo y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2.	107
Tabla 4. Correlación entre la edad y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2.	108
Tabla 5. Correlación entre profesión y presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2.	110
Tabla 6. Correlación entre el medio de transporte y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2.....	112
Tabla 7. Correlación entre los tests realizados y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2.....	113
Tabla 8. Antígenos utilizados para la detección de Tau y Lactoferrina.	116
Tabla 9. Anticuerpos utilizados para la detección de Tau y Lactoferrina.	117
Tabla 10. Caracterización de MNPs durante la biofuncionalización mediante DLS.	132
Tabla 11. Cuadro resumen de la caracterización de las AuNPs mediante tres técnicas diferentes.....	139
Tabla 12: Cálculo del número de moléculas de STV necesarias para tapizar las AuNPs.....	147
Tabla 13. Caracterización durante el proceso de biofuncionalización de AuNPs.....	150
Tabla 14. Caracterización durante el proceso de biofuncionalización de AuNPs (adapta de Valle et al., 2023).....	153
Tabla 15. Comparación entre las técnicas ELISA e IODM (adapta de Valle et al., 2023).	163

Tabla 16. Comparación entre nanopartículas de oro y nanopartículas magnéticas.....	164
Tabla 17. Leyenda de los distintos chips empleados.	167
Tabla 18. Recuento del número de organoides visualizados cada 2 días.....	175
Tabla 19. Tamaño de las poblaciones de AuNPs en el protocolo de biofuncionalización mediante DLS.....	183
Tabla 20. Interpolación de los datos obtenidos en la ecuación de la recta de calibrado para calcular la concentración del biomarcador en el medio de cultivo.	188

Abreviaturas y Acrónimos

3P-Tau	Tau trifosforilada
Ac-Tau	Tau acetilada
ACE2	<i>Angiotensin-Converting Enzyme 2</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APOE4	Apolipoproteína E 4
APP	<i>Amyloid-beta Precursor Protein</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
AuNP	Nanopartícula de oro
BCR	<i>B Cell Receptor</i>
BSE	<i>Backscattered electrons</i>
BICELL	<i>Biophotonic Sensing Cell</i>
BIOD S. L.	<i>Bio Optical Detection S.L.</i>
BIWELL	<i>Biophotonic Sensing Well</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBGP	Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas
CDR	<i>Complementarity-Determining Region</i>
CEA	<i>CarcinoEmbryonic Antigen</i>
CH	<i>Constant Heavy domain</i>
CK20	Citoqueratina 20
CN	Control negativo
CNB	Centro Nacional de Biotecnología
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>

CP	Control positivo
CRP	<i>C-Reactive Protein</i>
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
CTB	Centro de Tecnología Biomédica
CL	<i>Constant Light domain</i>
d_H	Diámetro hidrodinámico
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Fc	Fragmento cristalizable
FER	Ferritina
f_{TRANS}	Función de Transferencia
GOFB	Grupo de Óptica Fotónica y Biofotónica
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCSC	Hospital Clínico San Carlos
HRP	<i>HorseRadish Peroxidase</i>
IdISSC	Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos
I	Intensidad de señal
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IGFBP2	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 2</i>
IgM	Inmunoglobulina M
IgTs	Inmunoglobulinas totales

IML	Instituto de Medicina de Laboratorio
IND	Indeterminado
IODM	<i>Interferometric Optical Detection Method</i>
iPSCs	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
IROP	<i>Increase Relative Optical Power</i>
Kd	Constante de Disociación
Ki-67	Antígeno Ki-67
LF	Lactoferrina
LoD	<i>Limit of Detection</i>
NC	Nitrocelulosa
NCB-2	Nivel 2 de contención biológica
N-N	Negativo permanece Negativo
N-P	Negativo pasa a Positivo
NPs	Nanopartículas
OP	<i>Optic Power</i>
PB	<i>Phosphate-Buffered</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
PG	Proteína G
P-N	Positivo pasa a Negativo
P-P	Positivo permanece Positivo
PSEN1	Presenilina-1
PSEN2	Presenilina-2
pTau	Tau fosforilada
PVC	<i>PolyVinyl Chloride</i>
Ref	Referencia
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rS1	Proteína recombinante <i>spike</i> truncada
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2</i>

SE	<i>Secondary Electrons</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
STV	Estreptavidina
TBS-T	<i>Tris buffer saline with Tween</i>
TMB	5,5'-tetrametilbencidina
U	Incertidumbre
UPM	Universidad Politécnica de Madrid
uTau	Tau ubiquitinada
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visible
VH	<i>Variable Heavy domain</i>
VL	<i>Variable Light domain</i>

1. Introducción

En las últimas décadas, parte de la investigación biomédica se ha centrado en el descubrimiento de biomarcadores específicos de enfermedades. Un **biomarcador** es aquella sustancia que facilita información acerca del estado de una enfermedad, ya que permite detectar una patología u observar la respuesta a un tratamiento, entre otros ejemplos.

Estos biomarcadores poseen un gran potencial, ya que pueden ser de carácter predictivo, permitiendo predecir la evolución aproximada de la enfermedad, asegurando un tratamiento temprano y óptimo; de carácter diagnóstico, otorgando información del estado concreto en el que se encuentra la enfermedad; o de carácter pronóstico, facilitando información de la evolución del paciente a lo largo del tiempo.

Gracias a estos biomarcadores la medicina se ha vuelto mucho más precisa en el tratamiento de muchas enfermedades, por lo que la investigación de nuevos métodos para detectar estos marcadores biológicos ha tenido una gran relevancia en los últimos años. El desarrollo de sistemas de detección de enfermedades ha provocado que la detección de biomarcadores sea cada vez más sensible y específica.

Los sistemas empleados en la detección de moléculas biológicas se denominan **biosensores**. Estos biosensores pueden tener anclados multitud de moléculas de diferente composición, las cuales actúan como receptores biológicos capaces de unirse a la molécula objetivo. Además, el transductor encargado de transformar dicha unión en una señal también puede variar dependiendo de la naturaleza física de la señal, existiendo infinidad de biosensores diferentes empleados tanto comercialmente como en investigación.

Esta tesis comenzó a la par que se declaraba la pandemia de la COVID-19 en marzo de 2020. Esta pandemia es derivada por de la enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2, la cual supuso millones de muertes en todo el mundo. Debido al desbordamiento del sistema sanitario fue necesario el desarrollo de kits de diagnóstico para la detección de la enfermedad de forma precisa.

Otros dos de los retos a los que se enfrenta la comunidad científica en el siglo XXI son el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Por un lado, estas últimas son una de las principales causas de discapacidad entre las personas de mayor edad en el mundo, un ejemplo es la enfermedad de Alzheimer, siendo la forma más común de demencia. Por otro lado, las enfermedades neoplásicas son responsables de millones de muertes al año, siendo la principal causa de muerte en el mundo, pudiendo afectar a personas de cualquier rango de edad.

Por estos motivos, la **principal motivación** de esta tesis es desarrollar un **kit de diagnóstico** capaz de ser adaptado a diferentes enfermedades para el análisis de diversos biomarcadores mediante estos sistemas de detección *in vitro*. Para ello se emplearán biosensores ópticos interferómetros, cuya señal puede ser potenciada mediante el empleo de **nanopartículas**, optimizando la sensibilidad y especificidad del biosensor. Concretamente, este kit de diagnóstico será empleado en la detección de biomarcadores específicos de la COVID-19 y la enfermedad de Alzheimer.

Como objetivo final se propone estudiar las enfermedades neoplásicas mediante el empleo de la tecnología ***Organ-on-a-chip***, gracias a la cual se podrá evaluar estas enfermedades mediante técnicas de imagen. Además, se plantea utilizar los kits de diagnóstico desarrollados para la detección de biomarcadores relacionados con el cáncer de colon en el medio de cultivo.

1.1. Objetivos

Los objetivos principales de la tesis a conseguir son:

- Desarrollar **kits de diagnóstico** multiplexados que detecten **biomarcadores de COVID-19** en el suero obtenido de pacientes, y que también permitan el seguimiento de biomarcadores en saliva de voluntarios durante tres meses.
- Adaptar los kits de diagnóstico para poder detectar **biomarcadores específicos de la enfermedad de Alzheimer**.
- **Optimizar** la sensibilidad de los kits de diagnóstico mediante el empleo de **nanopartículas**, una vez se haya estandarizado un modelo de ensayo para la detección de un biomarcador de Alzheimer.
- Diseñar un **chip microfluídico** empleando la tecnología *Organ-on-a-chip* del Grupo de Óptica, Fotónica y Biofotónica, capaz de albergar muestras derivadas de **cáncer de colon**. En consecuencia, desarrollar así un modelo de cáncer de colon funcional en el que poder medir **biomarcadores** en kits de diagnóstico que permitan ayudar a analizar el desarrollo de la patología.
- Implementar un método de **caracterización del modelo de cáncer de colon** para relacionar lo observado en estos chips microfluídicos con los biomarcadores detectados mediante el empleo de nanopartículas.

1.2. Estructura general

La tesis se divide en tres bloques principales, precedidos por esta introducción y sucedidos por los apartados de conclusiones y líneas futuras de investigación.

Los tres bloques principales son:

- A. **Estado de cuestión.** Esta tesis se basa en tres pilares fundamentales: el diseño de un kit de diagnóstico, la optimización de este mediante el empleo de nanopartículas, y el empleo de estas dos técnicas en la tecnología *Organ-on-a-chip* para el desarrollo de un modelo de enfermedad novedoso. Por ello, en este apartado se sientan las bases de estos pilares, describiendo los principales conceptos relacionados con los biosensores, y más en profundidad los biosensores ópticos interferométricos; también se detalla en qué consisten las nanopartículas y los métodos empleados en su caracterización; y para finalizar se describen los principales modelos de enfermedad y se presenta la tecnología *Organ-on-a-chip*.
- B. **Materiales y métodos.** Se describen las técnicas de fabricación de kits de diagnósticos basados en biosensores ópticos interferómetros presentados en el estado de la cuestión; además de la síntesis, funcionalización y caracterización de las nanopartículas propuestas para la optimización de estos biosensores. Seguidamente, se describen las tres patologías que serán estudiadas durante el transcurso de la tesis, centrándose en los biomarcadores característicos de estas enfermedades que serán detectados en los kits de diagnóstico. Finalmente, se describe la fabricación de los chips microfluídicos empleados en la tecnología *Organ-on-a-chip* para el análisis de biomarcadores.
- C. **Resultados.** En este apartado se presentan y se discuten los resultados obtenidos en la detección de biomarcadores mediante kits de diagnóstico en las tres patologías propuestas: COVID-19, enfermedad de Alzheimer y cáncer colorrectal. Además, se compara la sensibilidad alcanzada en estos kits mediante el empleo de nanopartículas frente a un inmunoensayo estándar. Para finalizar se propone un modelo de seguimiento de enfermedad basado en el desarrollo de organoides cultivados gracias a la tecnología *Organ-on-a-chip*, cuyos biomarcadores se analizan gracias al empleo de estos kits de diagnóstico y nanopartículas de oro.

2. Estado de la cuestión

2.1. Biosensores

Un **biosensor** es aquel dispositivo que permite la conversión de una reacción biológica o química en una señal medible, permitiendo detectar la presencia del analito deseado (Bhalla et al., 2016). Gracias a estos dispositivos el ser humano ha sido capaz de medir y detectar multitud de analitos. En este sentido, se ha adaptado cada biosensor a una utilidad específica gracias a los avances que han podido ser implementados sobre ellos debido a la evolución en campos tan diversos como la medicina, la biotecnología, la nanotecnología o la electrónica.

Un biosensor se conforma de tres componentes (Bhalla et al., 2016; Monošík et al., 2012): un biorreceptor, un transductor y un detector.

- El **biorreceptor** es la molécula encargada de reconocer específicamente el analito deseado, provocando un cambio fisicoquímico que puede ser medido.
- El **transductor** es el componente que transforma el cambio producido durante el reconocimiento en una señal cuantificable.
- El **detector** se encarga de procesar las señales recibidas del transductor y transformarlas en información que puede ser analizada.

La Figura 1 muestra de manera esquemática las partes principales de un biosensor, más concretamente el biosensor que será el objeto principal de esta tesis: un biosensor con un anticuerpo como biorreceptor y con un transductor fotónico.

Dependiendo de la naturaleza del biorreceptor existen diferentes tipos de biosensores, pudiendo diferenciarse los biosensores que emplean anticuerpos como biorreceptores como uno de los tipos más empleados. Asimismo, existen diferentes biosensores dependiendo del transductor utilizado, ya que hay una gran variedad de propiedades que pueden ser utilizadas como señales al observarse un cambio durante la detección de un analito.

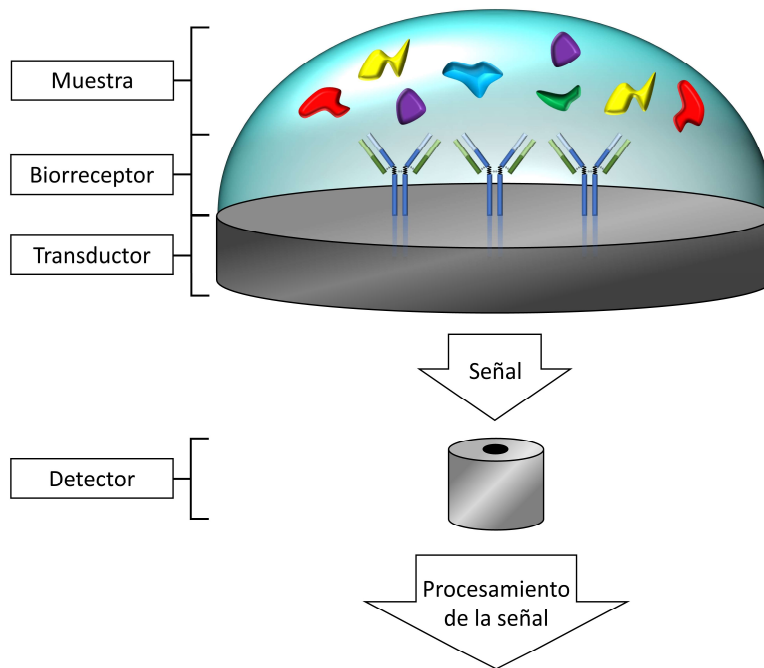


Figura 1. Esquema de las diferentes partes de un biosensor.

La característica principal de un biosensor es la **selectividad**, es decir, cuánto es capaz de distinguir el analito deseado entre el resto de moléculas o sustancias que pudieran interferir en la medida (Bhalla et al., 2016; *Vocabulario Internacional de Metrología*, 2012). Otras características importantes a tener en cuenta en los biosensores son:

- **Sensibilidad:** se establece como la relación entre la variación de la señal del biosensor con respecto a la variación de la magnitud detectada por parte del biosensor (Bhalla et al., 2016; *Vocabulario Internacional de Metrología*, 2012).
- **Resolución:** se refiere al cambio mínimo de la magnitud de medida apreciado en la escala que provoca una variación perceptible en el valor medido por parte del dispositivo (Bhalla et al., 2016; *Vocabulario Internacional de Metrología*, 2012).
- **Reproducibilidad:** consiste en la obtención de resultados muy similares o idénticos ante la repetición de la medida o del ensayo, proporcionando información de la fiabilidad del biosensor (Bhalla et al., 2016; *Vocabulario Internacional de Metrología*, 2012).

- **Exactitud:** indica cómo de cerca se encuentra la medida realizada por el biosensor del valor real de la muestra medida (Bhalla et al., 2016; *Vocabulario Internacional de Metrología*, 2012).
- **Estabilidad:** cómo de susceptibles son las medidas ante perturbaciones externas en el dispositivo de medida (Bhalla et al., 2016; *Vocabulario Internacional de Metrología*, 2012).
- **Límite de Detección** o LoD (por su nombre en inglés *Limit of Detection*): indica el cambio mínimo de cantidad o concentración de analito que un sistema puede detectar (Lavín et al., 2018; *Vocabulario Internacional de Metrología*, 2012).

2.1.1. Tipos de biosensores

Debido al avance de la biomedicina, la tecnología relacionada con los biosensores ha experimentado un gran desarrollo, produciéndose un aumento en la diversidad de biosensores empleados, ajustándose a las distintas necesidades de la industria. Esta realidad ha podido observarse durante la pandemia por COVID-19 y la inmediata aparición de biosensores específicos como las pruebas de antígenos.

Existen diferentes formas de clasificar los biosensores, como por ejemplo la que distingue entre aquellos biosensores que utilizan una molécula marcada (*label-based*) o los que no precisan de ella (*label-free*) (Pioz et al., 2022). Otro ejemplo de clasificación es la que tiene en cuenta el biorreceptor empleado (Monošík et al., 2012), que pueden variar desde células completas a moléculas como los aptámeros o las proteínas, entre las que se distinguen las enzimas con actividad catalítica de los anticuerpos con afinidad por el analito. Sin embargo, en lo referente a esta tesis vamos a emplear la clasificación según el tipo de transductor utilizado (Karunakaran et al., 2015; Mehrotra, 2016; Monošík et al., 2012).

- **Electroquímico.** En este tipo de biosensores la unión entre el analito y el componente biológico del biosensor desencadena una reacción química que produce un cambio en las propiedades electroquímicas del transductor, convirtiendo este reconocimiento en una señal eléctrica. Dependiendo de la propiedad que se vea afectada, se puede diferenciar entre biosensores conductimétricos (detectan cambios en la conductividad), potenciométricos (detectan cambios en el potencial), amperométricos (detectan cambios en la corriente) e impedimétricos (detectan cambios en la impedancia).

- **Óptico.** En un biosensor óptico se detectan cambios en las propiedades ópticas del sistema al producirse el reconocimiento por parte del biorreceptor con el analito objetivo. Se pueden observar variaciones en la absorción, en la dispersión, en el índice de refracción o en la fluorescencia.
- **Piezoeléctrico.** Un biosensor piezoeléctrico se basa en la detección de cambios en la frecuencia de resonancia mecánica en el cristal donde se encuentran fijados los biorreceptores una vez se produce el reconocimiento. Esto se debe al cambio en la masa efectiva debido a la unión del analito con el biorreceptor bajo la influencia de un campo eléctrico alterno externo.
- **Termométrico.** Los transductores termométricos detectan cambios de temperatura asociados a las reacciones bioquímicas producidas entre el analito y el biorreceptor.
- **Magnético.** En este tipo de biosensores, por lo general, se recubren nanopartículas magnéticas con las moléculas encargadas del reconocimiento, que, bajo un campo magnético externo, podrá observarse cambios en sus propiedades magnéticas provocados por la presencia del analito a detectar.

2.1.2. Biosensores Ópticos

Los biosensores ópticos necesitan una fuente de luz, puesto que se basan en la detección de cambios en las **propiedades ópticas** del sistema (Lakshmipriya & Gopinath, 2018). A continuación, se desarrollarán algunos de los biosensores ópticos más empleados.

2.1.2.1. Biosensores basados en el Plasmón de Resonancia Superficial

Los biosensores basados en el Plasmón de Resonancia Superficial (SPR, por sus siglas en inglés *Surface Plasmon Resonance*) permiten realizar medidas muy precisas gracias al empleo de una superficie metálica sobre la que se incide luz con un ángulo de incidencia determinado o a una longitud de onda determinada (Figura 2).

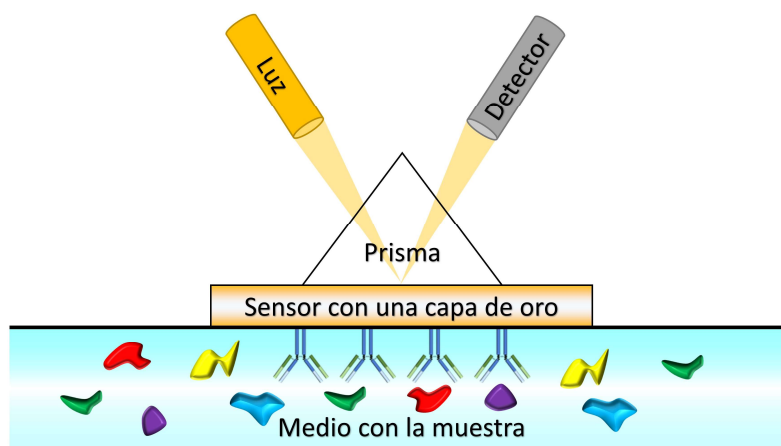


Figura 2. Esquema de un biosensor SPR.

En la interfase entre la superficie metálica y un material dieléctrico (en este caso la solución con el analito en contacto con el biorreceptor) se produce un efecto denominado onda de plasmón superficial, en el cual una onda oscilante de densidad de electrones se propaga por dicha interfase. Esta onda es detectable como una caída en la intensidad de luz reflejada en las condiciones específicas antes nombradas. Este efecto es muy sensible a cambios en el índice de refracción en la interfaz de la capa metálica con el material dieléctrico. Por ello se utiliza para detectar el analito de interés, ya que en presencia de este se podrá observar un desplazamiento de la caída de la intensidad de luz reflejada (Singh et al., 2023).

2.1.2.2. Biosensores basados en fibra óptica

Los biosensores basados en fibra óptica presentan una fibra que consta de dos partes, el revestimiento y el núcleo (Singh et al., 2023). En un punto de la fibra el núcleo no tiene revestimiento o se ha reducido; en cambio, se han unido a él los biorreceptores encargados de reconocer el analito (Figura 3). Al transmitirse la luz a través de la fibra, en este punto descubierto se aprovecha la interacción del campo evanescente con el analito para detectar su presencia observándose un cambio en una propiedad óptica concreta. Existen multitud de configuraciones diferentes en el diseño de estos biosensores para la detección de moléculas.

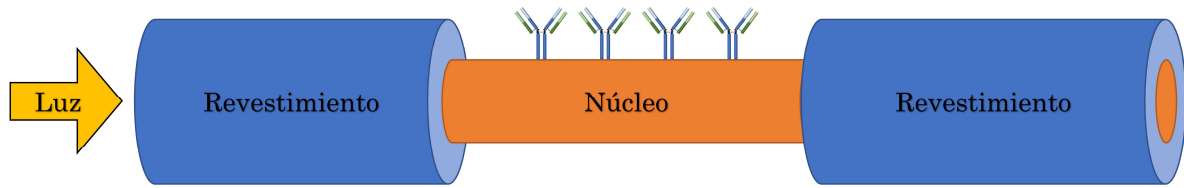


Figura 3. Esquema de un biosensor basado en fibra.

2.1.2.3. Biosensores interferométricos

Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo de esta tesis es la optimización de un biosensor basado en un transductor óptico de interferencia. Este tipo de biosensores aprovechan un **patrón de interferencia** para detectar un analito, dicho patrón se crea cuando dos ondas electromagnéticas polarizadas se acoplan (Ramirez et al., 2022). Esto ocurre gracias a que una de estas ondas es la onda de referencia, en cuya trayectoria no existe ninguna modificación, y la otra onda viaja por una trayectoria en la que se encuentra biofuncionalizado el biorreceptor (González-Guerrero et al., 2016). La presencia del analito en la muestra provocará una alteración en las propiedades de esta onda (en concreto en la fase de la onda), que, al acoplarse a la onda de referencia, producirá una interferencia constructiva o destructiva que podrá ser medida para confirmar o no la existencia del analito en la solución.

Existen multitud de biosensores basados en interferometría, pudiendo clasificarlos en biosensores interrogados verticalmente o interrogados horizontalmente.

Un ejemplo de biosensor interferométrico interrogado **horizontalmente** es el interferómetro de Mach-Zender (Sinjab et al., 2019). En este biosensor, una guía de onda se bifurca en dos ramas de una misma longitud que vuelven a confluir, en esta confluencia se realiza la medida de la intensidad de luz (Figura 4). En el caso de que el analito no esté presente la interferencia será constructiva y la señal será máxima; en cambio, si el analito está presente, la intensidad medida al final será menor conforme mayor sea la concentración de este.

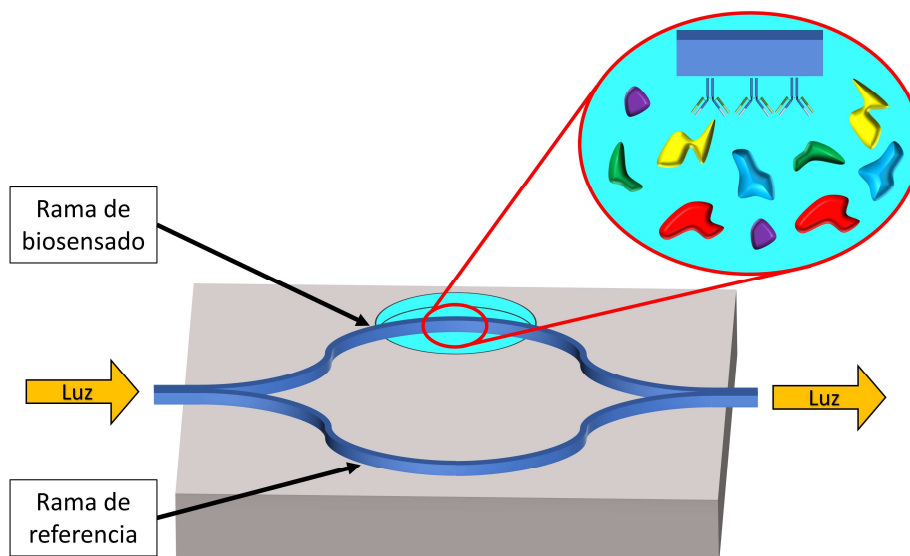


Figura 4. Biosensor interferométrico interrogado horizontalmente. Se observa ampliado la zona donde se encuentra la muestra y los biorreceptores.

Por otro lado, un ejemplo de biosensor interferométrico interrogado **verticalmente** es el interferómetro Fabry-Pérot.

2.1.2.3.1 Fabry-Pérot

El interferómetro de Fabry-Pérot se caracteriza por ser un biosensor muy simple que no necesita tener una configuración determinada como ocurre con otro tipo de biosensores ópticos horizontales. Estos últimos necesitan un procedimiento muy complejo para que el acoplamiento de las dos ondas de luz sea óptimo. Sin embargo, el interferómetro de Fabry-Pérot solo necesita que la fuente de luz incida sobre el sensor en un ángulo determinado y que se detecte la luz transmitida o reflejada.

Este tipo de biosensor consiste en una cámara con dos superficies paralelas reflectantes (Figura 5). Si se proyecta sobre este tipo de estructuras un haz de luz con un ángulo de incidencia determinado, parte de este haz será reflejado en la primera superficie, y otra parte del haz atravesará la cámara y se reflejará en la segunda superficie; la luz reflejada podrá ser medida a través de un fotodetector. Debido a las trayectorias divergentes en las dos partes del haz anteriormente mencionadas, se producirá un patrón de interferencia determinado por el **ángulo de incidencia** y por la **distancia** entre las dos superficies reflectantes. Estos picos de resonancia serán observables en un espectro de transmisión en función de la longitud de onda (Islam et al., 2014).

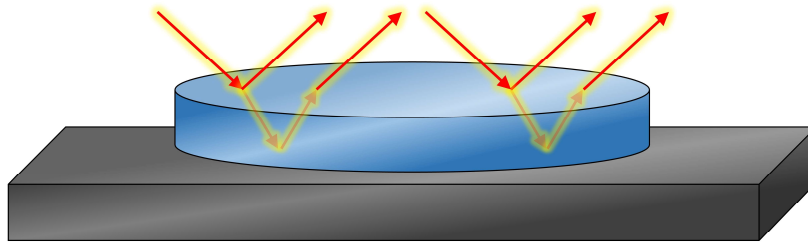


Figura 5. Interferómetro de Fabry-Pérot.

Estos interferómetros pueden ser empleados como biosensores ya que al inmovilizar sobre ellos los biorreceptores se podrá observar un cambio en el espectro de transmisión si se ha producido el reconocimiento del analito, puesto que la capa dieléctrica habrá aumentado de tamaño y el índice de reflexión también cambiará. En este sentido, el **desplazamiento** del pico de resonancia puede relacionarse con la concentración de analito presente en la muestra.

2.1.2.3.2 BICELLS

El biosensor que ha sido empleado en esta tesis, y que está basado en un interferómetro de Fabry-Pérot, se denomina **BICELL** (por el nombre en inglés *Biophotonic Sensing Cell*). Este biosensor fue diseñado y patentado por el Grupo de Óptica, Fotónica y Biofotónica (GOFB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) (Holgado et al., 2010). Este biosensor se diseñó para salvar algunas de las problemáticas comunes en los biosensores interferométricos, como el elevado coste de fabricación, ya que se fabrican a nivel de oblea, facilitando su escalabilidad y reduciendo costes; o la necesidad de implementar elementos adicionales para el acoplamiento de la luz, puesto que son interrogados verticalmente. Estas BICELLS pueden definirse como el área que conforma la estructura fotónica, y consisten en nanoestructuras que forman una red periódica, permitiendo tener una matriz de nanosensores en vez de un único lugar de biosensado.

La primera propuesta de esta tecnología BICELL consistía en una red de micropilares resonantes. Seguidamente, posteriormente se reportó la producción de un entramado de nanopilares formados por un sustrato de SiO_2/Si sobre el que se depositaba resina SU-8, que permitió la inmovilización de una proteína y su posterior reconocimiento con un anticuerpo (López-Romero et al., 2010). Posteriormente, se diseñaron estructuras fotónicas más sencillas: estas BICELLS se basaron en un interferómetro Fabry-Pérot, que consistía en un sistema multicapa (Holgado et al., 2016).

Este tipo de biosensor ha sido utilizado en los últimos años en la detección de múltiples biomarcadores. Algunos ejemplos son las moléculas ANXA1, ANXA11, PRDX5, CST4, PLAA y S100A6, como biomarcadores de la enfermedad de ojo seco, o la proteína C reactiva (M. Laguna et al., 2015; M. F. Laguna et al., 2014, 2015; Santamaría et al., 2017, 2018). Teniendo en cuenta la trayectoria y las características de las BICELLS, se decide emplearlas en la detección de biomarcadores de COVID-19, enfermedad de Alzheimer y cáncer de colon, patologías escogidas para desarrollar esta tesis.

2.1.3. Inmunoensayos

Un **inmunoensayo** es el término aplicado a la técnica de biosensado que emplea la interacción existente entre **anticuerpo y antígeno** para la detección del analito de interés. Por tanto, se puede definir un inmunoensayo como aquella técnica capaz de detectar la concentración de una molécula mediante el empleo de un anticuerpo o de un antígeno.

2.1.3.1. Tipos de Inmunoensayos

En la literatura pueden encontrarse diferentes maneras de clasificar los inmunoensayos (Slagle & Ghosn, 1996). En esta tesis se ha seleccionado la clasificación según la **configuración del ensayo**, en la que se distinguen los inmunoensayos competitivos y los no competitivos.

- **Inmunoensayo no competitivo.** En este tipo de ensayos no existe esta competencia entre los antígenos (Slagle & Ghosn, 1996), por tanto, cuanto mayor sea la concentración del analito, mayor es la señal de medida (Figura 6). Pueden diferenciarse 3 tipos de ensayos:
 - **Inmunoensayo directo.** Este ensayo se basa en la inmovilización del anticuerpo en el biosensor, sobre el que posteriormente se incuba la muestra que presenta el antígeno a detectar.
 - **Inmunoensayo indirecto.** En este caso se inmoviliza el antígeno primero, seguidamente se incuba la muestra con el anticuerpo, el cual es el analito que se persigue detectar en este ensayo.
 - **Inmunoensayo tipo Sándwich.** Este tipo de ensayo se caracteriza por el empleo de dos anticuerpos monoclonales. El primer anticuerpo se inmoviliza en el biosensor, tras lo cual se incuba la muestra que contiene el antígeno a detectar. Posteriormente, se emplea el segundo

anticuerpo, que reconoce una zona diferente del antígeno que se encuentra unido al primer anticuerpo. Este segundo anticuerpo se utiliza para revelar o amplificar la señal que por sí mismo el antígeno no permite que sea detectable.

