

4. Resultados

En este capítulo se presentan, analizan y discuten los resultados obtenidos en el análisis de biomarcadores de los tres modelos de enfermedad estudiados:

1. En primer lugar, se muestran los resultados observados en los dos ensayos realizados con muestra real (suero y saliva) para detectar anticuerpos frente al virus causante de la COVID-19 utilizando kits de diagnóstico referidos con anterioridad.
2. Seguidamente, se muestra un proceso de optimización de la sensibilidad de estos kits de diagnóstico mediante el uso de nanopartículas para la detección de biomarcadores para la enfermedad de Alzheimer.
3. Finalmente, se presenta un modelo de cáncer colorrectal basado en el cultivo de organoides en chips microfluídicos, y se propone una metodología para medir biomarcadores en el medio de cultivo gracias a la combinación de kits de diagnóstico y nanopartículas de oro.

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

El primer objetivo de la tesis es verificar la capacidad de multiplexado de los kits de diagnóstico y la reproducibilidad de los protocolos de funcionalización de estos kits. Para ello, se realizan dos ensayos con el fin de detectar anticuerpos y otros biomarcadores de la COVID-19.

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

En el primer ensayo para detectar de biomarcadores de la enfermedad de COVID-19 se desarrolla un kit de diagnóstico multiplexado. Este kit permite la medición de varios marcadores en el suero de **74 pacientes** con PCR positiva para esta enfermedad: la Ferritina (**FER**), la Proteína C Reactiva (**CRP**), las Inmunoglobulinas totales (**IgTs**), las Inmunoglobulinas G (**IgGs**), las Inmunoglobulinas M (**IgMs**) y las Inmunoglobulinas A (**IgAs**). Estos pacientes son clasificados en **graves, moderados y leves** por médicos especialistas durante el mes de marzo de 2020 en el Hospital Clínico San Carlos (HCSC).

Una vez realizado el ensayo con las condiciones descritas en el apartado 3.3.1.1.1., se obtienen los resultados de las señales interferométricas procedentes de la incubación de los sueros pertenecientes a pacientes graves (Figura 65), moderados (Figura 66) y leves (figura 67). Estas señales proporcionan información de los niveles de IgTs, FER y CRP, como se refleja en el artículo publicado en 2022 (Murillo et al., 2022).

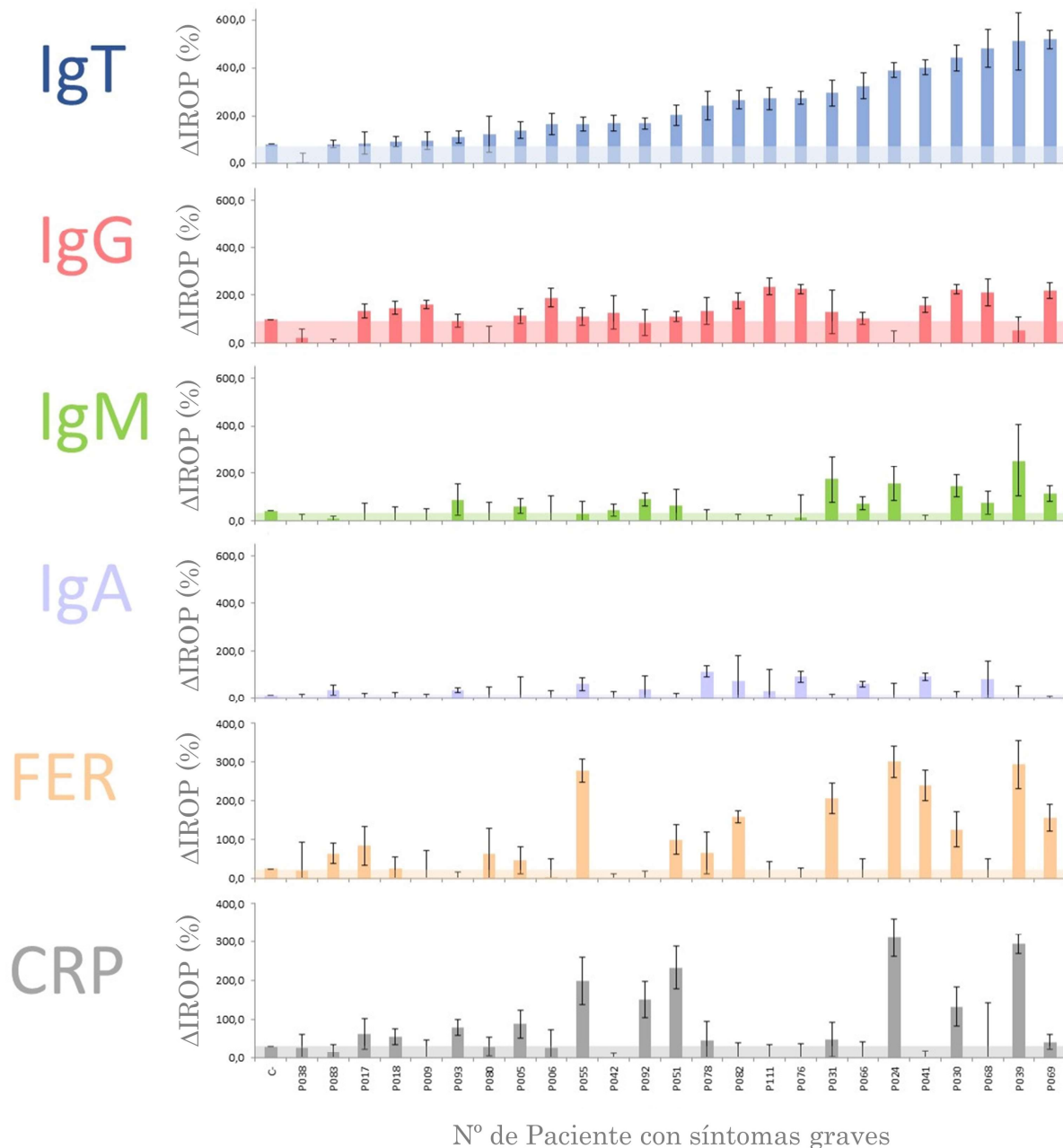


Figura 65. Resultados de la señal de lectura correspondientes a los diferentes biomarcadores en las muestras de pacientes con síntomas **graves**. El sombreado corresponde a la señal de fondo en cada gráfica (adapta de Murillo et al., 2022).

Además, se incuban Igs secundarios sobre los kits de diagnóstico para determinar los niveles correspondientes a IgGs, IgMs e IgAs específicos del SARS-CoV-2 en el suero de los pacientes.

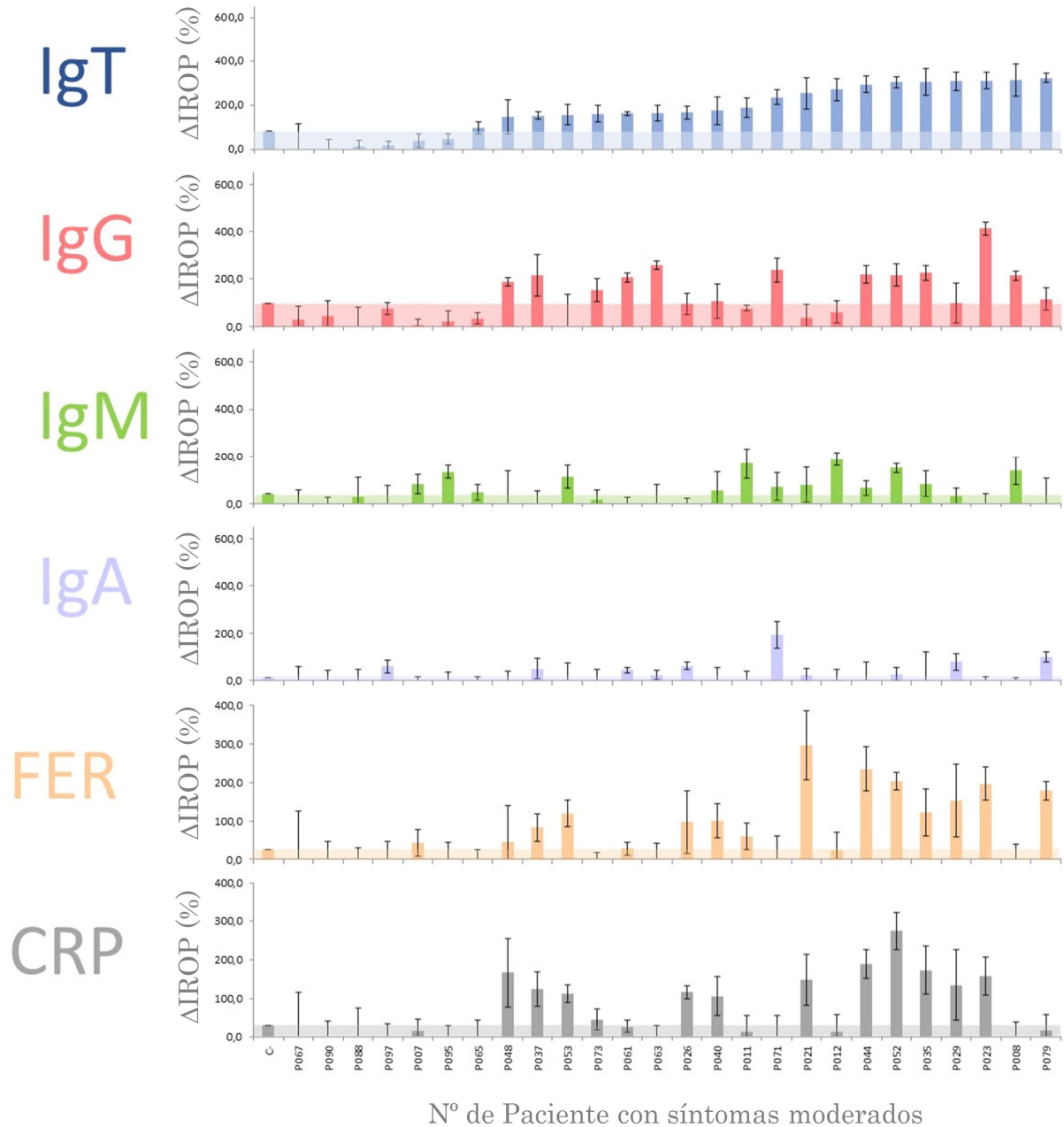


Figura 66. Resultados de la señal de lectura correspondientes a los diferentes biomarcadores en las muestras de pacientes con síntomas **moderados**. El sombreado corresponde a la señal de fondo en cada gráfica (adapta de Murillo et al., 2022).

A continuación, se clasificaron cada uno de los pacientes en función de si el valor del biomarcador se encuentra por encima de la señal de fondo (**positivo**) o no (**negativo**). Esta clasificación se realiza para cada uno de los 6 biomarcadores (Figura 68).

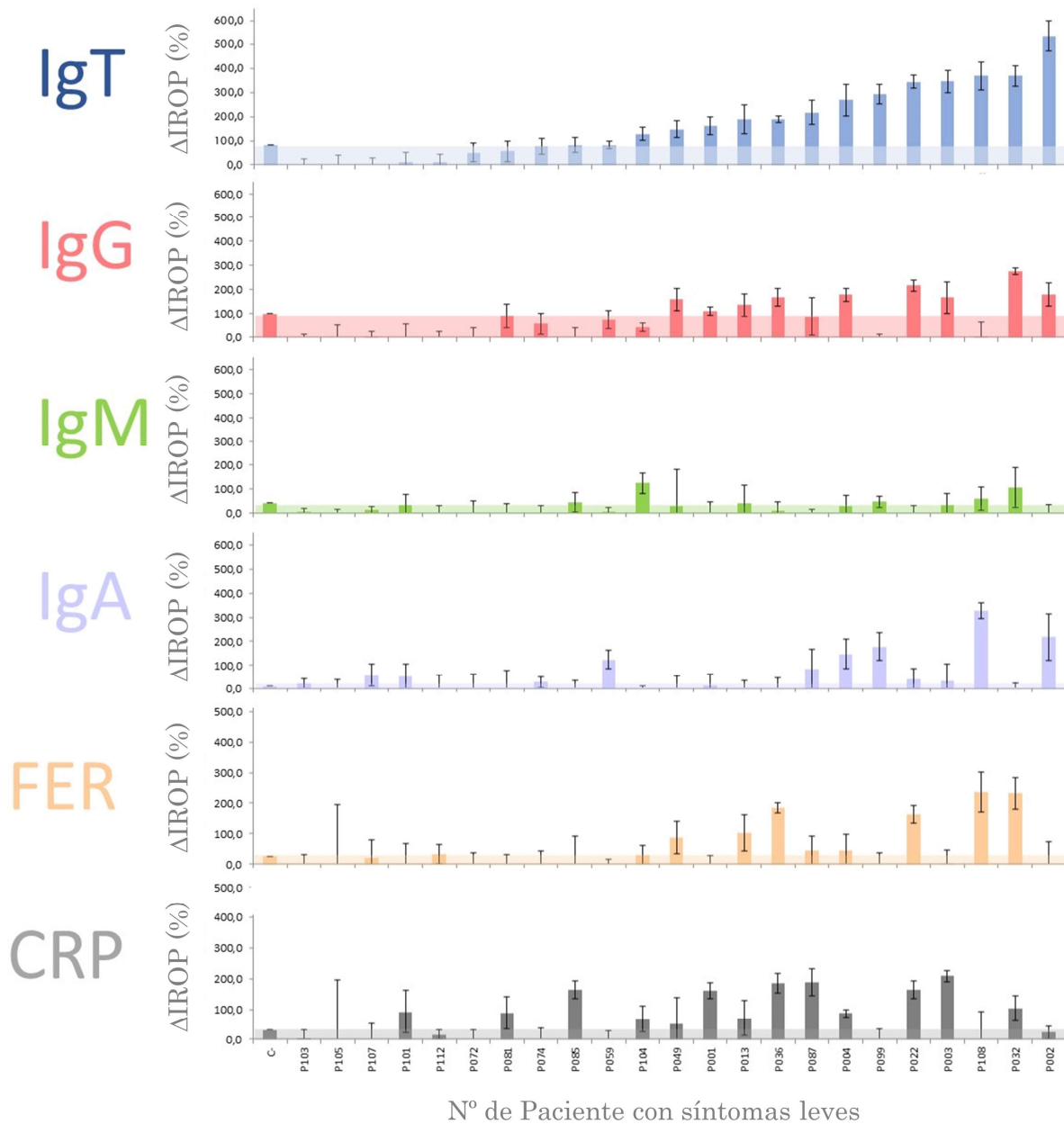


Figura 67. Resultados de la señal de lectura correspondientes a los diferentes biomarcadores en las muestras de pacientes con síntomas **leves**. El sombreado corresponde a la señal de fondo en cada gráfica (adapta de Murillo et al., 2022).

Cabe mencionar que casi la totalidad de los pacientes graves presentan IgTs positivos (96%), esto no ocurre en los pacientes moderados (77%) y leves (65%). Además, también se puede observar que existen más pacientes graves positivos en IgGs (72%) que pacientes moderados (54%) o leves (39%). Otro dato que resulta destacable es que el 60% de los pacientes graves y el 58% de los moderados son positivos en FER, frente al 43% de los pacientes leves. Ocurre de forma similar con las IgMs. Finalmente, no se observan diferencias significativas en los porcentajes de positivos en IgAs y CRP entre los grupos de gravedad.

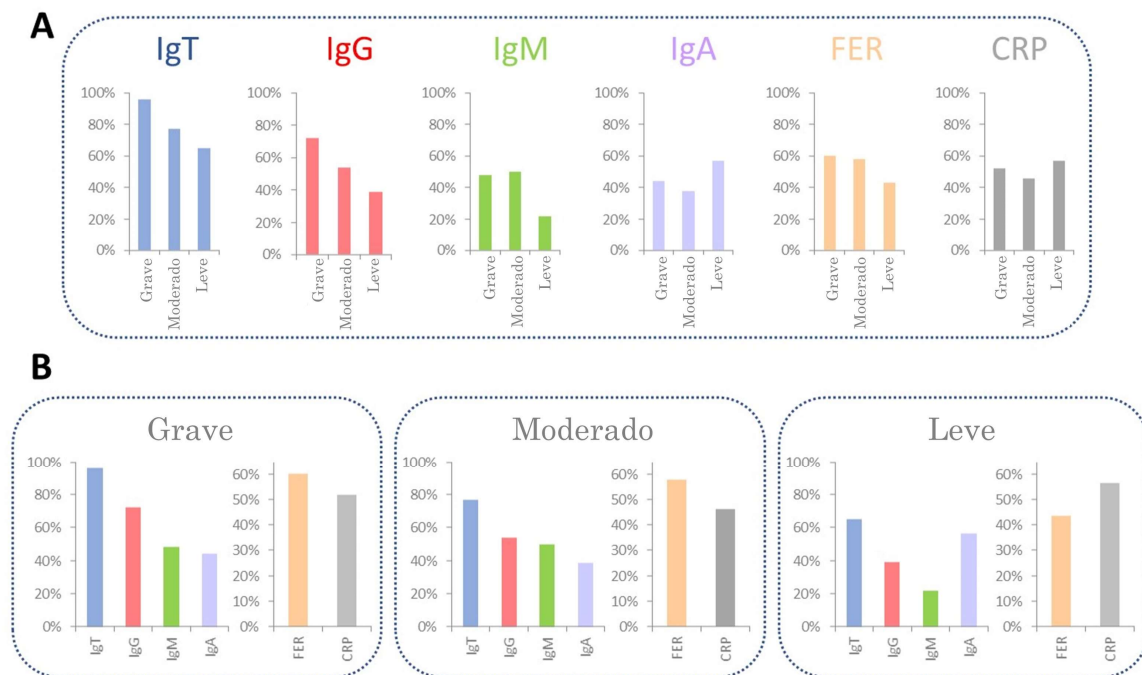


Figura 68. A. Comparación cualitativa del porcentaje de positivos para cada biomarcador en función del grado de gravedad. B. Clasificación del porcentaje de positivos para cada biomarcador en los tres grupos de gravedad (adapta de Murillo et al., 2022).

Para completar los ensayos, se analizan de la misma forma 20 sueros de donantes de sangre del Hospital Clínico San Carlos. Estas muestras fueron tomadas en febrero de 2020, por lo que no se determinó si padecían o no la enfermedad de manera asintomática o han podido cursarla en los días previos. Por ello, se considera que estas muestras son de **casos asintomáticos** (Figura 69). Tras el análisis se observan algunos casos en los que existen niveles altos de biomarcadores de COVID-19.

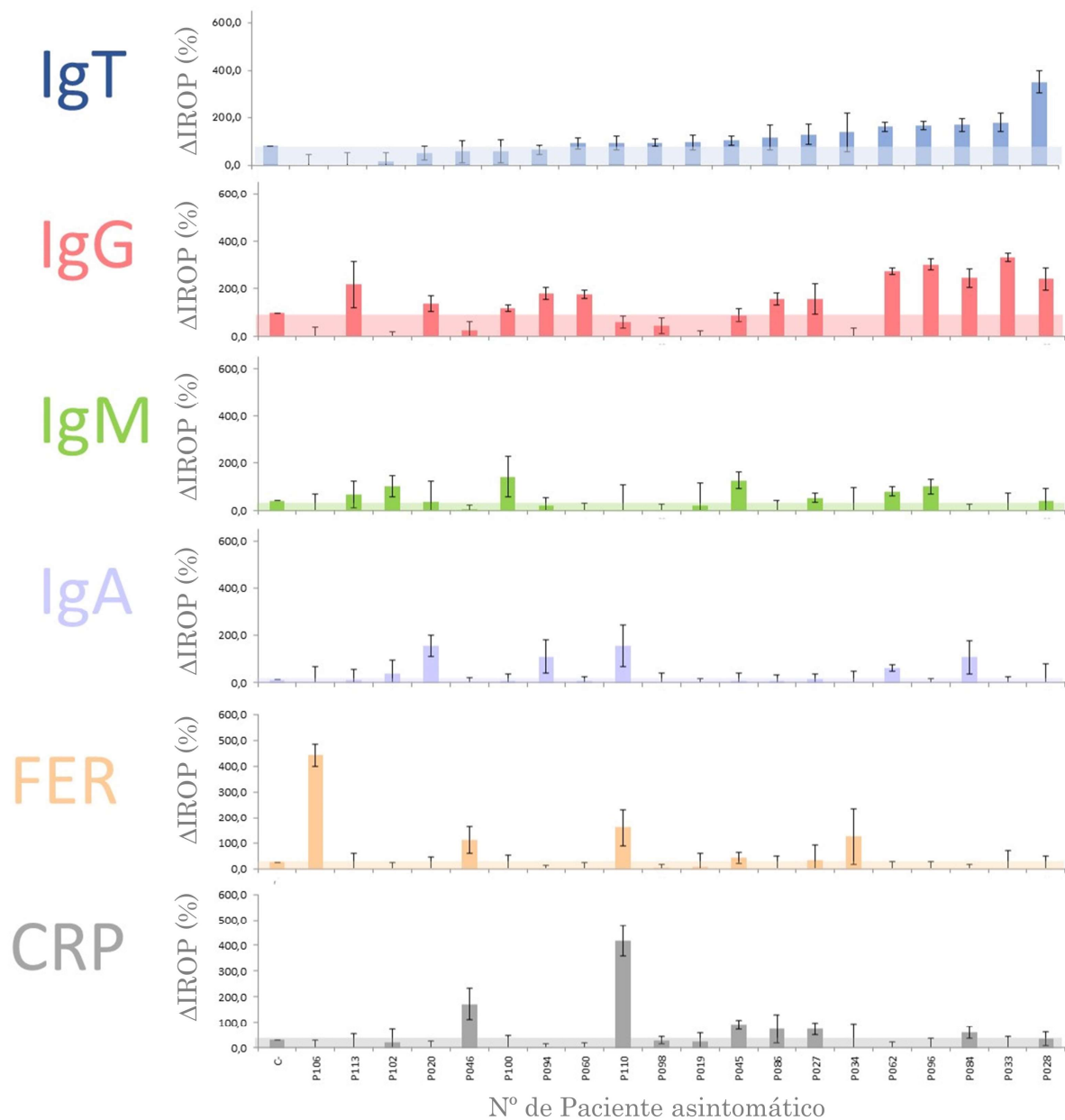


Figura 69. Resultados de la señal de lectura correspondientes a los diferentes biomarcadores en las muestras de donantes **asintomáticos**. El sombreado corresponde a la señal de fondo en cada gráfica (adapta de Murillo et al., 2022).

Para terminar el estudio, se llevan a cabo dos tipos de análisis. El primero de ellos es un **ANOVA**, con él se determina que el grado de gravedad del paciente es un factor significativo para el valor obtenido de **IgT**. El resultado muestra un valor-p de 0.045, que se considera significativo. Al comparar los valores de IgT con los diferentes grados de gravedad se obtiene una diferencia significativa entre el grupo de pacientes graves con el grupo de moderados (valor de p de 0.028) y con el grupo de leves (valor de p de 0.036).