- **Inmunoensayo competitivo.** Este tipo de ensayo se basa en utilizar dos muestras diferentes: una muestra con el antígeno a detectar y otra muestra de antígeno con concentración conocida (Slagle & Ghosn, 1996). Estas dos muestras compiten por los lugares de reconocimiento de los anticuerpos, por lo que la primera muestra se mezcla con el anticuerpo específico, y así posteriormente se utiliza este anticuerpo para reconocer la muestra de concentración conocida (Figura 6). Generalmente la muestra conocida de antígeno es la que dará una señal máxima, por lo que, si existe una concentración mayor de antígeno en la muestra a detectar, la señal cuantificada es más baja. Esta técnica permite discernir concentraciones muy bajas de antígeno, por lo que en este tipo de ensayos la sensibilidad es mucho mayor.

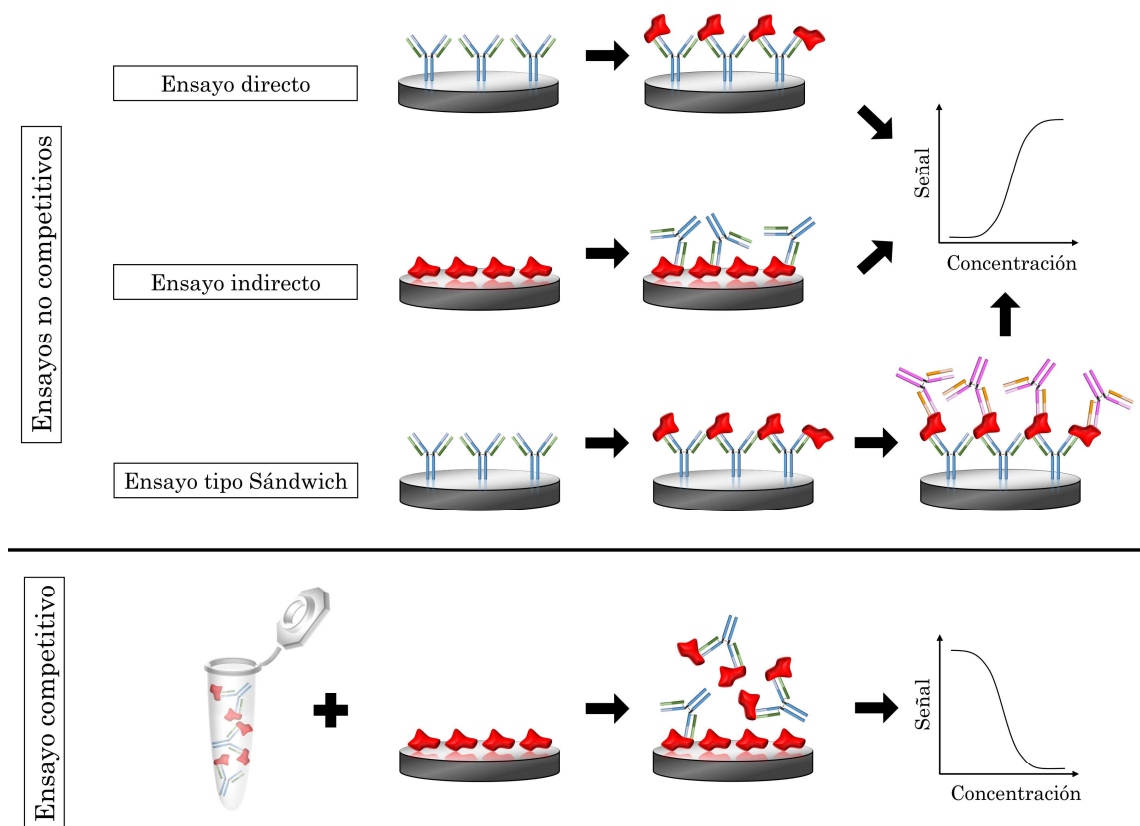


Figura 6. Tipos de inmunoensayos según su configuración. En la parte superior se pueden observar tres tipos de ensayos no competitivos: directo, indirecto y tipo Sándwich. En la parte inferior se muestra un ensayo competitivo.

Cabe recordar otro tipo de clasificación, en la que se diferencian aquellos inmunoensayos que necesitan una molécula encargada de revelar el resultado (*label-based*), de aquellos que no necesitan de este tipo de molécula (*label-free*), simplificando así el ensayo.

El ejemplo más empleado de inmunoensayos que precisan de una molécula marcada es la técnica **ELISA** (siglas de su nombre en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). En esta técnica es necesario utilizar una enzima anclada al biorreceptor que reconoce el analito deseado (Hosseini et al., 2018). Estas enzimas pueden generar un producto perceptible mediante la detección de la intensidad de la luz transmitida, cuantificando mediante fluorescencia o espectrofotometría la transmisión de una determinada longitud de onda de luz.

En esta tesis se optimizan biosensores que no precisan de moléculas marcadas (*label-free*).

2.1.3.2. Anticuerpos

Como se explica al principio de este capítulo, existen diferentes moléculas capaces de actuar como biorreceptor, en este apartado vamos a realizar un especial énfasis en el caso de los anticuerpos.

Un **anticuerpo**, también denominado como inmunoglobulina (Ig), es una proteína de alta masa molecular (alrededor de 150 kDa), sintetizada por células del sistema inmune para la defensa del organismo (Graves et al., 2020). Más específicamente, tras una infección se produce la respuesta inmune, que consiste inicialmente en una respuesta inespecífica (inmunidad innata), seguida de una segunda respuesta específica (inmunidad adaptativa) (Smith & Germolec, 1999).

Toda aquella sustancia que es capaz de activar la respuesta inmunitaria se denomina **antígeno**, este es reconocido por las células que actúan durante la respuesta adaptativa. La región del antígeno reconocida específicamente por el anticuerpo se denomina **epítipo** (Chiu et al., 2019; Schroeder & Cavacini, 2010).

Las células encargadas de la producción de anticuerpos son las **células plasmáticas**, que proceden de la diferenciación celular de linfocitos tipo B. Los **linfocitos B** son células del sistema inmune que presentan un receptor en su superficie denominado BCR (por sus siglas en inglés *B Cell Receptor*). Este receptor está formado por una inmunoglobulina no secretable y se encarga de reconocer múltiples antígenos. Esta amplia capacidad de reconocimiento se debe a que durante el proceso de diferenciación celular a linfocito B, tiene lugar un proceso de recombinación génica,

en el cual se producen los cambios necesarios para la enorme variabilidad que muestran los anticuerpos frente a diversos antígenos (Smith & Germolec, 1999).

Una vez se produce el reconocimiento del antígeno por el BCR, el linfocito B se activa y se transforma en una célula plasmática capaz de producir y secretar grandes cantidades de anticuerpos específicos en el organismo (Smith & Germolec, 1999).

Una Ig tiene una estructura común que consta de cuatro cadenas polipeptídicas, idénticas dos a dos. Dos de ellas son **cadenas ligeras** idénticas y las otras dos son **cadenas pesadas** idénticas. Cada cadena ligera está unida covalentemente por puentes disulfuro a una cadena pesada diferente, a su vez, las cadenas pesadas están unidas entre sí por puentes disulfuro. Cada una de las cadenas tiene una región constante y otra variable (Graves et al., 2020; Schroeder & Cavacini, 2010).

Las cadenas ligeras, están formadas por un dominio variable (VL, del inglés *Variable Light domain*) y otro dominio constante (CL, del inglés *Constant Light domain*). Por otro lado, en las cadenas pesadas, existen 3 o 4 dominios constantes (CH, del inglés *Constant Heavy domain*) y un dominio variable (VH, del inglés *Variable Heavy domain*). En la **región variable** se encuentran tres segmentos hipervariables (Figura 7), denominados CDR (por sus siglas en inglés *Complementarity-Determining Regions*), los cuales son los encargados de reconocer el epítipo del antígeno, otorgando la especificidad a la inmunoglobulina (Chiu et al., 2019; Graves et al., 2020). El fragmento del anticuerpo que se une al antígeno se denomina región Fab (del inglés *Fragment antigen-binding*), mientras que a la otra región se la designa como Fc (fragmento cristalizante); el segmento que une estas dos regiones se le denomina región bisagra.

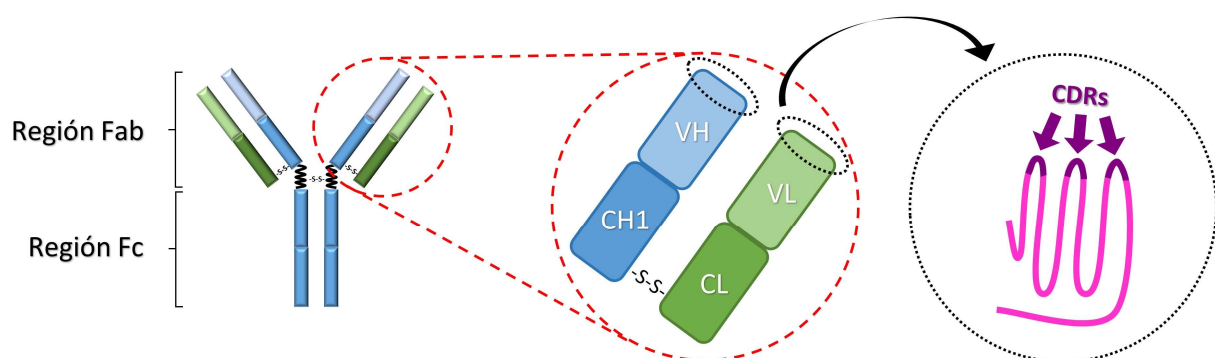


Figura 7. Estructura de una inmunoglobulina.

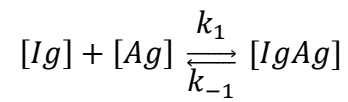
En el ser humano existen 5 isotipos diferentes de Igs (Chiu et al., 2019), debido a las diferencias en su región constante:

- **IgG**. Se trata del isotipo más abundante, y presenta cuatro subtipos diferentes. Este isotipo se encuentra siempre en forma **monomérica**, y participa en estadios más tardíos de la infección. Puede encontrarse en circulación en el torrente sanguíneo.
- **IgE**. Se encuentra en concentraciones muy bajas en el suero en forma de monómero. Se caracteriza por mediar las reacciones de hipersensibilidad, como por ejemplo la alergia, aunque también media la reacción a ciertos parásitos.
- **IgD**. Este isotipo no se encuentra en secreción ya que solo se expresa en la membrana celular de los linfocitos B, siendo el encargado del reconocimiento del antígeno.
- **IgA**. Se trata de un isotipo que generalmente se encuentra formando dímeros, y se encarga de la defensa inmune en las mucosas del organismo.
- **IgM**. Este isotipo se caracteriza por su secreción en forma pentamérica, participando en estadios más tempranos de la infección.

2.1.3.3. Interacción anticuerpo-antígeno

Como hemos visto, la respuesta del sistema inmune adaptativo se genera debido a la interacción de un Ig con un antígeno (Ag). Esta unión, que sucede entre la región Fab del anticuerpo y el epítipo del antígeno, está mediada por interacciones moleculares **no covalentes**, como son los puentes de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals, los enlaces iónicos o las interacciones hidrofóbicas. Estas uniones no son tan resistentes, por lo que esta interacción puede verse afectada por diferentes factores a tener en cuenta a la hora de realizar un inmunoensayo, entre los que destacan el pH, la temperatura o la fuerza iónica.

Para estudiar dicha interacción (IgAg), el parámetro más utilizado es la **constante de disociación** (Kd), la cual describe la **afinidad** de la unión analito-biorreceptor: a menor Kd, mayor será la afinidad de la unión. Esta propiedad ofrece información sobre el proceso de unión, la cinética y el equilibrio que se forma en la solución (Azimzadeh & Van Regenmortel, 1990). Para calcular la constante de disociación es necesario plantear el equilibrio de la reacción:



En este equilibrio existen la constante cinética de asociación (k_1) del anticuerpo con el antígeno y la constante de disociación cinética del complejo (k_{-1}). Una vez establecido este equilibrio la constante de disociación se puede calcular como:

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[Ig][Ag]}{[IgAg]}$$

2.2. Nanopartículas

Una **nanopartícula** (NP) tiene como característica principal que todas sus dimensiones se encuentran en una escala nanométrica, es decir, la longitud de sus tres ejes se encuentra entre 1 y 100 nm. En el caso de que uno de sus ejes difiera significativamente de los otros dos en más de 3 órdenes de magnitud, se catalogaría como nanofibra (Joudeh & Linke, 2022).

Existen multitud de nanopartículas diferentes, ya que estas pueden variar en tamaño, composición o forma. En este sentido, existen nanopartículas cilíndricas, en forma de estrella, o esféricas, como las que son empleadas en esta tesis. A pesar de esta diversidad, la mayoría de estas nanopartículas se ven influenciadas por el **movimiento browniano** debido a su pequeño tamaño. Este movimiento se define como el movimiento aleatorio que experimenta una partícula que se encuentra suspendida en un fluido.

Otra característica a destacar es que estas nanopartículas pueden ser uniformes o constar de varias capas, en función del propósito y objetivo perseguido se pueden añadir estas capas a la nanopartícula (Joudeh & Linke, 2022). En el caso de que una NP posea varias capas se pueden distinguir:

- Núcleo. Es la parte central de la nanopartícula.
- Capa exterior. Esta capa presenta propiedades químicas diferentes al núcleo.
- Capa superficial. En esta capa se encuentran las moléculas que están en contacto con la solución, como pueden ser polímeros o proteínas.

2.2.1. Tipos de nanopartículas

Según la composición de la nanopartícula pueden diferenciarse dos grupos principales (Figura 8) (Joudeh & Linke, 2022):

- **Orgánicas.** Este tipo de NPs están compuestas de lípidos, proteínas u otros compuestos orgánicos. Por ello, generalmente presentan interacciones intermoleculares, las cuales son no covalentes, permitiendo que este tipo de NPs sean más lábiles. Algunos ejemplos de este tipo de NPs son los

liposomas o las micelas, ambos son empleados en técnicas de administración de fármacos.

- **Inorgánicas.** Estas NPs no están formadas por compuestos orgánicos, esto implica una mayor diversidad y que sus uniones son más rígidas. Algunos tipos de NPs inorgánicas son las nanopartículas metálicas, nanopartículas de sílice mesoporosas o nanopartículas de óxido de hierro. Debido a la multitud de tipos y propiedades que estas poseen, son empleadas en diversas aplicaciones en biomedicina.

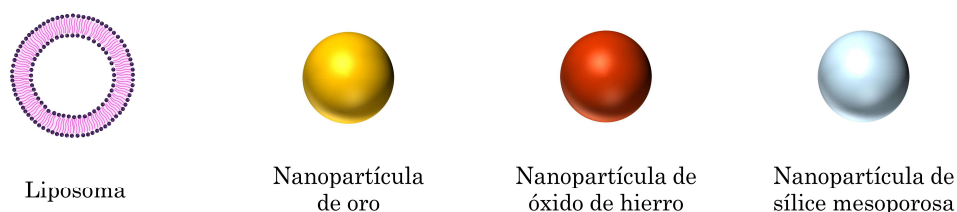


Figura 8. Ejemplos de nanopartículas orgánicas e inorgánicas metálicas, de óxido de hierro y mesoporosas.

2.2.2. Empleo de nanopartículas en biosensores

Una de las múltiples aplicaciones en las que pueden ser empleadas las nanopartículas inorgánicas son los sistemas de biosensado (Ramesh et al., 2016). Dependiendo del tipo de nanopartícula y de sus características fisicoquímicas se determina en qué biosensor puede ser utilizada (Howes et al., 2014).

Debido a la posibilidad de manipular la superficie de una NP, las nanopartículas se emplean generalmente en sistemas de detección como una herramienta para la purificación de muestras con concentraciones muy bajas del analito deseado.

Un ejemplo concreto de esta utilidad son las nanopartículas de óxido de hierro, las cuales gracias a sus propiedades magnéticas (también denominadas **nanopartículas magnéticas** o MNPs) son empleadas en los sensores magnéticos (Dadfar et al., 2020), ya que estos biosensores pueden medir cambios en las propiedades magnéticas, como se explica en la sección 2.1.2.

Otro ejemplo es el empleo de nanopartículas metálicas para la optimización de los sistemas de detección ópticos debido a sus propiedades ópticas (Ghasemi et al., 2018). En el caso de las **nanopartículas de oro**, por ejemplo, su uso se debe al fenómeno del plasmón de resonancia superficial que son capaces de desencadenar, aumentando la sensibilidad y amplificando la señal de detección en multitud de sensores (Fan et al., 2020).

Tanto las nanopartículas magnéticas como las nanopartículas de oro (AuNPs) son empleadas durante el desarrollo de esta tesis para la optimización de los biosensores interferométricos descritos en la sección 2.1.2.3.2.

2.2.3. Caracterización de nanopartículas

Para optimizar los protocolos de fabricación, funcionalización y biofuncionalización de nanopartículas es necesario caracterizar las nanopartículas en cada paso del proceso. La caracterización de las nanopartículas actúa como **control de calidad** de cada paso permitiendo observar variaciones de tamaño, carga superficial, forma, etc., y detectando desviaciones no deseadas, como puede ser la agregación de las nanopartículas durante el proceso.

Existen multitud de técnicas que permiten determinar las diferentes características de las nanopartículas (Mourdikoudis et al., 2018). En este sentido, el empleo de **microscopía electrónica de barrido** (SEM, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscope*) o la microscopia electrónica de transmisión permiten observar el tamaño aproximado de la nanopartícula. La **espectrofotometría** permite calcular la concentración y el tamaño de nanopartículas de oro aproximados. La **dispersión dinámica de la luz** (DLS, por sus siglas en inglés *Dynamic Light Scattering*) permite establecer el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas, y, combinando esta técnica con la electroforesis puede medirse su **potencial zeta**.

A continuación, se detalla cómo las principales técnicas de caracterización empleadas en esta tesis permiten hallar las propiedades de las nanopartículas.

2.2.3.1. Microscopía electrónica de barrido

Una estrategia para caracterizar nanopartículas es el empleo del **microscopio electrónico de barrido**, capaz de obtener imágenes de una superficie con una resolución muy alta (Modena et al., 2019).

Este microscopio utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz como otro tipo de microscopios. Este haz de electrones es acelerado mediante un campo eléctrico; cuanto más se acelera, más energía tiene y más penetra en la muestra. Seguidamente pasa por unas lentes condensadoras, que reducen el diámetro del haz, y por una lente objetivo, en la cual habrá unas bobinas deflectoras, que permite barrer la muestra punto por punto obteniendo una imagen.

Una vez el haz de electrones impacta sobre los átomos de la muestra, se producen múltiples señales (Figura 9), entre las que se encuentran: la reflexión de estos mismos electrones, denominados **BSE** (por sus siglas en inglés *BackScattered Electrons*), esta reflexión es debida a la dispersión elástica, en la cual no cambia la energía pero sí la dirección de estos; la emisión de **electrones secundarios** (SE, del nombre en inglés *Secondary Electrons*) por dispersión inelástica, en la cual sí cambia la energía de la partícula; la emisión de **rayos X**, debido a la energía liberada puesto que el haz arranca un electrón de la capa interna del átomo; entre otros. Se puede equipar el microscopio electrónico de barrido con un detector específico para cada tipo de emisión resultante, aun así, el más empleado es el detector de electrones secundarios (Mourdikoudis et al., 2018).

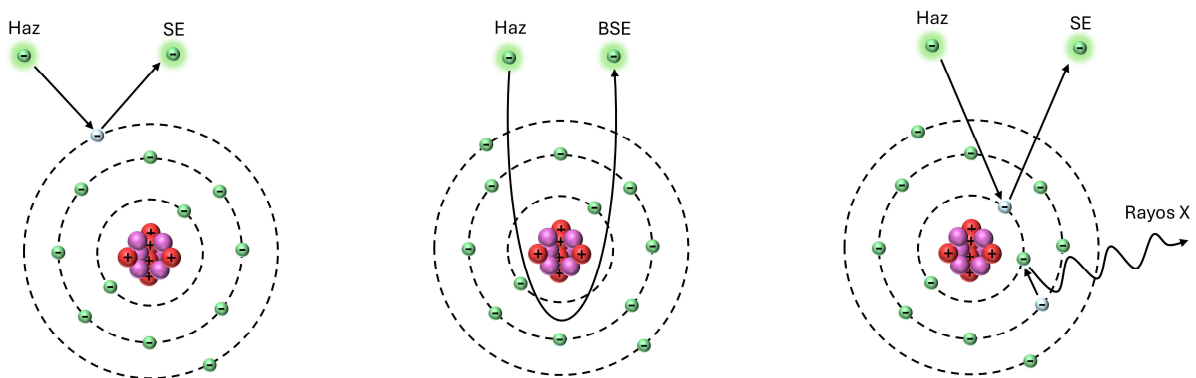


Figura 9. Tipos de emisiones detectadas por SEM. A la izquierda se puede observar cómo se genera un SE. En el centro se observa la reflexión de un BSE. En la derecha puede observarse la generación de rayos X.

2.2.3.2. Dispersión Dinámica de Luz

Otra técnica para caracterizar nanopartículas es la dispersión dinámica de la luz, que permite analizar la dispersión de la luz sobre una solución de nanopartículas para establecer el **tamaño hidrodinámico** que estas poseen (Uskoković, 2012).

Como se ha descrito previamente en este apartado, el movimiento aleatorio que experimenta una partícula que se encuentra suspendida en un fluido se denomina **movimiento Browniano**. Este fenómeno determina la difusión de las partículas esféricas de pequeño tamaño, como las nanopartículas, en un líquido con un número de Reynolds bajo (cuyo flujo es de carácter laminar). Este movimiento se define por el Coeficiente de Difusión (D) en la ecuación de Stokes-Einstein (Modena et al., 2019).

$$D = \frac{k \times T}{3 \times \pi \times \eta \times d_H}$$

Analizando el coeficiente de difusión mediante esta ecuación, se puede determinar el diámetro hidrodinámico (d_H) de las nanopartículas de una disolución. Para ello, se requiere conocer la viscosidad (η) y controlar la temperatura (T), puesto que la constante de Boltzmann está establecida (k).

De esta manera, la técnica DLS analiza la **variación de la intensidad de la luz** con el tiempo debida a la dispersión que provocan las partículas en disolución en movimiento. En función del **tamaño de la partícula**, estas se mueven a una **velocidad determinada**, provocando **cambios en la intensidad** de la luz con respecto al tiempo (Figura 10): a mayor tamaño más lentamente se mueven, produciéndose menos cambios en la intensidad de luz; por el contrario, a menor tamaño más rápidamente se mueven, provocando más cambios. Estas fluctuaciones temporales en la intensidad se analizan mediante una función de autocorrelación de la intensidad que permite obtener información sobre el diámetro hidrodinámico de las NPs (Uskoković, 2012).

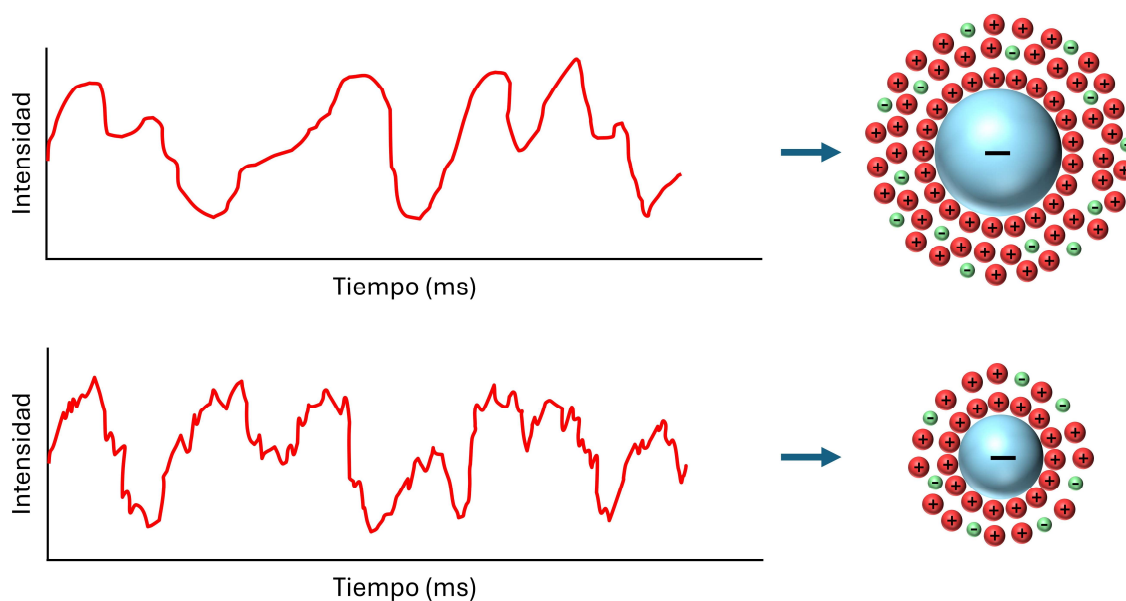


Figura 10. Análisis de la Dispersión Dinámica de Luz. A la izquierda se puede observar las gráficas que registran los cambios en la intensidad a lo largo del tiempo, a la derecha se puede observar el tamaño de la NP a la que corresponden estas gráficas.

2.2.3.3. Potencial Zeta

El **potencial zeta** (ζ) es una propiedad que tiene toda partícula en una solución coloidal. Esto se debe a la carga eléctrica que adquieren las partículas debido a la interacción que se produce entre la superficie de las partículas (con unas propiedades químicas determinadas), y la solución en la que se encuentran (con sus propias propiedades químicas). Esto implica que, cambiando las propiedades de la solución, cambiará el potencial zeta de las nanopartículas (Uskoković, 2012).

Esta propiedad se define como la diferencia de **potencial eléctrico** entre el medio de dispersión y el *slipping plane*, que se refiere a la interfase entre el medio de dispersión y la capa de iones del medio de dispersión que se encuentra adherida a la partícula monodispersa (Figura 11). Esta capa no debe confundirse con la capa de Stern, la cual se define como la capa de iones más cercana a la superficie de la partícula, teniendo un tamaño igual al diámetro de los iones.

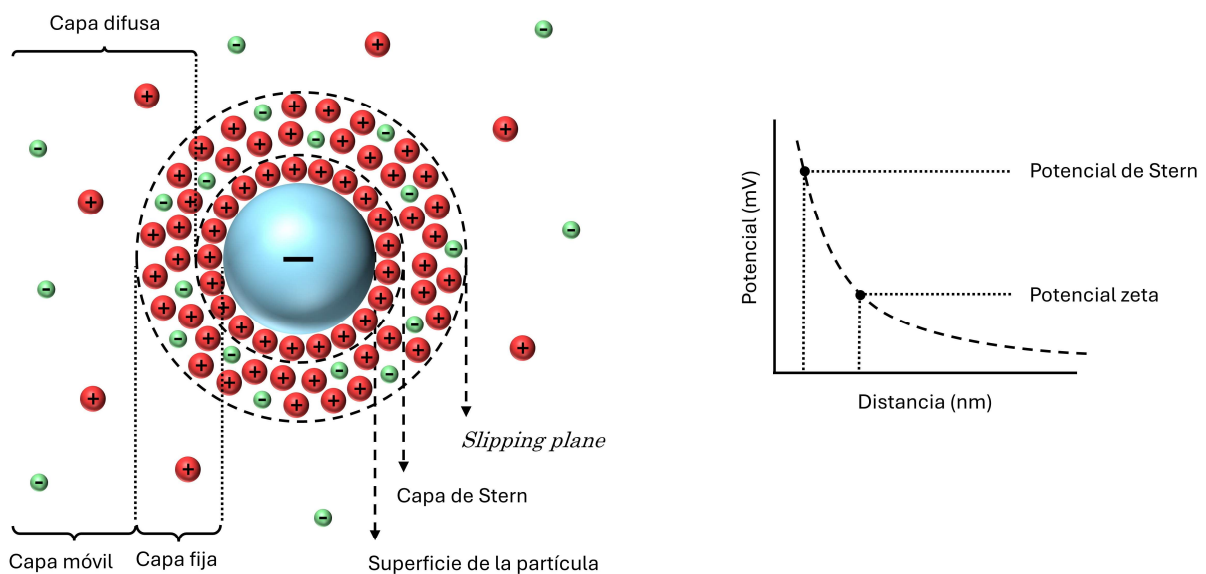


Figura 11. Capas iónicas de una nanopartícula. A la izquierda pueden observarse las diferentes capas que existen en la interacción nanopartícula-solución. A la derecha se encuentra una representación de como el potencial decae según se aleja de la superficie de la nanopartícula.

La medida del potencial zeta se utiliza para determinar la **estabilidad** de las nanopartículas en una solución, el valor de referencia para determinar que una solución de nanopartículas es electrostáticamente estable es ± 30 mV. Cuanto más se acerque el potencial zeta a 0 mV, es decir, al punto isoeléctrico de la nanopartícula, más inestable será la solución (Modena et al., 2019).

Para mejorar la estabilidad de las nanopartículas se pueden emplear varias técnicas, como por ejemplo variar el pH de la disolución o cambiar el buffer empleado. En cambio, si se aumenta la fuerza iónica de la disolución, el potencial zeta se aproxima al punto isoeléctrico, generando inestabilidad.

La teoría DLVO establece que la estabilidad de las partículas en una disolución depende de las **fuerzas de atracción** y las **fuerzas de repulsión**. En el caso de las NPs, las fuerzas de Van der Waals actúan como fuerzas de atracción entre las nanopartículas, mientras que las fuerzas electroestáticas, debidas a la capa doble eléctrica, se comportan como fuerzas de repulsión. La suma del potencial de ambas fuerzas se denomina **energía potencial** (Uskoković, 2012).

Para que la estabilidad de una suspensión de nanopartículas se vea comprometida se debe superar una barrera energética (zona sombreada de la Figura 12A). Es decir, es necesaria una cantidad de energía para desestabilizar una solución estable. Esta energía es capaz de reducir tanto la distancia entre las nanopartículas que el efecto de las fuerzas de Van der Waals es mayor que la repulsión electroestática. De esta manera, un aumento determinado de la velocidad de las nanopartículas permite superar la barrera energética. Por otro lado, un aumento considerable de la fuerza iónica en el medio provoca que la fuerza electroestática de la capa doble eléctrica disminuya, y como consecuencia tiene una menor influencia en la energía potencial, por lo que no es capaz de compensar las fuerzas de atracción de Van der Waals y la solución flocula (Figura 12B).

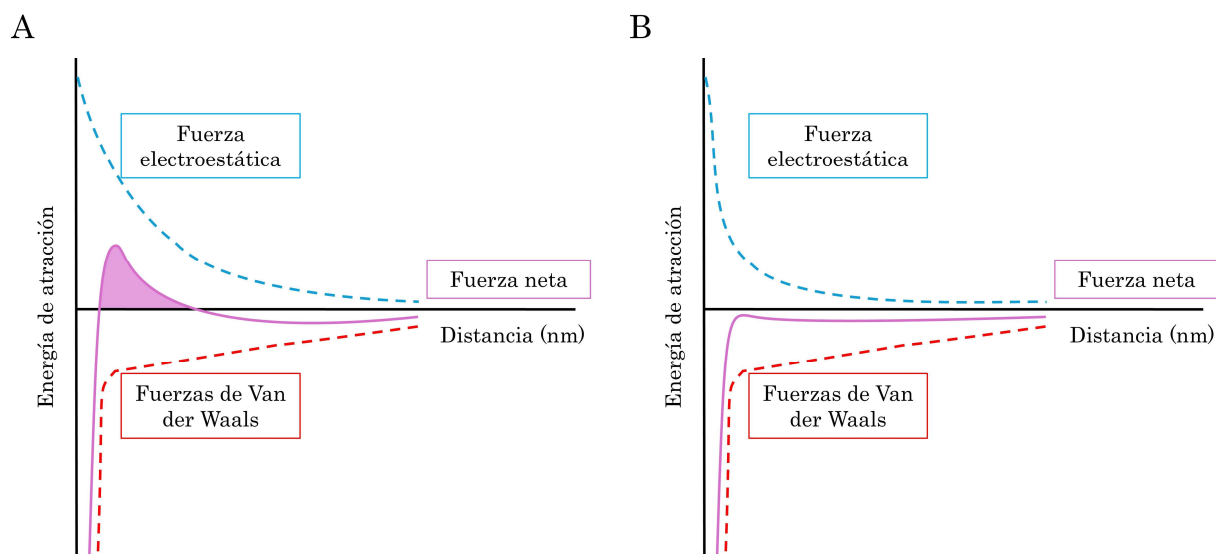


Figura 12. A) Relación fuerzas de atracción y fuerzas de repulsión de una solución estable, en sombreado se observa la barrera energética. B) Relación fuerzas de atracción y fuerzas de repulsión de una solución inestable.