El segundo análisis es un **análisis del grado de correlación** entre cada marcador biológico detectado. Aunque se trata de un modelo simple muestra que existe una mayor correlación entre los valores de IgTs y los valores de IgG, así como entre los valores de IgTs y los valores de FER (Figura 70).

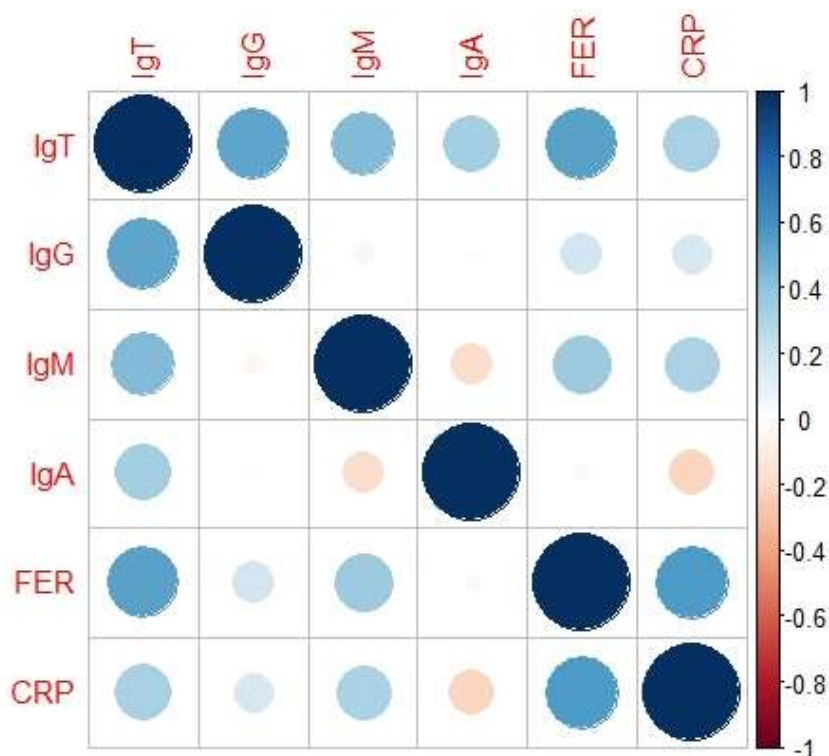


Figura 70. Matriz de correlación, en la cual cuanto mayor es el tamaño del círculo, mayor es el nivel de correlación indicado en la barra a la derecha de la figura (adapta de Murillo et al., 2022).

Finalmente, se realiza un **modelo de regresión múltiple** para correlacionar los niveles de **IgTs** con los otros cinco biomarcadores. Este análisis se lleva a cabo mediante los **valores de p** de cada biomarcador presentados en la Tabla 2.

	IgG	IgM	IgA	FER	CRP
IgT	1.59×10^{-6}	1.22×10^{-4}	3.62×10^{-3}	1.17×10^{-6}	4.72×10^{-1}

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).

En este modelo se excluye el biomarcador CRP, ya que el valor de p de este marcador es superior al considerado como estadísticamente significativo (0.05). El resto de las variables sí son **significativas**, por lo que se aplican al modelo. Teniendo

en cuenta todo ello, se calculan los coeficientes que definen los valores de IgTs en función de los biomarcadores IgGs, IgMs, IgAs y FER, obteniendo la siguiente ecuación:

$$\widehat{IgT} = -0.20 + 0.76 [IgG] + 1.02 [IgM] + 1.91 [IgA] + 0.43 [FER]$$

Este modelo, que cuenta con un R² de 70.29%, señala que los niveles de IgT aumentan conforme aumentan los valores de los otros cuatro marcadores.

Además, si se consideran las variables de **gravedad** en el modelo de regresión múltiple se obtienen un R² del 73.01%, y la ecuación resultante se muestra a continuación:

$$\widehat{IgT} = 22.72 + 0.78 [IgG] + 1.05 [IgM] + 0.88 [IgA] + 0.41 [FER] - 58.92 [L] - 14.78 [M]$$

Este modelo no solo indica que el valor de IgT aumenta conforme aumentan los valores de IgGs, IgMs, IgAs y FER, sino que nos muestra que, en el caso de los pacientes moderados o leves, los niveles de IgT serán inferiores a los niveles de paciente graves.

Como conclusión, mediante los kits de diagnóstico interferométricos multiplexados empleados durante el desarrollo de esta tesis se puede detectar seis biomarcadores distintos de la enfermedad COVID-19 en muestras de pacientes con diferentes niveles de gravedad, llegando incluso a desarrollar **un modelo estadístico predictivo de gravedad** (Murillo et al., 2022).

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

Otro de los ensayos realizados en esta tesis se basa en la de detección de biomarcadores para la enfermedad de COVID-19 en **saliva**. En este caso se estudia la evolución de las inmunoglobulinas específicas totales (IgT) contra la proteína *spike* del virus SARS-CoV-2, en particular la **evolución de los anticuerpos IgA**, en **196 voluntarios** durante los tres últimos meses de 2020. Para ello, se recoge la saliva de voluntarios y se procesa cada 10-12 días para analizar los anticuerpos contra el SARS-CoV-2, resultando en seis pruebas por voluntario, con un total de pruebas de 855. Tras medir los anticuerpos mediante un kit de diagnóstico multiplexado, se normalizan los resultados de los datos utilizando como referencia un control negativo (CN) en saliva IgA (0%) y un control positivo (CP) en saliva IgA (100%), ambos confirmados por ELISA (Murillo et al., 2021).

Una vez se miden y normalizan las muestras de todos los voluntarios, se comparan los resultados obtenidos en **IgT e IgA**, para analizar si estos resultados son consistentes, es decir, que no haya diferencias de clasificación entre IgT e IgA. Tras el análisis, la mayoría de las pruebas realizadas son coherentes (85%), no obstante, algunas muestras fueron incoherentes: IgA positiva e IgT negativa o IgT positiva e IgA negativa. Estas incoherencias se clasifican en función de la posible razón a la que pueden deberse y posteriormente se descartan.

Por último, se analizan los conjuntos completos de muestras de cada voluntario para determinar la evolución de los anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2. Se clasifica a cada voluntario según la evolución de sus anticuerpos contra el SARS-CoV-2 (Figura 71). Los anticuerpos pueden: (1) permanecer detectables (**P-P**), (2) no ser detectables en ninguna entrega (**N-N**), (3) empezar a ser detectables en mitad del estudio (**N-P**), o (4) dejar de ser detectables durante el estudio (**P-N**). Además, existe un grupo de voluntarios cuyos datos son indeterminados (**IND**).

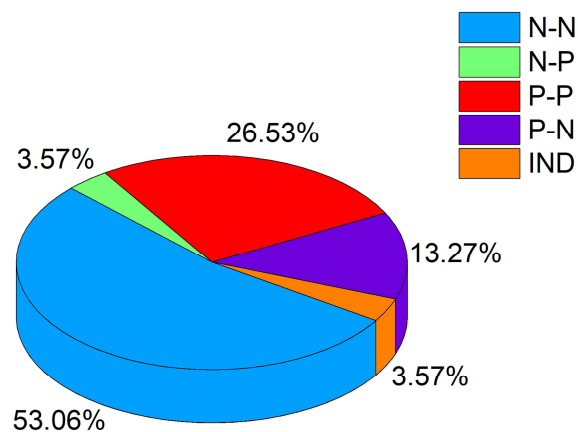


Figura 71. Gráfico de la clasificación de voluntarios: sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).

La evolución de las IgAs de los voluntarios de principio a fin del estudio se resume en la Figura 72.

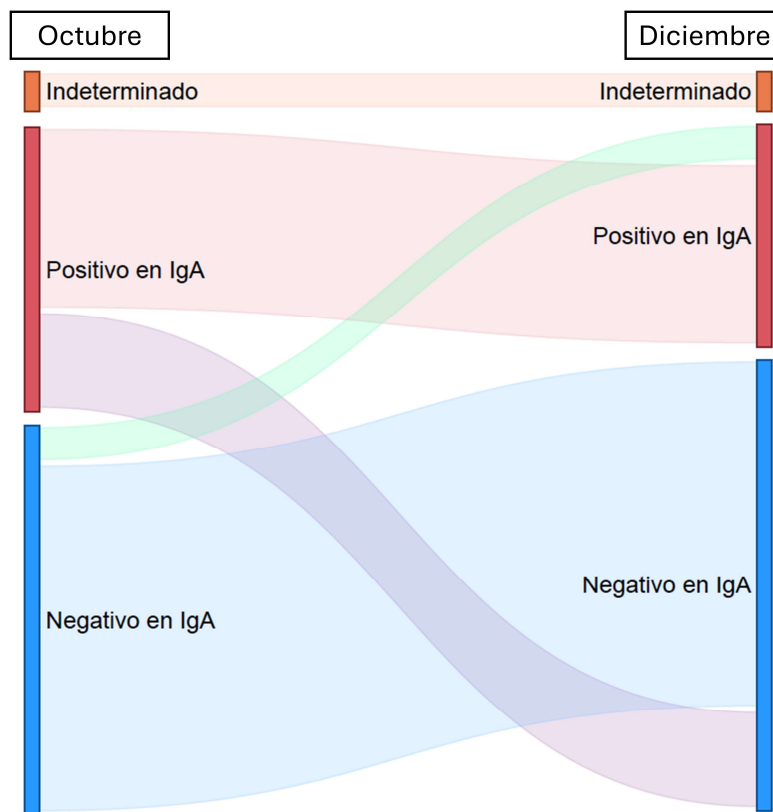
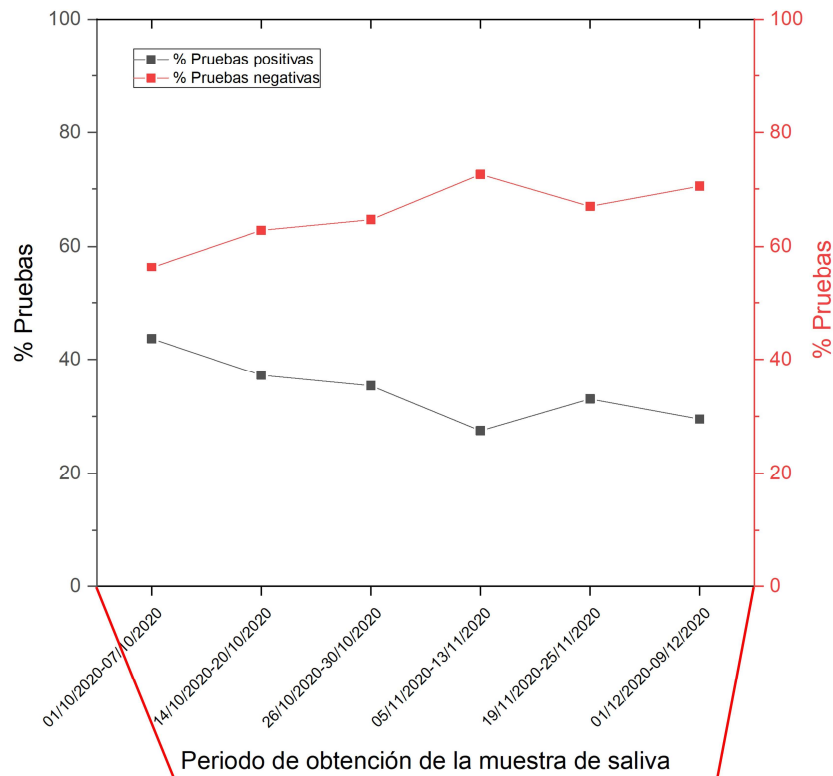


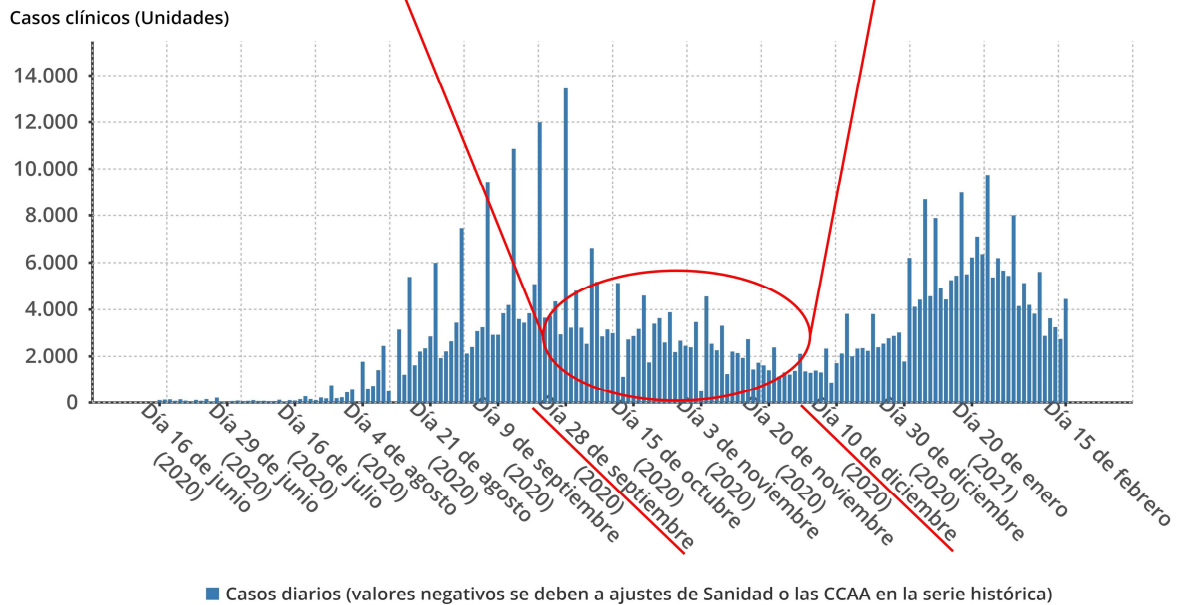
Figura 72. Distribución de las IgAs desde el comienzo del estudio (octubre de 2020) hasta el final (diciembre de 2020).

Para analizar la evolución de los anticuerpos en las salivas de los voluntarios, en primer lugar, se realiza un análisis longitudinal de todas las pruebas. Para ello, se clasifica el porcentaje de pruebas IgA positivas e IgA negativas de acuerdo al análisis en cada uno de los 6 periodos de entrega.

Como se muestra en la Figura 73, la cantidad de anticuerpos IgA detectables disminuye a medida que avanza el estudio, con una **disminución del 10% de voluntarios positivos**. También existe una disminución en los casos notificados de COVID-19 en la Comunidad de Madrid en la misma época del estudio.



Evolución de casos de coronavirus notificados cada día en Comunidad de Madrid



Fuente: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, www.epdata.es

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.

A continuación, se analiza cómo los voluntarios oscilaban entre las dos categorías principales, positivos y negativos (Figura 74), observando que a lo largo de todas las semanas hay voluntarios con IgAs que dejan de ser detectables.

Una vez realizado el análisis de los voluntarios, se recopilan los datos de los mismos, Para ello, durante la recogida de muestras, los voluntarios rellenan un cuestionario *online* a partir del cual se clasifican sus respuestas en función de los resultados del análisis previo.

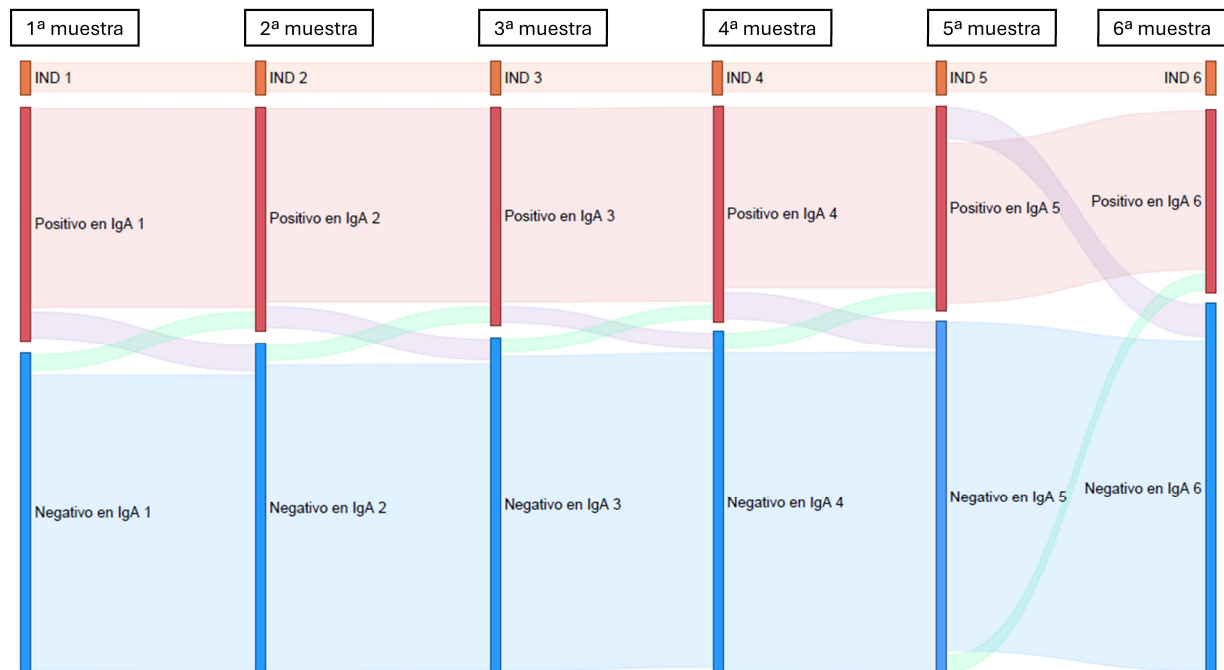


Figura 74. Distribución de los voluntarios por semana.

Cada voluntario proporciona información detallada con cada entrega de muestra, así, se recogen un total de 522 respuestas de 184 voluntarios diferentes. En este cuestionario se especifica el sexo, la edad, el grupo profesional o el medio de transporte habitual. Las características de los participantes del estudio se basan en los resultados obtenidos en este **cuestionario *online*** facilitado a los voluntarios.

Tras el análisis y como se observa en la Tabla 3, se determina que no existe relación entre el **sexo** y la presencia de anticuerpos detectables contra el virus SARS-COV-2 en saliva (Figura 75).

Sexo	Masculino	Femenino
n (%)	84 (45.65%)	100 (54.35%)
P-P	27.38%	26.00%
P-N	10.71%	15.00%
N-P	3.57%	4.00%
N-N	54.76%	51.00%
IND	3.57%	4.00%
TOTAL	100.00%	100.00%

Tabla 3. Correlación entre el **sexo** y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2.

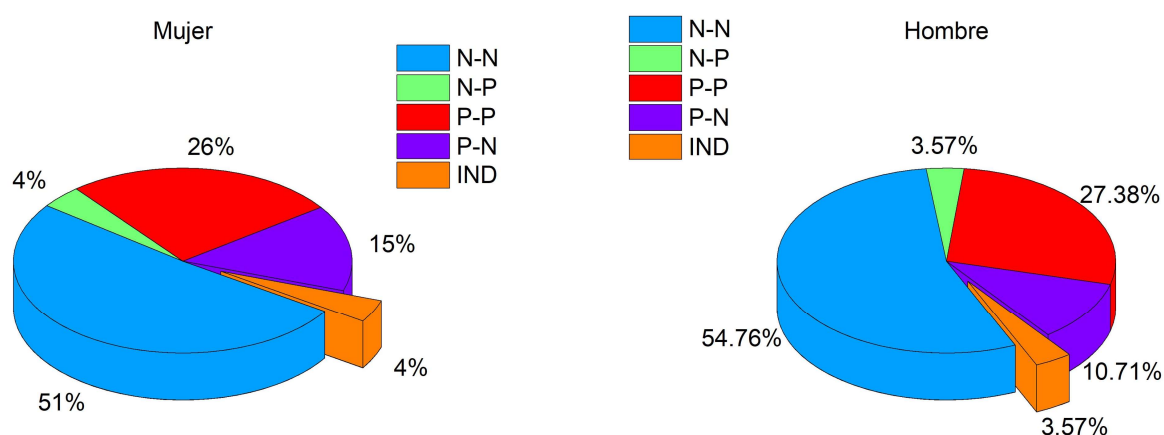


Figura 75. Relación entre el sexo y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2. Voluntarios sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).

Como se recoge en la Tabla 4, los datos muestran que el 32.07% de la cohorte de voluntarios tienen entre 18 y 29 años: el 23.73% de ellos se clasificaron como P-P, el 15.25% como P-N, el 0% como N-P, el 57.63% como N-N y el 3.39% como IND. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los voluntarios de edades comprendidas entre 30 y 39 años (17.39%): 15.63% fueron clasificados como P-P, 6.25% como P-N, 12.50% como N-P, 62.50% como N-N, y 3.13% como IND (Figura 76). Estos resultados muestran que, en los voluntarios más jóvenes, el porcentaje de voluntarios que no presentan anticuerpos detectables contra la COVID-19 en la saliva es superior al 50%.

Edad	18-29	30-39	40-49	50-59	60-69	Sin respuesta
n	59	32	39	45	7	2
(%)	(32.07%)	(17.39%)	(21.20%)	(24.46%)	(3.80%)	(1.09%)
P-P	23.73%	15.63%	23.08%	37.78%	42.86%	50.00%
P-N	15.25%	6.25%	20.51%	8.89%	14.29%	0.00%
N-P	0.00%	12.50%	2.56%	2.22%	14.29%	0.00%
N-N	57.63%	62.50%	48.72%	46.67%	28.57%	50.00%
IND	3.39%	3.13%	5.13%	4.44%	0.00%	0.00%
TOTAL	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

Tabla 4. Correlación entre la **edad** y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2.

Por el contrario, en los rangos de edad de 40-49 y 50-59 años, el porcentaje de voluntarios sin anticuerpos detectables se encuentra por debajo del 50% (48.72% y 46.67% respectivamente). Los voluntarios mayores de 60 años representan apenas un 3.8% de la cohorte de edad de la encuesta, pero aparentemente también presenta tendencia descendente.

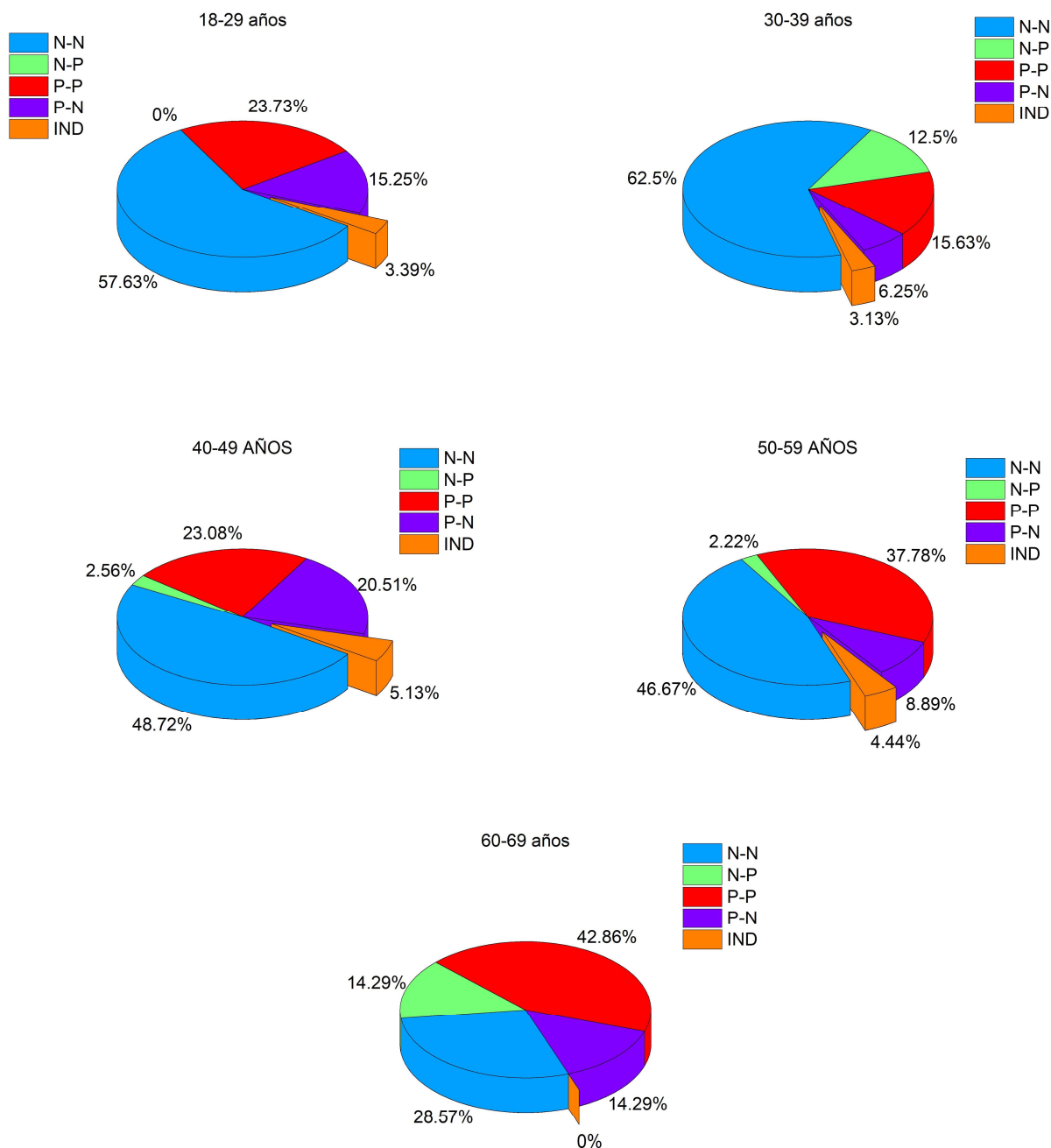


Figura 76. Clasificación de los voluntarios según la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2 en los distintos rangos de edades. Voluntarios sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).

Asimismo, se observa en los datos recopilados en la Tabla 5 una tendencia similar en lo que respecta a los **grupos profesionales**: los grupos ocupados mayoritariamente por jóvenes, como los estudiantes de grado/máster (10.87%) o los estudiantes de doctorado (19.57%), presentan un alto porcentaje de voluntarios sin anticuerpos detectables contra el SARS-CoV-2 (65.00% y 63.89% respectivamente).

Además, el personal auxiliar (11.41%) y el personal docente e investigador (40.76%) son los grupos profesionales con menor número de voluntarios incapaces de expresar anticuerpos detectables (42.86% y 46.67% respectivamente) (Figura 77).

Grupo Profesional	Personal Docente e Investigador	Personal de Administración y Servicios	Personal auxiliar	Estudiante predoctoral	Estudiante de Grado o Máster
n (%)	75 (40.76%)	32 (17.39%)	21 (11.41%)	36 (19.57%)	20 (10.87%)
P-P	33.33%	18.75%	28.57%	25.00%	15.00%
P-N	10.67%	15.63%	23.81%	8.33%	15.00%
N-P	2.67%	12.50%	4.76%	0.00%	0.00%
N-N	46.67%	53.13%	42.86%	63.89%	65.00%
IND	6.67%	0.00%	0.00%	2.78%	5.00%
TOTAL	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

Tabla 5. Correlación entre **profesión** y presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2.

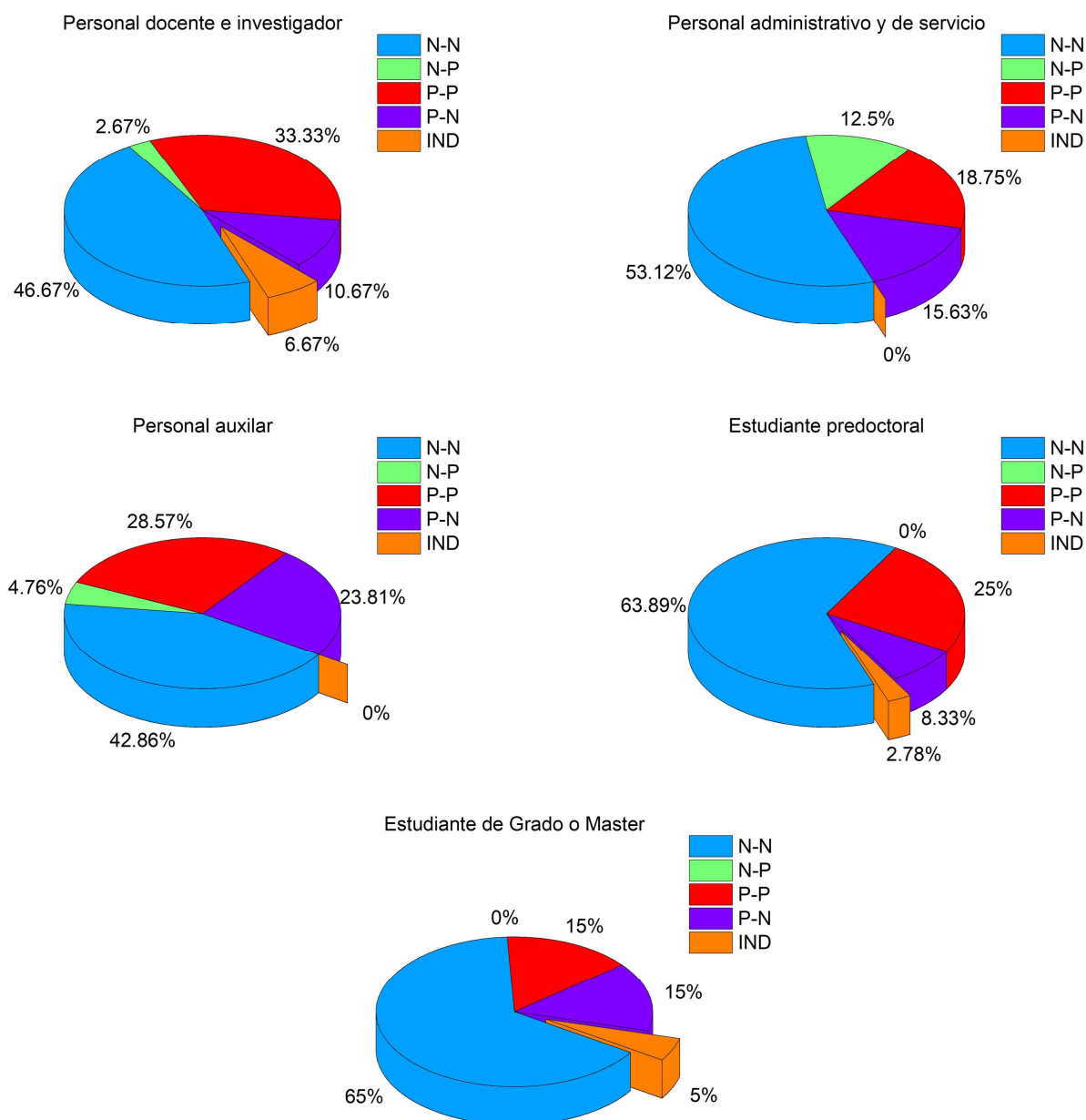


Figura 77. Clasificación de los voluntarios según la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2 en los distintos grupos de trabajo. Voluntarios sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).

Analizando el **medio de transporte** utilizado por los voluntarios, se observa en la Tabla 6 que menos del 50% (46.72%) de los voluntarios con vehículo particular (74.46%) no expresan anticuerpos detectables contra el SARS-CoV-2. Esto puede deberse a que los jóvenes tienen más dificultades para acceder a un transporte particular, por lo que hacen uso del transporte público (Figura 78).

Medio de transporte	Transporte público	Vehículo propio	Vehículo compartido	Otros	Ninguno
n (%)	28 (15.22%)	137 (74.46%)	9 (4.89%)	6 (3.26%)	4 (2.17%)
P-P	17.86%	31.39%	11.11%	0.00%	0.00%
P-N	3.57%	15.33%	22.22%	0.00%	0.00%
N-P	3.57%	3.65%	0.00%	16.67%	0.00%
N-N	67.86%	46.72%	66.67%	66.67%	100.00%
IND	7.14%	2.92%	0.00%	16.67%	0.00%
TOTAL	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

Tabla 6. Correlación entre el **medio de transporte** y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2.

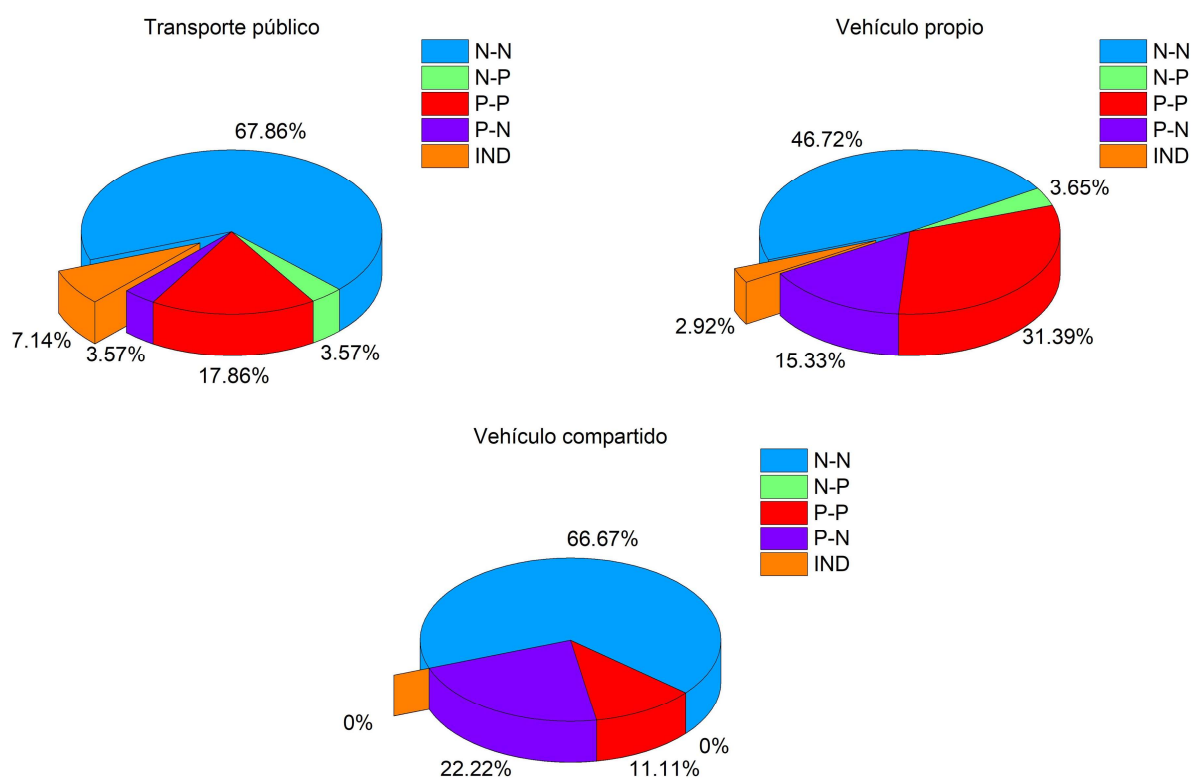


Figura 78. Clasificación de los voluntarios según la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2 en los distintos grupos de medio de transporte utilizado. Voluntarios sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).

El 7.07% de los voluntarios es diagnosticado por PCR positiva o prueba serológica: sólo el 30.77% de ellos ya no presenta anticuerpos detectables en saliva en el momento del estudio (Tabla 7). Mientras que el 69.33% de los voluntarios siguen expresando estos anticuerpos, aunque para uno de ellos llega a ser no detectable (Figura 79). Todos ellos se realizan la prueba 2 meses antes de empezar el estudio (entre el 3 de marzo y el 1 de agosto).

Tests COVID-19 realizados	PCR positiva	Tests serológicos positivos	Tests rápidos	Diagnóstico médico sin test	Síntomas sin diagnóstico	Sin sintomatología
n	9	4	1	3	13	154
(%)	(4.89%)	(2.17%)	(0.54%)	(1.63%)	(7.07%)	(83.70%)
P-P	66.67%	50.00%	0.00%	33.33%	23.08%	24.03%
P-N	11.11%	0.00%	100.00%	33.33%	15.38%	12.34%
N-P	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.55%
N-N	22.22%	50.00%	0.00%	33.33%	61.54%	54.55%
IND	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.55%
TOTAL	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

Tabla 7. Correlación entre los tests realizados y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2.

En este estudio, se analizan los anticuerpos IgA específicos frente al SARS-CoV-2 en la saliva de 196 voluntarios para evaluar la inmunidad frente al COVID-19, considerando 4 grupos principales en su clasificación, los que no presentan anticuerpos detectables en saliva (N-N), los que sí presentan (P-P), aquellos cuyos anticuerpos dejan de ser detectables (P-N), y en los que aparentemente empiezan a ser detectables (N-P).

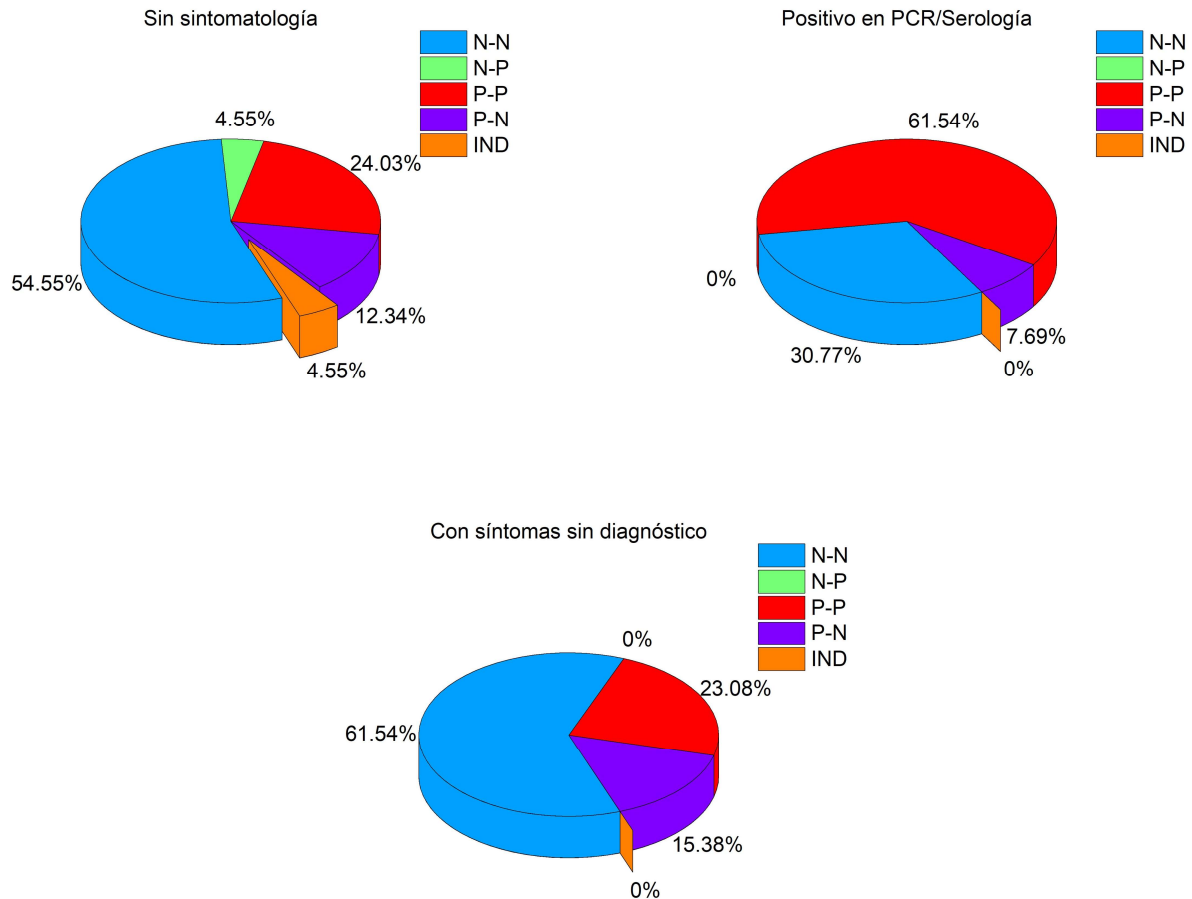


Figura 79. Relación entre los tests realizados previos al estudio y la presencia de anticuerpos frente a SARS-COV-2. Voluntarios sin anticuerpos detectables (N-N), con anticuerpos que empiezan a ser detectables (N-P), con anticuerpos que permanecen detectables (P-P), con anticuerpos que dejan a ser detectables (P-N).

Como conclusión de este apartado de la tesis, en cuanto a la clasificación de estos voluntarios, se observa que más del 50% no presentan anticuerpos en saliva, en contraste con el 26.5% de los voluntarios que sí presentan anticuerpos detectables en saliva. Además, como se muestra que al final del estudio, un 13% de los voluntarios ya no presentan anticuerpos detectables en saliva, que aparentemente son detectables al principio del estudio. Esto sugiere que las señales de IgA específicas del SARS-CoV-2 en saliva pueden **decaer con el tiempo**. Este hecho concuerda con lo observado en otros artículos, lo que podría sugerir que existen tanto poblaciones con anticuerpos en saliva que permanecen como anticuerpos que decaen (Dobaño et al., 2021).

Respecto al cuestionario, 9 de los voluntarios son diagnosticados mediante una prueba de PCR positiva ese año: 4 de ellos en octubre (el mes de inicio del estudio), y los 5 voluntarios restantes antes de septiembre. De estos 5 voluntarios, 3

muestran un descenso de anticuerpos específicos contra COVID-19 en saliva, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Sterlin et al., 2021).

Como se observa en la Tabla 3, que no hay diferencias en función del sexo. En cambio, existen algunas diferencias en función de la edad: hay más voluntarios jóvenes sin anticuerpos detectables que voluntarios de edad avanzada, contrariamente a lo observado en otros estudios (Cervia et al., 2020). Esta diferencia se puede apreciar en el grupo profesional de estudiantes de grado o máster y estudiantes de doctorado, donde existe un alto porcentaje de voluntarios sin anticuerpos detectables frente al virus SARS-CoV-2.

Por tanto, los resultados de este estudio, así como la bibliografía, muestran **dos tipos diferentes de poblaciones**: aquella cuyos **IgAs** en saliva **disminuyen** y aquella en los que **persisten** (Dobaño et al., 2021, 2022); además, aparentemente, hay un número de personas que desarrollan anticuerpos sin síntomas previos (Ebell et al., 2022). En base a estos resultados, se sugiere recoger saliva, además de suero, para tener una aproximación más exacta en los estudios de prevalencia y transmisión del SARS-CoV-2. En este sentido las muestras de saliva suponen una ventaja puesto que se trata de un método **no invasivo** capaz de aportar información adicional a las pruebas clásicas de PCR y de serología de anticuerpos.

4.2. Detección de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

En este apartado de la tesis se propone detectar dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer: las proteínas Tau y Lactoferrina. Los kits de diagnóstico basados en 65 celdas interferométricas utilizados en la sección anterior, que presentan una gran capacidad de multiplexado, serán adaptados para la detección de estos biomarcadores. Una vez que se estandarizan las condiciones del inmunoensayo para detectar el biomarcador elegido, se optimiza esta metodología de detección mediante el empleo de nanopartículas, con el fin de alcanzar una sensibilidad mayor a la proporcionada por la técnica ELISA.

En la Tabla 8 se pueden observar los diferentes antígenos utilizados durante este apartado para la detección de Tau y Lactoferrina, y en la Tabla 9 los anticuerpos que se han empleado para detectar estos antígenos.

Biomarcador	Nombre del antígeno utilizado	Características	Casa comercial
Tau	AcTau	Péptido de Tau de 3.3 kDa acetilado	Lincbiotech
	3PTau	Péptido de Tau de 3.3 kDa trifosforilado	Lincbiotech
	uTau	Péptido de Tau de 3.3 kDa ubiquitinado	Lincbiotech
	PTau	Péptido de Tau de 3.3 kDa fosforilado	Lincbiotech
	Tau	Fragmento de Tau de 26 kDa	Sigma Ref. APREST88626
Lactoferrina	Lactoferrina	Proteína completa	Bio Rad Ref. PHP 239

Tabla 8. Antígenos utilizados para la detección de Tau y Lactoferrina.

Biomarcador	Nombre del anticuerpo utilizado	Características	Casa comercial
Tau	Anti-AcTau	Se une a Tau acetilada	Lincbiotech
	Anti-PTau	Se une a Tau fosforilada	Lincbiotech
	Anti-Tau	Se une a Tau	Sigma Ref. HPA048895
Lactoferrina	Anti-LF	Se une a Lactoferrina	Fisher Scientific Ref. A80144A
	Anti-LF biotinilado	Se une a Lactoferrina	Fisher Scientific Ref. A80143B

Tabla 9. Anticuerpos utilizados para la detección de Tau y Lactoferrina.

4.2.1. Ensayos de detección de péptidos de Tau

Para el desarrollo de los experimentos de este apartado se colabora con la empresa Lincbiotech en el margen de un proyecto para el desarrollo de nuevos anticuerpos capaces de detectar la proteína Tau modificada. Esta empresa proporciona péptidos pequeños de la secuencia de la proteína Tau, específicamente, péptidos de 3.3 kDa, en cuya secuencia se encuentran aminoácidos que pueden ser modificados.

Como se describe en la sección 3.3.2.1., en la enfermedad de Alzheimer la proteína Tau puede sufrir modificaciones postraduccionales, como la acetilación o la fosforilación, siendo la hiperfosforilación de Tau uno de los signos más característicos de la enfermedad. Por ello, los péptidos seleccionados para realizar un kit diagnóstico de EA poseen estas modificaciones en la secuencia.