2.2.3.4. Espectroscopía de absorción

La espectroscopía de absorción es una técnica que consiste en el paso de un haz de luz a través de una muestra con el fin de medir la intensidad de luz absorbida por la muestra. Esta técnica se basa en la ley de Lambert-Beer, que relaciona la cantidad de absorción de luz por parte de la muestra con la concentración de dicha muestra. Mediante la siguiente ecuación se obtiene el valor de absorbancia (A) conociendo la intensidad de la luz emitida (I_0) y la intensidad una vez ha incidido en la muestra (I).

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0}$$

Como puede observarse en la representación de la figura 13, a medida que aumenta la concentración de las nanopartículas el color de la solución se va oscureciendo, por lo que la absorción de luz será mayor.

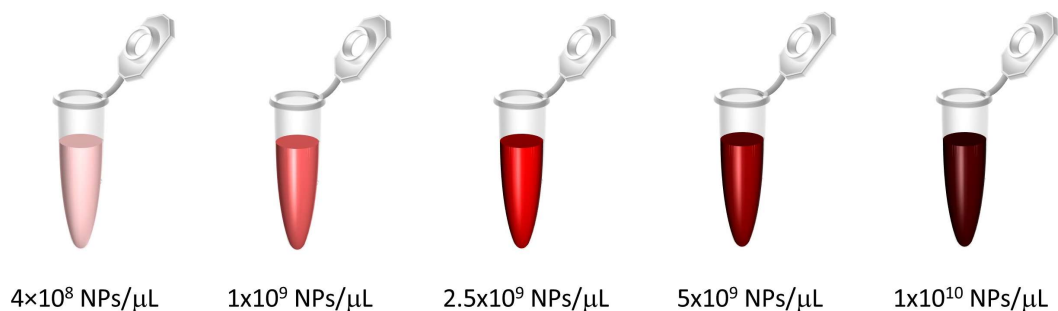


Figura 13. Variación del color de una solución de AuNPs en función de la concentración.

Esta técnica se emplea principalmente para caracterizar **nanopartículas de oro**, ya que se ha reportado que existe una relación entre la **concentración** de oro de la muestra con el valor de absorbancia a 400 nm (Scarabelli et al., 2013). Por ello se realiza un espectro de absorbancia en las regiones del espectro visible y UV (Figura 14), y se observa que la absorbancia varía de acuerdo con la longitud de onda. En este espectro, además de obtener información de la concentración de las nanopartículas de oro, se puede calcular el **tamaño** aproximado de estas, ya que existe una relación entre la absorbancia 450 nm y el pico máximo de absorción del espectro y el **diámetro** de las nanopartículas de oro de la solución (Haiss et al., 2015) (Figura 14).

2.3. Modelos de enfermedad

La investigación biomédica ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años en el estudio de enfermedades. Para ello se han ampliado los **modelos de enfermedades** humanas utilizados para el estudio y análisis de estas mismas con el fin de descubrir aproximaciones a nuevos tratamientos, empleando tanto modelos animales como modelos celulares *in vitro*. Un modelo de enfermedad consiste en la producción de un sistema que represente de manera **controlada** el comportamiento de la enfermedad.

Hasta ahora se han presentado diferentes métodos para la detección de analitos mediante el empleo de biosensores. Además, se han propuesto las nanopartículas como posible herramienta potenciadora de algunos métodos de biosensado. La detección de analitos puede ser empleada en numerosas aplicaciones como pueden ser la monitorización de procesos industriales, el control de contaminantes, tanto en el medio ambiente como en alimentación, o, en este caso, en la biomedicina.

Los biosensores se emplean en la investigación biomédica para la detección de biomarcadores diagnósticos de enfermedades concretas. Hoy en día se ha extendido el empleo de **biomarcadores** como predicción del desarrollo de una enfermedad, como por ejemplo la glucosa, uno de los marcadores más analizados en las analíticas que se realizan en el ámbito hospitalario, ya que niveles altos de este marcador implican la posibilidad de padecer diabetes.

En esta tesis se propone un sistema de detección *in vitro* que permite el estudio de biomarcadores en tres enfermedades que han supuesto y suponen un problema social: **COVID-19, enfermedad de Alzheimer y cáncer colorrectal**. A continuación, se presentan los tipos de modelos de enfermedades que pueden ser empleados para el estudio de estas enfermedades.

2.3.1. Tipos de modelos de enfermedades

Durante el estudio de una enfermedad, los modelos empleados se seleccionan en base a las ventajas e inconvenientes que poseen, es decir, según las condiciones fisiológicas que presentan. Generalmente los modelos de enfermedades se clasifican en modelos *in vivo* y modelos *in vitro* (Figura 15) (Loewa et al., 2023).

Los modelos de investigación *in vivo* se caracterizan por llevarse a cabo en organismos vivos; por el contrario, cuando la experimentación se lleva a cabo en un laboratorio, en células o tejidos procedentes de un organismo, estos modelos se denominan *in vitro*.

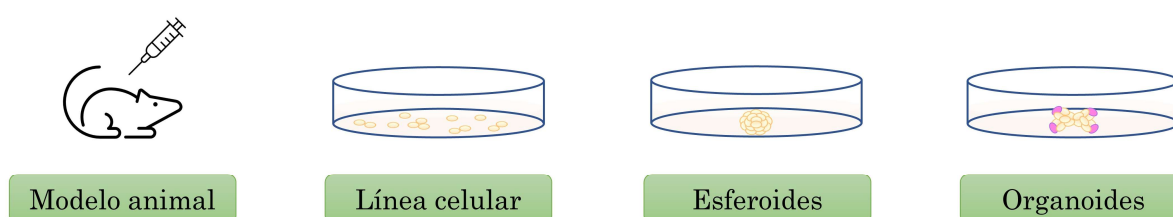


Figura 15. Ejemplos de modelos *in vivo*, *in vitro* 2D e *in vitro* 3D.

2.3.1.1. Modelos *in vivo*

La investigación *in vivo* emplea comúnmente **animales**, puesto que a través de ellos pueden observarse los efectos del estudio en el individuo. Durante años ha sido el principal método de estudio debido a su capacidad para replicar condiciones fisiológicas (Barré-Sinoussi & Montagutelli, 2015), no obstante, en los últimos años se han observado limitaciones en este tipo de modelos. En primer lugar, el planteamiento de anticuerpos como posibles fármacos, los cuales implican una gran especificidad hacia dianas de naturaleza humana, por lo que el estudio en animales no es de gran utilidad. Por otro lado, el estudio de enfermedades infecciosas se encuentra limitado en estos modelos, puesto que no todos los organismos son susceptibles a estas enfermedades. Por último, existen grandes discrepancias entre especies, como sucede en el estudio de enfermedades psiquiátricas, para las cuales es difícil encontrar modelos animales que las repliquen.

2.3.1.2. Modelos *in vitro*

Como se ha descrito previamente, los modelos *in vitro* se llevan a cabo en el laboratorio. En este sentido, el empleo de modelos derivados de humanos permite un mayor acercamiento a las condiciones e interacciones que ocurren en la fisiología de nuestra especie. Estos modelos pueden clasificarse en 2D o 3D.

- **Modelos *in vitro* 2D.** Se trata del segundo modelo más empleado hasta la fecha, en él, se emplean células derivadas de pacientes para estudiar una enfermedad concreta. Esta estrategia permite el estudio de los mecanismos patogénicos de enfermedades por lo que resulta de gran utilidad en las etapas iniciales del descubrimiento de nuevos fármacos. Los modelos *in vitro* 2D más empleados son las **líneas celulares inmortalizadas**, ya que permiten una gran disponibilidad debido a su gran proliferación. Seguidamente, las **células primarias** obtenidas directamente de un tejido vivo, que presentan mayor heterogeneidad, pero menor tasa replicativa. Finalmente, las **células madre pluripotentes inducidas** (iPSCs, por sus siglas en inglés *Induced pluripotent stem cells*), con una mayor tasa de proliferación y capaces de diferenciarse a linajes celulares variados (Loewa et al., 2023).
- **Modelos *in vitro* 3D.** Estos modelos surgen de la necesidad de superar las carencias que presentan los modelos 2D, ya que en ellos no se pueden replicar las **interacciones** existentes entre el entorno y las células próximas. Por ello, en este tipo de modelos se replica el **microambiente** en el cual las células pueden crecer e interactuar. Existen diferentes estructuras de modelos *in vitro* 3D:
 - **Esferoides.** Disponen de una matriz donde las células pueden crecer libremente, estas tienden a juntarse formando una esfera. Este tipo de modelo se puede emplear para cualquier tipo celular.
 - **Organoides.** Este sistema de cultivo tridimensional de células no solo presenta células próximas entre sí, si no que muestran diferenciación a distintos linajes celulares. Esto se consigue gracias al cultivo a partir de **células madre** adultas de tejidos primarios o de células madre embrionarias o pluripotenciales. Los organoides se cultivan en una matriz extracelular con un suministro de medio de cultivo rico en factores de crecimiento, simulando un entorno fisiológico, que permite replicar la proliferación, diferenciación y las funciones características del tejido del que se obtuvo la muestra (Loewa et al., 2023).

2.3.2. Tecnología *Organ-on-a-chip*

La tecnología *Organ-on-a-chip* ha provocado una gran revolución en los **modelos de enfermedades**. Esta estrategia se basa en el empleo de plataformas microfluídicas que permiten perfundir el medio de cultivo deseado en continuo a tejidos o cultivos celulares. Por ello, permite fabricar **plataformas** en las que se cultivan diferentes tejidos conectados mediante canales (Figura 16), replicando con gran precisión la fisiología de la enfermedad (Carvalho et al., 2023; Loewa et al., 2023). Así, los modelos basados en *Organ-on-a-chip* (OoC) proporcionan una nueva manera de estudiar los mecanismos moleculares subyacentes de la progresión de una enfermedad, así como el estudio de nuevos fármacos, obteniendo información aproximada de la eficacia y la toxicidad que pudieran tener estos fármacos.

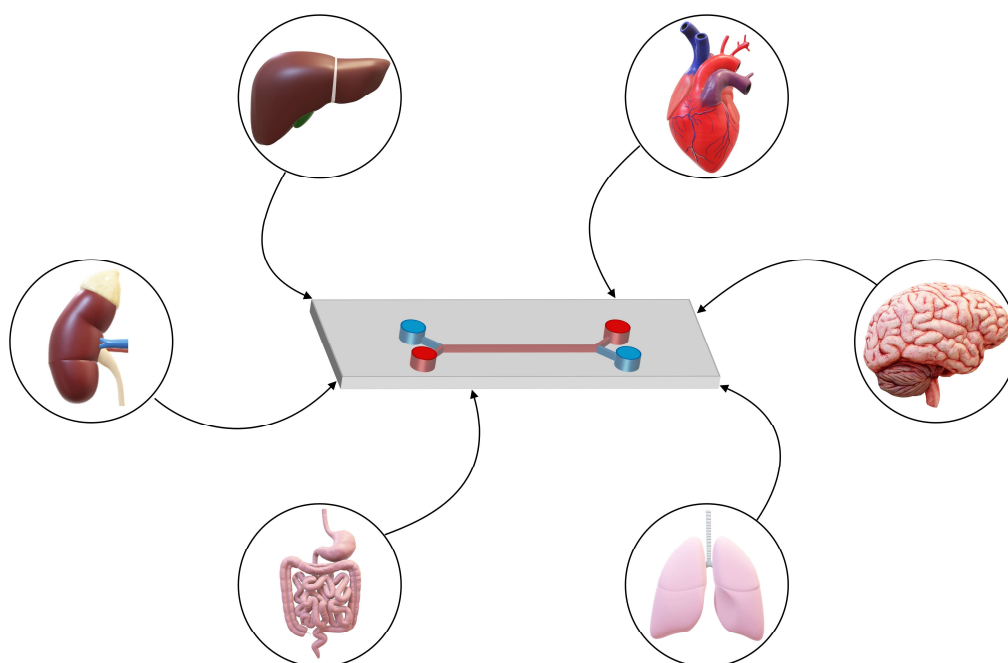


Figura 16. Sistema de cultivo *Organ-on-a-chip* en el que se pueden recrear las condiciones fisiológicas de diversos órganos y estudiar la interacción entre diferentes tejidos.

Esta tecnología permite adaptar las plataformas empleadas según las necesidades del estudio, utilizando cualquiera de los modelos presentados en el apartado anterior, desde células madre pluripotentes inducidas a organoides, para desarrollar sistemas que simulen la actividad de un órgano o sistemas “multi-órgano”. Además, permite monitorizar cualquier variación celular o del entorno que se produzca gracias a la implementación de **biosensores** en este tipo de plataformas. A su vez, permite el avance en medicina de precisión y medicina personalizada mediante el cultivo de células madre derivadas de pacientes,

disminuyendo la necesidad de emplear modelos animales. (Mastrangeli & van den Eijnden-van Raaij, 2021) .

Cabe señalar que en la tecnología OoC existen dos factores muy importantes a tener en cuenta, la microfluídica y los materiales utilizados en el montaje del sistema.

Por un lado, gracias a la microfluídica se alcanzan mejoras en varios aspectos respecto a los estudios a mayor escala, como son la reducción de coste o el control de parámetros experimentales. Este control se debe en gran medida a que en este ámbito se utilizan volúmenes de muestra muy bajos, lo que implica una reducción del número de Reynolds, y, por tanto, se pasa de un flujo turbulento e incontrolable a un flujo laminar. Además, al usar plataformas con un tamaño mucho menor se reduce el uso de reactivos, la cantidad de material empleado y se mejora la velocidad de mezcla de los volúmenes utilizados (Farhang Doost & Srivastava, 2024).

Por otro lado, durante la fabricación de los sistemas OoC hay que tener en cuenta las características del material empleado, si es necesario el empleo de membranas permeables o si los cultivos necesitan de soportes estructurales. Aunque se están desarrollando multitud de materiales para la fabricación de plataformas OoC, algunos de los más utilizados actualmente son el polidimetilsiloxano (PDMS), el policarbonato o tereftalato de polietileno. Aunque el policarbonato es transparente y biocompatible, generalmente es solo utilizado como membrana porosa, ya que estructuralmente presenta gran rigidez. Por ello, el PDMS es uno de los materiales más empleados, gracias a su transparencia, permeabilidad a gases, flexibilidad, y biocompatibilidad, sin embargo, no permite la formación de una matriz extracelular natural. Por este motivo también se emplean otros polímeros basados en colágeno, los cuales presentan una mayor biocompatibilidad, y factores de crecimiento y hormonas que facilitan la simulación de condiciones fisiológicas. El ejemplo más utilizado es el Matrigel, el cual consiste en una biomatriz compleja formada por proteínas que forman una matriz extracelular que permite la adhesión celular al sustrato del chip, permitiendo diseñar modelos de intestino en los que se generan formaciones similares a criptas. Mientras la matriz se encuentra en estado líquido se combina con las células para que al polimerizar permitan una conformación tridimensional del cultivo (Galateanu et al., 2022).

3. Material y métodos

3.1. Biosensores ópticos

Como se mencionó anteriormente en la sección 2.1.2.3. del estado de la cuestión, en esta tesis doctoral se emplean biosensores ópticos interferométricos. En este apartado se profundiza en el tipo de biosensores empleados, su fabricación y método de lectura.

3.1.1. Fabricación de kits de diagnóstico

La fabricación de los biosensores ópticos se lleva a cabo en dos etapas (Figura 17).

En primer lugar, se parte de una oblea de **silicio** recubierta por una fina capa antirreflejante de **SiO₂** como sustrato primario. Esta fina capa de 140 nm de espesor no refleja a la longitud de onda utilizada (850 nm), mejorando la capacidad de medida del dispositivo de medida para discernir entre la celda de biosensado y el resto del kit de detección.

En segundo lugar, mediante la técnica de *spin coating* se deposita de forma homogénea una película del espesor deseado de **SU-8**. Esta técnica aprovecha la fuerza centrífuga de manera que, una vez depositado el material deseado en el centro del sustrato, se distribuye homogéneamente por toda la oblea. El SU-8 es un **polímero** negativo con grupos **epoxi**, que se entrecruzan gracias a un tratamiento con luz ultravioleta (350-400nm). En este proceso de polimerización se emplea una máscara fotolitográfica negativa con una geometría diseñada para la fabricación de los kits diagnósticos deseados, ya que solo se dará el proceso de entrecruzamiento en aquellos lugares a los que la máscara deje expuesta la resina. Después, se realiza un tratamiento térmico para terminar de fijar la resina entrecruzada, seguido de un lavado para eliminar la resina de la oblea que no ha sido expuesta a la luz ultravioleta a través de un baño con disolvente orgánico (Murillo et al., 2021). Las máscaras utilizadas para la polimerización varían en función del kit de diagnóstico empleado, en la sección 3.1.1.1. se describen las características de cada tipo de kit.

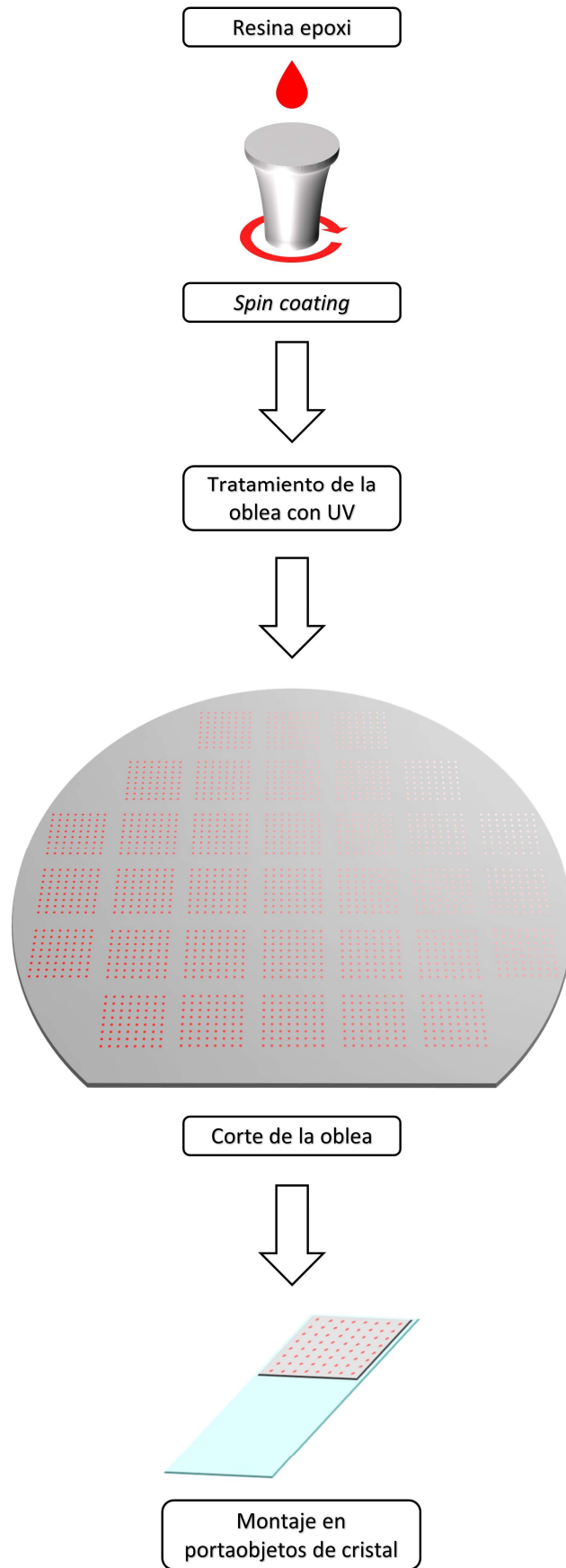


Figura 17. Esquema de fabricación de un kit de diagnóstico.

Adicionalmente, es posible añadir una capa de **nitrocelulosa** (NC) sobre la resina SU-8. Para la adición de esta capa de NC se realizará otro paso más de *spin coating* y un ataque térmico. Este tipo de sensor se denomina **BIWELL**, puesto que no se realiza el proceso de litografía, sino que se dispone un vinilo antirreflejante en la superficie del kit para la formación de pocillos, (Figura 18).

Finalmente, una vez que la oblea dispone de la configuración de biosensores deseada, se secciona en estructuras más pequeñas mediante una sierra de diamante. Cada una de estas estructuras es adherida a un portaobjetos de vidrio, dando lugar a los kits de diagnóstico, ya preparados para ser medidos en la plataforma de lectura.

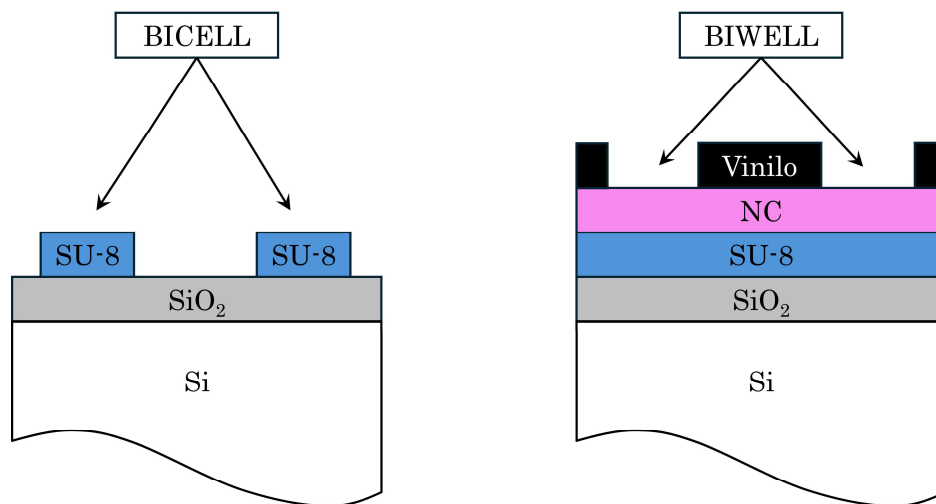


Figura 18: Representaciones gráficas no a escala de un kit con dos BICELLS y un kit con dos BIWELLS.

3.1.1.1. Tipos de kits de diagnóstico

El Grupo de Óptica, Fotónica y Biofotónica de la Universidad Politécnica de Madrid ha implementado una serie de mejoras en la producción de estos kits de diagnóstico en los últimos años. En un principio, se fabricaban kits con 3 celdas, los cuales fueron sustituidos por kits de 16 celdas de SU-8 para poder realizar mayor cantidad de determinaciones, posteriormente, se diseñaron kits capaces de albergar 64 y 65 celdas. Asimismo, este aumento de sensores también se observó en los kits con BIWELLS, pasando de kits con 4 pocillos a kits con 65 pocillos.

Durante el desarrollo de esta tesis se han empleado tres tipos de kits de diagnóstico (Figura 19):

- **Kit de 65 BIWELLS.** Se trata de un kit de diagnóstico diferente al resto, ya que posee en su superficie 65 pocillos en los que se encuentran la superficie sensora. Esta consiste en un sustrato de Si, una capa de SiO₂, una capa de SU-8 y una última película de nitrocelulosa. Estos pocillos tienen 1000 μm de diámetro y son capaces de retener una gota de 1.5 μL.
- **Kit de 16 BICELLS.** Este kit presenta en su superficie 16 celdas sensoras que consisten en un sustrato de silicio, una capa de SiO₂ y una capa de polímero SU-8. Estas celdas tienen 200 μm de diámetro, con el fin de retener una gota de 1.5 μL alrededor de estas, se deposita sobre el kit una máscara de PVC (por su nombre en inglés *PolyVinyl Chloride*). Debido al bajo número de celdas, este kit se emplea en aproximaciones preliminares para hallar los rangos de concentración y establecer las condiciones con las que se realizar los ensayos posteriores, disminuyendo el tiempo del ensayo a nivel de lectura del kit. Para ello, generalmente se emplea una n de 4 bajo cuatro condiciones diferentes.
- **Kit de 65 BICELLS.** Se trata de un kit basado en celdas de SU-8, al igual que en el caso anterior. La diferencia radica en el número de celdas que posee, ya que, al tener un mayor número de estas, los ensayos en este kit son más robustos con un n elevado y muchas condiciones diferentes, por ejemplo, con una n de 7 podemos emplear nueve condiciones distintas. Por esa razón, este kit permite emplear sus celdas para detectar un marcador en un elevado número de muestras como ocurre en la detección de anticuerpos frente a SARS-CoV-2.
- **Kit de 64 BICELLS.** Este tipo de kit de diagnóstico contiene gran cantidad de celdas de SU-8, al igual que el diseño anterior, sin embargo, su diseño es más simple y sus celdas más separadas. Esta disposición evita tener que repetir ensayos por la unión indeseada de 2 gotas de 2 celdas contiguas.

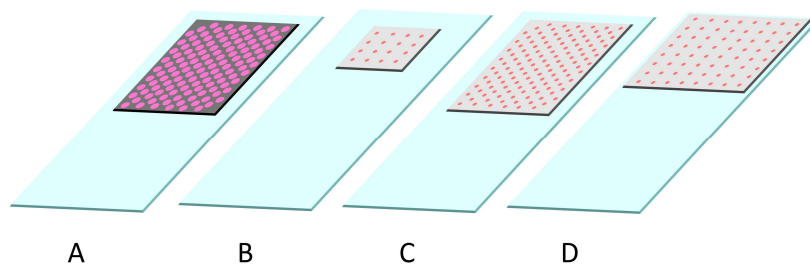


Figura 19. Tipos de kits de diagnóstico empleados. A) Kit de 65 BIWELLS B) Kit de 16 BICELLS. C) Kit de 65 BICELLS. D) Kit de 64 BICELLS.

3.1.2. Método de lectura

El Grupo de Óptica, Fotónica y Biofotónica desarrolla los kits de diagnóstico descritos anteriormente y sobre los que se cimenta esta tesis. El método de detección que se emplea en estos kits se basa en el **Método de Detección Óptica Interferométrica (IODM)**. Este novedoso método de lectura se encuentra registrado como Patente nº EP2693164A1 (Holgado Bolaños et al., 2012).

Se trata de un método de interrogación óptica vertical que compara **dos señales**. Por un lado, existe un interferómetro de referencia que es interrogado y da lugar a la **señal interferométrica de referencia** (I_{ref}). Por otro lado, se realiza una interrogación de la celda de la que se quiere obtener información, de la cual se obtiene la **señal interferométrica de medida** (I_m). Dado que la señal de referencia permanece inalterada no se observan cambios en dicha señal. Sin embargo, la señal de medida sí varía en caso de haberse producido la unión del analito con los biorreceptores anclados en la celda, generándose un desplazamiento en la señal del interferómetro. La relación matemática entre estas dos señales interferométricas está definida por la Función de Transferencia (f_{TRANS}):

$$f_{TRANS} = \frac{I_m}{I_{ref}}$$

En concreto, una fuente de luz interroga el interferómetro de referencia y simultáneamente otra fuente de luz interroga el interferómetro de medida. Seguidamente, dos detectores de potencia óptica (OP, por su nombre en inglés *Optical Power*) recogen las señales en una región del espectro determinada (entre λ_1 y λ_2). Teniendo esto en cuenta puede considerarse la siguiente ecuación:

$$f_{TRANS} = \frac{OP_m}{OP_{ref}}$$

El cálculo de la potencia óptica entre dos longitudes de onda (λ) se define como la integral de la intensidad de señal (I) recogida en esa región específica del espectro, que como hemos visto depende del **espesor** del interferómetro, es decir, de cuanto material hay inmovilizado en el sensor (Holgado et al., 2014).

$$OP[\lambda_1, \lambda_2] = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} I(\lambda) d\lambda$$

Como se puede observar en la Figura 20, los biosensores interferométricos están diseñados para que la región en la que se produce la detección sea óptima. Para ello se emplea un interferómetro de referencia en cuyo rango se observa el mínimo

$$\Delta IROP(\%) = \left(\frac{I_{m1}[\lambda_1, \lambda_2] - I_{ref}[\lambda_1, \lambda_2]}{I_{ref}[\lambda_1, \lambda_2]} \right) \times 100 - \left(\frac{I_{m2}[\lambda_1, \lambda_2] - I_{ref}[\lambda_1, \lambda_2]}{I_{ref}[\lambda_1, \lambda_2]} \right) \times 100$$

$$\Delta IROP(\%) = \left(\frac{I_{m1}[\lambda_1, \lambda_2] - I_{m2}[\lambda_1, \lambda_2]}{I_{ref}[\lambda_1, \lambda_2]} \right) \times 100$$

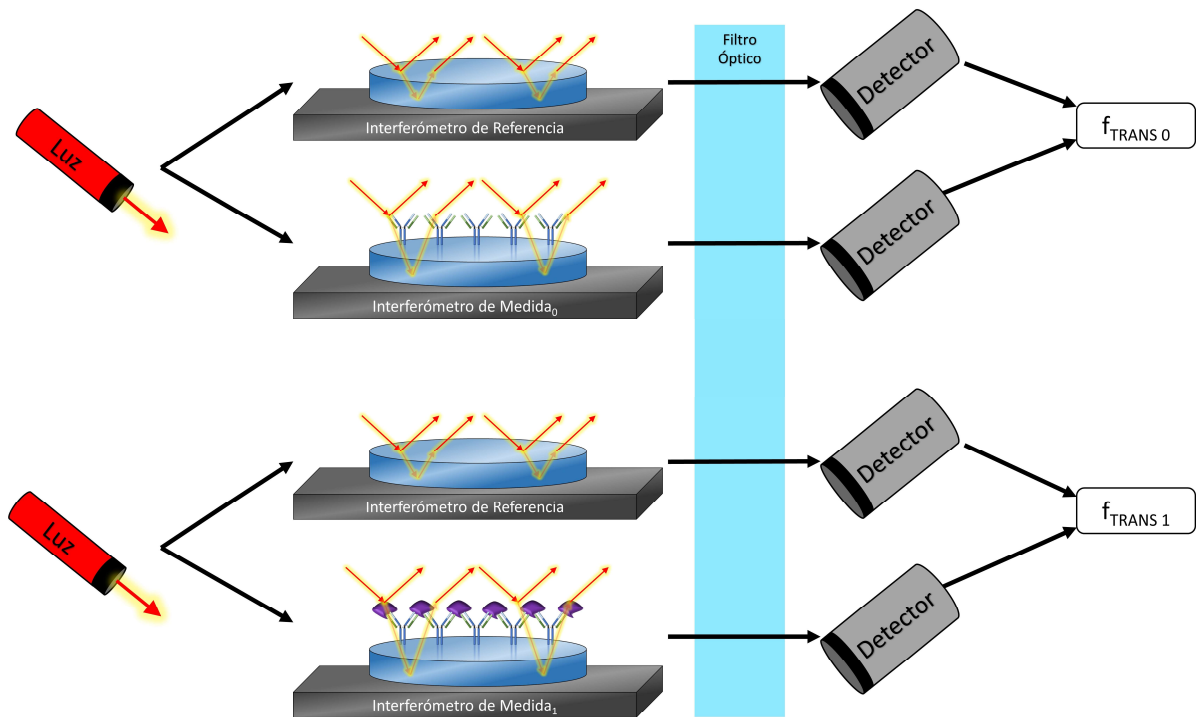


Figura 21. Esquema de la obtención de $\Delta IROP$.

Este método de lectura IODM permite detectar cambios mínimos en el espesor del biosensor, permitiendo determinar variaciones ínfimas en la concentración del analito objetivo. Este sistema de detección se ha implementado en un dispositivo *Point of care* para facilitar la realización de ensayos diagnósticos *in situ*, rápidos y económicos.

Este dispositivo de lectura *Point of care* diseñado y desarrollado por la empresa *Bio Optical Detection S.L.* (BIOD S. L.), permite la lectura de los interferómetros mediante interrogación vertical. La última versión de esta plataforma de lectura se denomina **MOX** (Figura 22), y es la utilizada durante todo el desarrollo de esta tesis. Esta versión presenta mejoras en la velocidad y precisión de las mediciones, logrando la lectura de un kit multiplexado con 65 celdas interferométricas en 12 minutos.

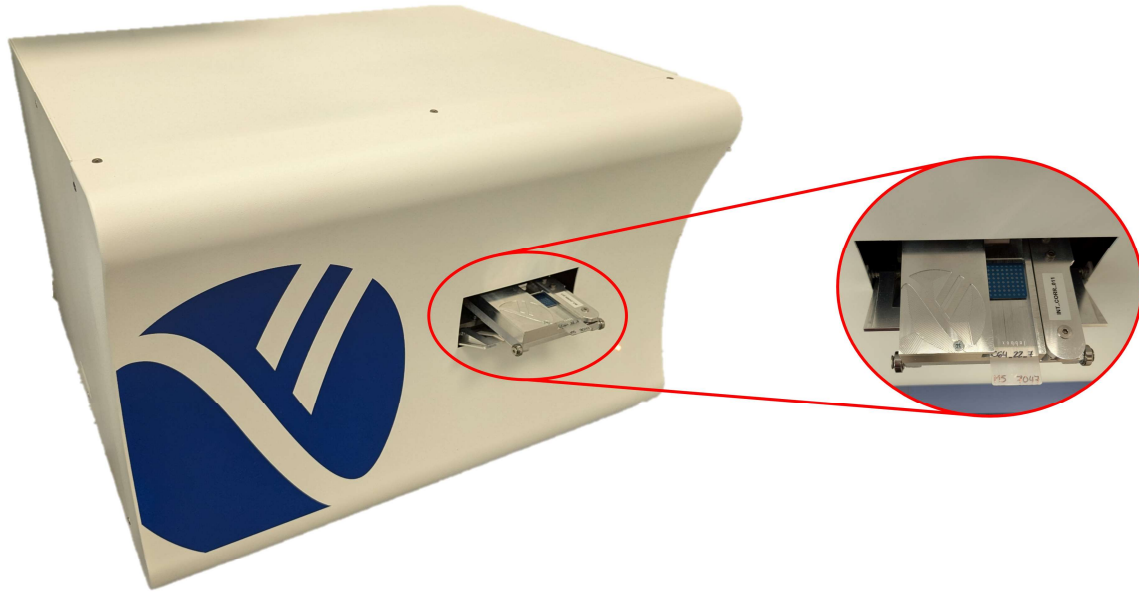


Figura 22. Imagen de la plataforma de lectura MOX.

Por último, para todos los datos obtenidos mediante MOX durante el transcurso de esta tesis se realiza un test de *outliers* del programa GraphPad, basado en el método de Grubb. Finalmente, se obtiene el error estándar dividiendo la desviación estándar (σ) por la raíz del número de observaciones (n).

$$\text{Error estándar} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

3.2. Nanopartículas

Como se detalla en la sección 2.2. del estado de la cuestión, las nanopartículas son ampliamente estudiadas para su aplicación en áreas de la investigación biomédica como los biosensores. A continuación, se detallan los tipos de nanopartículas que se han utilizado en el desarrollo de esta tesis, así como los procesos de funcionalización, biofuncionalización y caracterización de estas.

3.2.1. Nanopartículas magnéticas

Inicialmente, se emplean **nanopartículas magnéticas** (MNPs) para **optimizar** la detección de biomarcadores mediante biosensores interferométricos. Estas nanopartículas poseen la ventaja de poder ser manipuladas mediante campos magnéticos. Las nanopartículas magnéticas empleadas en esta tesis fueron cedidas por la Dra. Puerto Morales, siendo empleado óxido de hierro en su síntesis, más concretamente la forma compuesta por magnetita.

El protocolo de funcionalización se lleva a cabo a un pH de 3 en ultrasonido durante 15 minutos (Figura 23), en el cual se mezcla 1 mg de DMSA (Ácido dimercaptosuccínico) por cada 7 mg de MNPs. Seguidamente, se eleva el pH a 10 para que un carboxilo quede activado, eliminando mediante centrifugación el exceso de DMSA (Ruiz et al., 2019).

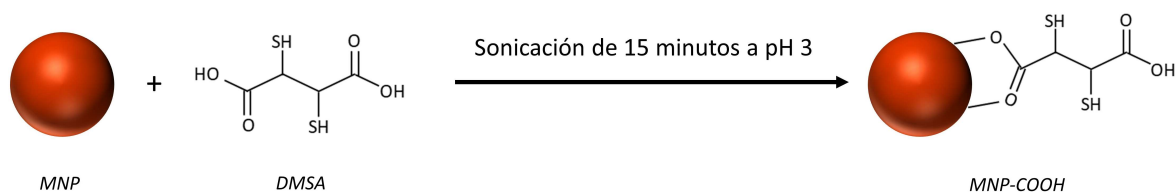


Figura 23. Esquema del proceso de funcionalización de MNPs.

3.2.2. Nanopartículas de oro

En segundo lugar, para el desarrollo de esta tesis se emplean nanopartículas de oro (AuNPs), puesto que pueden ser sintetizadas por nuestro grupo, controlando así las condiciones de la síntesis para obtener el tamaño deseado. Este tipo de nanopartícula posee **propiedades plasmónicas** que permiten calcular de forma más precisa la concentración de la solución empleada (Scarabelli et al., 2013).

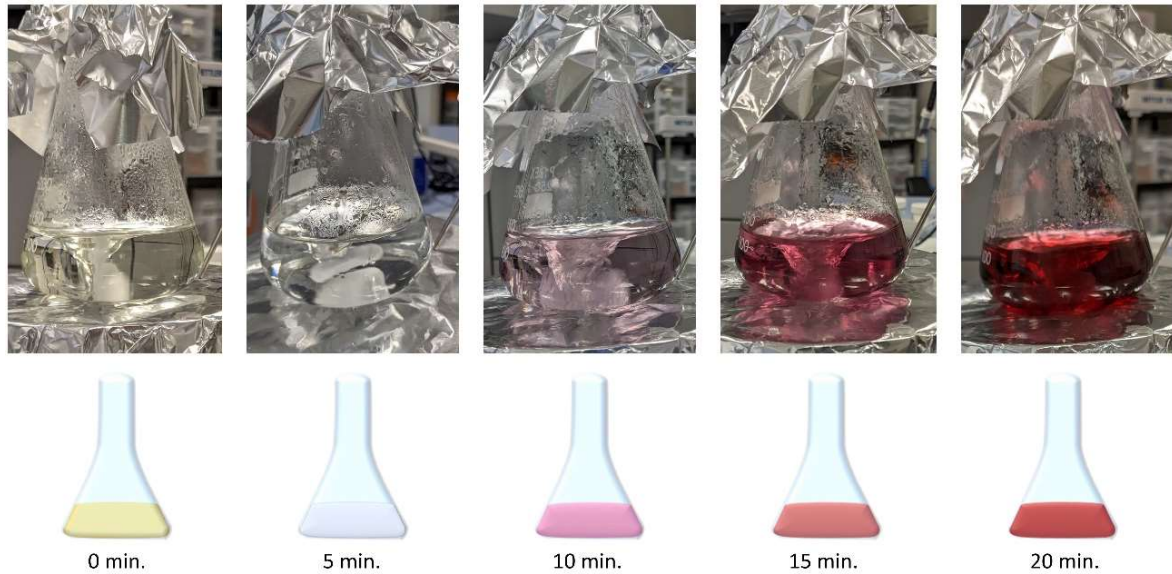


Figura 25. Proceso de síntesis de nanopartículas de oro en el laboratorio.

3.2.2.2. Funcionalización de nanopartículas de oro

Para la funcionalización de las nanopartículas de oro se emplea ácido polietilenglicol 2-mercaptoetil éter acético (**SH-PEG-COOH**) (Sigma, Ref.: 757845), molécula seleccionada debido a las ventajas de su estructura. Por un lado, presenta **un grupo sulfhidrilo**, capaz de formar un fuerte enlace con la superficie de oro de la nanopartícula (formando un enlace S-Au) (Kang et al., 2019). Por otro lado, presenta una **larga cadena** que actúa como espaciador, evitando la unión entre nanopartículas (Rodríguez-Lorenzo et al., 2018). Finalmente, presenta un **grupo carboxilo**, encargado de unir la nanopartícula con una biomolécula mediante la química de las carbodiimidas (este paso se desarrollará en la sección 3.2.4.). Esta química facilita la activación del carboxilo para la conjugación con los grupos amino de la **proteína G (PG)** y de la **biotina-hidrazida**.

Para llevar a cabo la funcionalización es necesario conocer la concentración de las AuNPs una vez sintetizadas, para ello se caracterizan mediante las técnicas presentadas en la sección 2.2.3. Conociendo la concentración a la que se encuentran y el tamaño de su núcleo de oro, se calcula la superficie total de todas las AuNPs. Para ello, se multiplica la concentración de las nanopartículas (NPs/ μL) por el volumen de la solución (μL), hallándose el número de nanopartículas totales en la solución. La superficie de una esfera es igual a $4\pi r^2$, siendo “r” el radio de la nanopartícula, multiplicando este valor por el número de NPs totales se obtiene la superficie total de las AuNPs.

Una vez realizados los cálculos, se añaden 10 moléculas de PEG por nm² de superficie total de la solución de nanopartículas. Seguidamente, se incuban con polietilenglicol durante 24 horas a 4 °C en agitación (Figura 26), eliminando el sobrenadante por centrifugación y resuspendiéndolas en H₂O.

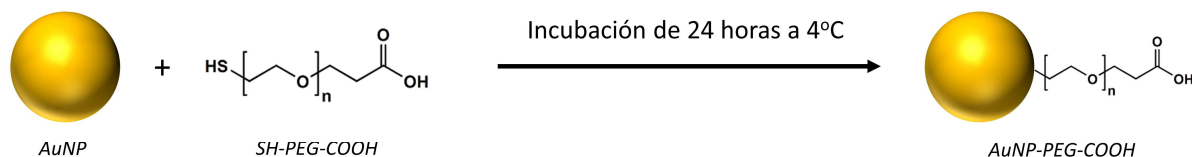


Figura 26. Esquema del proceso de funcionalización de AuNPs.

3.2.3. Caracterización de nanopartículas

Inmediatamente después de sintetizar las nanopartículas se caracterizan mediante cuatro métodos diferentes: visualización a través de un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), cálculo del perfil de distribución mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS), determinación del potencial zeta y análisis del espectro de absorción.

3.2.3.1. Microscopio Electrónico de Barrido

En esta tesis para la caracterización de las nanopartículas se emplea un Microscopio Electrónico de Barrido modelo FIB-SEM, Zeiss Cross Beam. Para tomar fotos con el SEM se selecciona un voltaje de 10 kV y se utilizan de aumentos de 5000×, 30000×y 100000×.

Se utiliza el software **ImageJ** (versión Fiji) para modelar en 3D la superficie de los biosensores interferométricos. Puesto que esta aplicación asigna a cada píxel un valor entre 0 y 255 en una escala de blanco y negro. La fracción de área blanca (%) se mide para cada imagen ajustando el umbral a 127 (50%) para diferenciar las AuNPs de la superficie negra (Valle et al., 2023).

3.2.3.2. Dispersión Dinámica de Luz

Como vimos en la sección 2.2.3.2., la técnica **DLS** permite, mediante la medición de la dispersión de la luz, obtener el **diámetro hidrodinámico** de una partícula, debido a los cambios que producen dichas partículas en movimiento en la intensidad de la luz dispersada (Mourdikoudis et al., 2018). Para ello, en esta tesis se utiliza un equipo **Zetasizer Advance Range Ultra**.

Este dispositivo detecta la variación de la intensidad con el tiempo y la transforma en una función temporal de autocorrelación (Figura 27), en la cual se tienen en cuenta la intensidad (I), el tiempo (t) y el tiempo de retardo del correlador (τ). Esta función puede expresarse como una ecuación exponencial, donde “B” es la línea base a tiempo infinito, “A” es el intercepto, “q” es el vector de dispersión, y “D” es el coeficiente de Difusión empleado para deducir el diámetro hidrodinámico.

$$G(\tau) = \left\langle \frac{I(t_0) \times I(t_0 + \tau)}{I(t_\infty)^2} \right\rangle = B + A \sum e^{-2 \times q^2 \times D \times \tau}$$

Por medio del vector de dispersión corrige la dependencia angular aplicando la siguiente fórmula, en la que se debe conocer el índice de refracción del dispersante (n), la longitud de onda del láser (λ) y el ángulo de detección (θ):

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

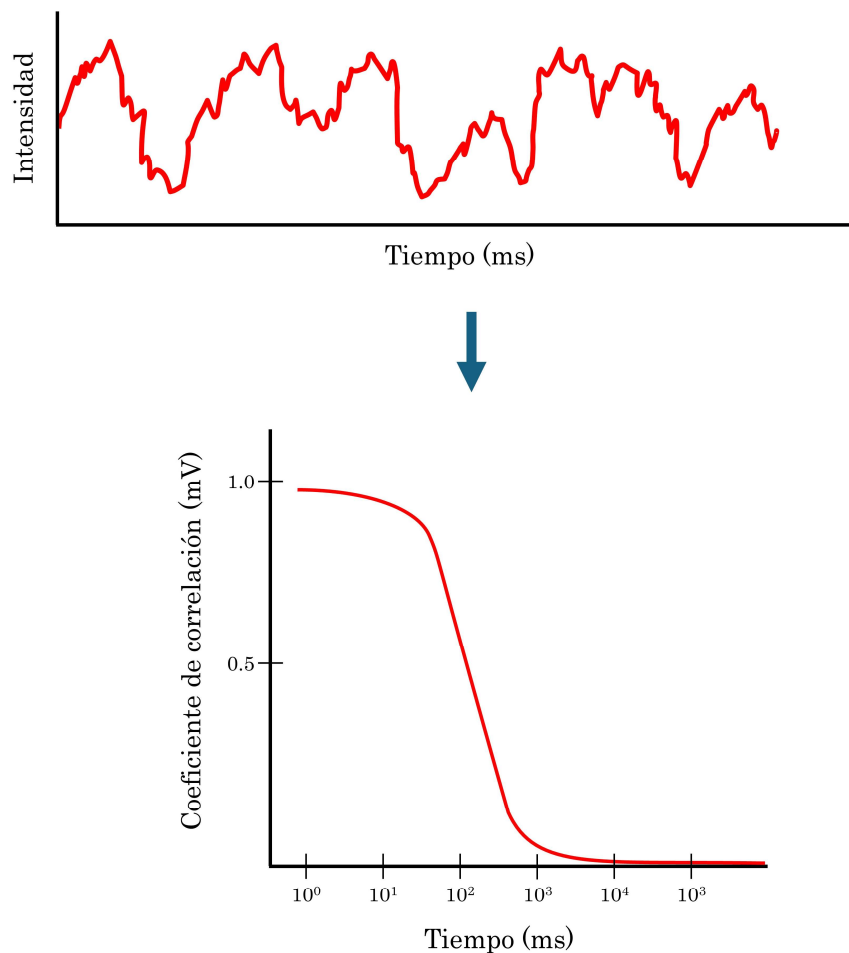


Figura 27. Transformación de la variación de la intensidad con el tiempo en una función de correlación por medio de Zetasizer.

El d_H está relacionado con la función de correlación de forma que cuanto antes decae la función de correlación, menor es el d_H de la nanopartícula, por el contrario, cuanto más tarda en decaer mayor es el tamaño. Cabe mencionar que la línea base de esta función debe ser **plana**, lo contrario indica que existe otra población de partículas en la solución tan grandes que se encuentran fuera de rango. Para terminar, mediante esta función se puede obtener información de la pendiente, ya que cuanto mayor es la pendiente menor es el grado (o índice) de **polidispersidad**. Este parámetro mide la heterogeneidad de tamaños de partículas en una solución: a menor grado de polidispersidad, menor es la anchura de la distribución de tamaños. Se considera una muestra monodispersa cuando el índice de polidispersidad es menor de 0.3.

El láser del equipo Zetasizer que ilumina la muestra tiene una longitud de onda de 633 nm y posee tres detectores a **tres ángulos diferentes** (Figura 28). Generalmente se utiliza el detector a un ángulo de 90° para obtener la distribución de tamaños y el de 173° para obtener el potencial zeta.

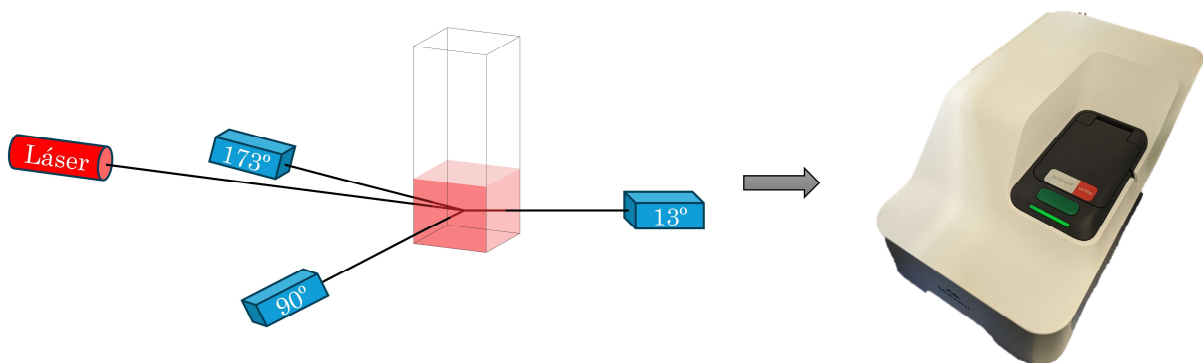


Figura 28. Disposición de los tres detectores (azul) a diferentes ángulos en el equipo Zetasizer.

Para las nanopartículas de oro el índice de refracción que la casa comercial del equipo establece es 0.18 y el valor de absorción es 3.433, en cambio, para las MNPs el índice de refracción es 2.36 y el valor de absorción es 0.147. Para dispersantes similares al agua establecen un índice de refracción de 1.33 y una viscosidad de 0.8872 mPa×s. Todos los datos se recogen después de 3 mediciones a 25 °C.

3.2.3.3. Potencial zeta

Como se detalla en la sección 2.2.3.3. el potencial zeta es un parámetro clave para evaluar la estabilidad de una solución de nanopartícula.

Ante el efecto de un campo eléctrico las partículas cargadas sufren efectos electrocinéticos: la **electroforesis** y la electroósmosis. La electroforesis es el movimiento que sufre una partícula con carga ante el efecto de un campo eléctrico con respecto al líquido en el que se encuentra suspendida. La electroósmosis es el movimiento que sufre un líquido ante el efecto de un campo eléctrico con respecto a un canal (Uskoković, 2012).

Mediante el equipo Zetasizer (Figura 29) se realiza una electroforesis, que intercambia la polaridad del campo eléctrico con el fin de evitar la polarización de los electrodos. Este cambio tiene lugar rápidamente, evitando el efecto electroosmótico, ya que se observa la velocidad de las nanopartículas sin que el líquido se mueva debido a este efecto.

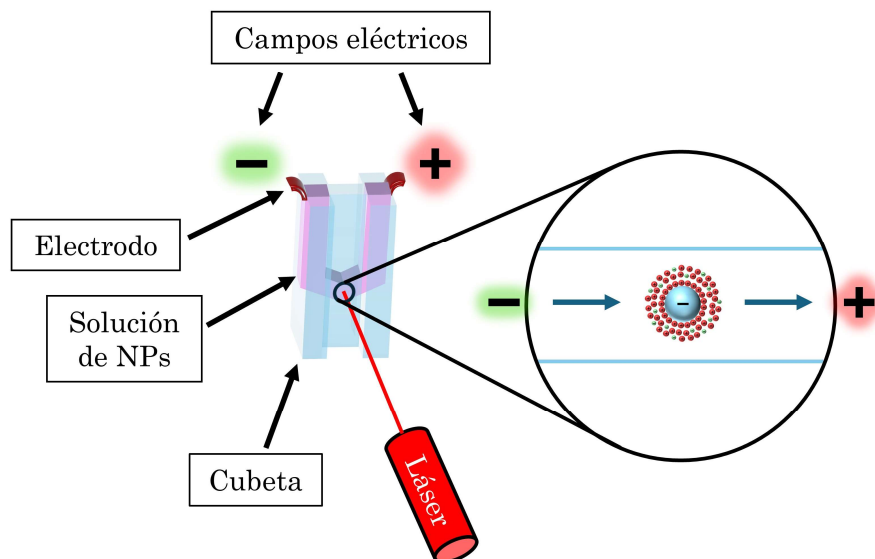


Figura 29. Cubeta del equipo Zetasizer para la medida del potencial zeta.

Gracias a la técnica de electroforesis se puede determinar la movilidad electroforética, y posteriormente, deducir el **potencial zeta** utilizando la ecuación de Henry (Modena et al., 2019). Para ello se hace pasar un haz del láser a través de la muestra sometida a electroforesis, y se mide la luz dispersada por las partículas en movimiento. Esta luz dispersada sufre una desviación en la frecuencia respecto a la frecuencia de un haz de referencia que proviene de la misma fuente y con el mismo camino óptico. Al modular el haz de referencia con un espejo oscilante se obtiene una frecuencia de referencia de 1000 Hz. La diferencia de frecuencia (Δf) establece la velocidad de la nanopartícula (v) al

someterse a un campo eléctrico durante la electroforesis mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta f = \frac{2 \times v \times \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda}$$

Siendo “ λ ” la longitud de onda del láser y “ θ ” el ángulo de dispersión.

Por tanto, el empleo de la electroforesis permite calcular la velocidad de la partícula en la suspensión (v); posteriormente, mediante la siguiente ecuación se determina la movilidad electroforética (μ_e), ya que el Zetasizer establece el campo eléctrico (E).

$$v = \mu_e \times E$$

Como se ha mencionado anteriormente, el potencial zeta (ζ) y la movilidad electroforética (μ_e) están relacionados mediante la ecuación de Henry:

$$\mu_e = \frac{2 \times \varepsilon \times \zeta \times F(\kappa \times a)}{3 \times \eta}$$

De esta ecuación están establecidas la constante dieléctrica (ε), la viscosidad del medio (η) y la función de Henry ($F(\kappa \times a)$), esta última pudiendo cambiar en función de si el medio es polar o apolar. Esta función es el resultado de multiplicar el radio de la partícula (a) por κ , este valor es el inverso del grosor de la doble capa eléctrica (K), es decir, $\kappa = 1/K$. El equipo Zetasizer establece mediante la aproximación de Hückel que $F(\kappa \times a) = 1.0$ en medios apolares, y por la aproximación de Smoluchowski que $F(\kappa \times a) = 1.5$ en medios polares.

3.2.3.4. Espectroscopía de absorción

Como se describe en la sección 2.2.3.4., el espectro de absorción de una solución de AuNPs nos permite determinar el **tamaño aproximado** de estas mediante la relación de la señal de 450 nm y la posición del pico plasmónico máximo del espectro, cuanto menor es la distancia entre el pico de absorción y la absorbancia a 450 nm, mayor es el diámetro de la nanopartícula (Haiss et al., 2015); así como la **concentración** mediante el valor de absorbancia de 400 nm (Scarabelli et al., 2013). Durante el desarrollo de esta tesis los espectros UV-vis de las AuNPs se obtienen utilizando el espectrofotómetro UV-vis OPTIZEN Alpha (Figura 30).

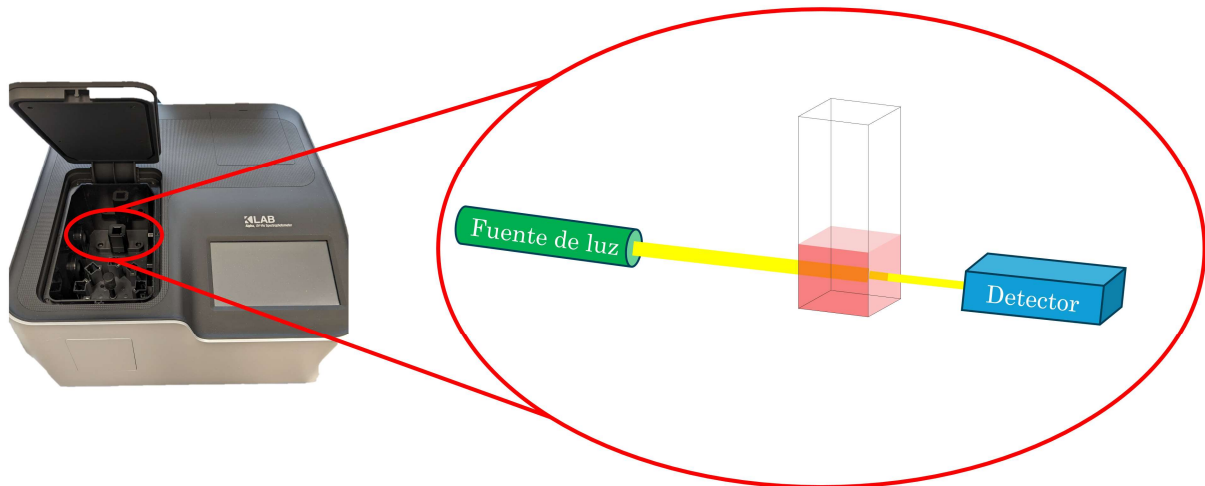


Figura 30. Esquema de la absorción de luz por parte de una muestra colocada en una cubeta dentro de un espectrómetro.

3.2.4. Biofuncionalización de nanopartículas

El objetivo principal del empleo de las nanopartículas en esta tesis es incorporar en ellas **anticuerpos** que nos permitan **amplificar** la señal obtenida en los interferómetros. En este sentido, el recubrimiento de la superficie de las NPs con moléculas biológicas se denomina biofuncionalización.

Tras la funcionalización de las nanopartículas con un grupo químico funcional, este reacciona adecuadamente para conseguir el anclaje de la molécula deseada. Por ello, además de tener en cuenta la molécula que se quiere añadir, se debe tener en cuenta la química de la superficie de la nanopartícula, ya que es fundamental que las NPs permanezcan **estables**, evitando su agregación por un desequilibrio en la relación de fuerzas atractivas y repulsivas provocadas por cambios en la solución durante los distintos procesos a los que se someten estas nanopartículas.

En esta tesis se emplea un método de biofuncionalización covalente, en el cual se produce una unión fuerte y estable entre los grupos funcionales de las NPs y los grupos de la molécula que se pretende acoplar. Para ello, el método empleado se basa en las carbodiimidas, un tipo de moléculas que median la formación de **enlaces amidas** entre grupos carboxilos y aminas, cuyo grupo funcional es $RN=C=NR$ (Avvakumova et al., 2014).

Para realizar dicho método de biofuncionalización se emplea 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (**EDC**). Este compuesto reacciona con los **grupos carboxilos**, en nuestro caso, con los grupos carboxilos de la nanopartícula, formando un intermediario denominado O-acilisourea. El intermediario formado reacciona

con un grupo amino para formar un enlace amida, siendo el principal inconveniente que este intermediario es inestable. Como solución se añade NHS (N-hidroxisuccinimida), o en su defecto sulfo-NHS (el grupo sulfo incrementa la solubilidad del compuesto), ya que gracias a este reactivo se forma un enlace éster sulfo-NHS intermediario que reacciona con las **aminas primarias** para formar definitivamente el enlace amida deseado (Figura 31). Además, para controlar el pH de la reacción se emplea ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 0.1 M a pH 5.5 (Kim & Herr, 2013).

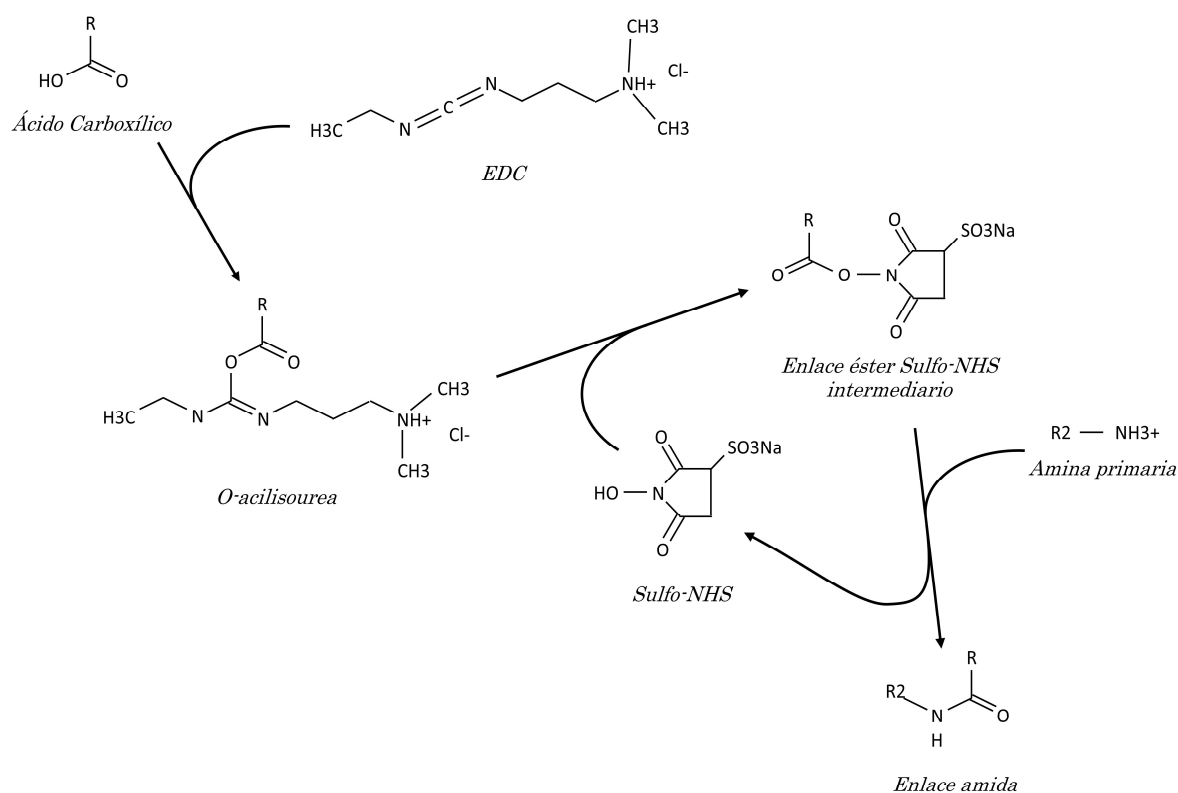


Figura 31. Esquema de la reacción mediada por la carbodiimida EDC.

En esta tesis, las dos moléculas con aminas primarias unidas a la superficie de las nanopartículas mediante este método son la **proteína G** y la **biotina-hidrazida**. La proteína G es una proteína ampliamente empleada en biosensores debido a su afinidad por la región constante de los anticuerpos, mejorando el anclaje y la orientación de estos anticuerpos a la nanopartícula. Por otro lado, la biotina es una pequeña molécula de gran afinidad por la **estreptavidina**, proteína con cuatro sitios de unión para biotina, por lo que esta molécula se emplea comúnmente como etiqueta en anticuerpos (Figura 32).

Para calcular cuanta cantidad de proteína es necesaria añadir para tapizar la nanopartícula por completo se realizan los mismos cálculos desarrollados en la sección 3.2.2.2. para hallar la superficie total de las nanopartículas. Una vez calculada la superficie total, es necesario calcular la superficie que puede ocupar una proteína en la nanopartícula. Conociendo la masa molecular de esta proteína se puede realizar una estimación del radio de la proteína (Erickson, 2009) y con este se haya la superficie que ocupa (πr^2). Finalmente, dividiendo la superficie que ocupa una proteína por la superficie total se obtiene cuantas proteínas son necesarias para tapizar la superficie por completo, multiplicando este número por la masa molecular de la proteína y dividiendo por el número de Avogadro se obtienen los gramos de proteína necesarios para tapizar las NPs.