Los cuatro péptidos facilitados son: **AcTau** (péptido con un grupo acetilo), **3PTau** (péptido hiperfosforilado), **uTau** (péptido ubiquitinado) y **PTau** (péptido con un único grupo fosfato). Asimismo, se cuenta con dos anticuerpos específicos de Tau: el **anti-PTau**, que detecta Tau fosforilada, y el **anti-AcTau**, que detecta Tau acetilada.

4.2.1.1. Evaluación de la inmovilización de péptidos de Tau modificada y de anticuerpos que los detectan

Como primera aproximación se realizan curvas de inmovilización de los péptidos y de los anticuerpos descritos para determinar a qué concentración se puede conseguir el tapizado del sensor. Las inmovilizaciones ($n=4$) se realizan en cámara húmeda durante 20 horas a 20 °C.

Este primer experimento para demostrar el anclaje de las moléculas proporcionadas a la superficie sensora se realiza sobre kits de 16 BICELLS, los resultados pueden observarse en la Figura 80.

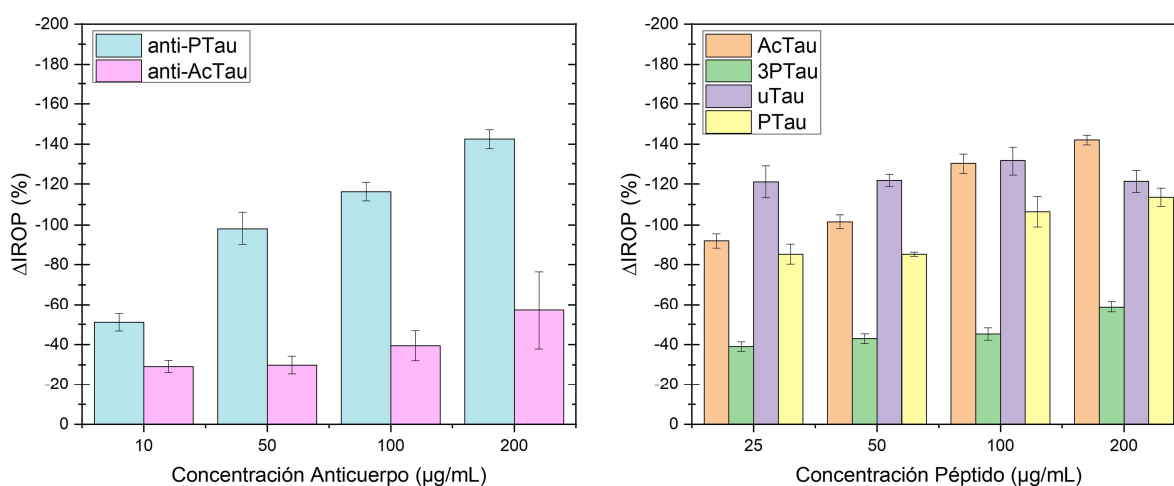


Figura 80. Inmovilización de anticuerpos específicos y péptidos de Tau modificados postraduccionalmente.

Por una parte, como se observa en la Figura 80, el único anticuerpo que aparentemente está inmovilizado correctamente es el que detecta Tau fosforilada (anti-PTau); en cambio el anti-AcTau no parece aumentar su señal a medida que aumenta la concentración empleada en el ensayo. Por otra parte, en lo relativo a los péptidos, se observa un aumento de la señal de inmovilización únicamente en el péptido acetilado (AcTau) y el péptido fosforilado (PTau).

4.2.1.2. Estudio de especificidad de anti-PTau por PTau

Teniendo en cuenta estos resultados preliminares, se realiza un ensayo en el cual se inmoviliza el péptido con el grupo fosfato (PTau) sobre un kit de diagnóstico de 65 celdas a una concentración de 125 $\mu g/mL$, ya que a esa concentración se observan señales superiores a -100 % de $\Delta IROP$.

Finalmente, se emplean diferentes concentraciones del anticuerpo anti-PTau para el reconocimiento, estos resultados se pueden observar en la Figura 81. Tanto las inmobilizaciones como el reconocimiento se realizan en cámara húmeda durante 20 horas a 20 °C, con n =7.

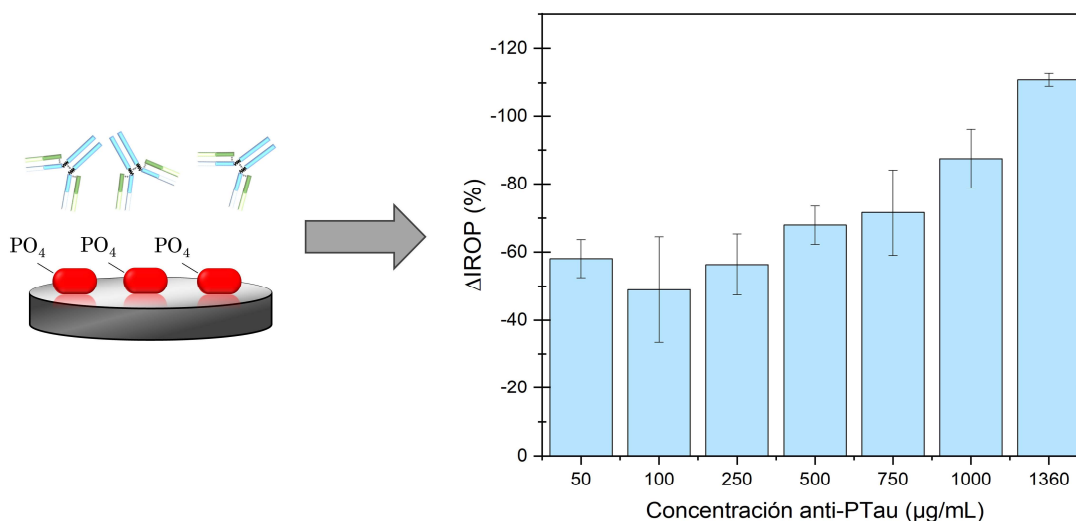


Figura 81. Señales del reconocimiento de concentraciones crecientes de anti-PTau sobre un kit tapizado con PTau (rojo).

Este resultado no es satisfactorio, ya que apenas se observa un aumento de señal a pesar de emplear altas concentraciones de anticuerpo en el reconocimiento. Esto puede deberse a que el anticuerpo no reconoce con mucha especificidad el péptido utilizado en la inmobilización.

4.2.1.3. Estudio de especificidad de anti-PTau por 3PTau

Por lo observado anteriormente, se realiza una nueva curva de inmobilización del péptido 3PTau, para observar si empleando este péptido aumenta la afinidad.

Para ello, se depositan concentraciones crecientes del péptido 3PTau en un kit de diagnóstico de 65 celdas. Las inmobilizaciones (n =13) se realizan en cámara húmeda durante 3 horas a 37 °C. Además, para comprobar la afinidad del anticuerpo se dispensan dos concentraciones diferentes de anti-PTau (200 y 1000 μg/mL) por cada concentración de péptido 3PTau inmobilizada en el kit (Figura 82). El reconocimiento (n = 6) se realiza en cámara húmeda durante 3 horas a 37 °C.

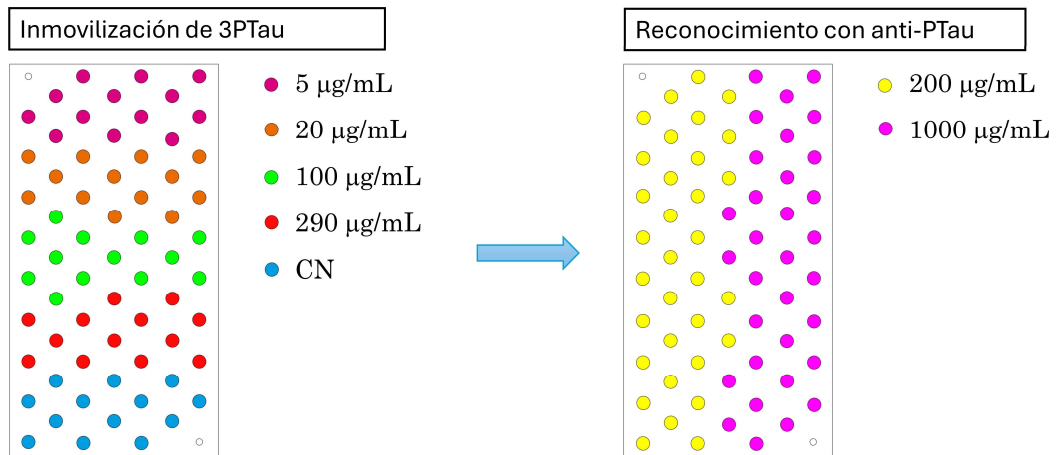


Figura 82. Esquema de la disposición de las gotas sobre el kit de diagnóstico en la inmovilización de 3PTau y en el reconocimiento con anti-PTau.

Como se observa en la Figura 83, aumentado la concentración de péptido 3PTau, se consigue aparentemente una señal de inmovilización mejor que la obtenida en el primer ensayo (-180 %).

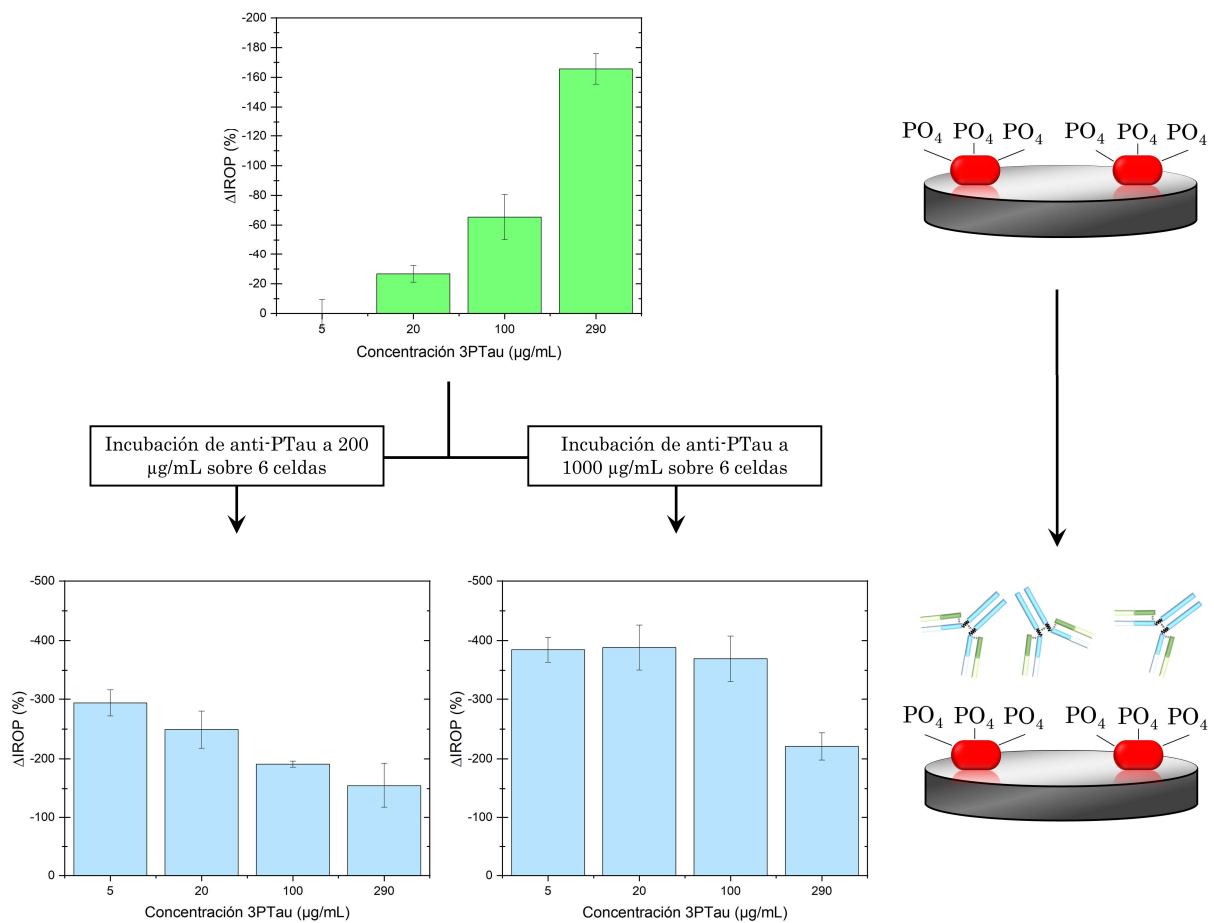


Figura 83. Señales de la inmovilización de 3PTau (en verde) y del reconocimiento por parte de anti-PTau (en azul) sobre ese mismo kit.

Cabe mencionar que en este ensayo disminuye la señal de reconocimiento cuanto mayor es el tapizado de la superficie, debido a unión inespecífica del anticuerpo a la superficie que no se encuentra bien tapizada, por lo que aparentemente se consigue tapizar completamente a una concentración de 290 $\mu\text{g/mL}$, asegurando un tapizado completo. Además, en el reconocimiento se alcanza una señal de -200%, obteniendo una afinidad del anticuerpo por este péptido mayor que la obtenida con el péptido anterior.

Hay que mencionar que estos estudios previos son para evaluar los péptidos y los anticuerpos proporcionados por Lincbiotech, pero el objetivo principal de este apartado de la tesis es establecer un kit de diagnóstico que sirva para detectar biomarcadores específicos de la EA. En consecuencia, el ensayo a estandarizar es el tapizado de un kit con el anticuerpo, detectando así la proteína objetivo. Para llevar a cabo la aproximación definitiva con la que alcanzar este objetivo se depositan concentraciones crecientes del anticuerpo anti-PTau en un kit de diagnóstico de 65 celdas (Figura 84).

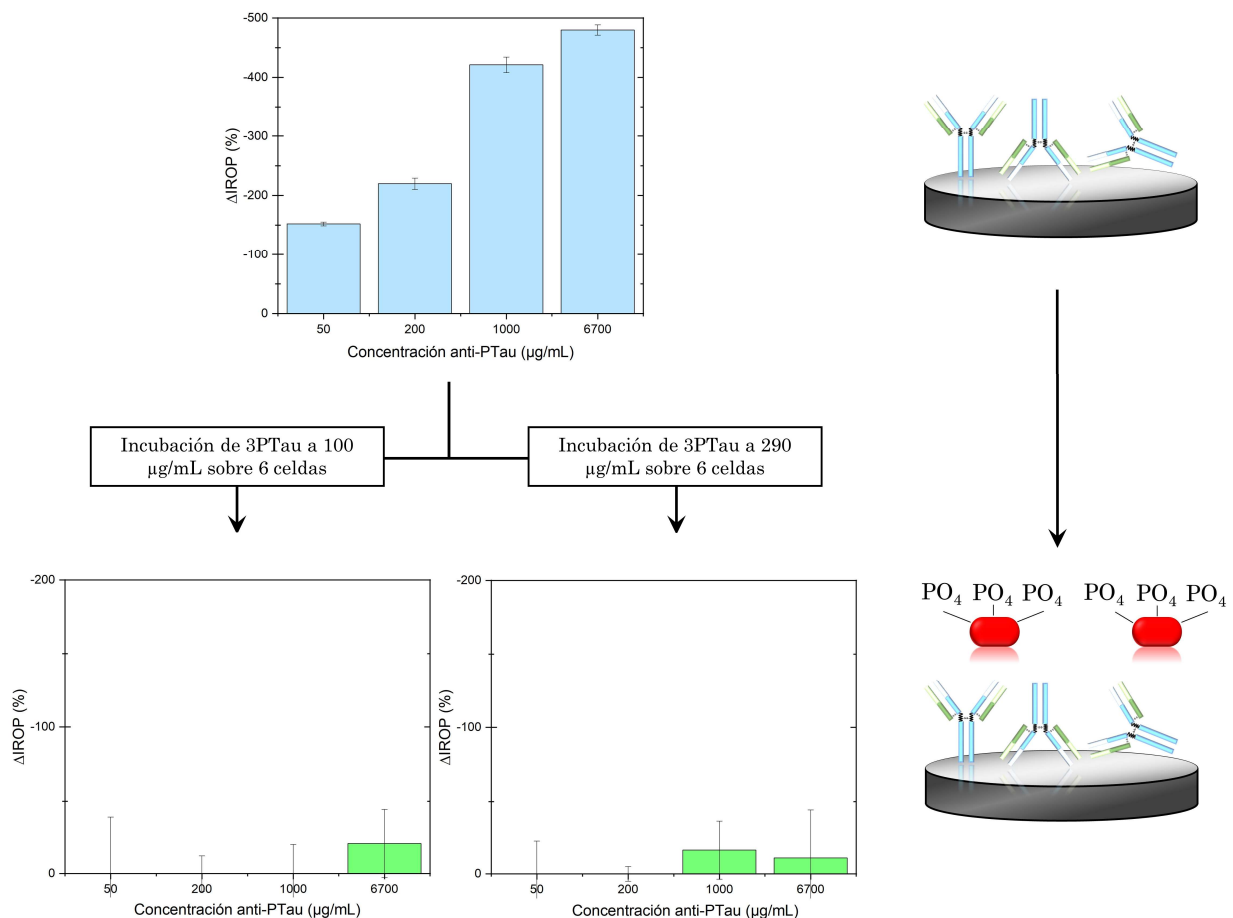


Figura 84. Señales de la inmovilización de anti-PTau y del reconocimiento de 3PTau sobre ese mismo kit

Las inmobilizaciones ($n = 13$) se realizan en cámara húmeda durante 3 horas a 37 °C, tras las cuales se bloquea durante una hora con hidrolizado de caseína. Para comprobar la capacidad del kit para detectar el péptido se dispensan dos concentraciones diferentes de 3PTau (100 y 290 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por cada concentración de anticuerpo inmovilizada en el kit. El reconocimiento ($n = 6$) se realiza en cámara húmeda durante 3 horas a 37 °C, con $n = 6$.

De este ensayo se deduce que a 1 mg/mL se alcanza aparentemente un tapizado completo de la superficie por parte del anticuerpo, así como que el tamaño del péptido dificulta la obtención de una señal clara.

Como se explica en la sección 3.1.2., en este tipo de biosensores interferométricos la detección de moléculas se basa en el aumento del espesor de la celda, el tamaño de un anticuerpo promedio es de 150 kDa y el tamaño del péptido a detectar es 3.3 kDa. Por lo que, como era de esperar, conseguir una buena sensibilidad con moléculas tan pequeñas es realmente complicado.

Mientras se lleva a cabo una búsqueda de un anticuerpo y un antígeno alternativos relacionados con la enfermedad de Alzheimer, se realiza un último ensayo con este péptido (3PTau) y este anticuerpo (anti-PTau) con el fin de comparar con un ensayo ELISA.

Para este ensayo se deposita una misma concentración del péptido 3PTau (290 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en un kit de diagnóstico de 65 celdas, esta inmobilización se realiza en cámara húmeda durante 3 horas a 37 °C. Finalmente, se incuban concentraciones crecientes de anti-PTau y tiene lugar el reconocimiento ($n = 5$) en cámara húmeda durante 3 horas a 37 °C. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 85.

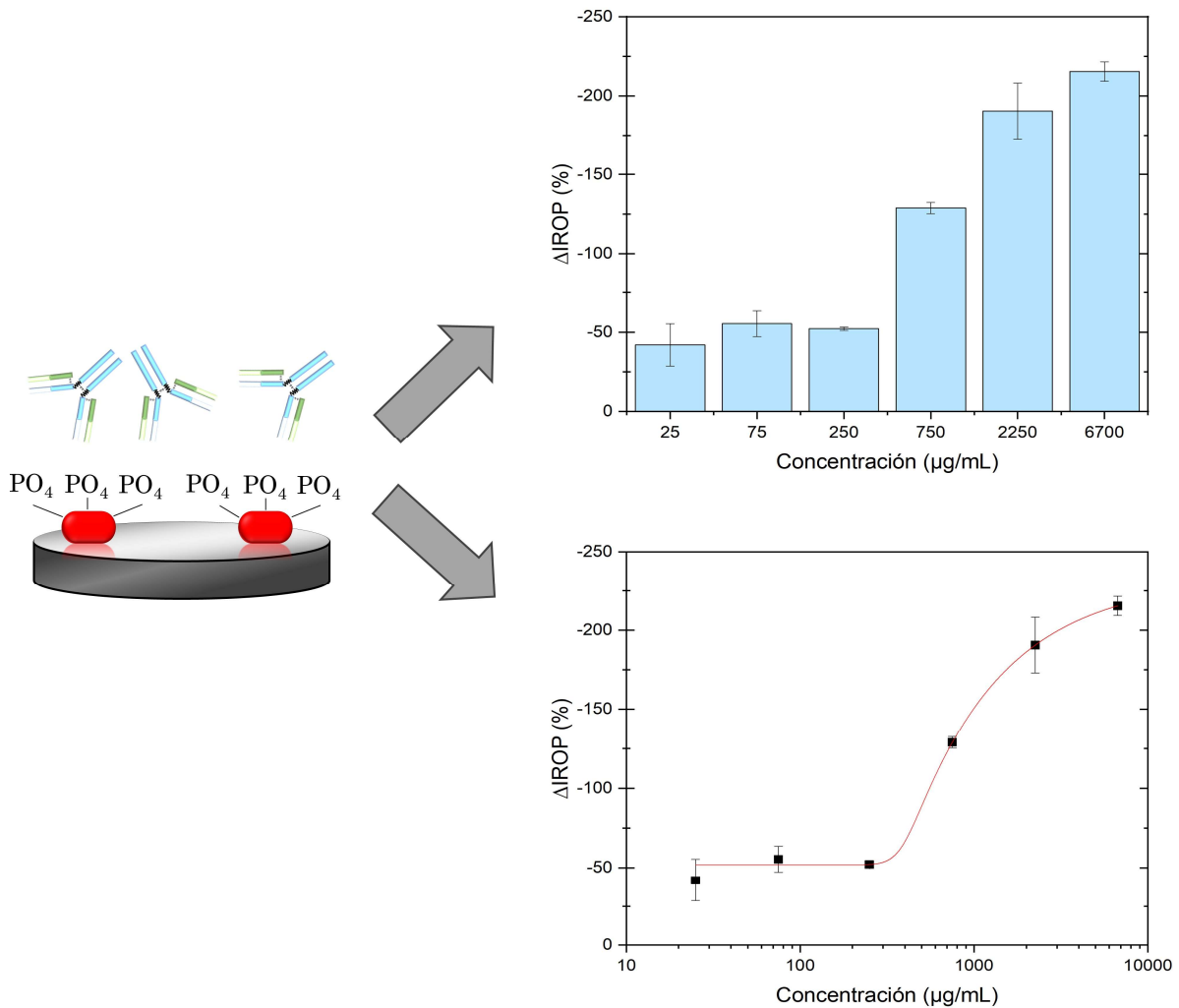


Figura 85. Curva de reconocimiento del anticuerpo anti-PTau a diferentes concentraciones sobre una superficie tapizada con el péptido 3PTau. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Logistic fit") de las señales obtenidas utilizando el software Origin, obteniendo un R^2 de 0.99935 en el ajuste de la curva (en rojo).