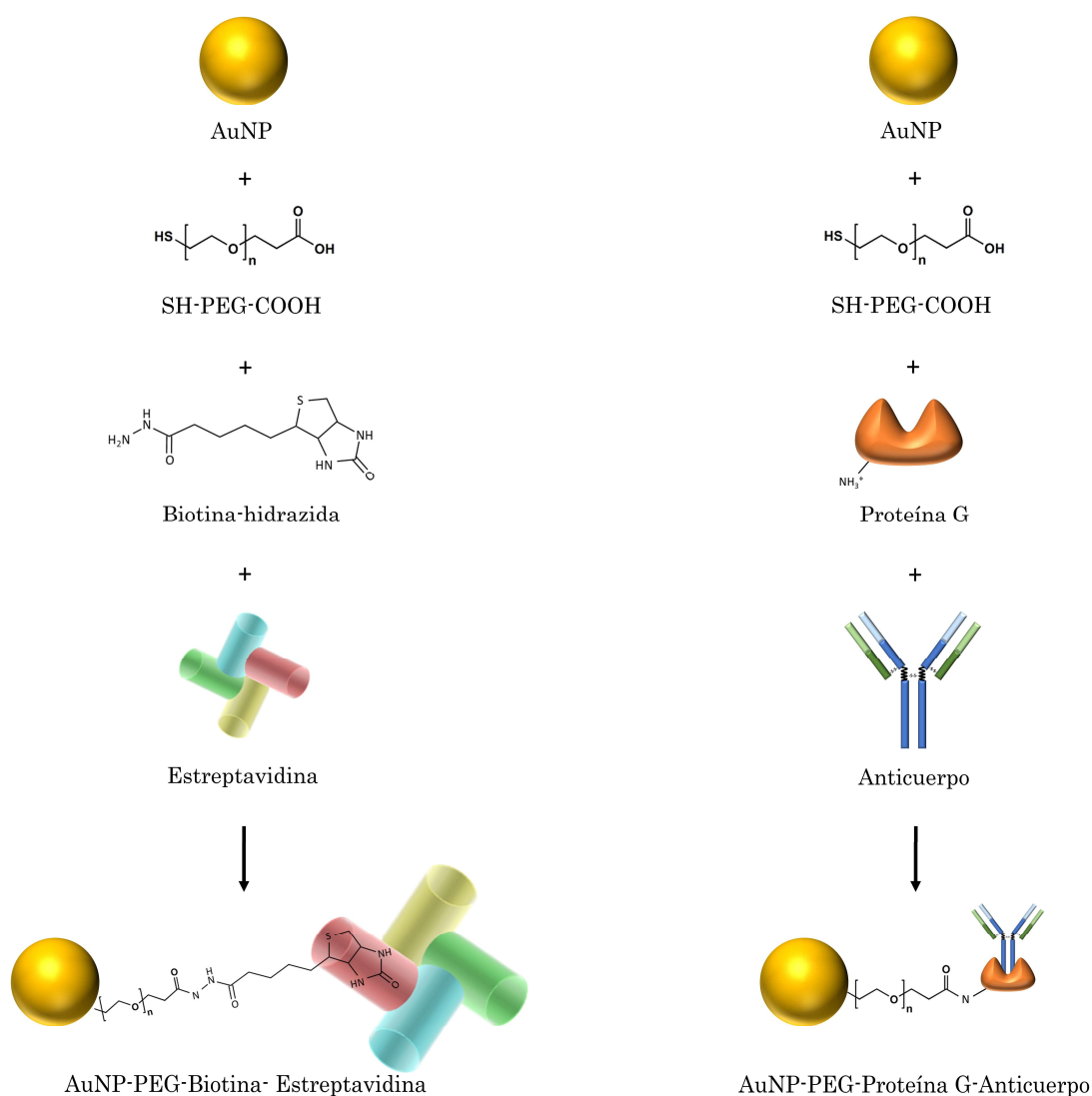


Figura 32. Esquema del proceso de funcionalización y biofuncionalización con biotina-hidrazida y su unión a la estreptavidina a la izquierda, y de la proteína G y su unión a un anticuerpo a la derecha.

3.3. Modelos de enfermedad analizados

Para el desarrollo de esta tesis, los kits de diagnóstico descritos anteriormente en la sección 3.1.1. se emplean en el estudio de tres enfermedades: Medición de Igs específicas como marcadores de la **COVID-19**, detección de biomarcadores relacionados con la **enfermedad de Alzheimer**, y el diseño de un sistema de diagnóstico *in vitro* para **cáncer colorrectal**. En este apartado se presentan estos tres modelos de enfermedad, explicando brevemente las enfermedades relacionadas y los biomarcadores elegidos para su diagnóstico.

3.3.1. Medición de Igs específicas como marcadores de la COVID-19

El primer modelo estudiado durante el desarrollo de esta tesis fue la producción de kits de diagnóstico enfocados en la detección de **anticuerpos específicos** frente al virus que provoca la enfermedad de la COVID-19.

El proyecto de esta tesis comenzó en marzo de 2020, momento en el que se declaraba el estado de emergencia nacional en España debido a la pandemia provocada por el virus **SARS-CoV-2**. En esta época el Grupo de Óptica, Fotónica y Biofotónica (GOFB) de la UPM comienza el desarrollo de un kit de diagnóstico capaz de detectar anticuerpos frente a este virus.

El Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave 2 (SARS-CoV-2) es un virus ARN responsable de la enfermedad conocida como COVID-19. Esta patología cursa con una afectación del sistema respiratorio, provocando tos, dificultad para respirar y neumonía. La cadena de ARN monocatenaria contiene cuatro genes: S, E, M y N. Estos genes codifican proteínas de la envuelta vírica: proteína **spike** (S), proteína de la envuelta (E) y la proteína de membrana (M); además de una proteína de la nucleocápside (N) encargada de unirse al genoma vírico (Zhang & Guo, 2020).

La proteína **spike** es la encargada de que el virus interactúe con moléculas del exterior de la membrana de la célula del huésped, en concreto, se une al receptor ACE2 (siglas del nombre en inglés *Angiotensin Converting Enzyme 2*). Posteriormente, gracias a esta proteína se fusiona la membrana celular con la envoltura vírica, permitiendo la infección de la célula (Figura 33). Al ser esta la proteína más expuesta del virus, es una buena candidata para que los anticuerpos producidos por el organismo reconozcan esta proteína (Zhang & Guo, 2020).

Para la detección de anticuerpos mediante un kit diagnóstico se emplea una proteína recombinante *spike* truncada (**rS1**). Esto quiere decir que no es la proteína completa, sino que solo se utiliza una región denominada S1, cuya función es la de reconocimiento de ACE2 y anclaje a la membrana celular. La otra región de la proteína se denomina S2 y su función es la de fusionar la membrana vírica con la membrana celular (Zhang & Guo, 2020).

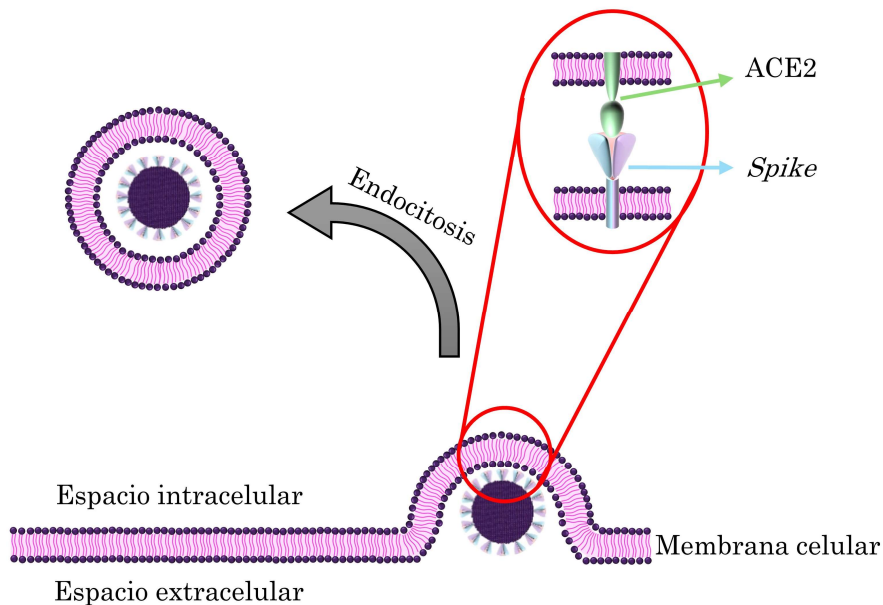


Figura 33. Esquema de la infección del virus SARS-CoV-2 a una célula humana.

Los resultados de la investigación realizada por el GOFB permitieron desarrollar un kit de diagnóstico capaz de medir inmunoglobulinas específicas en **suero y saliva** y probar su correlación con ELISA (Murillo et al., 2021). Este kit permite la realización de dos estudios: un ensayo de detección de biomarcadores en sueros de pacientes que padecen COVID-19, y un ensayo piloto de detección de anticuerpos frente a COVID-19 en salivas.

3.3.1.1. Ensayo de detección de biomarcadores en sueros de pacientes que padecen COVID-19

Gracias al desarrollo de kits de detección de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 y a su correlación con la técnica ELISA, se lleva a cabo un estudio basado en la detección de seis biomarcadores diferentes en **pacientes** que han padecido esta patología durante marzo de 2020. Este estudio es posible gracias al biobanco del Hospital Clínico San Carlos (HCSC), que proporciona 74 muestras de **suero** de pacientes, y 20 sueros de donantes de sangre, la presencia del virus en los pacientes

fue confirmada mediante RT-PCR (de su nombre en inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Las muestras se obtienen cumpliendo las normas éticas legales vigentes con la colaboración del Instituto de Medicina de Laboratorio (IML) y la Unidad de Innovación del HCSC.

Los profesionales del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) clasifican previamente los pacientes en: **graves** (aquellos que requieren ingresar en la unidad de cuidados intensivos y precisan ventilación mecánica), **moderados** (estos pacientes no necesitan de los cuidados anteriores, pero sí son hospitalizados) y **leves** (sin hospitalización) (Murillo et al., 2022). Este ensayo demuestra la capacidad de los kits de diagnóstico para detectar biomarcadores de enfermedades en un gran número de muestras de pacientes.

3.3.1.1.1 Condiciones del ensayo de biomarcadores en sueros

Para realizar el ensayo se emplean **tres biorreceptores**: anticuerpo anti-FTH (nombre del anticuerpo que reconoce una subunidad de la ferritina), anticuerpo anti-CRP (anticuerpo que reconoce la proteína C reactiva, o CRP, de su nombre en inglés *C reactive protein*), y la proteína recombinante truncada rS1. Esta última es proporcionada por el grupo dirigido por la Dra. Araceli Díaz, del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas perteneciente a la Universidad Politécnica de Madrid (CBGP-UPM). Esta proteína recombinante se produjo en *Pichia pastoris* y se purificó utilizando los métodos descritos en Murillo et al., 2021, gracias al ADNc del SARS-CoV-2 que fue amablemente cedido por la Dra. Isabel Sola (Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

En este estudio se emplean kits de 65 celdas en los cuales se deposita 1 μ L de muestra. Mediante el tratamiento con un ataque de plasma de O₂ se activa la superficie del biosensor, permitiendo inmovilizar rS1, anti-CRP y anti-FTH por unión covalente al polímero SU8 de la BICELL. A su vez, se incubó BSA (siglas del inglés *Bovine Serum Albumin*) como control negativo.

Para el proceso de inmovilización se utiliza una plataforma automatizada de dispensación de líquidos, el equipo Biodot AD1520TM (Figura 34). Este aparato deposita automáticamente sobre cada celda del kit 300 ng de proteína rS1 en PBS (por su nombre en inglés *Phosphate-Buffered Saline*) pH 7.5, 100 ng de anti-CRP en PBS, 100 ng de anti-FTH en PBS y 50 ng de BSA como control negativo. Así, el Biodot permite aumentar la reproducibilidad y la precisión de la etapa de dispensación. Posteriormente, los kits de diagnóstico se colocan en un incubador dentro de una cámara húmeda a 37 °C.

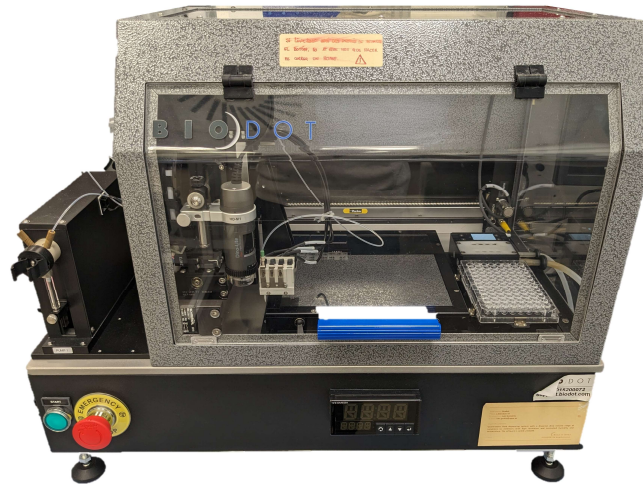


Figura 34. Plataforma dispensadora de gotas Biodot.

Tras la incubación de las proteínas, los kits se lavan durante 1 minuto con agua Milli-Q y se bloquean con hidrolizado de caseína 1x durante 1 hora en agitación para evitar uniones no específicas. Seguidamente, se incuban los **sueros** de los pacientes en los kits para la detección de biomarcadores (Figura 35).

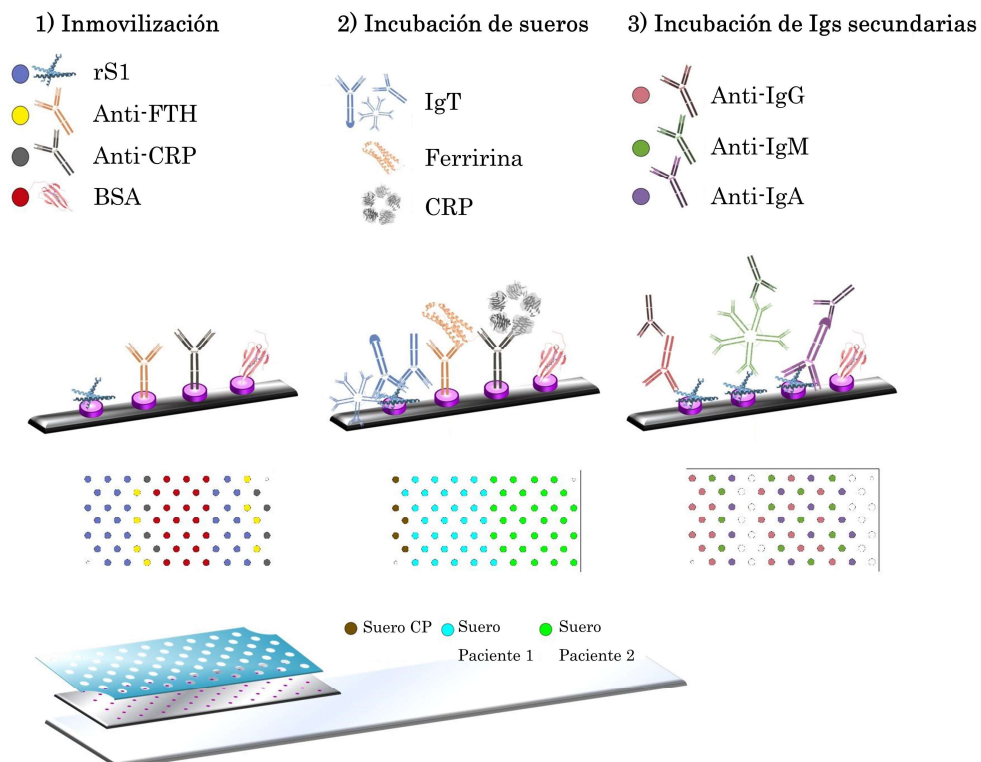


Figura 35. Esquema de los pasos a seguir para la detección de biomarcadores en un kit de diagnóstico. 1) Inmovilización de los biorreceptores y del CN (BSA). 2) Incubación de los sueros para el reconocimiento directo de los biomarcadores IgTs, FER y CRP. 3) Incubación de anticuerpos secundarios frente a IgGs, IgMs y IgAs (adapta de Murillo et al., 2022).

Previamente, los sueros se descongelan y se calientan en un baño a 56 °C con el fin de inactivar el sistema de complemento y reducir el riesgo biológico mediante la inactivación de los virus. Se incuban dos sueros de pacientes (dilución 1:10) por kit de diagnóstico, además de un suero positivo control (CP). Seguidamente, se lavan y se miden los kits para obtener los datos de tres biomarcadores: **IgTs** (Igs totales), ferritina (**FER**) y **CRP**.

Por último, se incuban tres anticuerpos secundarios: anti-IgG (1:250), anti-IgA (1:10) y anti-IgM (1:20). Esta incubación se realiza en una cámara húmeda a 37 °C durante tres horas, tras lo cual se obtienen los valores de Δ IROP (%) de los tres biomarcadores: **IgG**, **IgA**, **IgM**.

3.3.1.1.2 Análisis del ensayo de biomarcadores en sueros

Para poder analizar todos los biomarcadores de los sueros de los pacientes, en primer lugar, se realiza un análisis de varianza (**ANOVA** por sus siglas en inglés, *Analysis of Variance*) para determinar si el grado de gravedad del paciente es un factor significativo para el valor obtenido de **IgT** (Figura 36).

En segundo lugar, se realiza un **modelo de regresión lineal múltiple** para evaluar la relación de los distintos marcadores con el valor de IgT. Para ello, primero se realiza una **matriz de correlación** entre todos los biomarcadores; después se lleva a cabo un **modelo de regresión simple** de IgT frente al resto de biomarcadores; y finalmente se evalúan todas las variables en el **modelo de regresión múltiple**, añadiendo posteriormente las variables de gravedad (Murillo et al., 2022).

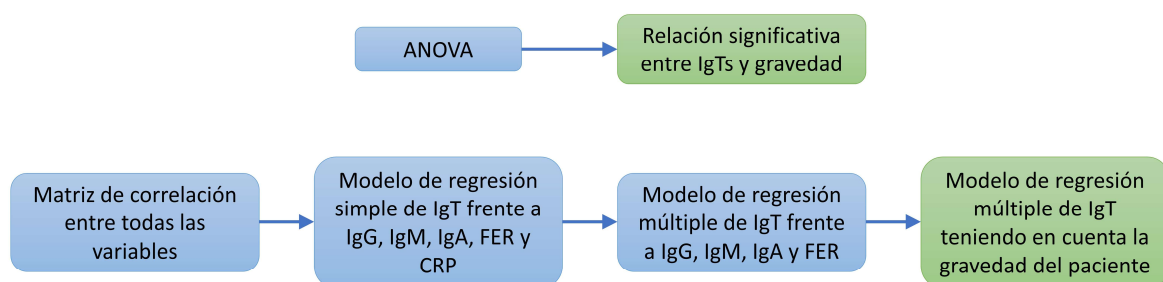


Figura 36. Esquema de los pasos seguidos para el análisis estadístico de los biomarcadores en sueros.

3.3.1.2. Ensayo piloto de detección de IgAs frente a SARS-CoV-2 en salivas

En la segunda mitad del año 2020, una vez desarrollados los kits de detección de anticuerpos, se propone realizar otro tipo de ensayo orientado a un estudio longitudinal de biomarcadores de la COVID-19.

Para detener la rápida propagación de la enfermedad es necesario un diagnóstico preciso, que facilite el tratamiento de las personas infectadas por el SRAS-CoV-2 y aisle a la población asintomática, lo que garantiza una menor propagación del virus. La prueba predominante para un diagnóstico eficaz del SRAS-CoV-2 es la RT-PCR, que utiliza muestras de la nasofaringe de pacientes sospechosos de estar infectados por el virus, ya sea por haber estado en contacto con una persona infectada por el virus o por presentar signos clínicos (tos seca y dificultad respiratoria) (Ritchie et al., 2020).

Sin embargo, también sería muy valioso monitorizar la seroconversión de la población general para saber cuántas personas han desarrollado anticuerpos contra el SRAS-CoV-2 (Amanat et al., 2020; Lumley et al., 2021; Post et al., 2020). Este método no permite determinar si un paciente está infectado, pero ayuda a conocer mejor la respuesta inmunitaria contra el SRAS-CoV-2 mediante la realización de estudios epidemiológicos (Figueiredo-Campos et al., 2020; Ramanathan et al., 2020; Rostami et al., 2021). Estos estudios se han llevado a cabo mediante pruebas serológicas que, junto con la PCR, han ayudado a evaluar la prevalencia del virus.

A pesar de ello, un estudio serológico tiene dificultades para recoger sangre (Dan et al., 2021; García-Abellán et al., 2021), mientras que la saliva es una muestra no invasiva mucho más fácil de recoger. Se ha informado de que también se han observado anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 en saliva, lo que la convierte en un fluido mucho más accesible para realizar ensayos a gran escala (Huang et al., 2021; Isho et al., 2020; MacMullan et al., 2021). En la saliva, un anticuerpo relevante es la IgA, presente principalmente en la mucosa. Pocos estudios han utilizado anticuerpos IgA presentes en la saliva para realizar estudios de prevalencia (Cervia et al., 2020; Pisanic et al., 2020; Smit et al., 2022). Sin embargo, existe un inconveniente: la IgA disminuye en el primer mes tras la infección (Alkharaan et al., 2021; Isho et al., 2020) y sólo permanece detectable 49/73 días después de los síntomas (Sterlin et al., 2021).

Además, algunos estudios observan un porcentaje significativo de la población con resultados válidos de anticuerpos contra el SRAS-CoV-2 sin síntomas y que niegan haber tenido una PCR positiva previa (Ebell et al., 2022). En otro estudio se observa que la conversión de anticuerpos en la saliva es 6 veces superior a la tasa de infección acumulada evaluada mediante cribado semanal por RT-PCR en saliva (Dobaño et al., 2021), y también hay estudios en los que población con títulos negativos de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 en suero mostraron IgA

específica contra el SARS-CoV-2 en fluidos mucosos (Cervia et al., 2020; Dobaño et al., 2022).

Por todo ello, una vez desarrollados los kits de detección de anticuerpos, se propone realizar, con la ayuda de la Universidad Politécnica de Madrid **un ensayo piloto voluntario** y experimental para la detección precoz, vigilancia y control de la COVID-19 en el Centro de Tecnología Biomédica. Este ensayo permite establecer si la estandarización de los procesos de biofuncionalización de los biosensores son los correctos y, además, demostrar la alta capacidad de estos kits para producir un gran número de ensayos: capaces de analizar cerca de 1000 muestras diferentes en 2 meses y medio.

Durante el ensayo piloto se recogen muestras de **saliva** de cada participante voluntario cada 12 días para estudiar el título de anticuerpos presentes en saliva frente a COVID-19 durante 2 meses y medio. Estas muestras se recolectaron concretamente entre el mes de octubre de 2020 y el mes de diciembre de 2020, teniendo un total de 6 muestras por voluntario. El total de participantes voluntarios es de 196, con un total de muestras cedidas al ensayo de 855.

3.3.1.2.1 Condiciones del ensayo piloto

Para la realización de este ensayo piloto se emplea la proteína recombinante truncada rS1. Esta fue proporcionada por el grupo dirigido por la Dra. Araceli Díaz, del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas perteneciente a la Universidad Politécnica de Madrid (CBGP-UPM). Esta proteína recombinante se produce en *Pichia pastoris* y se purifica utilizando los métodos descritos en el artículo, gracias al ADNc del SARS-CoV-2 amablemente cedido por la Dra. Isabel Sola (Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas) (Murillo et al., 2021).

En el ensayo piloto se emplean kits de 65 celdas en los cuales se deposita 1 μ L de la muestra. La biofuncionalización de las celdas se realiza activando la superficie del biosensor mediante un plasma de O₂ con el fin de inmovilizar la proteína **rS1** mediante unión covalente al SU8 de la BICELL. Además, se incubó **BSA** como control negativo para probar la selectividad del ensayo.

En este proceso de inmovilización se utiliza una plataforma automatizada de dispensación de líquidos, Biodot AD1520TM, que deposita automáticamente sobre cada celda 300 ng de proteína rS1 en PBS (pH 7.5), y 50 ng de BSA como control negativo. Esta plataforma, aumenta la reproducibilidad y la precisión de la etapa

de dispensación. Una vez realizada la dispensación de gotas se incuban los kits en un incubador dentro de una cámara húmeda a 37 °C (Figura 37).

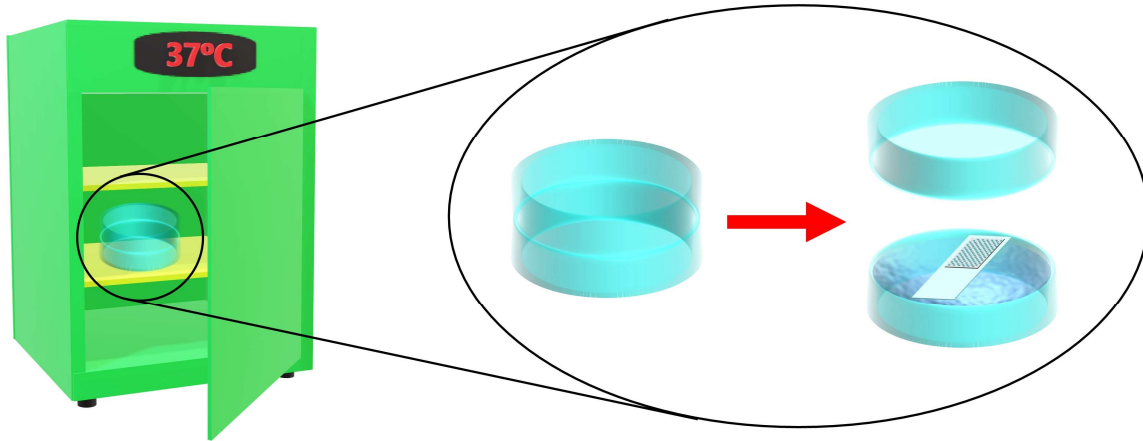


Figura 37. Incubación de un kit de diagnóstico en una cámara húmeda dentro de un incubador a 37 °C.

Tras la incubación de las proteínas (Figura 38), los kits se lavan durante 1 minuto con agua Milli-Q y se bloquean con hidrolizado de caseína 1x durante 1 hora en agitación para evitar uniones no específicas, tras lo cual se lavan los kits. En este punto, los kits están listos para ser utilizados en la medición de Igs en las muestras de saliva.

Las muestras de **saliva** se centrifugan y se dividen en alícuotas. Posteriormente, estas muestras se incuban durante la noche a 4 °C en los kits biofuncionalizados. Simultáneamente, se incuban un control positivo en saliva IgA (**CP**), un control negativo en saliva IgA (**CN**) (ambos confirmados por ELISA), y las muestras de saliva de los voluntarios en cada kit biofuncionalizado. Cada muestra de saliva de voluntarios se incubaba en 4 celdas en las que se incubaba previamente rS1 y en 3 celdas con BSA; el CP y el CN se incubaban en 4 celdas con rS1 y 4 con BSA. Por último, los kits de diagnóstico se lavan durante 1 minuto con agua Milli-Q y se secan con aire filtrado.

Una vez medida la señal de lectura de cada BICELL (Δ IROP), se incubaba anti-IgA humana (1:10, Sigma-Aldrich) en todas las celdas a 37 °C en ambiente húmedo para determinar la presencia de IgA. Esta señal de lectura (Δ IROP) se mide tras el lavado y secado.

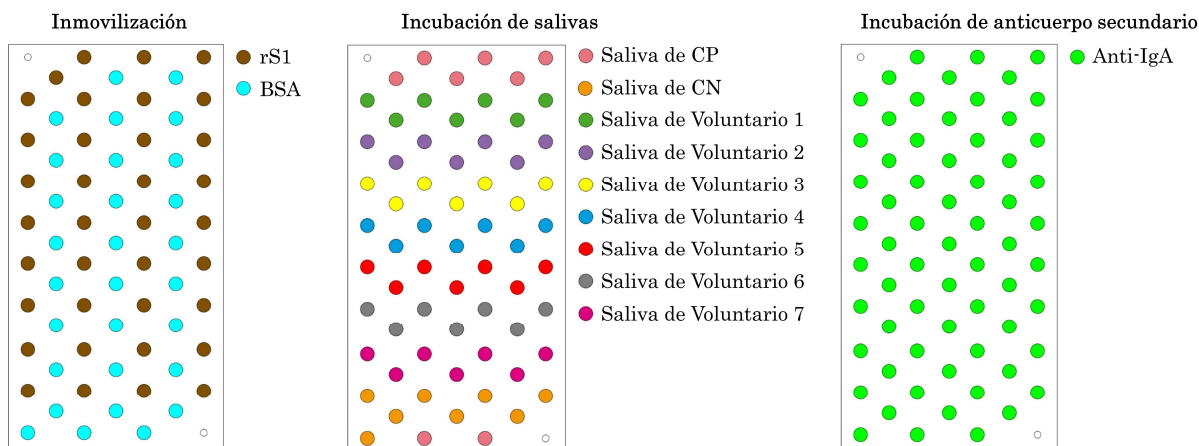


Figura 38. Esquema de los pasos a seguir para la detección de IgAs en un kit de diagnóstico. 1) Inmovilización de rS1 y del CN (BSA). 2) Incubación de las salivas de los voluntarios. 3) Incubación de anticuerpos secundarios frente a IgAs.

3.3.1.2.2 Análisis del ensayo piloto

Debido a la gran cantidad de muestras cedidas por los voluntarios, se realiza la metodología de análisis descrita a continuación, en ella también se emplean los controles previamente nombrados. En este ensayo las inmunoglobulinas totales (**IgT**) muestran la diferencia entre las señales obtenidas con cada saliva en rS1 y BSA.

Al igual que con las incubaciones de saliva, se mide una señal en rS1 y BSA por voluntario. La diferencia entre estas señales equivale a la cantidad de anticuerpos de tipo IgA presentes en la saliva (**IgA**).

Como control de calidad antes de realizar el análisis, se eliminan las pruebas con una incertidumbre superior al 40%.

Para el análisis de las muestras de los 196 voluntarios, se consideran tanto las señales obtenidas en IgT como en IgA de todas las tomas. El método para obtener IgT (%) e IgA (%) de cada voluntario se basa en la siguiente fórmula (Figura 39):

$$IgT (\%)_V = \frac{(IgT_V - IgT_{CN})}{(IgT_{CP} - IgT_{CN})} \times 100$$

$$IgA (\%)_V = \frac{(IgA_V - IgA_{CN})}{(IgA_{CP} - IgA_{CN})} \times 100$$

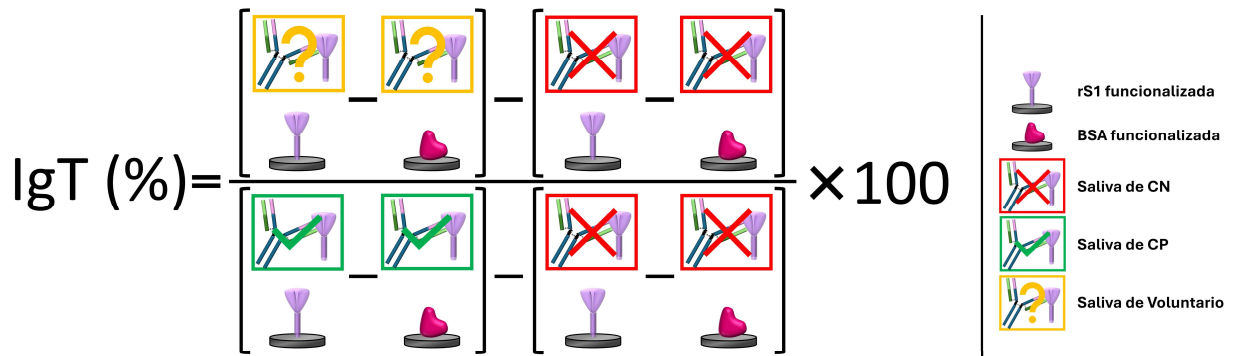
$$IgT (\%) = \frac{\left[\begin{array}{cc} \boxed{\text{?}} & \boxed{\text{?}} \\ \text{rS1} & \text{BSA} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{cc} \boxed{\text{X}} & \boxed{\text{X}} \\ \text{rS1} & \text{BSA} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{cc} \boxed{\text{✓}} & \boxed{\text{✓}} \\ \text{rS1} & \text{BSA} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{cc} \boxed{\text{X}} & \boxed{\text{X}} \\ \text{rS1} & \text{BSA} \end{array} \right]} \times 100$$


Figura 39. Esquema del cálculo de IgT (%).