Por otro lado, para llevar a cabo un ensayo empleando la técnica ELISA, la empresa que suministra estos péptidos facilita un protocolo y el material necesario para su realización. Entre cada uno de los pasos se realizan tres lavados con TBS-T 0.05% (por sus siglas en inglés *Tris buffer saline with Tween*).

El protocolo comienza con la inmovilización de 100 μ L de anticuerpo anti-PTau a 10 μ g/mL a 4 °C durante 20 horas en los pocillos de la placa ELISA. Tras lo cual se bloquea la superficie durante 1 hora a 37 °C. Seguidamente, se incuban 100 μ L del péptido 3PTau a diferentes concentraciones a 25 °C durante 2 horas. A continuación, se incuban 100 μ L de un anticuerpo comercial biotinilado a 250 ng/mL a 25 °C durante 1 hora en movimiento. Posteriormente, se incuban 100 μ L de estreptavidina-HRP (por sus siglas en inglés *HorseRadish Peroxidase*) a 50

ng/mL a 25 °C durante 1 hora en movimiento en oscuridad. Por último, se revela con TMB (Tetrametilbencidina) durante 10 minutos a 25 °C en oscuridad y se detiene la reacción con H₂SO₄.

La cinética de este ensayo se obtiene mediante un lector de placas ELISA (Tecan, Ref. Infite F50). Durante los 10 minutos del revelado con TMB, el láser empleado de una longitud de onda de 620 nm proporciona los resultados resumidos en la Figura 86A. Además, en la Figura 86B se muestra la relación entre absorbancia y concentración a los 10 minutos.

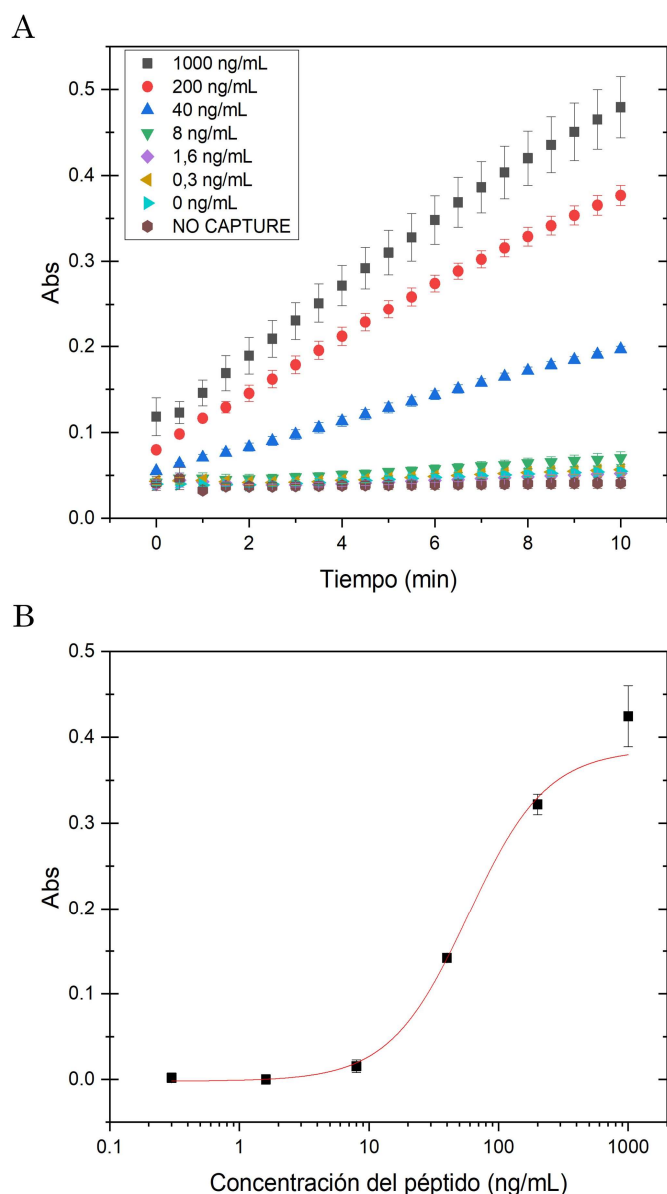


Figura 86. A) Cinética del ensayo ELISA. B) Señales del ensayo ELISA a los 10 minutos, se realiza un ajuste sigmoideal ("Hill1 fit") de las señales obtenidas a los 10 minutos utilizando el software Origin, obteniéndose un R² de 0.99868 en el ajuste de la curva (en rojo).

Como se puede observar en la Figura 85, la afinidad de este anticuerpo por el péptido es muy débil en los kits con sensores interferométricos, en concreto, existe una diferencia de cuatro órdenes de magnitud comparado con la detección mediante ELISA (Figura 86).

4.2.2. Ensayos con un fragmento recombinante de Tau y un anticuerpo anti-Tau unido a NPs Magnéticas

Como consecuencia de los resultados observados anteriormente, se propone utilizar un nuevo fragmento recombinante de Tau de mayor tamaño (Sigma, Ref.: APREST88626), concretamente 26 kDa.

4.2.2.1. Evaluación de la inmovilización del fragmento recombinante de Tau

Este fragmento comercial de Tau es inmovilizado en un kit de diagnóstico de 65 celdas a diferentes concentraciones, incubándose en cámara húmeda durante 2 horas a 37 °C, con $n = 7$. Podemos observar en la Figura 87 que la saturación de la curva se alcanza a 50 $\mu\text{g/mL}$.

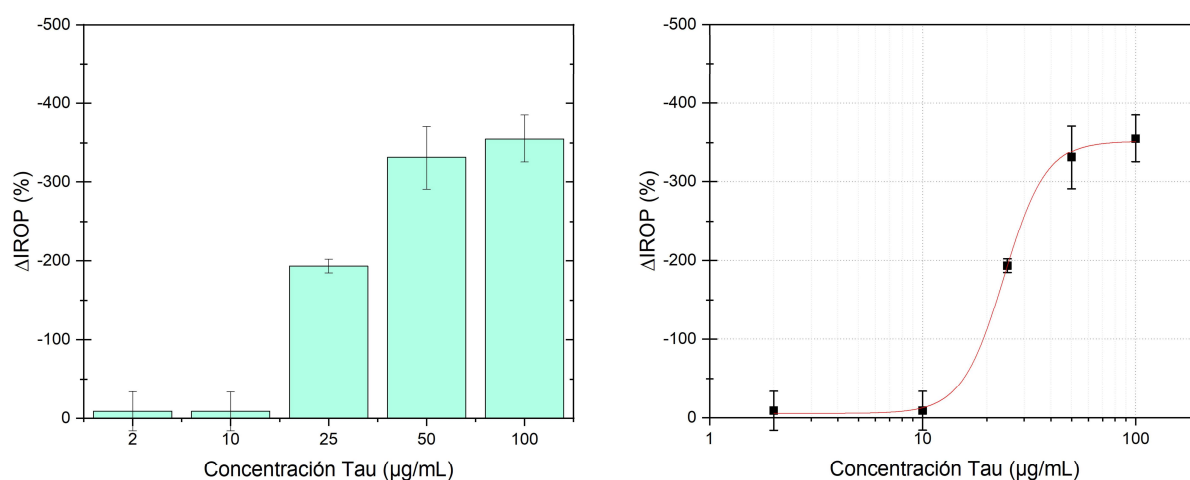


Figura 87. Incubación de la proteína Tau a diferentes concentraciones. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Hill1 fit") mediante el software Origin, obteniendo un R^2 de 0.99935 en el ajuste de la curva (en rojo).

4.2.2.2. Estudio de especificidad de anti-Tau por Tau

Tras esto, se selecciona un nuevo anticuerpo anti-Tau (Sigma, Ref.: HPA048895). Para corroborar la especificidad de este nuevo anticuerpo se tapiza completamente un kit de 65 celdas con Tau a 50 $\mu\text{g/mL}$, concentración a la que se encuentra saturado el sensor, durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda. Finalmente

se incuban diferentes concentraciones de este nuevo anticuerpo en 7 celdas por condición durante 2 horas a 37 °C Figura 88.

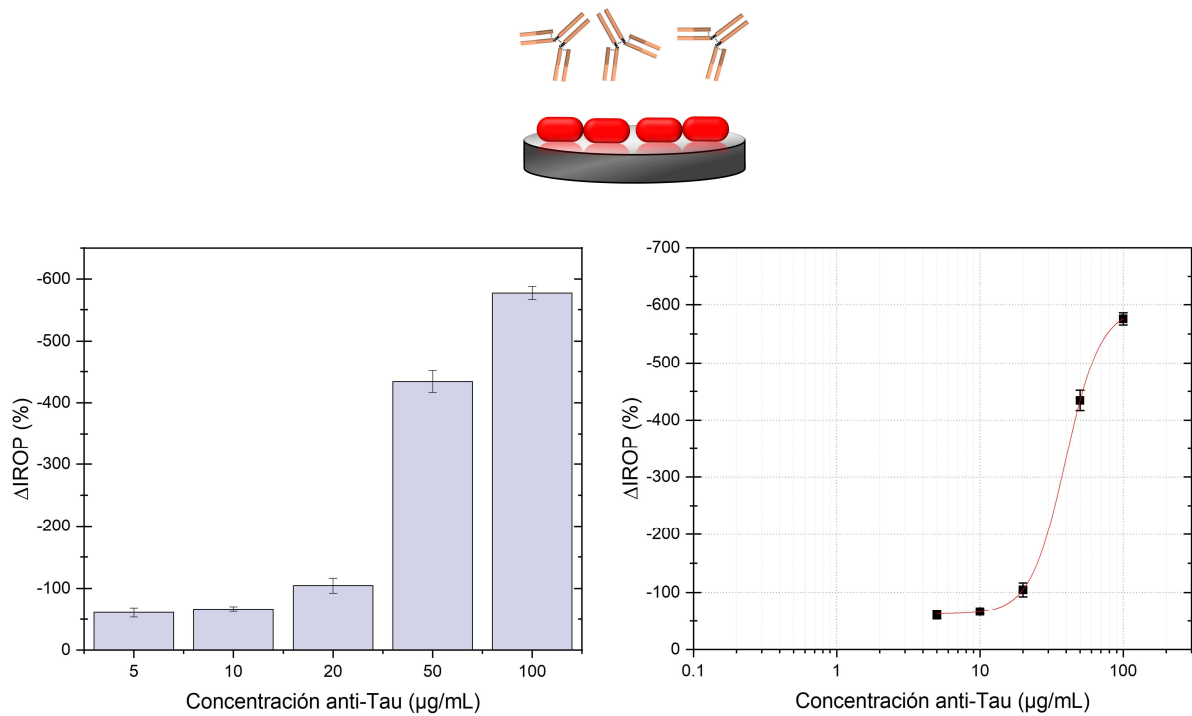


Figura 88. Curva de reconocimiento del anticuerpo anti-Tau a diferentes concentraciones sobre una superficie tapizada con Tau. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Hill1 fit") mediante el software Origin, obteniendo un R^2 de 0.99997 en el ajuste de la curva (en rojo).

En la Figura 88 se puede observar el ensayo de reconocimiento con el nuevo anticuerpo anti-Tau, en el que se obtienen señales más altas a partir de 50 μg/mL con los péptidos del anterior apartado.

Finalmente se realiza un ensayo en el que se tapiza completamente un kit de 65 celdas con anti-Tau a 50 μg/mL durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda, tras lo cual, se bloquea durante una hora con hidrolizado de caseína. Sobre este kit se incuban diferentes concentraciones de Tau en 7 celdas por concentración durante 2 horas a 37 °C.

Se observa que la saturación de la curva se alcanza a 50 μg/mL (Figura 89). Este ensayo se repite numerosas veces, obteniendo señales similares, por lo que se consigue estandarizar un ensayo en el que testar nanopartículas.

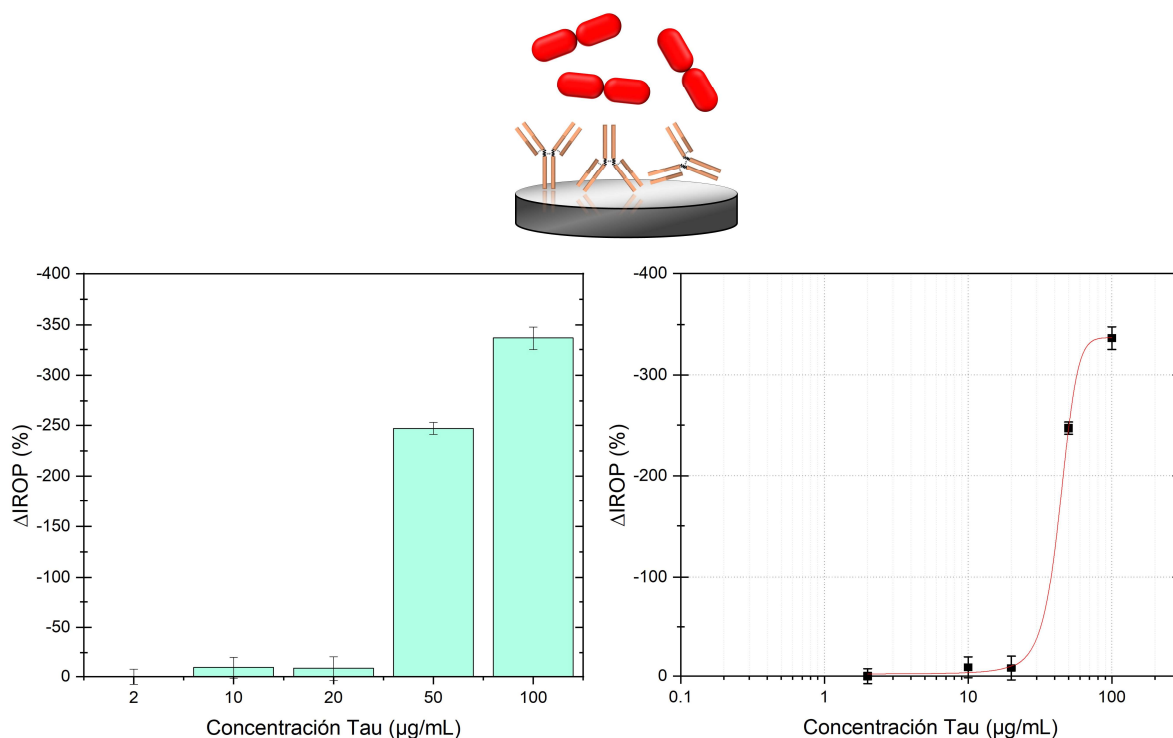


Figura 89. Curva de reconocimiento de Tau por parte del anticuerpo anti-Tau que tapiza el kit de diagnóstico. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Boltzmann fit") mediante el software Origin, obteniendo un R^2 de 0.99967 en el ajuste de la curva (en rojo).

4.2.2.3. Evaluación de la señal de las nanopartículas magnéticas en un sensor interferométrico

Como se explica a lo largo de esta tesis, las nanopartículas se pueden emplear para optimizar los métodos de biosensado, ya que permiten el cribado de muestra. En concreto se emplean nanopartículas magnéticas puesto que debido a su naturaleza presentan una serie de ventajas. Una de ellas es la facilidad que poseen para controlar el proceso de cribado mediante el empleo de un imán, lo que permite el aislamiento de estas NPs respecto de la muestra, es decir, se elimina fácilmente la solución permaneciendo únicamente las nanopartículas magnéticas que han capturado la molécula objetivo.

El primer ensayo consiste en depositar estas nanopartículas sobre kits de diagnóstico que tienen pocillos de nitrocelulosa en vez de celdas de SU-8. El objetivo de este ensayo es determinar las señales que pueden alcanzar estas nanopartículas sin estar tapizadas con ninguna proteína y observar su respuesta óptica en el sensor.

Para ello se incuban 2 μL de concentraciones crecientes de nanopartículas magnéticas tapizadas con un grupo DMSA, que presenta un final carboxilo, en cámara húmeda durante 3 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$, con $n = 5$. Estas partículas cuentan con un núcleo de 8.3 nm de diámetro.

En la Figura 90 se puede observar que estas nanopartículas no biofuncionalizadas son capaces de alcanzar una señal de $-800\% \Delta\text{IROP}$. Este resultado es satisfactorio, ya que empleando estas MNPs no solo se alcanzan estos valores en un ensayo específico, sino que además se debe tener en cuenta que se encuentran recubiertas con anticuerpos, con los cuales se alcanza una señal de alrededor de $-500\% \Delta\text{IROP}$. Se observa que la saturación de la curva se alcanza a concentraciones cercanas a 1×10^{12} NPS/ μL .

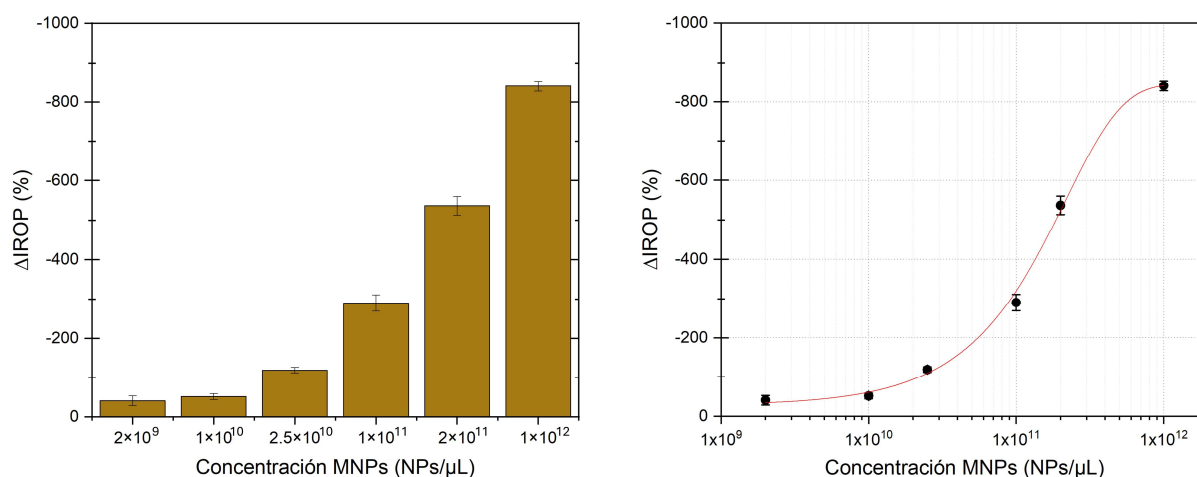


Figura 90. Gráfico de la incubación de MNPs sobre kits de nitrocelulosa. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Boltzmann fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99818 en el ajuste de la curva (en rojo).

4.2.2.4. Funcionalización de nanopartículas magnéticas con proteína G

Una vez confirmado que las nanopartículas son detectadas por el biosensor se procede a diseñar un protocolo de biofuncionalización basado en la química del EDC (sección 3.2.4).

Para ello, se activa 1 mL de MNPs a 1×10^{12} NPS/ μL añadiendo 120 μg de EDC cada hora durante 4 horas en sonicación en frío. Seguidamente, se centrifugan para eliminar el sobrenadante, se resuspenden en H_2O y se incuban en un baño de sonicación refrigerado con 100 μL de PG a 0.5 mg/mL (Figura 91). Tras 4 horas se centrifugan para eliminar el sobrenadante y se resuspenden en 0.5 mL de H_2O .

Posteriormente, se incuban durante una hora con 0.5 mL de dietanolamina 0.1 M para bloquear los grupos carboxilos que puedan quedar libres.

Tras centrifugar y lavar, se utiliza una pequeña cantidad para comprobar la correcta funcionalización de estas MNPs con PG.

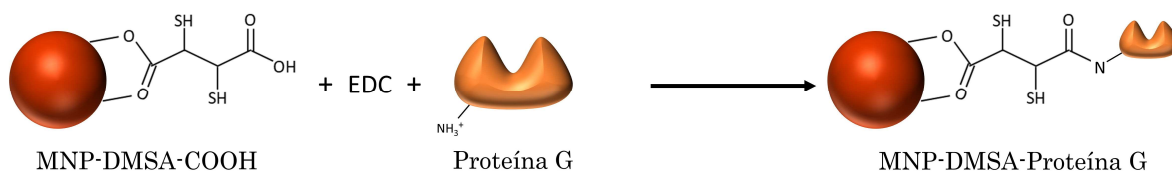


Figura 91. Biofuncionalización de MNPs con proteína G.

Para comprobar esta funcionalización se incuban 1.5 μL de la proteína Tau a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre un kit de 65 celdas durante 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ en ambiente de humedad. Esta proteína es reconocida por un anticuerpo anti-Tau, depositando 1.5 μL a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de este anticuerpo sobre las celdas previamente tapizados con Tau. Tras esta incubación de 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ en ambiente de humedad, se lavan los kits y se confirma la señal específica del anticuerpo, para finalmente incubar durante 24 horas a 20 $^{\circ}\text{C}$ en humedad distintas concentraciones de MNPs con proteína G (Sigma, Ref. P4689) funcionalizada en su superficie. Se incuban 5 celdas para cada condición, observándose en la figura 92 la especificidad de estas MNPs con PG por el anticuerpo anti-Tau, que se va a unir a las MNPs a continuación.

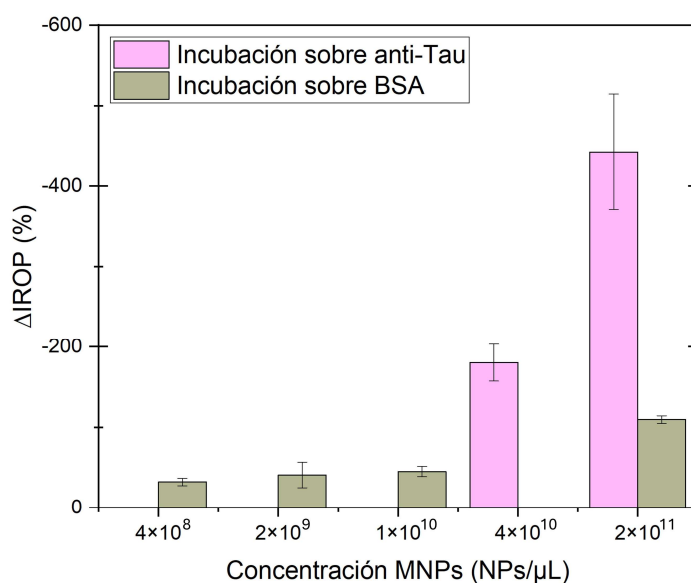


Figura 92. Ensayo de reconocimiento directo de MNPs con PG sobre anticuerpos.

4.2.2.5. Estudio de especificidad de nanopartículas magnéticas con anti-Tau por Tau

Las nanopartículas con proteína G en su superficie son incubadas con 0.2 mL de anti-Tau a 0.1 mg/mL durante 24 horas a 4 °C (Figura 93).

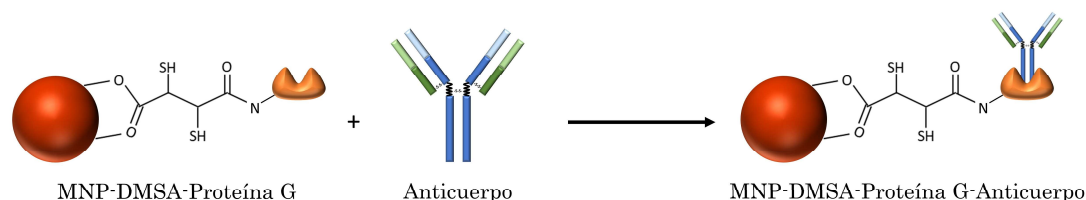


Figura 93. Unión de un anticuerpo a las MNPs biofuncionalizadas con proteína G.

A continuación, estas nanopartículas se incuban sobre un kit de 65 celdas con la superficie completamente tapizada con la proteína Tau (50 $\mu\text{g/mL}$) para su reconocimiento, empleando como control negativo FBS (por sus siglas en inglés *Fetal Bovine Serum*). Se incuban en cada celda 1.5 μL de concentraciones crecientes de MNPs con anti-Tau, empleando para cada condición 5 celdas. Esta incubación se lleva a cabo durante 24 horas a 20 °C en humedad.

Como se puede observar en la Figura 94, se obtienen valores altos de ΔIROP tanto en el control negativo como en el reconocimiento específico a la máxima concentración de las MNPs tapizadas con anti-Tau.

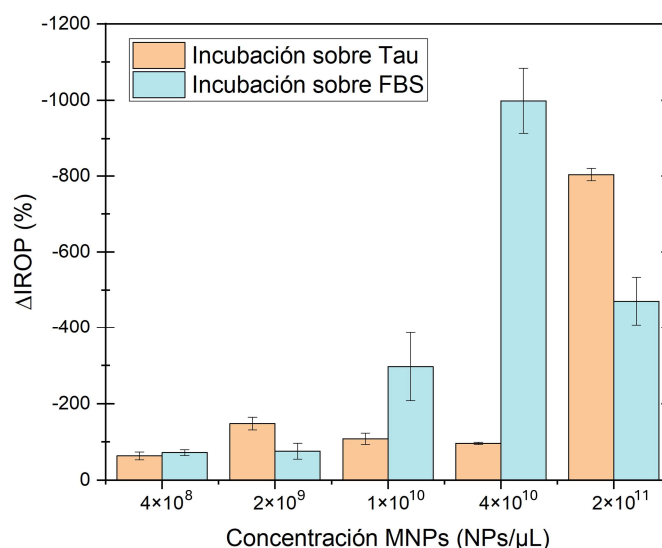


Figura 94. Ensayo de reconocimiento directo de MNPs con anti-Tau sobre Tau empleando como control negativo FBS.

Puesto que no se consigue observar especificidad en el ensayo, en el siguiente experimento se elige como control negativo la proteína BSA, manteniendo el resto de condiciones descritas previamente para el anterior control negativo. Salvo que, en este caso, no se incuban MNPs a cada concentración sobre BSA, sino que se incuban las MNPs a 5×10^9 NPS/ μ L y a 2×10^{11} NPS/ μ L sobre BSA.

En la Figura 95 se muestra el ensayo con BSA como control negativo, observando la ausencia de señal del control negativo, y una única señal específica a 2×10^{11} NPs/ μ L. En cualquier caso, ambos controles negativos registran señales inferiores a -200% Δ IROP (-175.80% Δ IROP y -161.18% Δ IROP), por lo que de ahora en adelante se emplea BSA como control negativo en los experimentos.

La concentración a la que comienza a observarse la señal específica de las MNPs con anti-Tau (Figura 95) se considera demasiado alta, además los valores de Δ IROP se consideran muy discretos. Dado que se pretende obtener valores más altos para amplificar la señal de detección se sustituyen las MNPs con grupo DMSA por MNPs con un núcleo de hierro más grande en los siguientes experimentos.

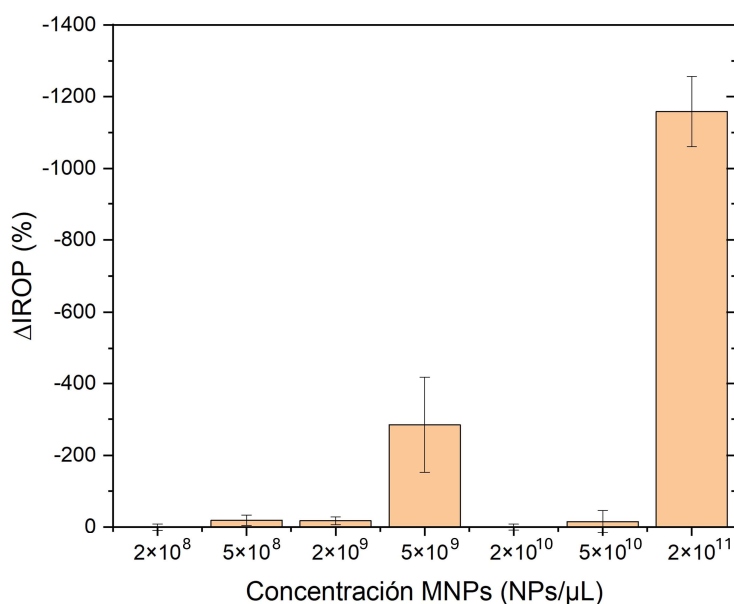


Figura 95. Ensayo de reconocimiento directo de MNPs con anti-Tau sobre Tau empleando como control negativo BSA.

Por ello, se escogen MNPs con grupo DMSA de mayor tamaño, de 19 nm y de 20 nm y se analizan por DLS. Como se puede apreciar en la Figura 96, en el caso de las MNPs con un diámetro de 19 nm existe una única población, por el contrario, en el caso de las de 20 nm se observan dos poblaciones. Finalmente, se seleccionan las MNPs de 19 nm para los siguientes ensayos.

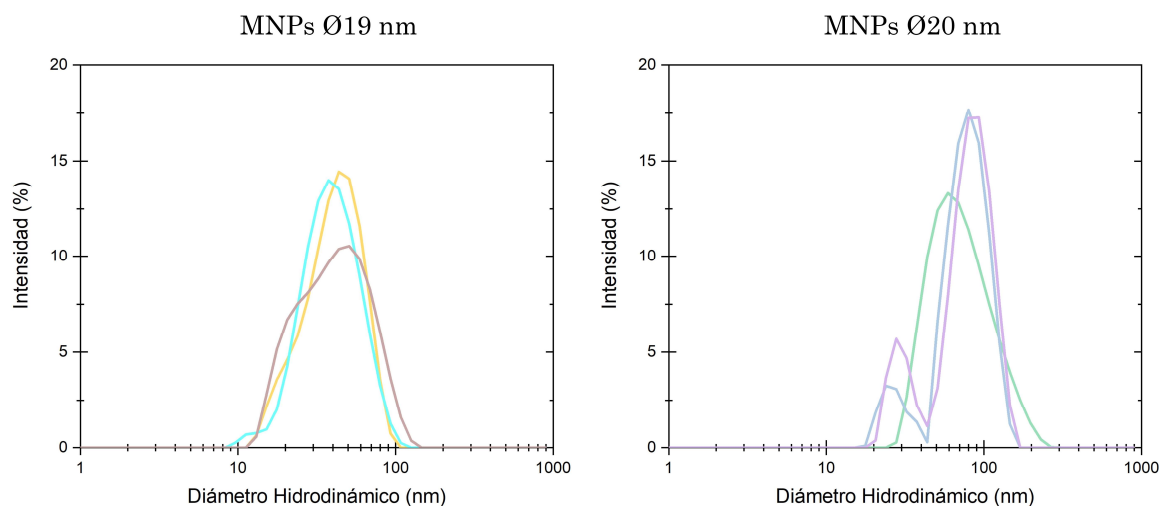


Figura 96. Distribución de las poblaciones de MNPs de mayor tamaño mediante DLS.

Una vez seleccionada la población de MNPs se procede con el mismo protocolo de biofuncionalización con el que se ha obtenido previamente una señal específica. Además, se realiza en paralelo un ensayo de biofuncionalización similar al anterior, con la diferencia de llevar a cabo la incubación de la proteína G en una noria a 4 °C durante 20 horas, en vez de en un baño de sonicación refrigerado durante 4 horas. Tras el proceso de biofuncionalización, y antes de realizar el ensayo de afinidad, estas nuevas MNPs se caracterizan empleando la técnica DLS (Tabla 10).

Población	d_H (nm)	Índice de polidispersidad
MNP de Ø19 nm	36.65 ± 0.79	0.20 ± 0.02
MNP + PG sonicadas	37.59 ± 0.10	0.17 ± 0.01
MNP + PG + anti-Tau sonicadas	42.05 ± 0.33	0.25 ± 0.02
MNP + PG en nevera	40.90 ± 0.17	0.19 ± 0.01
MNP + PG + anti-Tau en nevera	46.37 ± 0.47	0.29 ± 0.03

Tabla 10. Caracterización de MNPs durante la biofuncionalización mediante DLS.

Es relevante señalar que no se observan grandes cambios tras la unión de la proteína G a la nanopartícula. Es en la etapa de unión del anticuerpo cuando se puede observar un cambio sustancial, aunque comprometa, en parte, la polidispersidad en el caso de las MNPs incubadas en nevera. El potencial zeta no se refleja en la Tabla 10 ya que no se observan cambios en las distintas fases del proceso de biofuncionalización, manteniéndose siempre alrededor de -54 mV.

Se tapizan dos kits de 65 celdas con la proteína Tau y se deposita como control negativo BSA. Seguidamente, en cada celda se incuban 1.5 μL de concentraciones crecientes de MNPs con anti-Tau, empleando para cada condición 5 celdas. Esta incubación se realiza durante 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ en humedad.

En la Figura 97 se puede observar que las MNPs incubadas en nevera alcanzan una señal superior a -1000% ΔIROP a la máxima concentración, 2.84×10^{10} NPs/ μL .

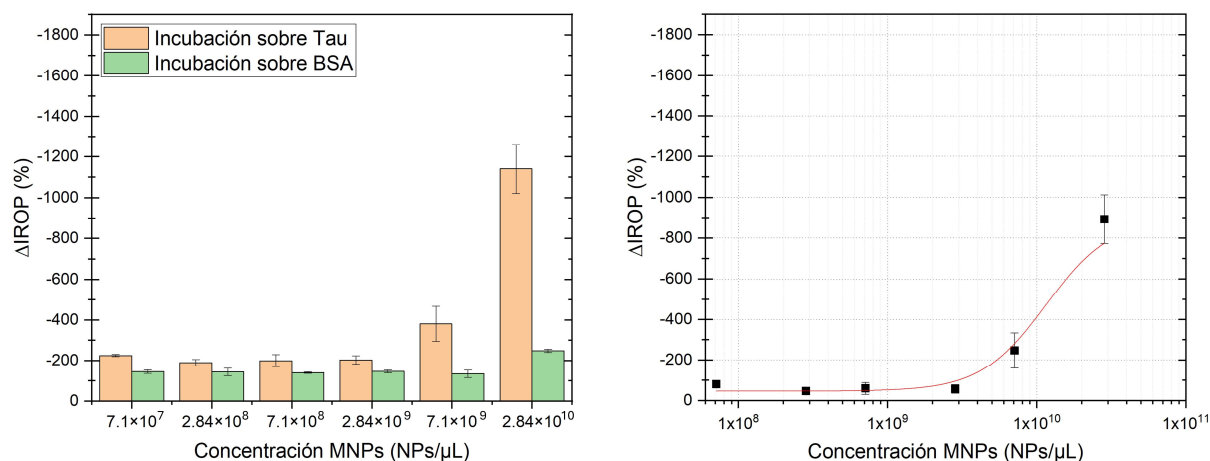


Figura 97. Ensayo de reconocimiento directo de MNPs con anti-Tau sobre Tau. Se realiza un ajuste sigmooidal ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.9000 en el ajuste de la curva (en rojo).

En la Figura 98 se puede observar que las MNPs sonicadas alcanzan señales más altas debido al empleo de concentraciones superiores en el reconocimiento, 6.46×10^{10} NPs/ μL .

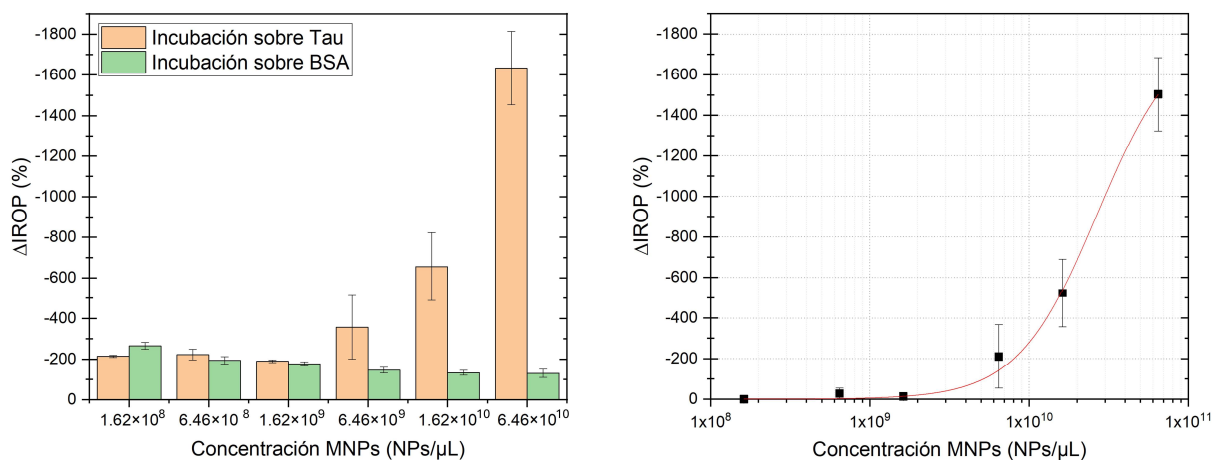


Figura 98. Ensayo de reconocimiento directo de MNPs con anti-Tau sobre Tau. Se realiza un ajuste sigmooidal ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.98643 en el ajuste de la curva (en rojo).

Cabe señalar que la diferencia entre las concentraciones empleadas en las MNPs sonicadas respecto a las MNPs incubadas en nevera, se debe al valor de concentración obtenido mediante el DLS de las MNPs tras su lavado. En este sentido, el protocolo de sonicado refleja un mayor rendimiento de la reacción.

Merece especial atención que, mediante estas nanopartículas magnéticas de mayor diámetro, se consigue alcanzar valores de $\Delta IROP$ superiores a -1000% utilizando concentraciones un orden de magnitud menor.

Tras la obtención de estas curvas de afinidad, se corrobora mediante SEM la presencia de las MNPs sobre las celdas interferométricas, lo cual permite observar cómo están distribuidas sobre el sensor. Así, se obtienen imágenes empleando aumentos de 30000 y 5000 (Figuras 99 y 100).

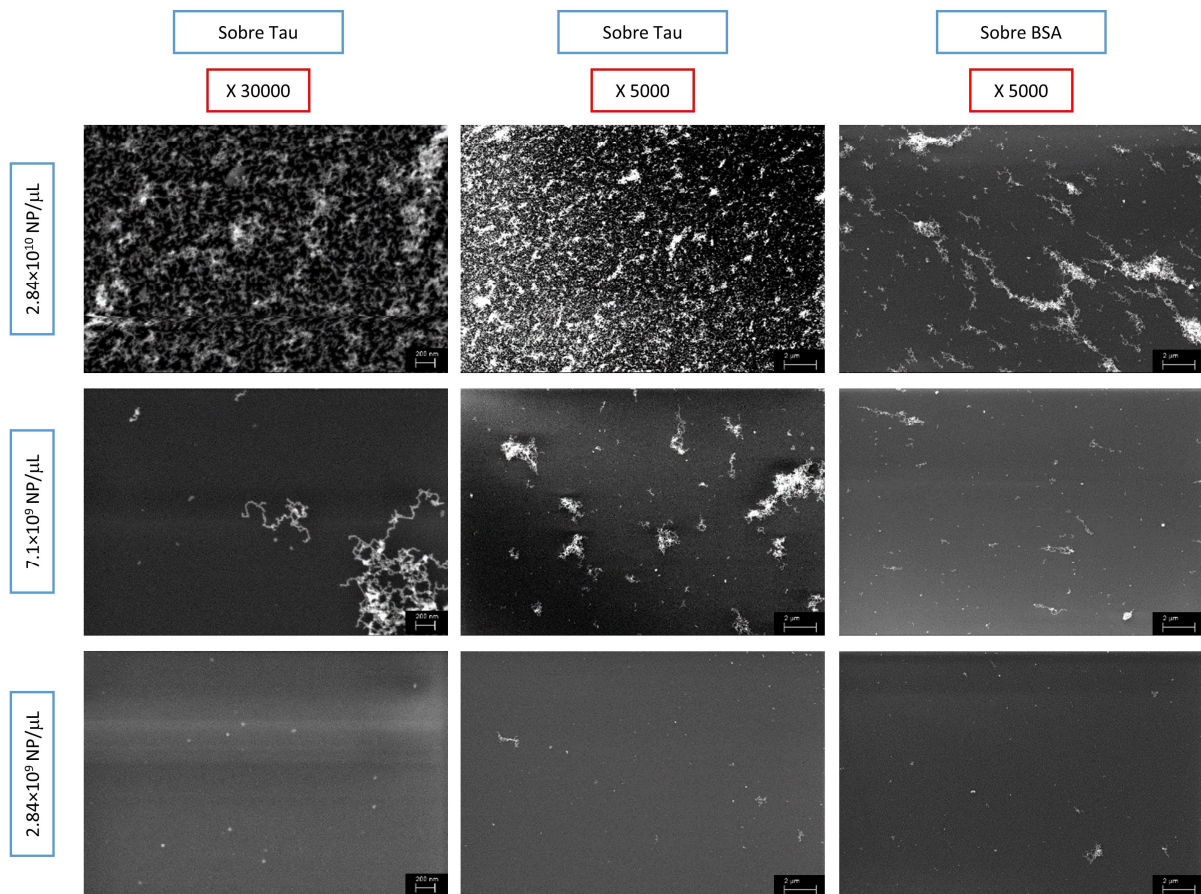


Figura 99. Imágenes del reconocimiento directo de MNPs incubadas en nevera con anti-Tau sobre Tau.

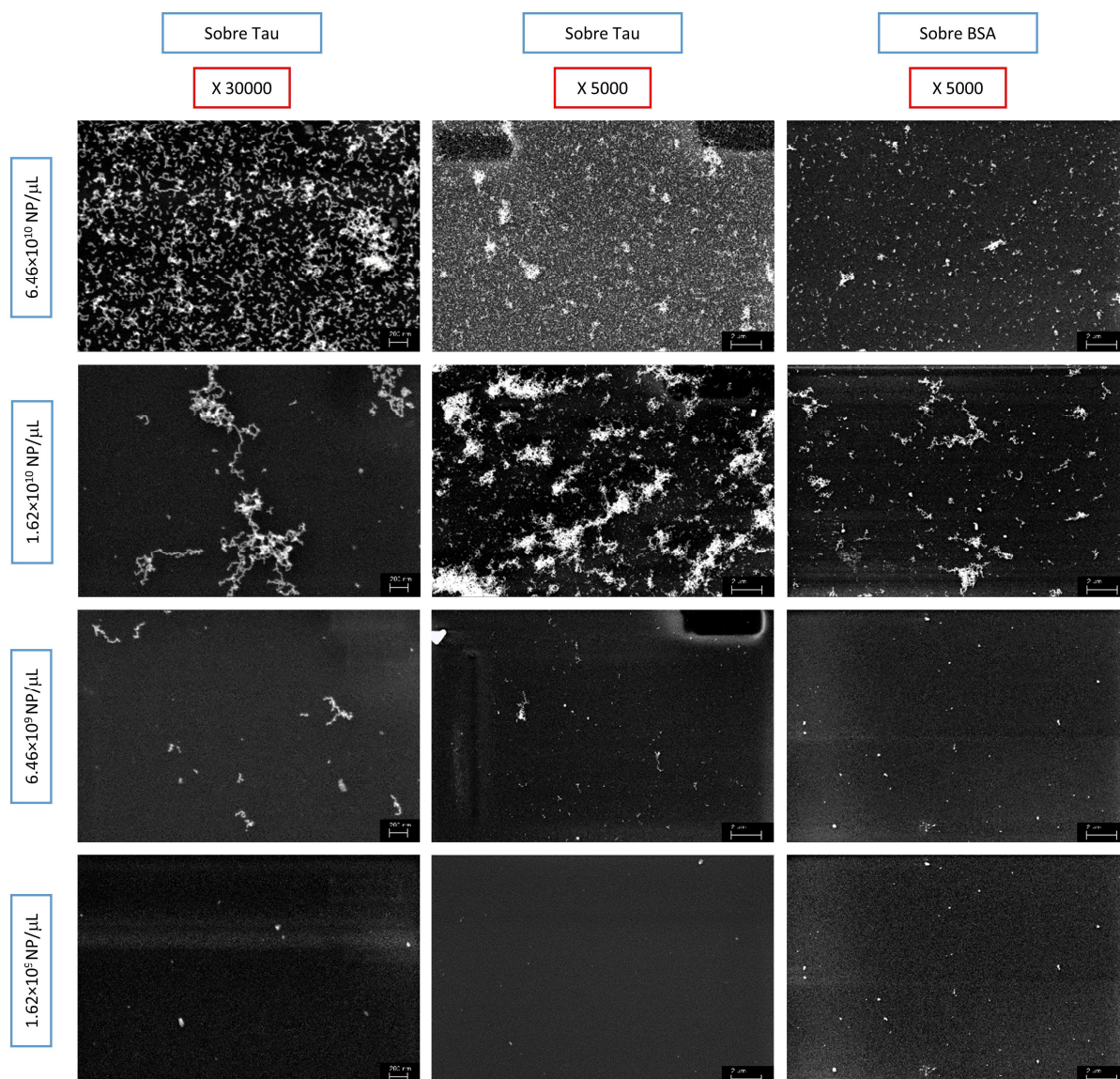


Figura 100. Imágenes del reconocimiento directo de MNPs sonicadas con anti-Tau sobre Tau.

En estas imágenes se puede observar que, a altas concentraciones de nanopartículas, la superficie de la celda parece estar tapizada completamente, formando una monocapa. Mientras que a concentraciones más bajas las MNPs parecen agruparse formando cadenas (Figura 101).