Teniendo estas ecuaciones en cuenta, se determina que el control positivo en IgT (%) e IgA (%) es 100, mientras que el control negativo en IgT (%) e IgA (%) es 0.

En cuanto al análisis de los resultados, la prueba se considera positiva en IgT o IgA, aplicando el siguiente criterio:

$$IgT (\%) - U_{IgT(\%)} > 0$$

$$IgA (\%) - U_{IgA(\%)} > 0$$

A continuación, se analiza el conjunto de pruebas de cada voluntario; cuando el conjunto es coherente, se clasifica al voluntario en uno de los siguientes grupos:

- **N-N.** El voluntario no presenta IgA en saliva frente al SARS-CoV-2.
- **N-P.** Aparentemente el voluntario empieza a producir anticuerpos IgA contra SARS-CoV-2.
- **P-P.** Se estima que este voluntario presenta IgA en saliva contra el virus SARS-CoV-2.
- **P-N.** Se deja de detectar anticuerpos IgA contra el SARS-CoV-2 en la saliva del voluntario.

Dado que este criterio es demasiado permisivo, se decide aplicar un **análisis en cascada** (Figura 40), en el que se estudian en diferentes criterios lineales y secuenciales de cada voluntario.

El siguiente criterio aplicado fue más estricto:

$$IgT (\%) - U_{IgT(\%)} > 15$$

$$IgA (\%) - U_{IgA(\%)} > 15$$

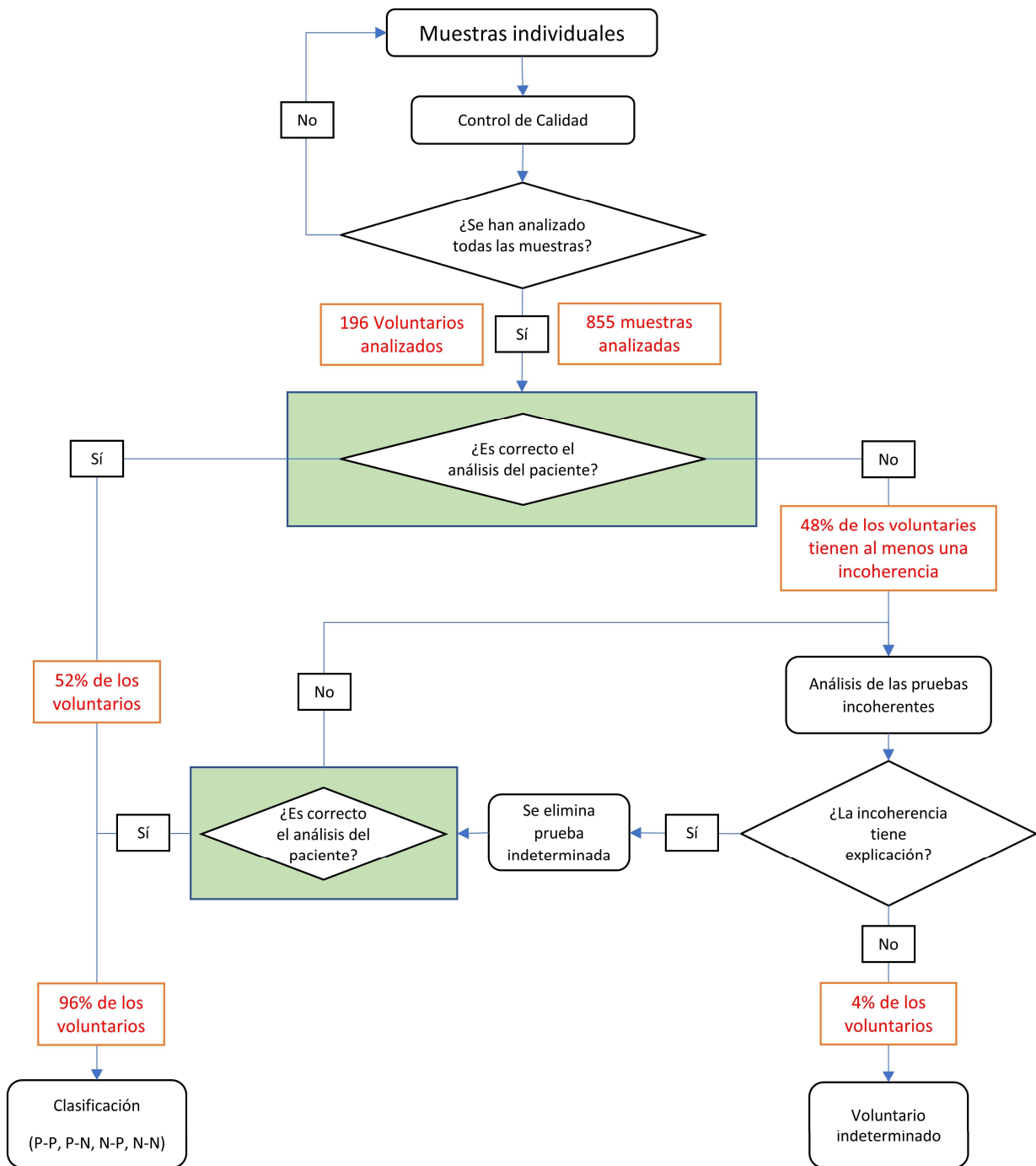


Figura 40. Análisis en cascada de las muestras de saliva.

Para asegurar que la normalización de la señal sobre los controles no está causando inconsistencia en algunas pruebas, se lleva a cabo un nuevo criterio. Con el cual se considera que una prueba es positiva cuando satisface las siguientes fórmulas:

$$Señal\ IgT - U_{Señal\ IgT} > Señal\ IgT_{CN} - U_{Señal\ IgT_{CN}}$$

$$Señal\ IgA - 3U_{Señal\ IgA} > Señal\ IgA_{CN} - 3U_{Señal\ IgA_{CN}}$$

Sólo el 2.5% de los pacientes se clasifican con este criterio, es decir, esta normalización parece reducir la incertidumbre.

Con este método de análisis en cascada se obtienen un **85% de pruebas coherentes y un 96% de voluntarios clasificados** (Figura 40).

Por último, se clasifican las pruebas incoherentes en tres grupos (Figura 41):

- Incoherencia por incertidumbre de medida (error de medida). La incoherencia puede deberse a una incertidumbre (U) mayor que la media aritmética de todas las incertidumbres de medición (\bar{x}) más la desviación típica (σ).

$$U > \bar{x} + \sigma$$

- Incoherencia en IgA. No es posible tener señales de IgA sin señales de IgT. Esta señal se debe probablemente a problemas durante el lavado en la incubación de anti-IgA.
- Coherencia global. Este criterio se utiliza para una prueba de incoherencia que no concuerda con el resto del conjunto de pruebas. Esta señal se debe probablemente a problemas durante el lavado en la incubación de la saliva.

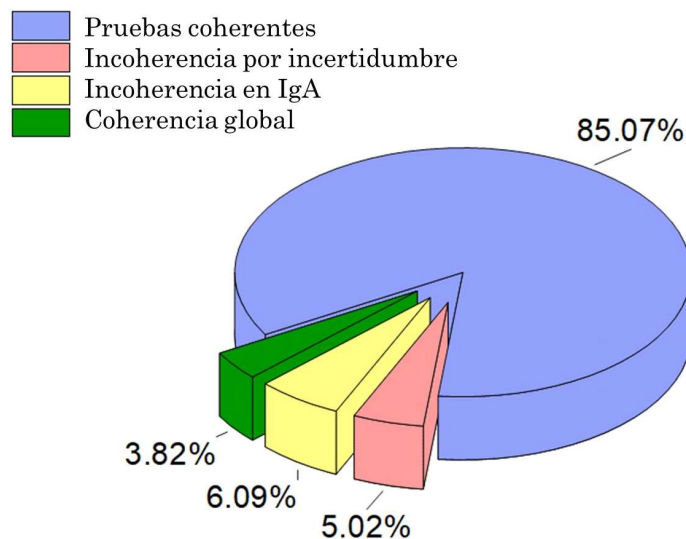


Figura 41. Clasificación de las diferentes pruebas en coherentes o incoherentes.

3.3.2. Detección de biomarcadores relacionados con la Enfermedad de Alzheimer

Una vez demostrada la capacidad para realizar múltiples ensayos, gracias al desarrollo de kits multiplexados, se procede a optimizar la sensibilidad de estos. Para ello se seleccionó como modelo de diagnóstico la enfermedad de Alzheimer, ya que se trata de una enfermedad muy extendida a nivel mundial y con un gran impacto social. Además, esta enfermedad cuenta con varios biomarcadores ampliamente implantados.

Al contrario que en el apartado anterior, durante esta sección no se explica el protocolo realizado, ya que, como se trata de un proceso de **optimización**, las condiciones de los ensayos cambian. Estos ensayos se basan en el empleo de las **nanopartículas** y en los métodos de **funcionalización y biofuncionalización** descritos en el capítulo 3.2. A continuación se introducen la patología de estudio y los marcadores utilizados en los ensayos.

La **enfermedad de Alzheimer** (EA) es una patología neurodegenerativa caracterizada por la **pérdida de memoria a corto plazo**; además, presenta otros síntomas asociados a medida que la enfermedad progresa. Esta patología fue descrita por primera vez en 1907 por Alois Alzheimer, al cual debe su nombre, y es la forma más común de demencia en el mundo, representando alrededor del 70% de los casos de este tipo de patologías (Prince et al., 2013).

Fisiológicamente, esta pérdida de memoria se debe a la degeneración del **hipocampo**, localizado en el lóbulo temporal, una zona del cerebro relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria. Otras características asociadas a la enfermedad son la degeneración de la **corteza cerebral** y el aumento de tamaño de los **ventrículos** del cerebro. Estos ventrículos son unas cavidades del encéfalo que portan el líquido cefalorraquídeo, de manera que aumenta su tamaño al degenerarse el cerebro (Figura 42) (Abeysinghe et al., 2020).

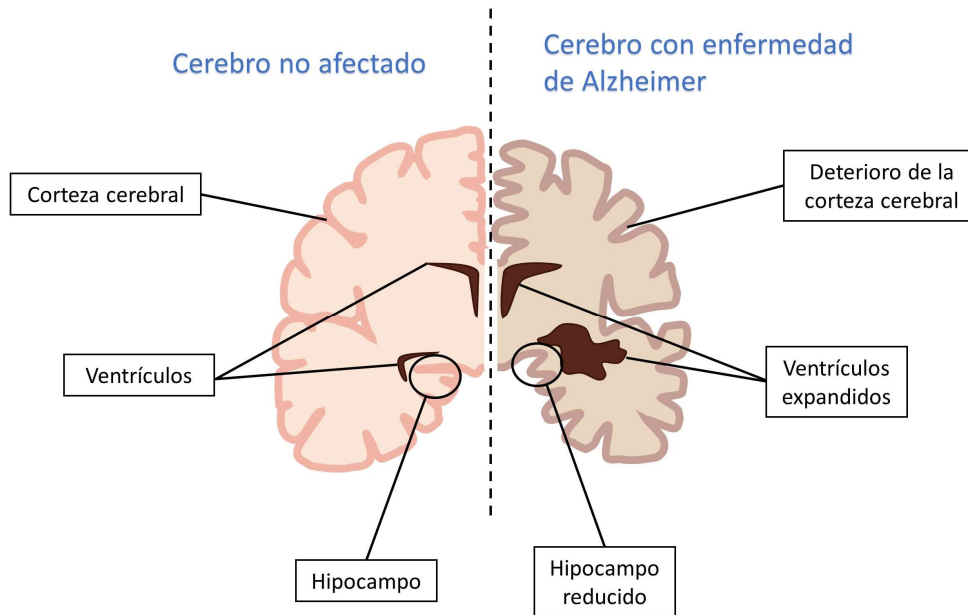


Figura 42. Principales diferencias entre un cerebro sano y un cerebro afectado por la enfermedad de Alzheimer.

Las principales etapas del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer son (Lyketsos et al., 2011):

- **Fase preclínica.** En esta fase los síntomas son prácticamente indetectables, ya que el deterioro cognitivo es muy leve y no interfiere en el desarrollo de las actividades cotidianas. Esto provoca que durante este estadio no se diagnostique la enfermedad.
- **Fase leve.** Durante esta etapa existe una pérdida de memoria a corto plazo, comienzan a observarse problemas relacionados con el lenguaje y se producen cambios en la personalidad y el estado de ánimo.
- **Fase moderada.** En esta fase se acrecientan los problemas del lenguaje y aumentan los problemas de conducta. Además, los pacientes son incapaces de generar ningún tipo de recuerdo reciente.
- **Fase severa.** En la etapa final de la enfermedad aparecen síntomas motores que provocan dificultad de movimiento, sumado a la exacerbación de los síntomas anteriores. Esta situación provoca que los enfermos no puedan tener independencia en la realización de ninguna actividad.

Como se ha descrito, además de la pérdida de memoria, a medida que avanza la enfermedad se observan otros síntomas asociados. El deterioro en la capacidad del lenguaje se debe a la afectación al área de Wernicke, una zona de la corteza

cerebral, que, junto al área de Broca, se encargan de la producción del lenguaje. El área de Broca se encuentra en el córtex prefrontal, el cual también se encuentra afectado durante la enfermedad de Alzheimer. El córtex prefrontal es el encargado de las funciones ejecutivas, de la planificación y de la conducta, lo cual puede explicar en parte los problemas de conducta asociados a los cambios de personalidad que experimenta la persona afectada (Figura 43) (Lyketsos et al., 2011).

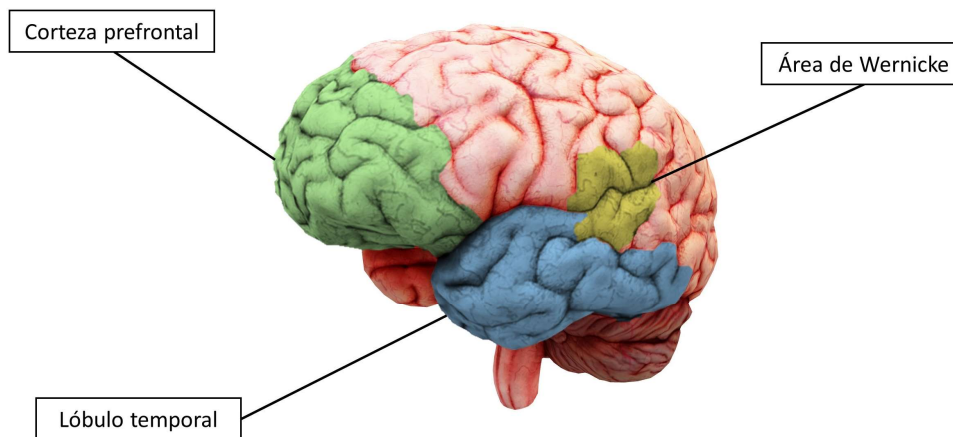


Figura 43. Principales áreas de la corteza afectadas durante la enfermedad de Alzheimer.

Como en la mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas, esta patología afecta principalmente a personas mayores de 65 años. En este caso, cuando la enfermedad de Alzheimer aparece a una edad avanzada se denomina EA de **inicio tardío**, de la cual no existe una causa conocida, pero sí se han establecido factores de riesgo que aumentan la probabilidad de padecerla, como por ejemplo la edad, el sexo, la genética, la obesidad o la diabetes.

Cuando la enfermedad de Alzheimer aparece entre los 30 y 65 años se denomina de **inicio temprano** o familiar, ya que en la mayoría de estos casos la enfermedad es hereditaria debido a un factor genético muy importante. La EA de inicio temprano representa menos del 5% de los casos de EA y se debe mayoritariamente a la aparición de una mutación en uno de los siguientes genes (Scheltens et al., 2022):

- **APP.** Este gen codifica la Proteína Precursora Amiloidea (APP, por sus siglas en inglés *Amyloid Precursor Protein*). Se trata de una proteína transmembrana que puede encontrarse principalmente en las zonas de sinapsis neuronal, por lo que numerosos estudios sugieren que su función es modular dicha sinapsis.

- **PSEN1.** Este gen codifica la proteína presenilina-1, una proteína transmembrana que posee una región catalítica. Las presenilinas forman parte del complejo proteico denominado **γ -secretasa**, aunque se ha reportado que el rol principal lo ejerce más concretamente la presenilina-1. La γ -secretasa es un complejo formado por cuatro proteínas encargado de escindir proteínas transmembrana, uno de los sustratos de esta secretasa es la Proteína Precursora Amiloide.
- **PSEN2.** Este gen codifica la proteína presenilina-2, otra presenilina que se encuentra codificada en los humanos. Se diferencia principalmente de la anterior en su distribución celular, ya que mientras que la presenilina-1 se encuentra en la membrana celular, la presenilina-2 está presente en endosomas y lisosomas.

Las secretasas se encargan de la proteólisis de algunas proteínas transmembranas, una de ellas es la APP. En caso de que la α -secretasa actúe antes que la γ -secretasa sobre la APP, se forma un péptido que no genera citotoxicidad, ya que es soluble. Pero si la γ -secretasa actúa tras la β -secretasa, se forma un péptido denominado como **β -amiloide**, el cual es insoluble (Figura 44). Este péptido de 36-43 aminoácidos que resulta de la digestión de la APP, forma agregados denominados **placas amiloides**. Estas placas se **acumulan** en el cerebro provocando un mal funcionamiento de las células del parénquima cerebral, lo que desencadena una respuesta inflamatoria por el sistema inmune, lo cual agrava el daño en las células nerviosas (Abeysinghe et al., 2020).

Cabe mencionar que además del péptido β -amiloide existen otras proteínas relacionadas con esta enfermedad. Un ejemplo es el caso de la apolipoproteína E (Apo-E), esta proteína es una de las encargadas de distribuir el colesterol y los lípidos alrededor del cuerpo, siendo la principal transportadora de colesterol hasta las neuronas en el cerebro. En función de la variable alélica que posea el individuo se asocia a un menor riesgo de padecer la enfermedad o a uno mayor, como es el caso de la variable alélica APOE4 (Scheltens et al., 2022).

A continuación se explican dos ejemplos de proteínas relacionadas con esta enfermedad, y que han sido objeto de estudio durante el desarrollo de esta tesis.

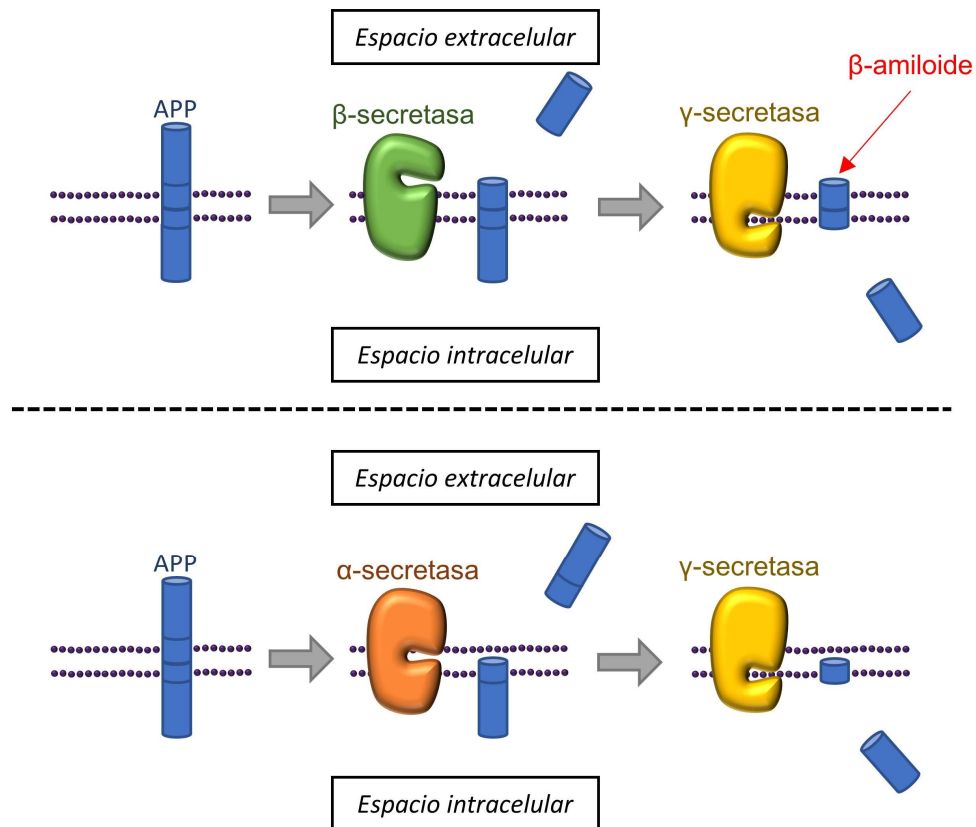


Figura 44. En la parte superior se representa un esquema de la producción del péptido β -Amiloide. En la parte inferior se observa un caso no citotóxico.

3.3.2.1. Detección de Tau

Además de los depósitos conformados por las placas amiloides, existen otro tipo de agregados característicos de la Enfermedad de Alzheimer, que también se encuentran en el cerebro, concretamente dentro de las neuronas. Es el caso de los ovillos neurofibrilares, que se forman por agregación de la proteína Tau.

La **proteína Tau** es una proteína que se expresa en las células del sistema nervioso central, cuya función es estabilizar los **microtúbulos** de los axones. Los microtúbulos forman parte del citoesqueleto de las neuronas y se encargan del transporte de todo tipo de moléculas a través del axón, además de colaborar en el crecimiento o acortamiento del axón (Sündermann et al., 2016).

Esta proteína se encuentra regulada por **modificaciones postraduccionales**, como la fosforilación, por ello, esta proteína puede encontrarse fosforilada de forma soluble sin formar agregados en condiciones no patológicas. En función de en qué aminoácidos de la secuencia de la proteína se produzcan las fosforilaciones, esta proteína tiene una mayor o menor afinidad por los microtúbulos. En el caso de la EA, cuando esta proteína se encuentra **hiperfosforilada** deja de unirse a los

microtúbulos, los cuales pierden estabilidad, y dan lugar a los **ovillos neurofibrilares**, derivando en un mal funcionamiento axonal (Drummond et al., 2020; Horie et al., 2020) (Figura 45).

Teniendo en cuenta su relevancia, la proteína Tau se ha planteado como uno de los biomarcadores más importantes en la detección precoz de esta enfermedad. En este sentido, durante el desarrollo de esta tesis se llevan a cabo diferentes kits de diagnóstico capaces de detectar esta proteína.

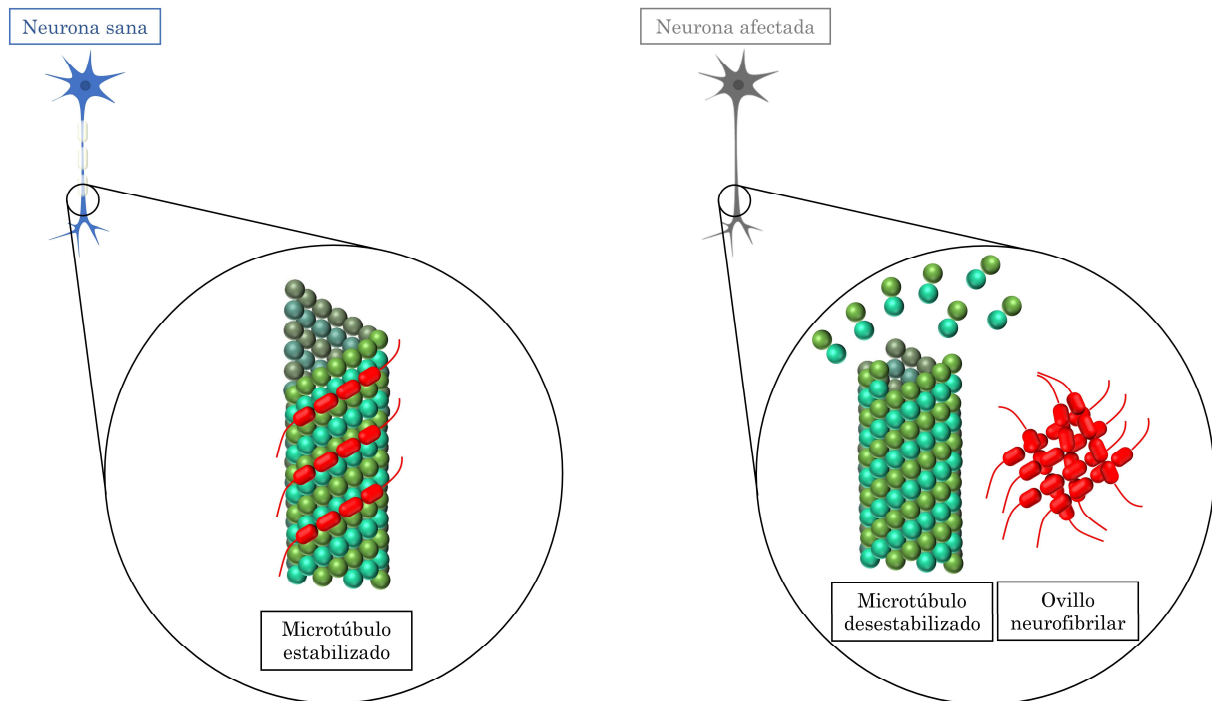


Figura 45. Esquema de la pérdida de función de la proteína Tau en la EA. En rojo la proteína Tau actúa como estabilizadora en una neurona sana, mientras en la EA forma ovillos neurofibrilares.

3.3.2.2. Detección de Lactoferrina

Otro biomarcador estudiado como posible marcador de la enfermedad de Alzheimer es la **Lactoferrina** (LF) (Carro et al., 2017). Esta glicoproteína fijadora de hierro (Rascón-Cruz et al., 2021) tiene múltiples funciones en el organismo, destacando la prevención del envejecimiento (B. Li et al., 2022; Y. Q. Li & Guo, 2021), la absorción de hierro (Rosa et al., 2017) o la modulación del sistema inmunitario (Kruzel et al., 2017; Masoudi et al., 2014).

La LF participa en la eliminación de radicales libres nocivos y en la inhibición de la formación de varios compuestos tóxicos generados durante procesos de inflamación (Kowalczyk et al., 2022). Estos compuestos agravan el estrés oxidativo

que tiene lugar en las células y potencian la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS, por las siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) (Kowalczyk et al., 2021) (Figura 46). Como se ha descrito en el apartado anterior, en la EA se produce un proceso de inflamación, en el cual se observa una mayor concentración de Lactoferrina como consecuencia de la respuesta del organismo a este proceso patológico (Bermejo-Pareja et al., 2020). Además, se ha reportado el impacto de la Lactoferrina en la ruta de AKT, la cual es una quinasa inhibidora de la fosforilación de Tau (Mohamed et al., 2019).

Teniendo en cuenta estas características en el transcurso de la tesis se desarrollan diferentes kits de diagnóstico capaces de detectar esta proteína.

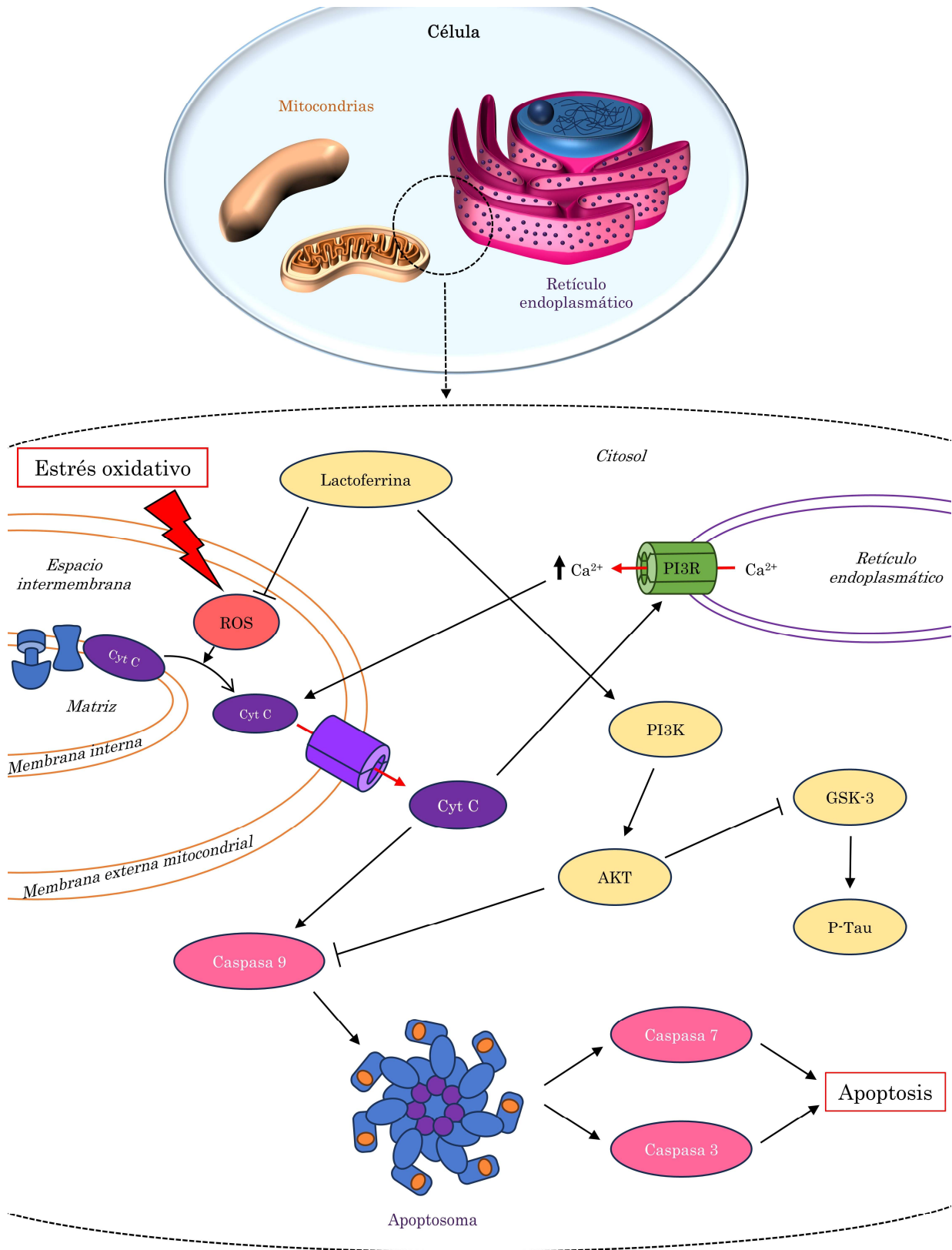


Figura 46. Cascada de señalización para la inhibición de la apoptosis por parte de la Lactoferrina.

3.3.3. Diseño de un sistema de detección in vitro para cáncer colorrectal

El último modelo de enfermedad a desarrollar en esta tesis es el cáncer de colon. Para ello, se adapta la tecnología *Organ-on-a-chip* desarrollada por el GOFB para otro tipo de muestras (Herreros et al., 2021, 2022), generando una plataforma microfluídica con la que poder emplear nanopartículas para medir biomarcadores de cáncer de colon y analizar su evolución a lo largo del tiempo.

El **cáncer** es un conjunto de enfermedades caracterizadas por un **crecimiento anormal** de células descontrolado en una parte del cuerpo, que puede **diseminarse** a otras zonas del organismo.

El **cáncer colorrectal** es uno de los tipos más comunes de cáncer, puesto que representa en torno al 10% de todos los cánceres diagnosticados anualmente a nivel mundial, siendo el segundo cáncer más frecuente en mujeres y el tercero en hombres. Estos datos epidemiológicos reflejan la importancia que tiene la investigación de este tipo de tumor (Binefa et al., 2014).

El colon es la última sección del aparato digestivo. Está dividido en seis tramos: ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoide y recto (Figura 47).