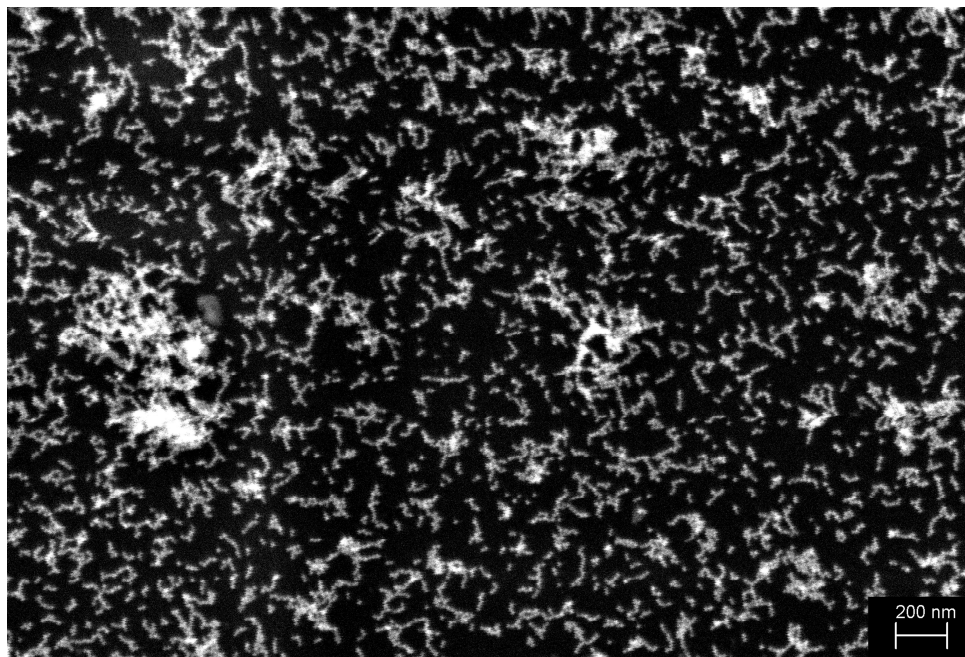


Figura 101. Imagen tomada por SEM de MNPs con anti-Tau a 6.46×10^{10} NPs/ μ L sobre un kit funcionalizado con Tau.

4.2.2.6. Ensayo competitivo con nanopartículas magnéticas con anti-Tau

Por último, se realiza un ensayo competitivo en el que MNPs con anti-Tau a una concentración de 3.23×10^{11} NPs/ μ L se incuban con Tau a 500 ng/mL durante 24 horas a 4 °C en agitación. Seguidamente, estas MNPs se depositan sobre un kit de 65 celdas tapizado con Tau, cuya incubación se realiza durante 6 horas a 37 °C en humedad. Como control positivo se utiliza la misma concentración de MNPs, en ausencia de Tau.

La Figura 102 muestra una señal muy baja de las MNPs previamente incubadas con Tau, ya que los anticuerpos no se encuentran libres y son incapaces de unirse a la superficie específica.

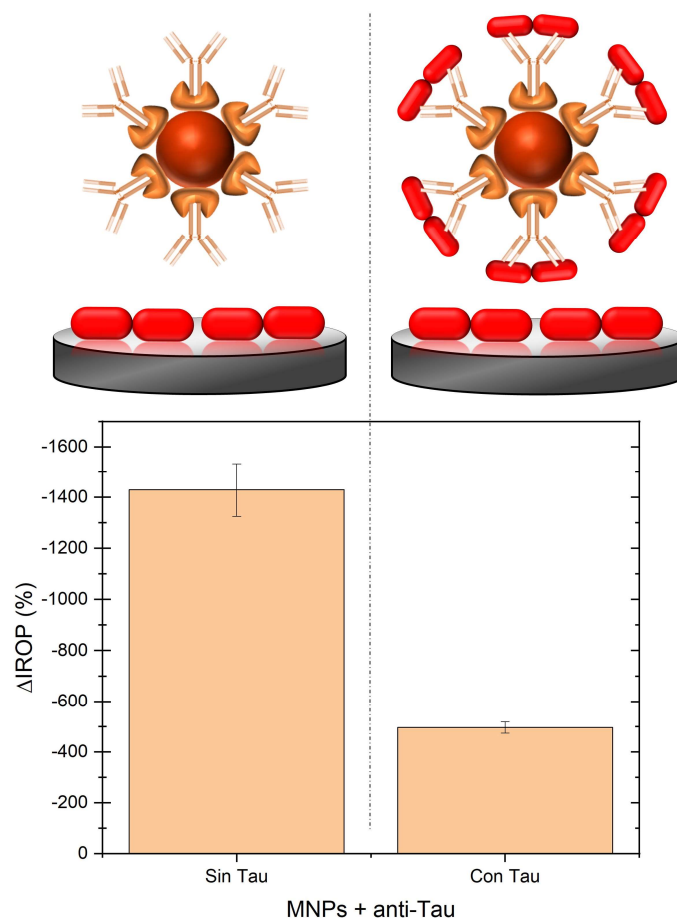


Figura 102. Ensayo competitivo de MNPs con anti-Tau sobre Tau.

Las MNPs con anti-Tau que han sido incubadas con Tau tienen una señal mucho menor sobre el kit tapizado con Tau, verificando que el reconocimiento llevado a cabo previamente se ha producido de manera satisfactoria.

Como se puede observar, a lo largo de este apartado se consigue tapizar nanopartículas magnéticas con anticuerpos capaces de detectar un biomarcador de la enfermedad de Alzheimer, en este caso la proteína Tau. Es necesario mencionar que durante el proceso de biofuncionalización no se observan cambios apreciables en el análisis mediante DLS hasta la unión del anticuerpo.

4.2.3. Ensayos con Lactoferrina y un anticuerpo anti-LF unido a NPs de oro

En el capítulo anterior se ha conseguido realizar ensayos con nanopartículas magnéticas con anticuerpos en su superficie, capaces de reconocer un biomarcador de la enfermedad de Alzheimer. Aunque ese anticuerpo y ese antígeno sean adecuados no se pudieron obtener más alícuotas de estos debido a que fueron descatalogados por la casa comercial. Mientras se busca otra pareja antígeno-anticuerpo relacionado con la enfermedad de Alzheimer, el GOFB comienza a trabajar con nanopartículas de oro el objetivo de estudiar la respuesta óptica en los biosensores descritos anteriormente, siendo utilizadas en los subsiguientes ensayos.

Bajo este contexto se procede a sintetizar nanopartículas de oro. Es necesario resaltar que esta decisión se toma teniendo en cuenta las ventajas de estas nanopartículas:

- Teniendo en cuenta que son sintetizadas por el mismo laboratorio se puede controlar el tamaño de las AuNPs sintetizadas, y presentan una disponibilidad ilimitada.
- Las AuNPs pueden ser caracterizadas por espectroscopía de absorción, como se explica en la sección 2.2.3.4. Esta técnica permite calcular la concentración de forma más exacta en comparación con el DLS. El DLS calcula la concentración en base al diámetro hidrodinámico, que aumenta con la biofuncionalización de la nanopartícula, y en base a las propiedades ópticas de la nanopartícula, que se mantienen constantes en el DLS, aunque en realidad varían a medida que se añaden moléculas a la superficie.
- Además, la respuesta óptica de estas AuNPs es mayor que en el caso de las MNPs debido a sus propiedades ópticas.

4.2.3.1. Síntesis y caracterización de AuNPs

La síntesis de las nanopartículas de oro se realiza mediante el protocolo descrito en la sección 3.2.2.1. Tras la síntesis de las AuNPs, se caracterizan mediante tres métodos diferentes: DLS, SEM (Figura 103) y espectroscopía de absorción. En el caso de la técnica DLS, se obtiene información aproximada sobre el diámetro hidrodinámico y la concentración de la solución mediante el análisis de la dispersión de la luz. Por otro lado, el SEM facilita una imagen sobre la que podemos

medir el diámetro de las AuNPs, aunque no de forma precisa. Finalmente, mediante la espectroscopía se puede obtener un valor aproximado del diámetro y de la concentración de la solución. Los datos obtenidos pueden observarse en la Tabla 11, observándose valores muy similares de diámetro de las AuNPs sintetizadas.

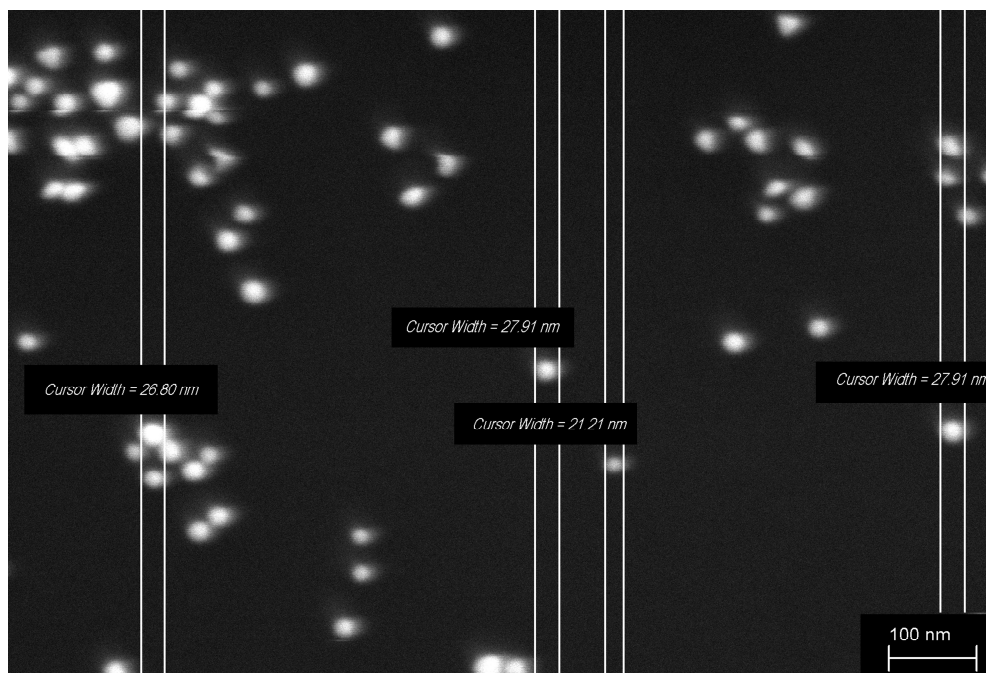


Figura 103. Caracterización del tamaño de las AuNPs sintetizadas mediante SEM.

Técnica	Diámetro (nm)	Concentración (NPs/ μ L)
DLS	24.65	8×10^8
Espectroscopía	23.73	4×10^8
SEM	25.96	

Tabla 11. Cuadro resumen de la caracterización de las AuNPs mediante tres técnicas diferentes.

Cabe señalar que, aunque son diferentes técnicas se obtienen valores aproximados muy cercanos entre sí en el caso del diámetro, y del mismo orden de magnitud en el caso de la concentración.

4.2.3.2. Evaluación de la señal de las nanopartículas de oro en un sensor interferométrico

A continuación, las AuNPs son concentradas mediante centrifugación y se depositan en un kit de diagnóstico de 65 BIWELLS con nitrocelulosa. Es necesario mencionar que, debido al aumento de tamaño, se alcanzan señales más altas (-2000% Δ IROP), por lo que se espera aumentar visiblemente la sensibilidad del biosensor (Figura 104).

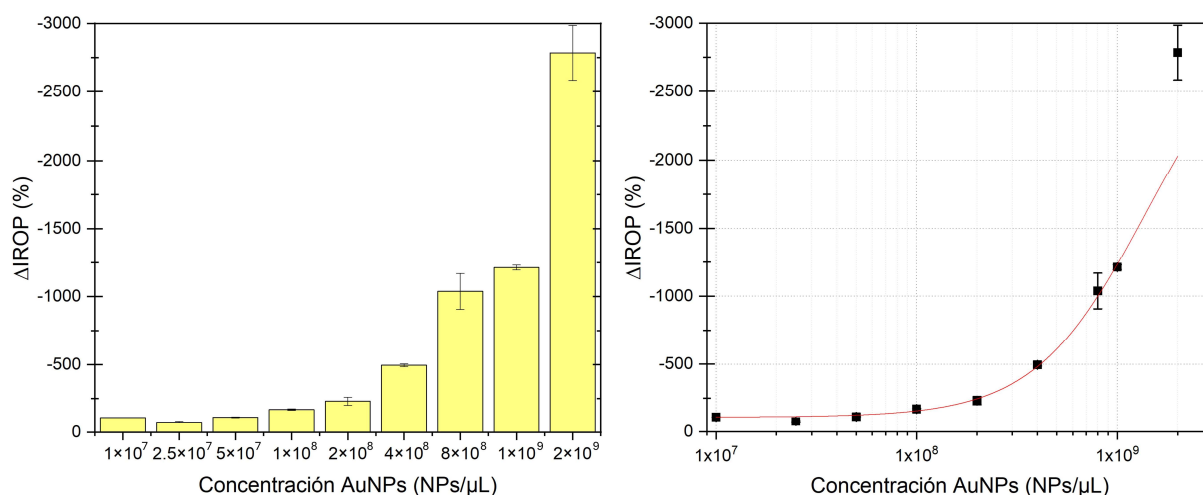


Figura 104. Gráfico de la incubación de AuNPs sobre kits de nitrocelulosa. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99883 en el ajuste de la curva (en rojo).

4.2.3.3. Funcionalización de nanopartículas de oro con biotina

Para realizar ensayos con nanopartículas de oro (antes de anclar proteínas) se prueba a anclar una molécula de biotina a los grupos carboxilos de nanopartículas tapizadas con PEG-COOH (sección 3.2.2.2.) (Figura 105). Para ello se emplea una biotina con un grupo hidrazida (Thermo Scientific, Ref.: 21339).

La población de nanopartículas empleada tiene alrededor de 25 nm de diámetro y presenta una concentración de 4.39×10^8 NPs/μL. Se incuban 40 mL de estas nanopartículas con 4.5 mg de PEG-COOH. Las cuales fueron lavadas y caracterizadas, obteniendo una concentración de 2.4×10^9 NPs/μL. Se añade 1 mL de MES 200 mM, 25 μL de hidrazida-Biotina en DMSO, y 12.5 μL de EDC (500mM) a 1 mL de estas AuNPs-COOH. Tras incubar durante 2 horas, se realizan lavados con agua ultrapura, y, se lavan en PB (del inglés *Phosphate-Buffered*) + Tween 0.1%. Una vez resuspendidas en PB, se caracterizan, obteniendo una concentración de 5.13×10^9 NPs/μL.

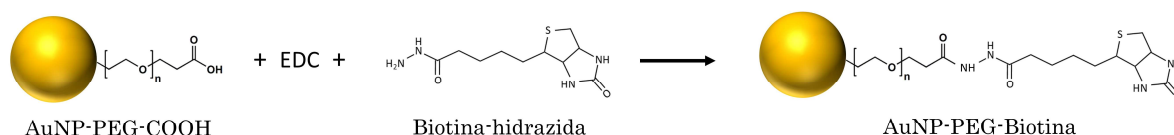


Figura 105. Biofuncionalización de AuNPs con Biotina-Hidrazida.

4.2.3.4. Estudio de especificidad de AuNPs con biotina por STV

Se inmovilizan 1.5 μL de la proteína STV a 250 $\mu\text{g/mL}$ en kits con 65 biosensores interferométricos con superficie de SU-8 durante 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$; paralelamente, se inmoviliza BSA como control negativo. A continuación, se incuban diferentes concentraciones de AuNPs sobre estos kits durante 4, 8 y 16 horas; a su vez, la mayor concentración de nanopartículas utilizada se incubó sobre la proteína BSA. Una vez obtenidas las medidas interferométricas se normalizan con el valor del control negativo (Figura 106).

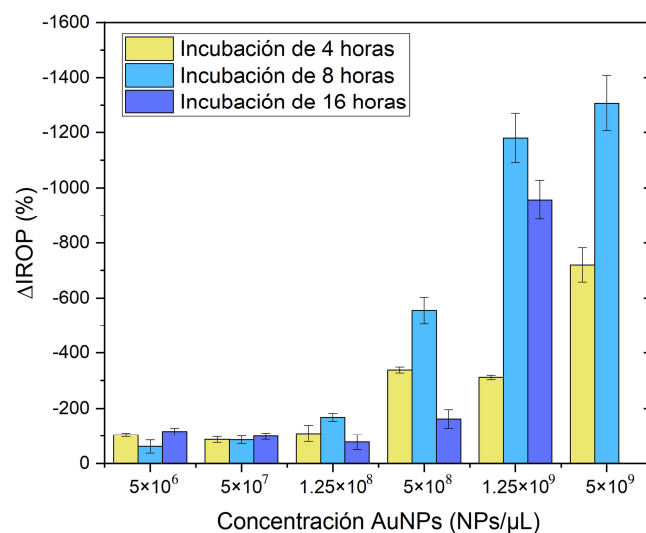


Figura 106. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con biotina sobre STV.

En el caso de la incubación de 16 horas, se observa en el chip que las gotas a la máxima concentración están evaporadas, por lo que se descartan incubaciones tan prolongadas con las AuNPs, por lo que se reduce el tiempo de incubación (Figura 107).



Figura 107. Imagen de un kit de diagnóstico en el que se están incubando diferentes concentraciones de AuNPs durante 4 horas, no existe evaporación.

Se incuban 40 mL de estas nanopartículas con 4.5 mg de PEG-COOH. Las cuales fueron lavadas y caracterizadas, obteniendo una concentración de 8.07×10^9 NPs/ μ L. Se añade 1 mL de MES 200 mM, 75 μ L de hidrazida-Biotina en DMSO, y 37.5 μ L de EDC (500mM) a 1 mL de AuNPs-COOH a 8.07×10^9 NPs/ μ L. Tras incubar durante 2 horas, se realizan lavados con agua ultrapura, y seguidamente se lava en PB + Tween 0.1%. Después de su caracterización se obtiene una concentración de 1.6×10^{10} NPs/ μ L.

Se inmovilizan 1.5 μ L de la proteína STV a 250 μ g/mL en kits con 65 biosensores interferométricos con superficie de SU-8 durante 2 horas a 37 °C; en paralelo, se inmoviliza BSA como control negativo. A continuación, se incuban diferentes concentraciones de AuNPs sobre estos kits durante 2, 4, 6 y 8 horas; asimismo, la mayor concentración de nanopartículas utilizada se incubó sobre la proteína BSA. Posteriormente se normalizan las medidas interferométricas obtenidas con el valor del control negativo (Figuras 108 y 109).

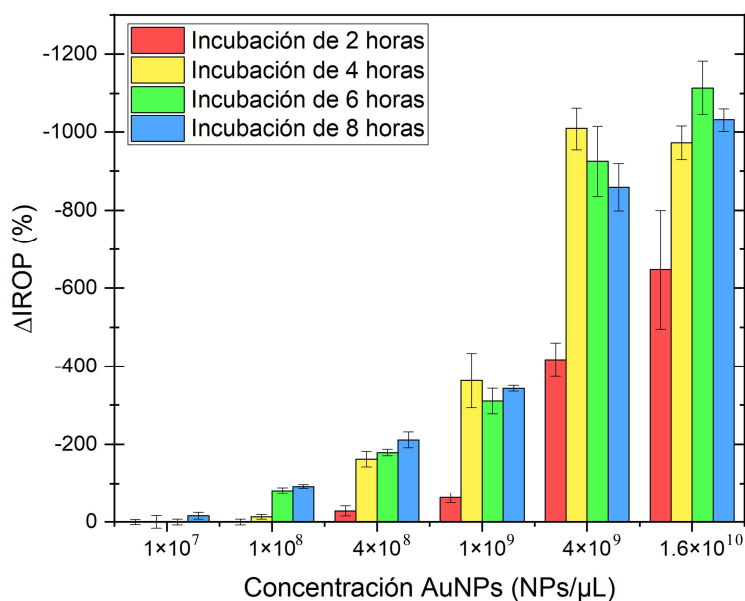


Figura 108. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con biotina sobre STV.

Se observa que a partir de las 4 horas las curvas son muy similares (Figuras 108), esto puede deberse a alcanzar el equilibrio en la unión biotina-STV. Además, la saturación de la curva se alcanza a 4×10^9 NPs/μL en las incubaciones a 4, 6 y 8 horas (Figuras 109).

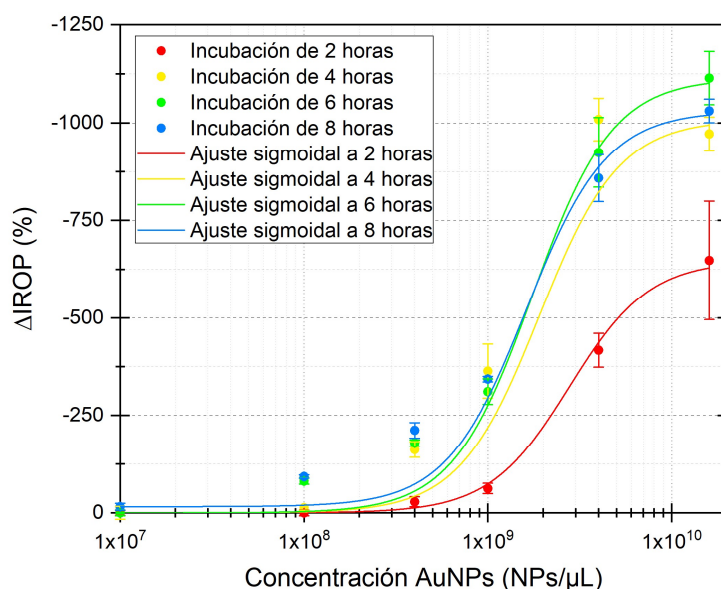


Figura 109. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con biotina sobre STV. Se realizan ajustes sigmoidales ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99702 en el ajuste de la curva de 2 horas (en rojo), de 0.93383 en el ajuste de la curva de 4 horas (en amarillo), de 0.97924 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).

Puesto que no se observan diferencias a partir de las 4 horas se realiza el mismo ensayo, pero durante 3 horas, además de incubar también durante 2 horas.

Para ello, se inmoviliza la proteína STV (1.5 μL a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en kits de 65 celdas con biosensores interferométricos con superficie SU-8 durante 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$; paralelamente, se inmoviliza BSA como control negativo. A continuación, se incuban diferentes concentraciones de AuNPs sobre estos kits durante 2 horas y 3 horas; a su vez, la mayor concentración de nanopartículas utilizada se incuba sobre la proteína BSA. Una vez obtenidas las medidas interferométricas se normalizan con el control negativo (Figura 110).

En la Figura 111 se confirma que, al igual que se aprecia en la Figura 109, la saturación de la curva se alcanza a 4×10^9 NPs/ μL en el caso de la incubación durante 3 horas. Nuevamente, no se alcanza saturación a las 2 horas.

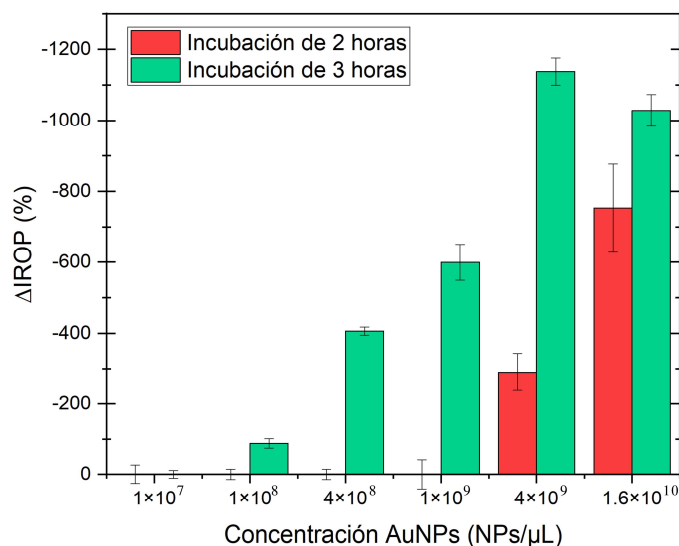


Figura 110. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con biotina sobre STV.