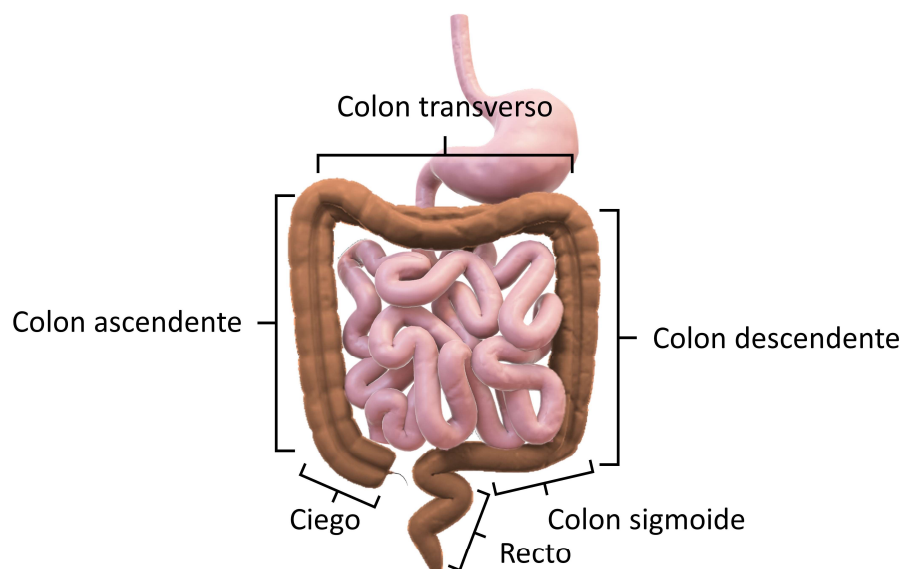


Figura 47. Esquema de las diferentes partes que conforman el colon.

Aunque existen algunos marcadores relacionados con la enfermedad, siendo el más estudiado el marcador **CEA** (por sus siglas en inglés *CarcinoEmbryonic Antigen*), no existe un biomarcador universal para este conjunto de enfermedades de alta variabilidad (Duffy et al., 2007; Fung et al., 2015). En este sentido, diseñar un sistema de detección de biomarcadores *in vitro* capaz de monitorizar la evolución del tumor podría en un futuro beneficiar a un gran número de pacientes. Para ello, como se ha mencionado anteriormente, se emplea la tecnología *Organ-on-a-chip* desarrollada por el GOFB en dos ensayos diferentes: cultivo de **biopsias** y cultivo de **organoides**, ambos derivados de tejido tumoral de colon. Este sistema de detección *in vitro* se realiza en colaboración con el Biobanco del IdISSC, el cual suministra las muestras de pacientes que han dado su consentimiento.

3.3.3.1. Fabricación de chips microfluídicos

Durante el desarrollo de la tesis se emplean principalmente dos tipos de chips microfluídicos (Tabla 1) para la fabricación de un sistema de detección *in vitro*:

- Por un lado, el primer chip microfluídico está formado por láminas de vinilo superpuestas que permiten conformar la estructura de los canales y las cámaras del interior del chip (Herreros et al., 2022). Este chip posee una tapa de PDMS y se coloca sobre un portaobjetos de vidrio.
- Por otro lado, se desarrolla un nuevo chip microfluídico formado completamente por PDMS.

Tipo de Chip	Subtipo de Chip	Imagen
Chip de vinilo	Con membrana	
	Sin membrana	
Chip de PDMS	Sin tapa	
	Con tapa	

Tabla 1. Clasificación de los diferentes tipos y subtipos de chips microfluídicos empleados.

3.3.3.1.1 Fabricación de chips microfluídicos de vinilo

Los chips microfluídicos de vinilo constan de una parte superior de vinilo y una parte inferior también de vinilo, además de una tapa de PDMS que es permeable a gases, permitiendo el intercambio de gases del medio y de la muestra con la atmósfera del incubador.

La **parte superior** presenta una precámara, que está diseñada para poder inyectar algún compuesto dentro del chip durante su incubación, como puede ser un fármaco o una tinción, y una cámara principal en la que se encuentra la biopsia (diseño superior de la Figura 48). Además, se pueden observar los canales de entrada y salida por los que se hará pasar el medio de cultivo.

La **parte inferior** posee un canal fluídico continuo que une los canales de entrada y de salida del medio de cultivo y que atraviesa la precámara y la cámara, las cuales comunican con las cámaras de la parte superior (diseño inferior de la Figura 48).

En la cámara se encuentra la biopsia en el caso del chip sin membrana, mientras que en el caso del chip con membrana supone la zona de contacto con la membrana permeable.

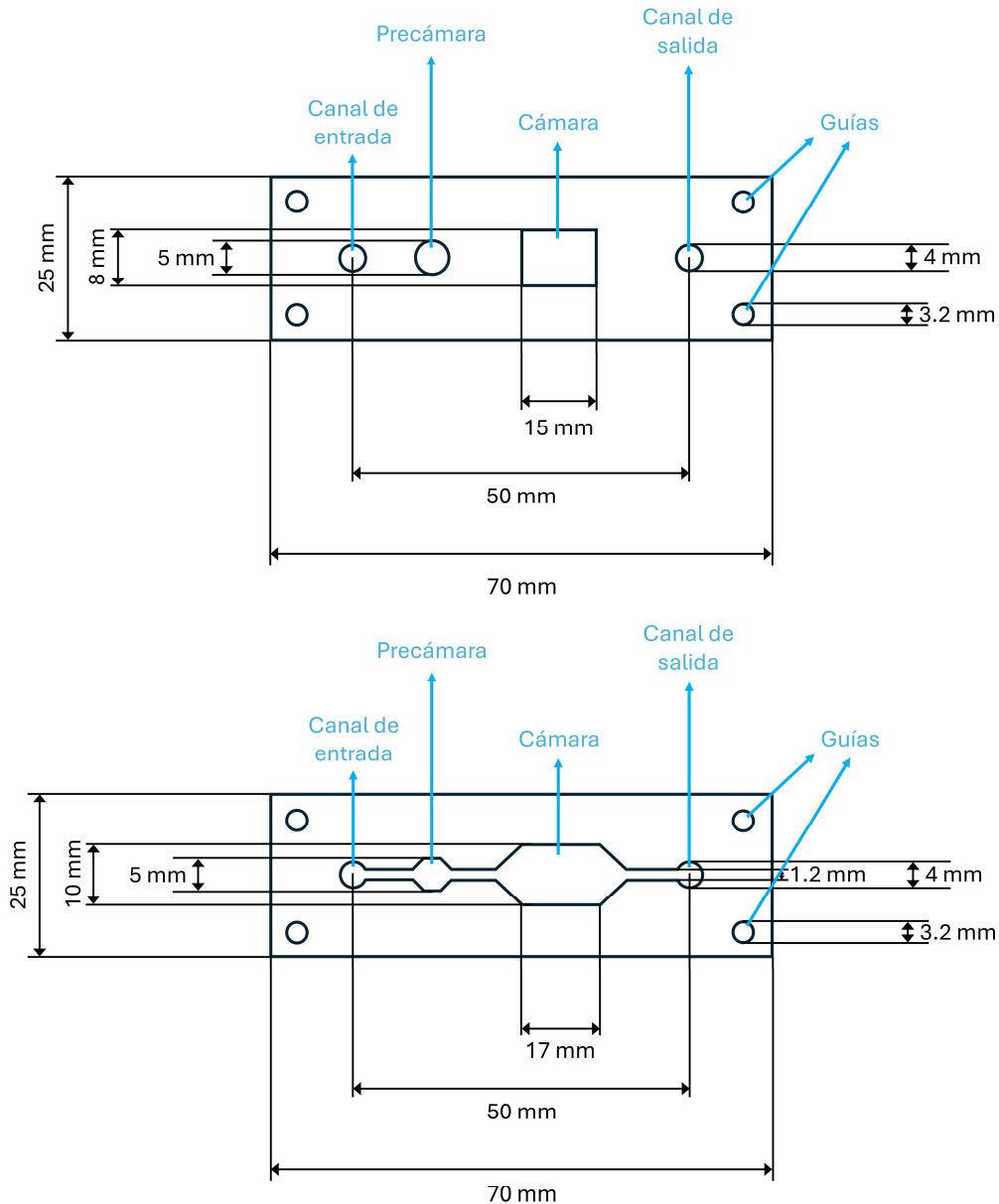


Figura 48. En el diseño superior se observan las dimensiones de la parte superior del **chip microfluídico de vinilo**. En el diseño inferior se visualizan las dimensiones de la parte inferior del chip.

Tanto en la parte superior como en la parte inferior se pueden observar cuatro agujeros por los que pasarán las guías que se utilizan durante el proceso de montaje (Figura 49A).

Como se ha mencionado anteriormente, se emplean dos tipos de chips microfluídicos de vinilo. El primer tipo de estos chips es un chip en cuyo interior se encuentra una membrana de policarbonato entre la parte superior y la parte inferior del chip, esta permite el intercambio de nutrientes entre los dos lados. El segundo tipo es un chip en el cual no se emplea esta membrana. La necesidad de emplear estos dos tipos de chips surge de que la bibliografía existente sobre el cultivo de tejidos plantea dos enfoques distintos. Por un lado, cuando las biopsias se encuentran sumergidas completamente en el medio de cultivo, sin necesidad de membrana, presentan un mejor suministro de nutrientes, sin embargo, conlleva una menor supervivencia debido al suministro limitado de oxígeno. Por el otro lado, existen los cultivos interfásicos, donde los tejidos tienen acceso al oxígeno puesto que se cultivan sobre una membrana porosa y permeable a los nutrientes.

El primer paso del montaje de los chips microfluídicos con membrana consiste en emplear un *plotter* para obtener las secciones utilizadas más adelante. El *plotter* es una impresora capaz de imprimir diversos materiales sobre los que realizar cortes con gran precisión.

Las secciones consisten en **láminas de vinilo** (adhesivas por un único lado), que pueden encontrarse en la Figura 49B, y en **láminas de vinilo de doble cara** (ambos lados son adhesivos), que pueden observarse en la Figura 49C. En el caso de las láminas de vinilo se pegan previamente un vinilo sobre otro, obteniendo una **lámina de vinilo doble**, lo que reduce el número de pasos del protocolo.

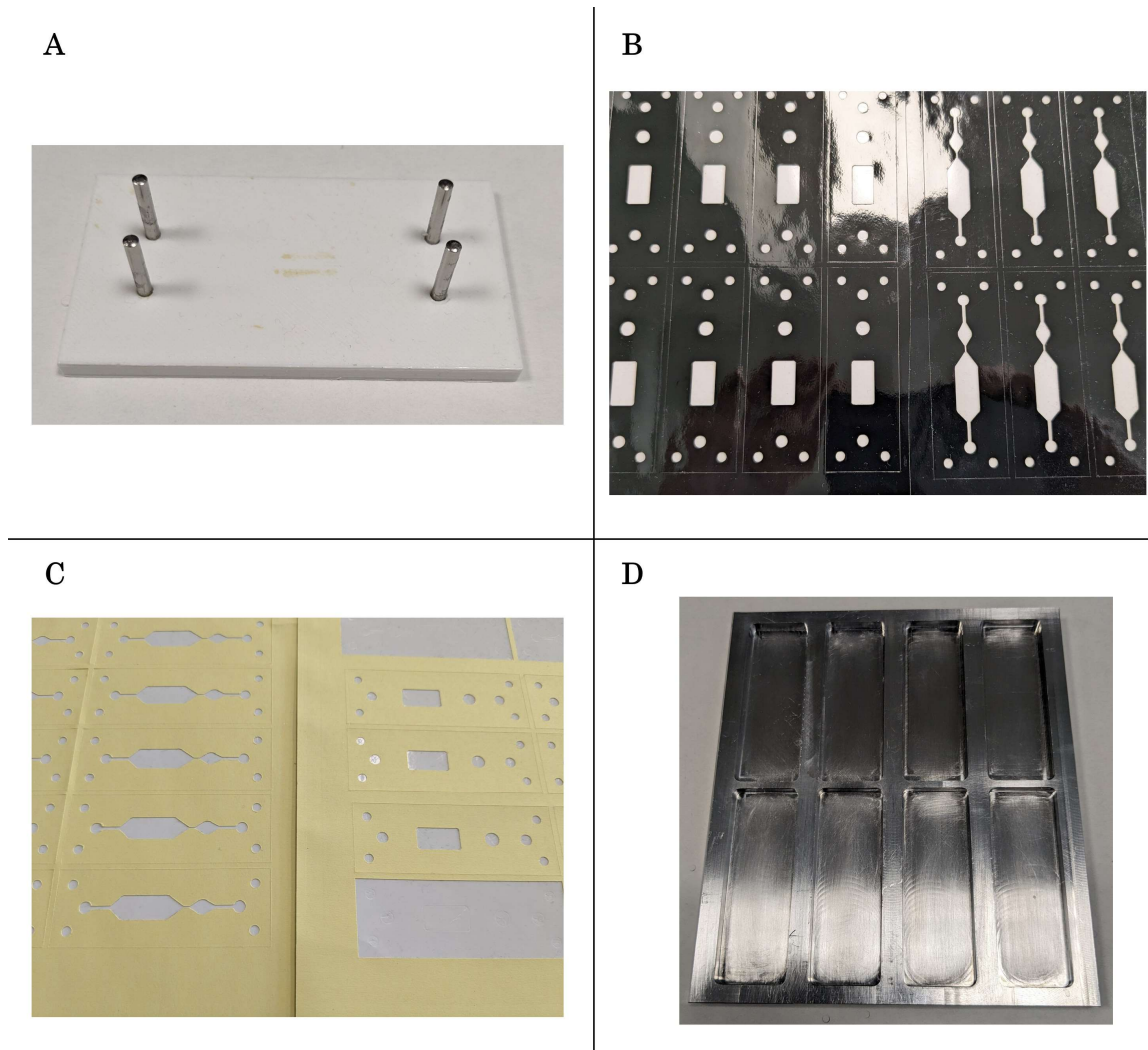


Figura 49. Material utilizado para el desarrollo de los chips microfluídicos de vinilo. A) montador. B) Vinilo. C) Vinilo de doble cara. D) Molde de PDMS.

Una vez obtenidas las secciones a utilizar, se eliminan las partes correspondientes a los canales fluídicos y a las cámaras en las que se lleva a cabo la incubación. Seguidamente, se introducen las láminas de vinilo de doble cara a través de las cuatro guías del **montador** que aparece en la Figura 49A en el siguiente orden (Figura 50):

1. Se colocan 4 vinilos dobles superpuestos con la parte adhesiva hacia abajo.
2. En el caso de que el chip presente membrana, se coloca a continuación un vinilo de doble cara sobre el que pegar la membrana para que esta se adhiera al chip.
3. Seguidamente se colocan 5 vinilos dobles superpuestos con la parte adhesiva hacia abajo.

- Finalmente, se coloca un vinilo de doble cara y sobre este se pega, por último, un vinilo doble con la parte adhesiva hacia arriba, el cual se une posteriormente a la tapa de PDMS.

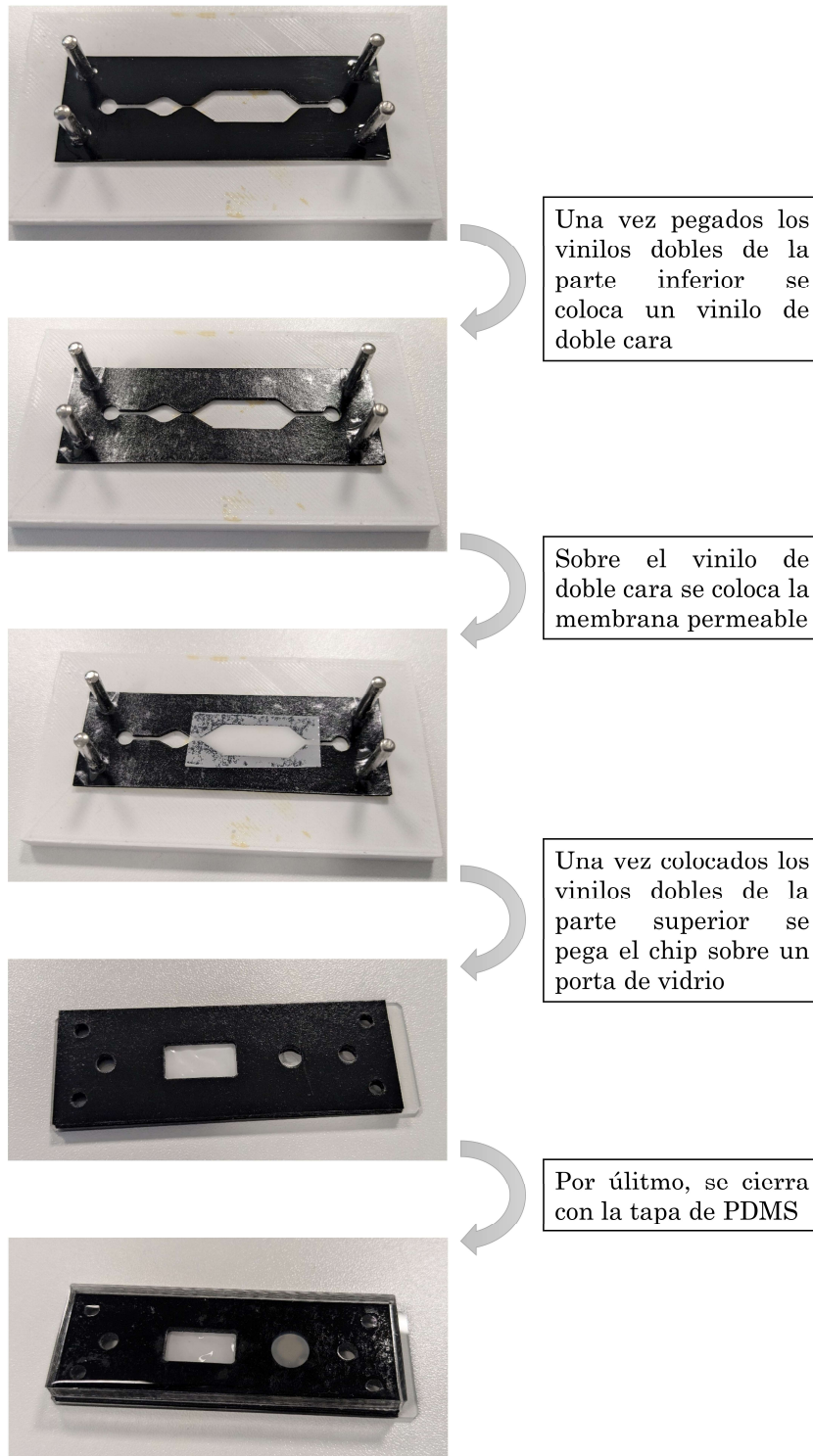


Figura 50. Pasos en el montaje de un chip de vinilo.

Cabe mencionar que, tanto para la primera lámina, como para la última se utiliza una lámina protectora que evita la adhesión indeseada al montador.

Tras realizar esta disposición se extrae el chip del montador y se retira la lámina protectora inferior para poder pegar el chip sobre un **portaobjetos de vidrio**. Seguidamente, se coloca sobre una placa calefactora durante 40 minutos a 90 °C para asegurar la adhesión mediante el tratamiento con calor, evitando posibles fugas entre láminas. Para ello, se emplea un peso que ejerza presión, transcurridos 30 minutos, se cubre el chip con la tapa de PDMS.

Esta tapa se fabrica mezclando el **PDMS** con un 10% de entrecruzante, tras lo cual se deposita sobre un molde (Figura 49D). En este momento se añade un tapón de teflón, que permite inyectar sustancias en la segunda cámara del chip microfluídico. Después de 48 horas, los bloques de PDMS se solidifican. Además, se realizan perforaciones con un *puncher* de 2.5 mm en los lugares donde irán los canales de entrada y salida del chip, en estos agujeros se introducen los tubos que permiten el flujo de líquidos.

Finalmente, se une el chip al bloque de PDMS, sin embargo, dado que es necesario incluir una biopsia en el interior, esto se realiza tras introducir la biopsia dentro del chip microfluídico.

Una vez el chip se encuentre montado a los canales de entrada y salida se les unirán dos tubos. El tubo de entrada mide 1.5 m y está conectado a la jeringa encargada de suministrar el medio de cultivo gracias a la bomba de perfusión. El tubo de salida mide 0.2 m y su extremo se encuentra en un Eppendorf que recolecta el medio de cultivo eluido.

3.3.3.1.2 Fabricación de chips microfluídicos de PDMS

Para el desarrollo de organoides los chips microfluídicos empleados son diferentes respecto a los explicados en la sección anterior. Estos chips son más sencillos de fabricar, ya que están formados por **dos bloques de PDMS unidos** entre sí para conformar el chip. A pesar de esto, el diseño es similar al anterior como puede observarse en la Figura 51, sin embargo, el tamaño de la cámara es más reducido, puesto que no es necesario incubar biopsias enteras.

Estos chips también presentan dos partes, una inferior y una superior. En la superior se encuentran las dos cámaras anteriormente mencionadas, (la de incubación y la de inyección), mientras que, en la inferior, además de las dos cámaras se puede observar el canal por el que transcurre el medio de cultivo.

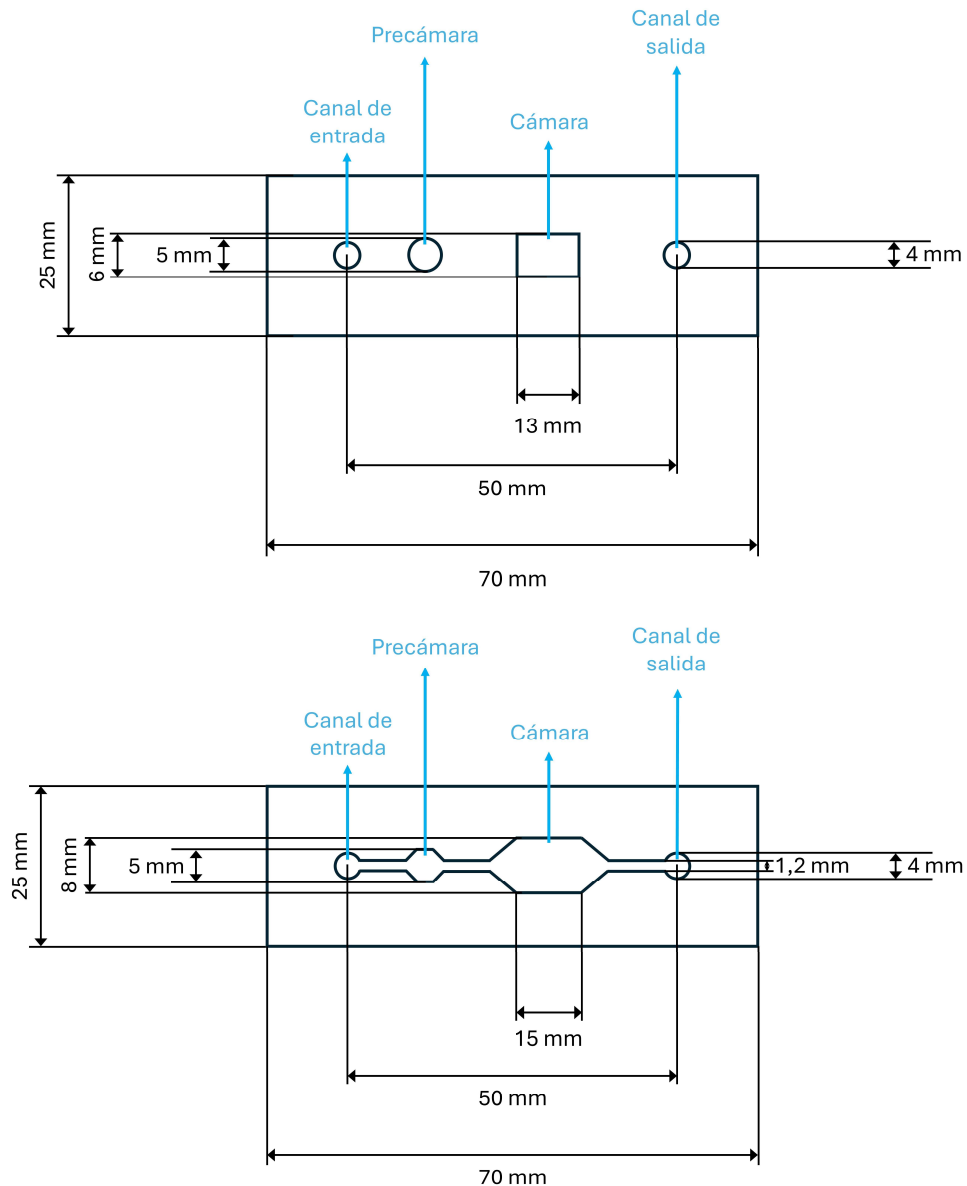


Figura 51. En el diseño superior se observan las dimensiones de la parte superior del **chip microfluídico de PDMS**. En el diseño inferior se visualizan las dimensiones de la parte inferior del chip.

Dado que no se utilizan vinilos, el protocolo de fabricación es más corto. Para generar estas piezas el bloque de PDMS se fabrica mezclando el PDMS con un 10% de entrecruzante, tras lo cual se deposita sobre el molde (Figura 52). En este punto se añade un tapón de teflón justo al lado de la cámara de incubación, para poder inyectar en la primera cámara del chip microfluídico. Tras 48 horas los bloques de PDMS solidifican.



Figura 52. Molde para la fabricación de piezas de PDMS.

Para unir la parte inferior y la parte superior de PDMS se realiza un ataque de plasma de oxígeno durante 2 minutos a 90 W. A continuación, se unen ambos bloques haciendo coincidir las cámaras y se ejerce presión (Figura 53). Finalmente, se colocan en un horno a 80 °C durante una hora.

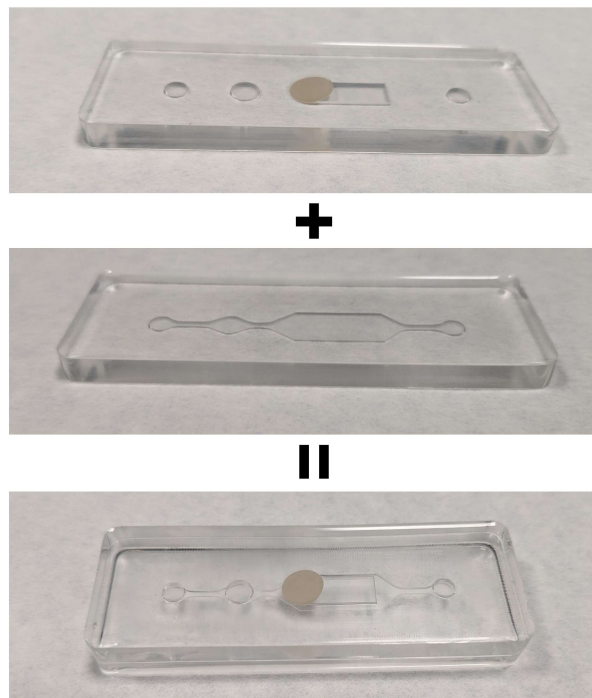


Figura 53. Montaje de un chip microfluídico de PDMS.

Existen dos variaciones de estos chips microfluídicos:

- Por un lado, se encuentra el **chip sin tapa**. Este chip no presenta ninguna modificación, por lo que para poder inyectar la muestra se coloca un tapón de teflón junto a la cámara de incubación (Figura 53).
- Por otro lado, existen los **chips con tapa**, a los que se les recorta el PDMS que cubre la cámara de incubación para poder depositar la muestra directamente. Tras colocar la muestra se utiliza como tapa un bloque de PDMS unido a un adhesivo de doble cara, de manera que el chip permanece cerrado y se mantiene estanco (Figura 54).

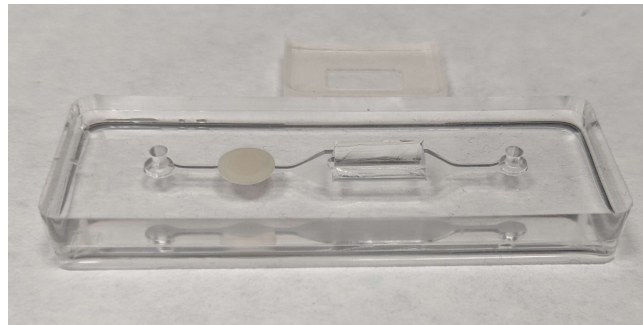


Figura 54. Chip microfluídico con tapa. Se puede observar la escisión por la que puede depositar la muestra, y en la parte superior la tapa que se emplea para cerrar el sistema.

3.3.3.2. Cultivo de biopsias

Este capítulo de la tesis está impulsado por la necesidad de mantener en condiciones controladas biopsias derivadas de cáncer de colon para poder estudiar los biomarcadores de la enfermedad durante un periodo concreto.

Para ello, se obtienen muestras de **cáncer colorrectal** cedidas por pacientes, que firmaron previamente un consentimiento informado, en colaboración con el Biobanco de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC).

Las muestras recogidas consisten en biopsias de **tejido tumoral y de tejido no tumoral** obtenidas de una misma cirugía, estas son seleccionadas por un patólogo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos. Una vez obtenidas se transportan hasta el CTB en medio de cultivo DMEM/F12 (por sus siglas en inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) en frío. Allí, estas biopsias son incubadas en chips microfluídicos con el fin de analizar el medio eluyente del chip para detectar biomarcadores.

Para la realización del modelo de enfermedad de cáncer de colon desarrollado en esta tesis se emplean dos tipos de chips microfluídicos, **un chip sin membrana o uno con membrana** permeable de policarbonato (Herreros et al., 2022).

Los chips fabricados son esterilizados haciendo pasar por ellos etanol al 70%, tras lo cual se hace pasar PBS estéril para eliminar restos de etanol.

Mientras se recibe y registra la biopsia en el biobanco del IdISSC, el bloque de PDMS se esteriliza con etanol 70%. Cuando el alcohol se evapora, se le aplica un ataque de plasma de oxígeno durante 2 minutos a 80 W y se aplica 15 min de luz ultravioleta para esterilizarlo nuevamente, ya que el plasma de oxígeno no es estéril.

Por último, se retira la lámina protectora de la última lámina del chip microfluídico, se introduce la biopsia y se adhiere el bloque de PDMS activado por plasma con el chip (Figura 55).

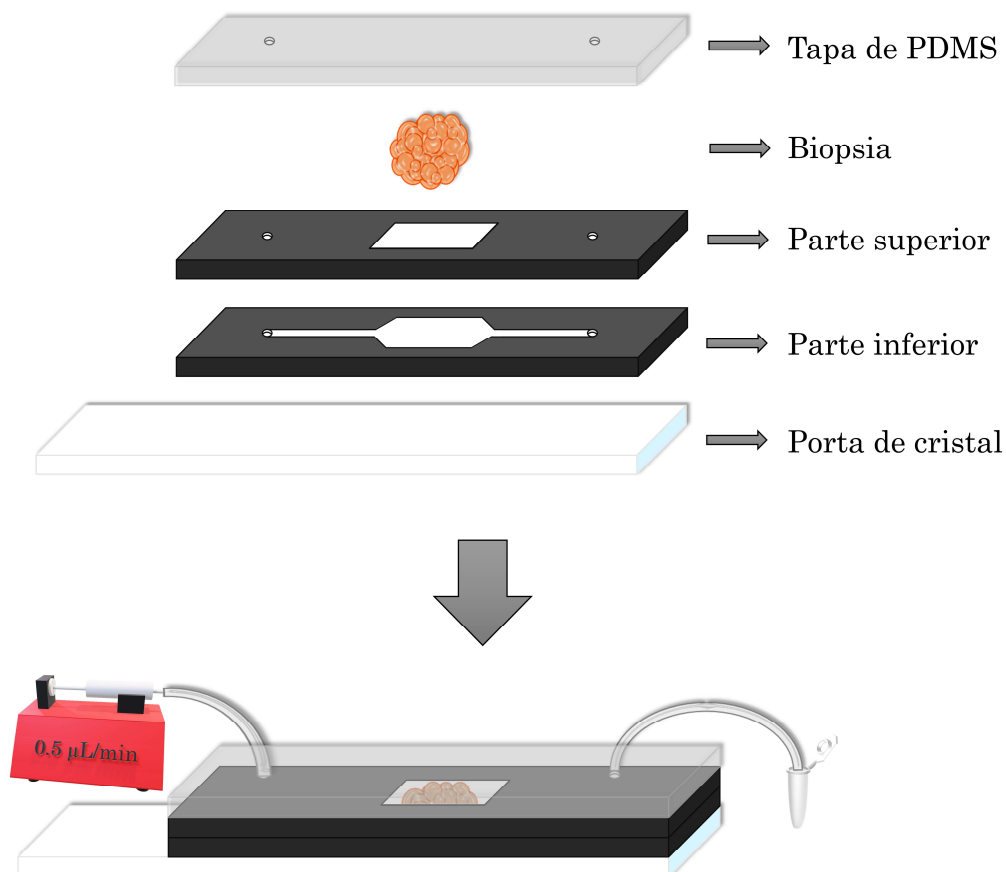


Figura 55. Esquema de la inserción de una biopsia en un chip de vinilo.

Una vez que se monta el chip con la biopsia en su interior, se lleva a cabo el cebado del chip con medio de cultivo DMEM/F12 con un caudal de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. En la Figura 56 se puede observar la conexión de una **bomba** a un chip dentro de un **incubador**. En este ensayo se cultivan las biopsias a 37 °C con 5% de CO_2 y un flujo de 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Una muestra de cómo pasa el medio de cultivo a través del chip se puede ver en la Figura 57, en la cual se emplea un colorante verde para apreciar mejor.



Figura 56. Imagen de una de las bombas que suministran medio de cultivo dentro del incubador.

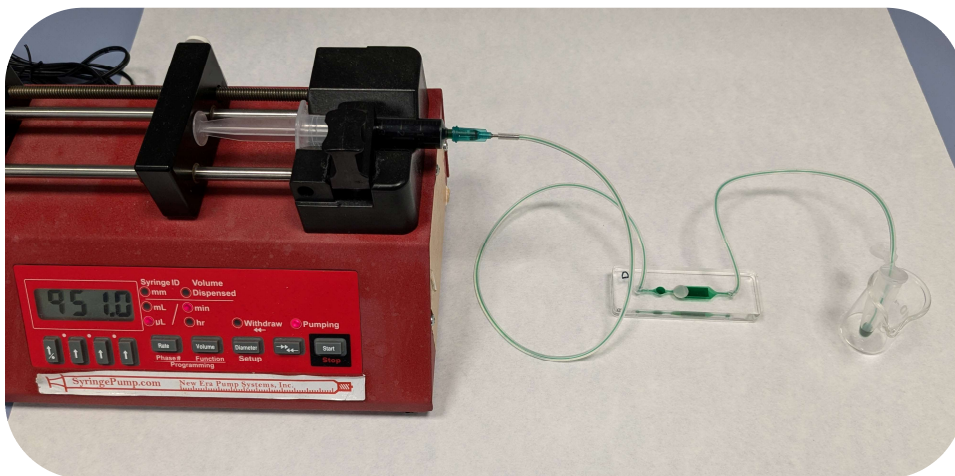


Figura 57. Imagen de una de las bombas que suministra un colorante a través de un chip de PDMS

3.3.3.3. Desarrollo de organoides

Además del cultivo de biopsias de cáncer de colon, en esta tesis se propone el desarrollo de organoides derivados de tejido intestinal como posible modelo de diagnóstico para la detección de esta patología. Para este ensayo se utilizan los chips microfluídicos de PDMS que han sido presentados en la sección 3.3.3.1.2., tanto los chips sin tapa como los chips con tapa.

Como se ha explicado en la sección 2.3.1.2. la generación de organoides ha sido objeto de estudio en los últimos años. De acuerdo con la bibliografía (Papaccio et al., 2023; Sato et al., 2011; Van De Wetering et al., 2015), la generación de estas estructuras 3D está condicionada por la incorporación de una extensa variedad de factores de crecimientos y suplementos al medio de cultivo (Figura 58).

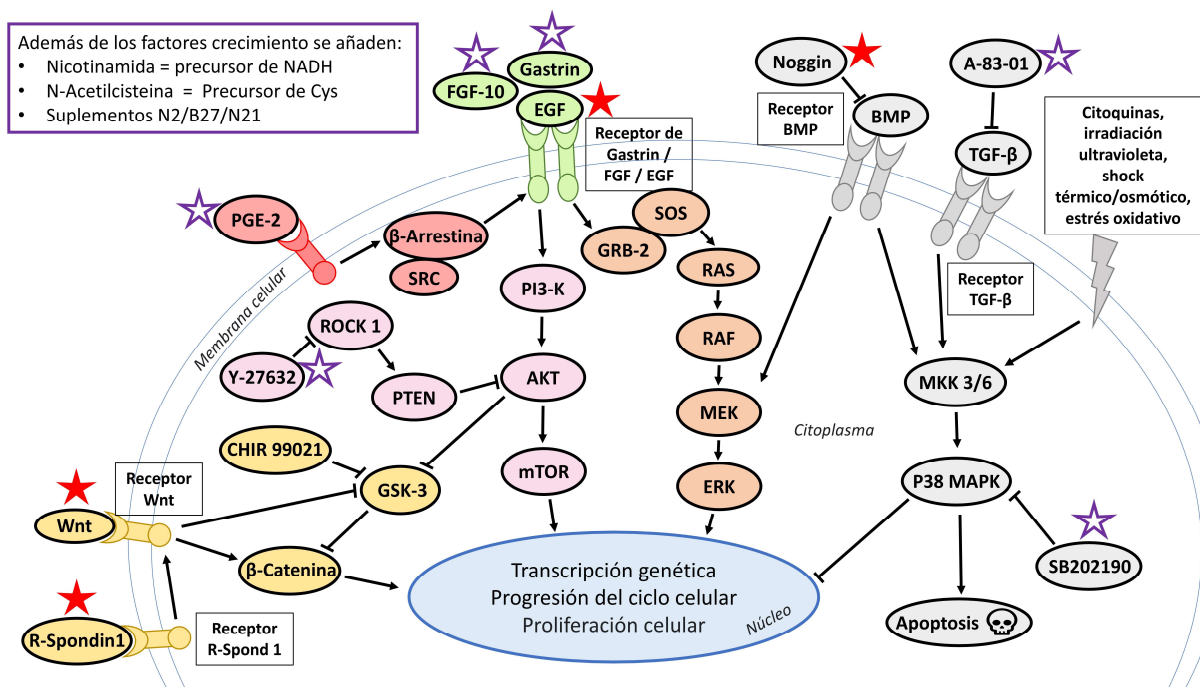


Figura 58. Rutas de señalización de los factores de crecimiento más empleados en el cultivo de organoides para inducir la proliferación. Con una estrella roja se señala aquellos factores que se emplean en la bibliografía, y con una estrella morada se muestra aquellos propuestos en algunos artículos.

El objetivo de esta tesis es el desarrollo de **un sistema de diagnóstico**, no la puesta a punto de un protocolo de generación de organoides. Por ello, se emplea un medio **cultivo comercial** que ya incorpora algunos de estos factores de crecimiento: IntestiCult™ *Organoid Growth Medium (Human)* (Stemcell. Ref.: 06010). Gracias a él y a un modelo de chips microfluídico más simple se eliminan variables que pueden afectar al objetivo principal, la **detección de biomarcadores**.

Para generar **organoides** a partir de tejido humano se obtienen muestras de pacientes con cáncer colorrectal en colaboración con el Biobanco de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), estos pacientes firmaron un consentimiento informado.

Se trata de biopsias de tejido tumoral y de tejido no tumoral obtenidas durante una misma cirugía y seleccionadas por un patólogo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos. Seguidamente, se transportan hasta el CTB en medio HBSS (siglas de su nombre en inglés *Hank's Balanced Salt Solution*) en frío.

Una vez en la campana de cultivos del laboratorio NCB-2 (nivel 2 de contención biológica) del CTB las biopsias se lavan con PBS frío y se elimina el sobrenadante. Posteriormente, las biopsias son **digeridas** físicamente con tijeras de cirugía, seguido de una solución de digestión (*Gentle Cell Dissociation Reagent*. Ref.: 100-0485). A partir de este punto se emplean puntas de pipeta recubiertas previamente con BSA al 1% en DMEM.

Tras la incubación de las biopsias en la solución de digestión en movimiento durante 30 min, se agitan vigorosamente con un 1 mL de DMEM/F12 con BSA al 1%, utilizando una pipeta para remover mejor las criptas del tejido. Posteriormente, se pasan a través de un filtro de 100 μm , se cuenta el número de criptas que hay en 10 μL de la digestión para ambos casos (tejido tumoral y no tumoral), y se calcula cuantas criptas hay en 1 mL.

Se emplean 200 **criptas** por cada pocillo o chip microfluídico en el que se va a cultivar estos organoides. El siguiente paso es añadir **en frío** 25 μL del medio de cultivo con las criptas a 25 μL de una **matriz 3D** de Matrigel (Corning™, ref.: 356231), que ofrece estabilidad a las estructuras que se vayan a formar (Figura 59). Esta matriz se prepara previamente en frío siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

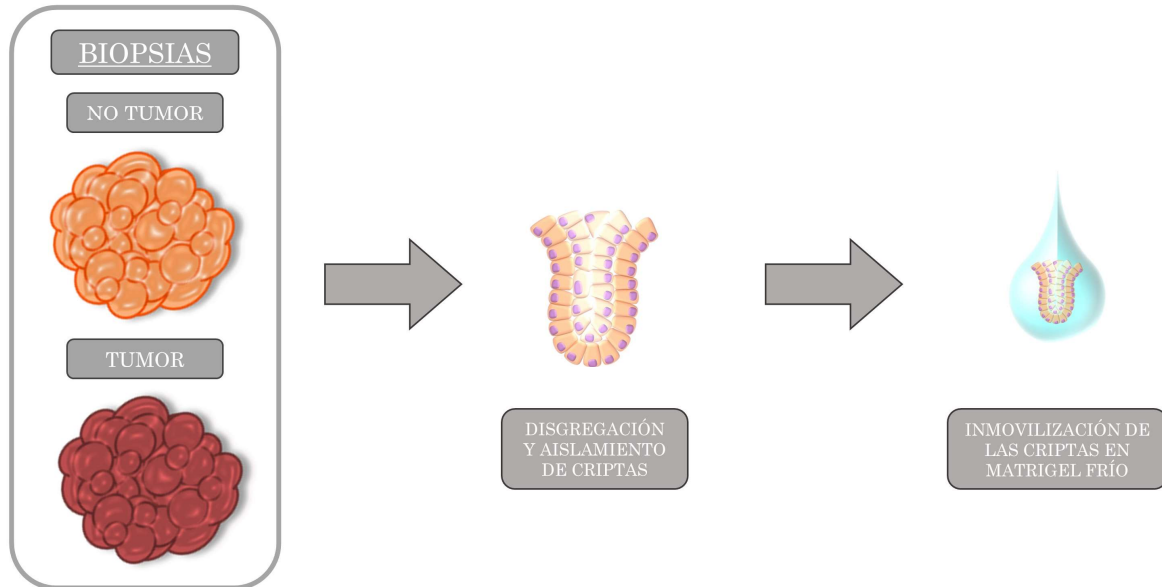


Figura 59. Esquema de la obtención de criptas en una matriz 3D.

Se añaden 50 μL de esta mezcla por cada chip microfluídico. En el caso de los chips sin tapa, la mezcla se introduce con una jeringa, cuya aguja debe estar fría, a través de un tapón de teflón incorporado en el chip. En cambio, en los chips con tapa se añade la mezcla con una pipeta, y posteriormente se tapa el chip para hacerlo estanco (parte superior de la Figura 60). Asimismo, se pipetea 50 μL de la mezcla en cada pocillo de la placa de cultivo (parte inferior de la Figura 60). Tras 15 min en el incubador a 37 $^{\circ}\text{C}$, la matriz se **solidifica**, en ese punto el medio de cultivo de organoides puede ser añadido.

En el caso de los chips microfluídicos una bomba suministra el medio de cultivo IntestiCult que incluye factores de crecimiento con un flujo de 0.26 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Figura 61). Por otro lado, en el caso de los pocillos de la placa de cultivo se añaden 0.75 mL del medio de cultivo IntestiCult, que se renueva cada dos días. El flujo de los chips microfluídicos está calculado para que sea equivalente al medio suministrado a los pocillos.

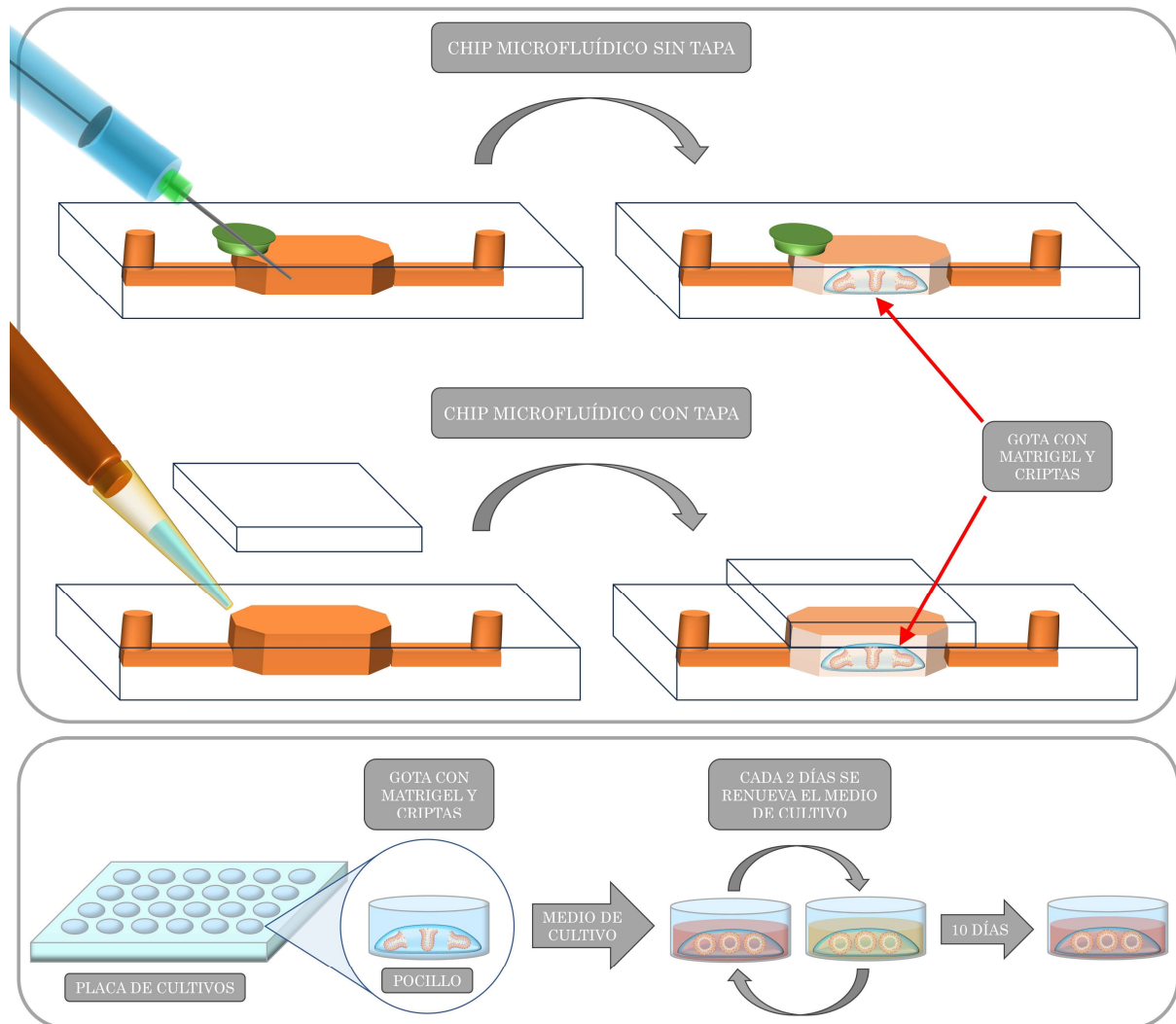


Figura 60. Esquema de la inclusión de la solución de criptas y matriz 3D en chips microfluídicos (parte superior) y en los pocillos de una placa de cultivo (parte inferior).

El medio eluyente de los chips microfluídicos **se recolecta** para el análisis de **biomarcadores** (Figura 61). También se recoge el medio extraído de los pocillos cada dos días.

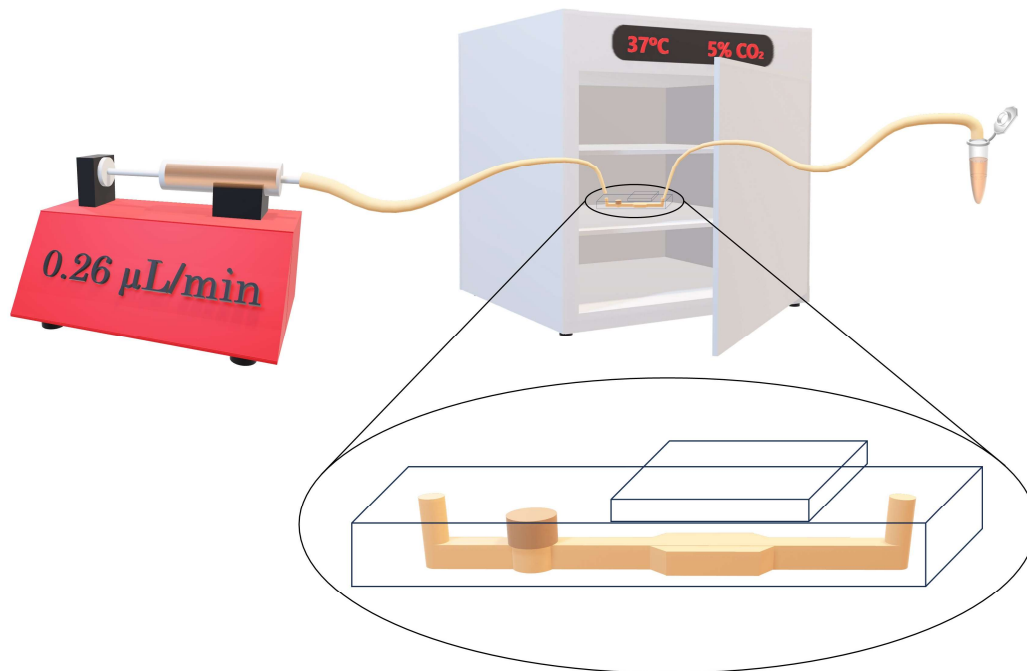


Figura 61. Empleo de una bomba para el suministro de medio de cultivo y recolección del medio eluyente.

Cada dos días se observan y analizan los organoides en un microscopio invertido Leica DMI3000 B emparejado a una cámara DFC 340 FX, y se **obtienen imágenes** tanto de los chips como de los pocillos de las placas de cultivo (Figura 62). Finalmente, se caracterizan al cabo de 10 días.

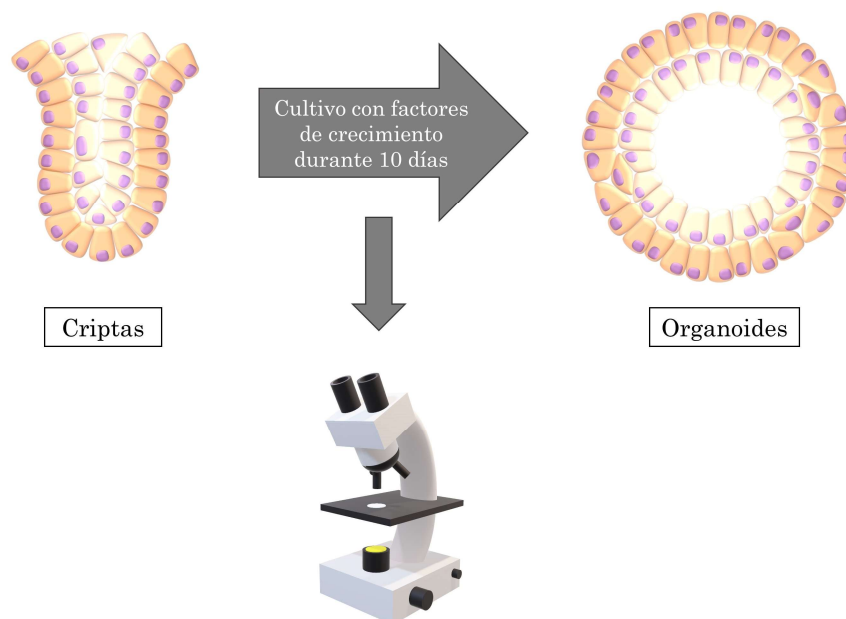


Figura 62. Visualización de la formación de organoides cada dos días.

3.3.3.3.1 Caracterización de organoides

Una vez finalizado el proceso de generación de organoides, **se caracterizan** para corroborar que las imágenes obtenidas pertenecen a organoides derivados de tejido colorrectal. Para ello se emplean dos marcadores que serán visualizados mediante **microscopía de fluorescencia**:

- **Queratina 20**, también denominada citoqueratina 20 (CK20). Se trata de una proteína localizada en el citoplasma, formando parte del citoesqueleto celular, concretamente se encuentra en los filamentos intermedios de enterocitos y de células caliciformes. Gracias a estas características permite corroborar que las células observadas derivan de la **mucosa intestinal** (Bergenheim et al., 2020; d'Aldebert et al., 2020). El anticuerpo empleado es producido en ratón, *Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 20* (Dako Omnis Clone Ks20.8, ref.: GA77761-2).
- **Antígeno Ki-67 (Ki-67)**. Es una proteína nuclear relacionada con la proliferación celular, dado que esta proteína se encuentra altamente expresada en células cancerosas, se emplea como marcador tumoral. Así, este marcador permite observar la presencia de células en **proliferación** dentro de los organoides, y por lo descrito anteriormente se espera visualizar una mayor expresión de esta proteína en los organoides derivados de tejido tumoral (Bergenheim et al., 2020; d'Aldebert et al., 2020). El anticuerpo empleado se produce en conejo, *Ki-67 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody* (SP6, Invitrogen, ref.: MA5-14520).

La técnica de microscopía de fluorescencia emplea uno o varios marcadores fluorescentes, denominados **fluoróforos**, que son excitados a una longitud de onda específica mediante un láser. Tras absorber parte de la energía del haz, los fluoróforos emiten luz en una longitud de onda mayor que la empleada en el láser, y por tanto de menor energía (Figura 63A). Esta **emisión de fluorescencia** es la que se visualiza gracias al empleo de un filtro de emisión en un microscopio de fluorescencia (Figura 63B).

Para el desarrollo de esta tesis se emplean dos tipos de microscopios. Por un lado, se ha empleado un microscopio de fluorescencia invertido Leica DMI3000 B emparejado a una cámara DFC 340 FX, como se ha descrito previamente. Por otro lado, un microscopio confocal de fluorescencia, con características más complejas, que permiten visualizar planos del espacio, obteniendo imágenes con más detalle, ya que elimina la señal que se encuentra fuera de foco (Figura 63C). La instalación

de microscopía confocal incluye dos microscopios confocales de barrido láser: un Zeiss LSM 710 con 5 cabezales láser (405, 488, 543, 594 y 633 nm) y un Leica SP8 AOBS, WLL Laser + Argón (458, 476, 488, 496, 514,) y 405 láseres y 2PMT+2HyD.

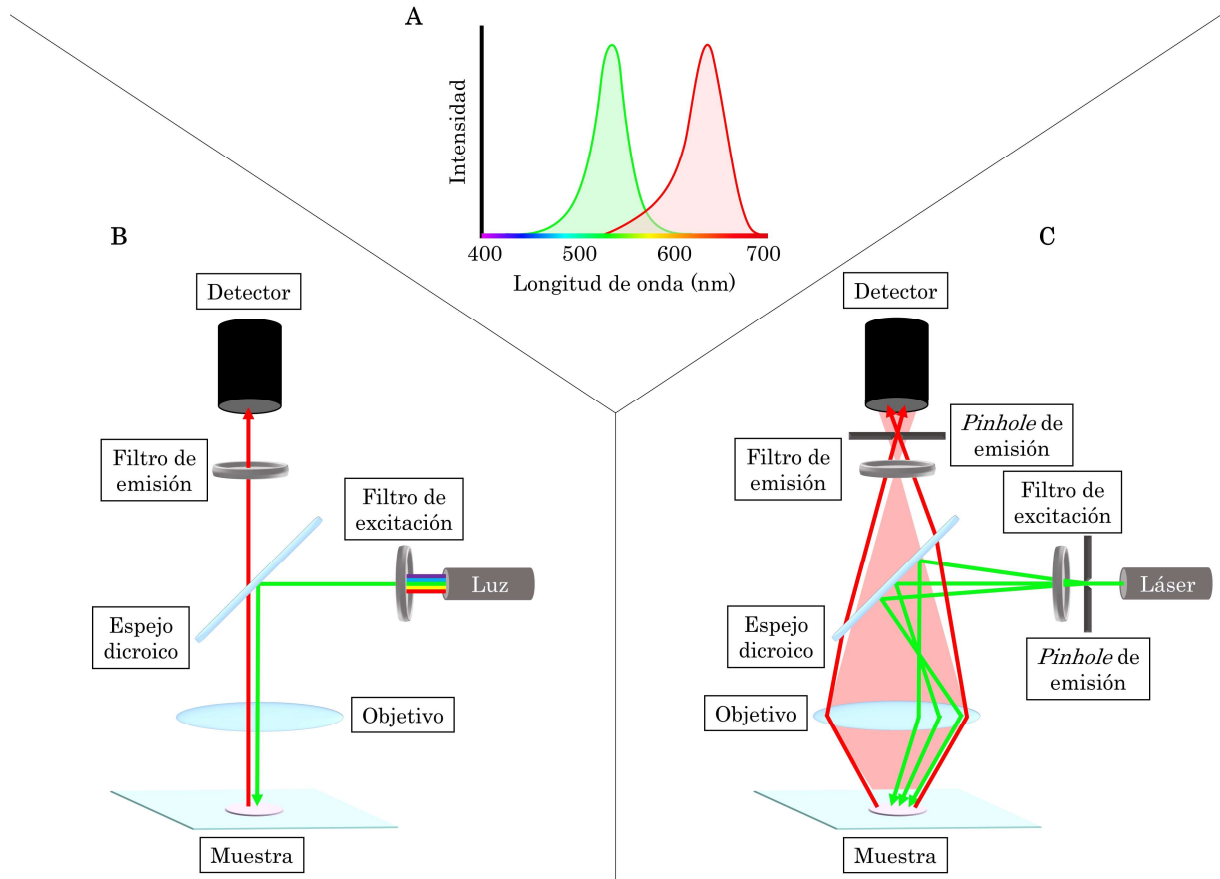


Figura 63. A. En verde el espectro de absorción de una muestra fluorescente, en rojo el espectro de emisión de esta misma muestra. B. Esquema de los componentes de un microscopio de fluorescencia. C. Esquema de los componentes de un microscopio confocal de fluorescencia.

En esta tesis se utilizan como fluoróforos el marcador Hoechst y dos fluoróforos unidos a anticuerpos:

- El **marcador Hoechst** es un colorante empleado para la tinción de **núcleos**, puesto que es capaz de intercalarse en el ADN. Este marcador es excitado por luz ultravioleta cuya longitud de onda es cercana a 350 nm, y es capaz de emitir en una longitud de onda alrededor de 461 nm, por lo que se visualiza como una fluorescencia **azul**.
- Además, se emplea un fluoróforo acoplado a un anticuerpo: *Goat anti-Mouse IgG (H+L), Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody, Alexa Fluor 488* (Invitrogen ref.: A28175). Este anticuerpo se une a **anticuerpos IgG**

procedentes de **ratón**, y el fluoróforo acoplado se excita a una longitud de onda de 488 nm y emite en una longitud de onda alrededor de 525 nm, por lo que se visualiza como una fluorescencia **verde**.

- Por último, se emplea un anticuerpo *Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), Highly Cross-Adsorbed, CF®594*. (Biotium, ref.: 20152). En este caso el anticuerpo se une a **anticuerpos IgG** de **conejo**, y el fluoróforo acoplado se excita a una longitud de onda de 594 nm y emite en una longitud de onda alrededor de 614 nm, es decir, se visualiza como una fluorescencia **roja**.

Estos anticuerpos que llevan acoplados fluoróforos se denominan anticuerpos secundarios, ya que se unen a los anticuerpos primarios y revelan la imagen mediante los fluoróforos que acoplan. El marcaje de la muestra con estos anticuerpos se lleva a cabo mediante el siguiente protocolo:

En primer lugar, se retira el medio de cultivo para tener acceso a los cristales que contienen el cultivo de los organoides. Se fija el cultivo durante 15 min en paraformaldehído al 4% en frío y seguidamente se realizan tres lavados con PBS frío. Tras ello, se permeabiliza y se bloquea los organoides con una solución de BSA al 1% y Tritón-X100 al 0.1% diluidos en PBS. Se incuban con los anticuerpos primarios a 4 °C en una noria durante 24 horas (diluidos 1:100 en la solución de bloqueo), y seguidamente se realizan tres lavados con PBS frío. Después se incuban con los anticuerpos secundarios a temperatura ambiente en una noria durante 1 hora (dilución 1:100 en la solución de bloqueo), y se lava tres veces con PBS frío. Posteriormente, se incuban con el marcador Hoechst durante 10 min (dilución 1:1000 en PBS) y se realizan 3 lavados con PBS frío. Por último, se utiliza Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich, ref.: F6182) como medio de montaje para su posterior visualización en el microscopio de fluorescencia.

El objetivo de este protocolo es, una vez generados los organoides, visualizar un conjunto de células cuya morfología se muestra en verde, y cuyos núcleos estén teñidos de azul. Además, se espera observar ciertos núcleos en rojo, lo cual indica que en esos organoides se está produciendo un crecimiento celular, y una mayor presencia de estos núcleos rojos en los organoides derivados de tejido tumoral (Figura 64).

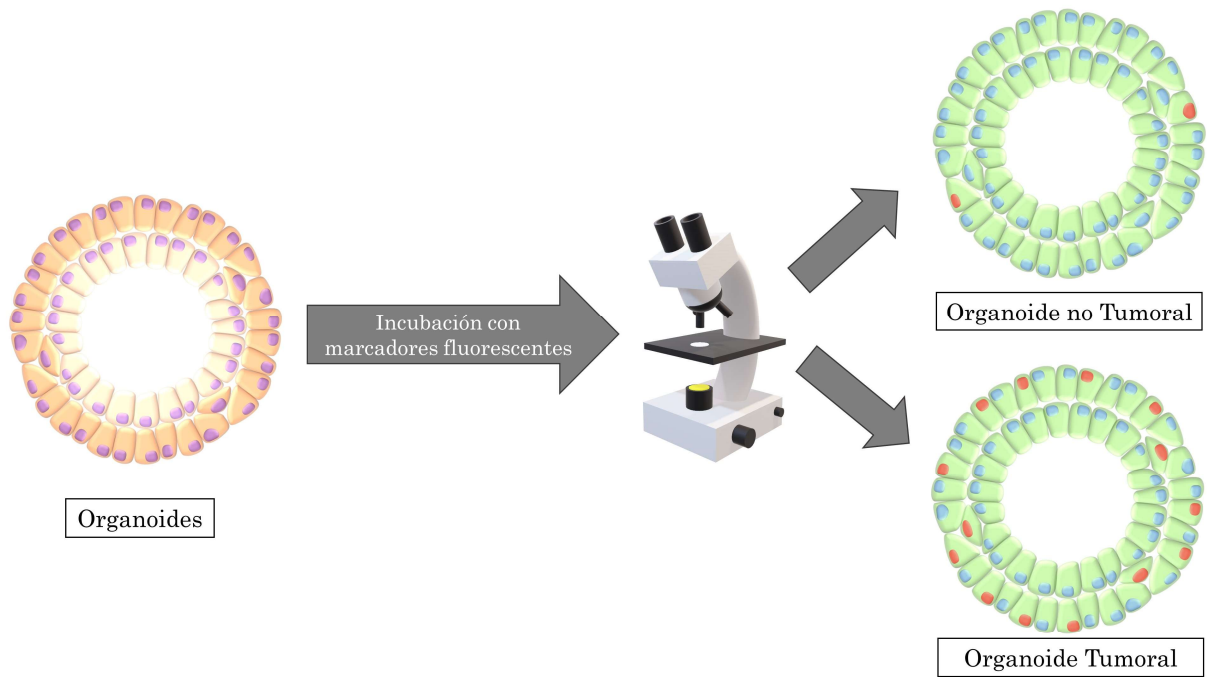


Figura 64. Diseño de la caracterización de organoides mediante inmunofluorescencia.