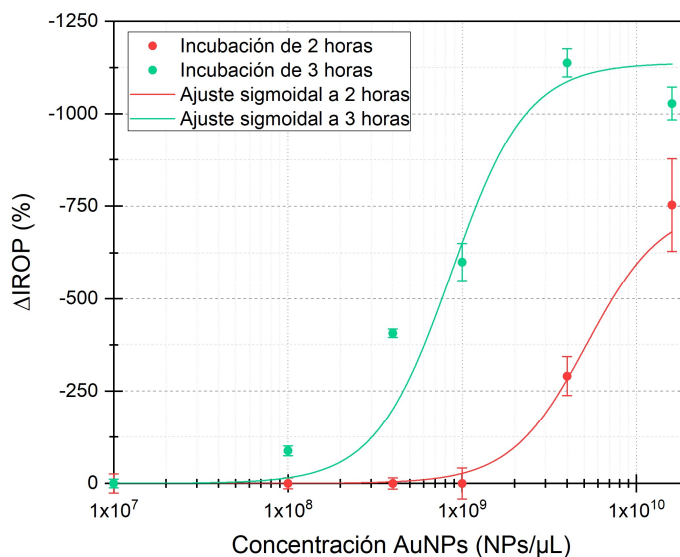


Figura 111. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con biotina sobre STV. Se realizan ajustes sigmoideales ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.9874 en el ajuste de la curva de 2 horas (en rojo), y de 0.94254 en el ajuste de la curva de 3 horas (en verde oscuro).

En último término, una vez se confirma que las nanopartículas con grupos biotina reconocen de forma específica a la estreptavidina inmovilizada, se realiza un ensayo que consiste en inmovilizar STV a distintas concentraciones en un kit de diagnóstico de 65 celdas durante 2 horas a 37 °C, para reconocer con una misma concentración de AuNPs en cada celda, concretamente, 1.5 μL de AuNPs a una concentración 2×10^9 NPs/μL, usando como control negativo BSA. Una vez obtenidas las señales, se normalizan con el valor del control negativo (Figura 112).

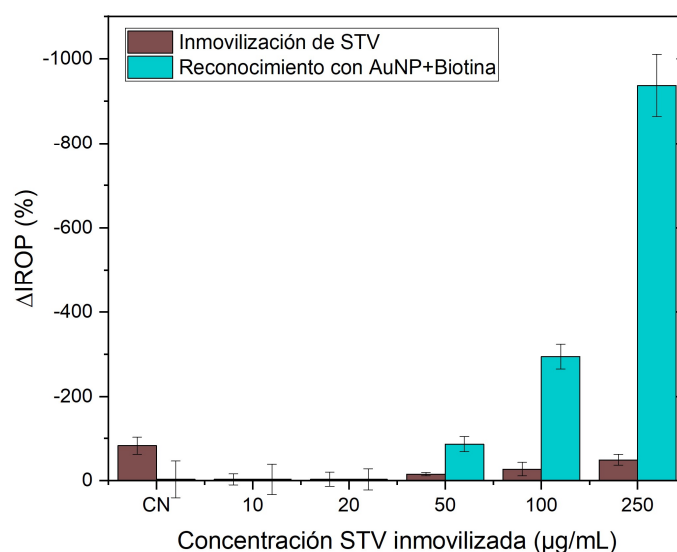


Figura 112. Ensayo de amplificación de la señal de distintas concentraciones de STV mediante el empleo de AuNPs.

Se observa que, mediante el uso de nanopartículas, las señales obtenidas de las celdas interferométricas aumentan, por lo que permiten amplificar la señal.

4.2.3.5. Ensayo competitivo con AuNPs con biotina y STV

A continuación, se realiza de un ensayo competitivo, para el cual se tapiza todo un kit de 65 celdas con STV a $250 \mu\text{g/mL}$. Al mismo tiempo, se incuban $10 \mu\text{L}$ de AuNPs a $2 \times 10^9 \text{ NPs}/\mu\text{L}$ durante 30 min con diferentes concentraciones de STV: 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 1×10^{-1} , 1, 1×10 , 1×10^2 y $1 \times 10^3 \text{ ng/mL}$.

Se trata de una primera aproximación para realizar el ensayo competitivo posterior para detectar biomarcadores. En la Figura 113 se puede apreciar que, en caso de emplear $1 \times 10^3 \text{ ng/mL}$ de STV, no se obtiene señal debido a que no quedan sitios libres, ya que las nanopartículas quedan totalmente tapizadas.

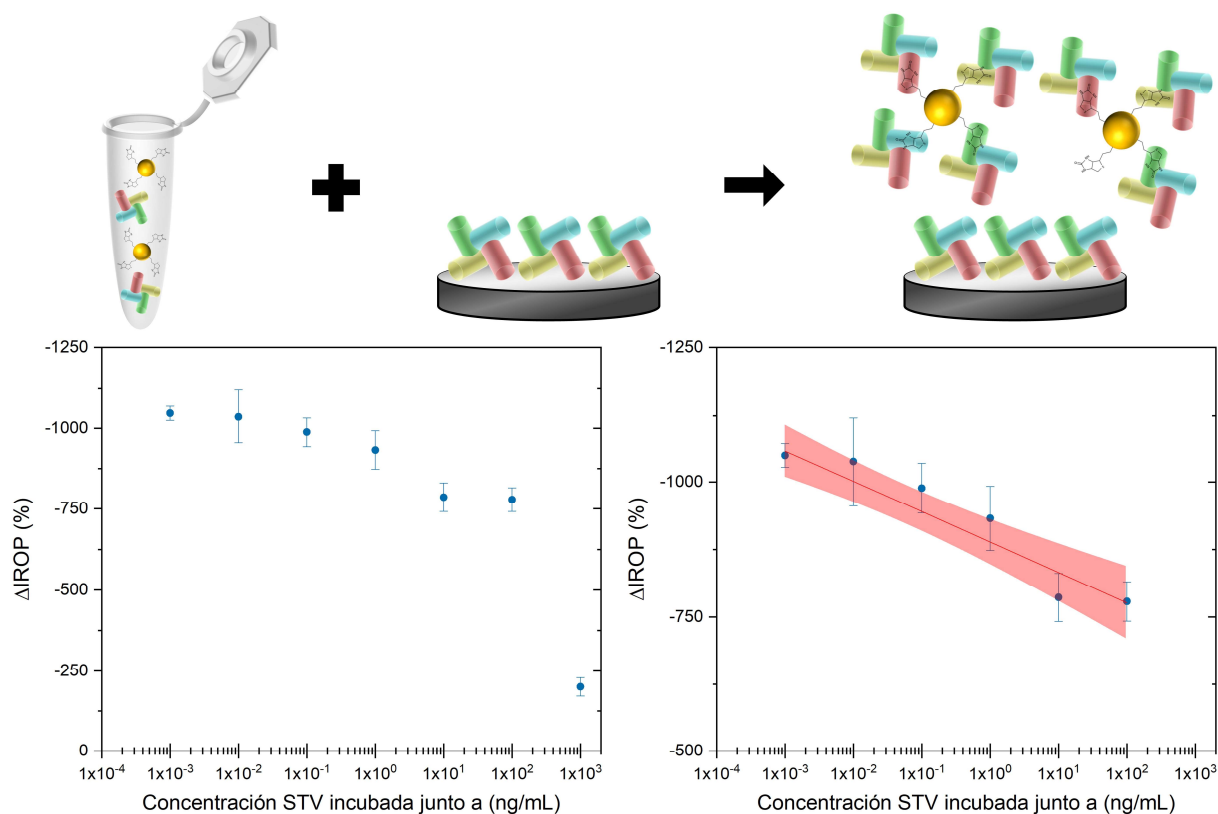


Figura 113. Ensayo competitivo para la detección de STV. En rojo se señala la banda de confianza.

Para asegurar que se han empleado las STV necesarias para tapizar por completo la superficie de las AuNPs se calculan cuántas moléculas hay en 1 mL de STV a $1 \times 10^3 \text{ ng/mL}$ basta con multiplicar el número de gramos ($1 \times 10^{-6} \text{ g}$) por el número de Avogadro (6.022×10^{23}) y dividir por la masa molecular. Con este cálculo se

obtienen 1×10^{13} moléculas totales de STV en el caso en el que se obtiene señal baja (1×10^3 ng/mL).

Por otro lado, para conocer cuántas moléculas de STV son suficientes para tapizar completamente la superficie de 2×10^9 NPs/ μ L de AuNPs en 10 μ L, se calcula el número total de AuNPs a 2×10^9 NPs/ μ L en 10 μ L, que son 2×10^{10} NPs. Estas AuNPs presentan un diámetro de 50 nm tras la unión de SH-PEG-COOH, conociendo el radio se puede calcular la superficie de una esfera ($4\pi r^2$), por lo que estas NPs tendrían una superficie total de 1.6×10^{14} nm². La STV es una proteína de 60 kDa con un tamaño de 5 nm aproximadamente, por lo que supondría una superficie ocupada en la esfera de 19.64 nm². Por ello, la cantidad de STV necesaria para tapizar por completo todas las AuNPs es de 8×10^{12} , por lo que se utilizaron 1×10^{13} moléculas totales de STV, las AuNPs se encontraban tapizadas completamente (Tabla 12).

Nº de NPs	Diámetro (nm)	Superficie total de NPs (nm ²)	Diámetro de STV (nm)	Superficie que ocupa la STV (nm ²)	STV necesario para tapizar las NPs
2×10^{10}	50	1.6×10^{14}	5	19.64	8×10^{12}

Tabla 12: Cálculo del número de moléculas de STV necesarias para tapizar las AuNPs.

Como se explica a lo largo de esta sección, se sintetizan nanopartículas, que pueden ser funcionalizadas con un grupo PEG con un carboxilo terminal. Esto permite unir moléculas a estas nanopartículas gracias a la química del EDC. Asimismo, se concluye que estas nanopartículas permiten amplificar las señales obtenidas mediante el kit de diagnóstico, el cual es empleado en el siguiente apartado para la detección de un biomarcador de la enfermedad de Alzheimer.

4.2.3.6. Evaluación de la inmovilización de la proteína Lactoferrina

El próximo objetivo es detectar un biomarcador de la EA con las nanopartículas de oro. Para este propósito se realizan dos tipos de ensayo basados en la activación de grupos carboxilo mediante EDC, por un lado, unir proteína G, y, por otro lado, unir Estreptavidina.

El primer paso es realizar un ensayo para hallar a qué concentración se debe inmovilizar la proteína Lactoferrina para su detección con nanopartículas de oro. Para ello se incuban concentraciones crecientes de esta proteína sobre los kits de 65 celdas mencionados anteriormente, empleando 1.5 μ L por celda, en un total de

8 celdas por condición. La incubación se realiza durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda.

Como se puede observar en la Figura 114, la concentración a la que la Lactoferrina satura el sensor es 50 $\mu\text{g/mL}$, por lo que es la concentración empleada en los kits sobre los que más adelante se prueba la especificidad de las nanopartículas de oro a las que se les ha unido anti-Lactoferrina (anti-LF).

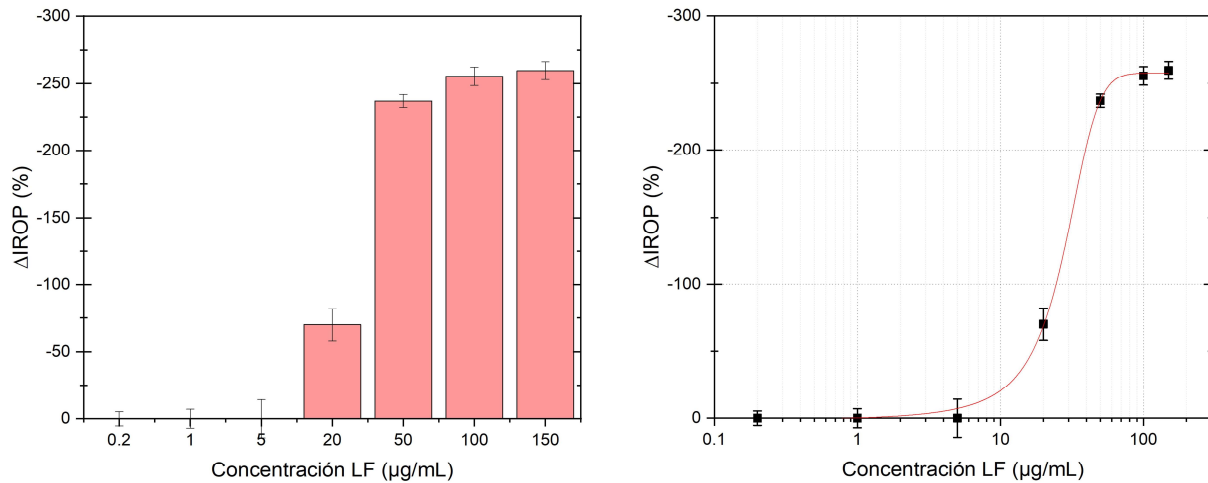


Figura 114. Incubación de Lactoferrina. Se realiza un ajuste sigmoïdal ("Boltzman fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99978 en el ajuste de la curva (en rojo).

Seguidamente, se tapiza por completo un kit de 65 celdas con Lactoferrina a 50 $\mu\text{g/mL}$ durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda, para después reconocer con el anticuerpo a emplear en el ensayo posterior con nanopartículas de oro (anti-LF). Se emplean concentraciones crecientes de este anticuerpo en 8 celdas por condición y se incuban durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda. La saturación de la curva se alcanza a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 115).

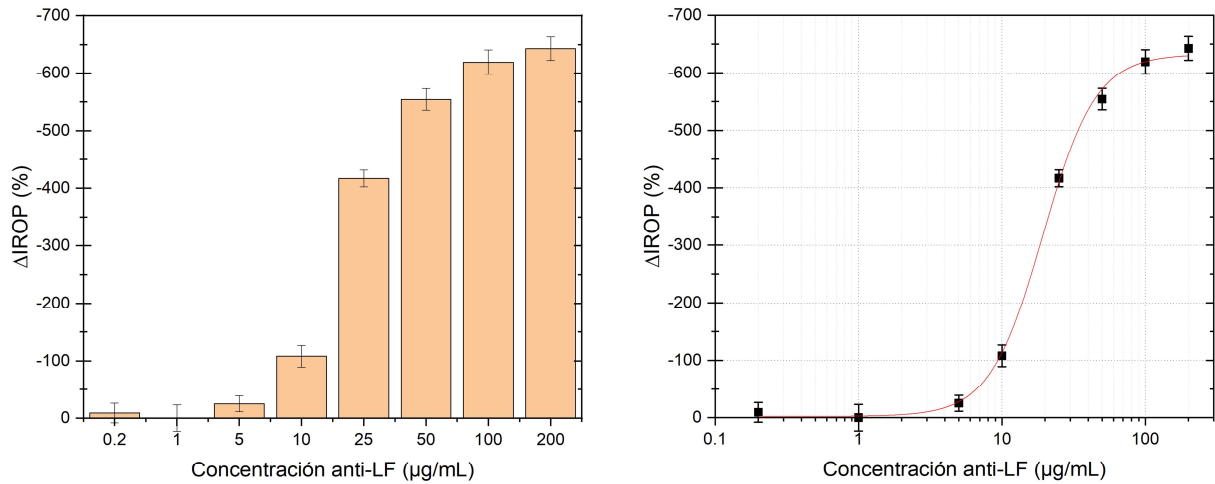


Figura 115. Ensayo de reconocimiento de Lactoferrina. Se realiza un ajuste sigmoial ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99898 en el ajuste de la curva (en rojo).

Finalmente, como el objetivo es detectar la proteína LF, se realiza un ensayo donde se tapiza un kit de 65 celdas por completo con anti-LF a 50 $\mu g/mL$ durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda, para después reconocer diferentes concentraciones de Lactoferrina, empleando 8 celdas por condición, incubándose durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda. Podemos observar que la saturación de la curva se alcanza a 50 μL en la Figura 116.

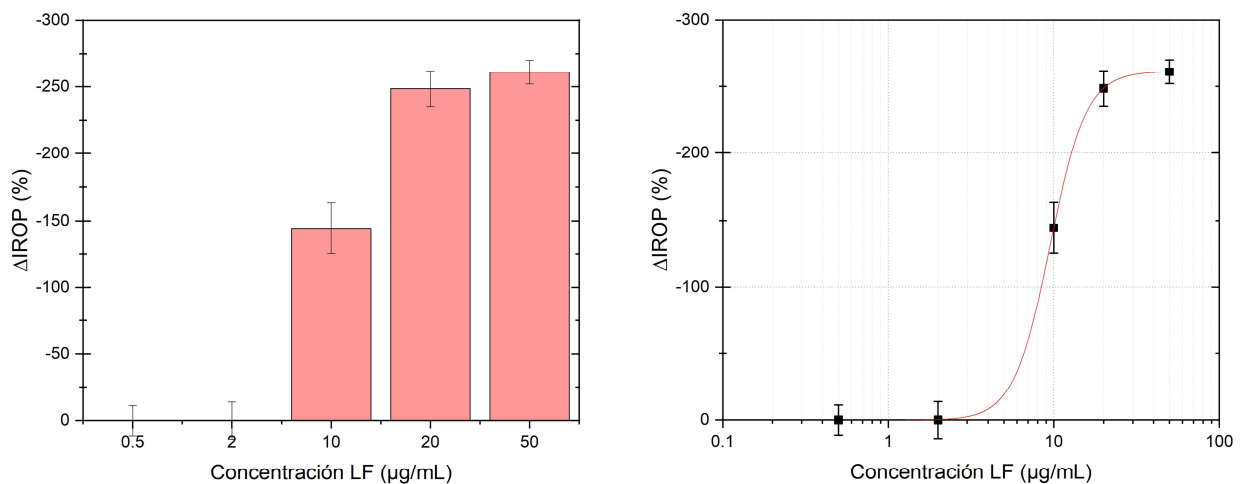


Figura 116. Curva de reconocimiento de Lactoferrina por parte del anticuerpo anti-LF que tapiza el kit de diagnóstico. Se realiza un ajuste sigmoial ("Hill1 fit") mediante el software Origin, obteniendo un R^2 de 0.99999 en el ajuste de la curva (en rojo).

4.2.3.7. Funcionalización de nanopartículas de oro con proteína G

A continuación, se utilizan una misma población de nanopartículas de 22 nm de diámetro con una concentración de 1.17×10^9 NPs/ μ L. Se incuban 125 mL de estas nanopartículas con 13 mg de SH-PEG-COOH. Posteriormente se lavan y se caracterizan, obteniendo una concentración de 4.25×10^9 NPs/ μ L.

A 1 mL de estas AuNPs-COOH se les añade 25 μ L de EDC a 500mM, además de 800 μ L de proteína G a 1 mg/mL. Se añade la proteína G por exceso, ya que para tapizar por completo la superficie de las nanopartículas se necesitarían 200 μ L. A su vez, se emplea 1 mL de esta población sobre la que se añade 25 μ L de EDC (500mM) y 400 μ L de Estreptavidina (1mg/mL), siendo necesarios 134 μ L de STV, debido a que su tamaño es mayor, en el caso de la proteína G es de 35 kDa y la STV es de 52 kDa.

Tras ser lavadas, se analizan en el DLS y por espectrofotometría ultravioleta-visible (Tabla 13), obteniendo las siguientes concentraciones: 2.16×10^{10} NPs/ μ L aquellas NPs unidas a PG y 3.11×10^{10} NPs/ μ L aquellas unidas STV. Seguidamente, se añade en exceso un anticuerpo anti-Lactoferrina (que en el caso de la nanopartícula con Estreptavidina el anticuerpo se encuentra biotinilado), concretamente, se incuban el triple de anticuerpo necesario para cubrir la superficie de 20 μ L de AuNPs.

Población	d_H (nm)	Índice de polidispersidad
AuNPs	22.59 ± 0.36	0.11 ± 0.01
AuNPs + PEG-COOH	41.14 ± 0.77	0.15 ± 0.01
AuNPs + PEG + STV	40.47 ± 0.58	0.26 ± 0.02
AuNPs + PEG + STV + anti-LF	39.51 ± 0.30	0.27 ± 0.01
AuNPs + PEG + PG	39.86 ± 1.50	0.23 ± 0.01
AuNPs + PEG + PG + anti-LF	41.10 ± 0.21	0.22 ± 0.01

Tabla 13. Caracterización durante el proceso de biofuncionalización de AuNPs.

Una vez lavadas y medidas en el DLS ambas poblaciones de AuNPs con anti-LF, se depositan en un kit de celdas tapizado con Lactoferrina a concentraciones crecientes.

El resultado de esta primera aproximación se muestra en la Figura 117, observando que existe una unión específica en el caso de las AuNPs con proteína G y anti-LF; en cambio, en el ensayo con Estreptavidina no se observa dicha unión específica. En base a estos resultados, se decide optimizar el protocolo de unión de proteína G a las AuNPs para poder anclar anticuerpos a esta.

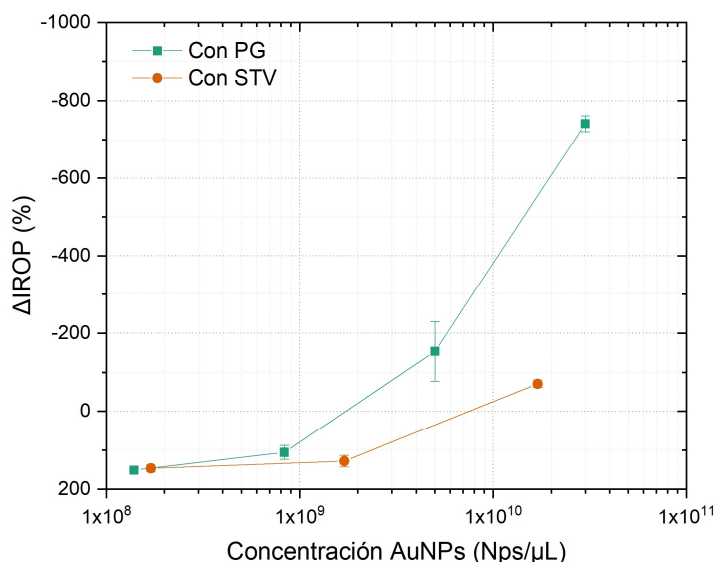


Figura 117. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF.

Nuevamente, se realiza un ensayo utilizando **las AuNPs con PG y anti-LF** para comprobar y confirmar la **especificidad** (Figura 118). En un kit de 65 celdas tapizado con Lactoferrina se incuban AuNPs a distintas concentraciones durante 2 y 3 horas.

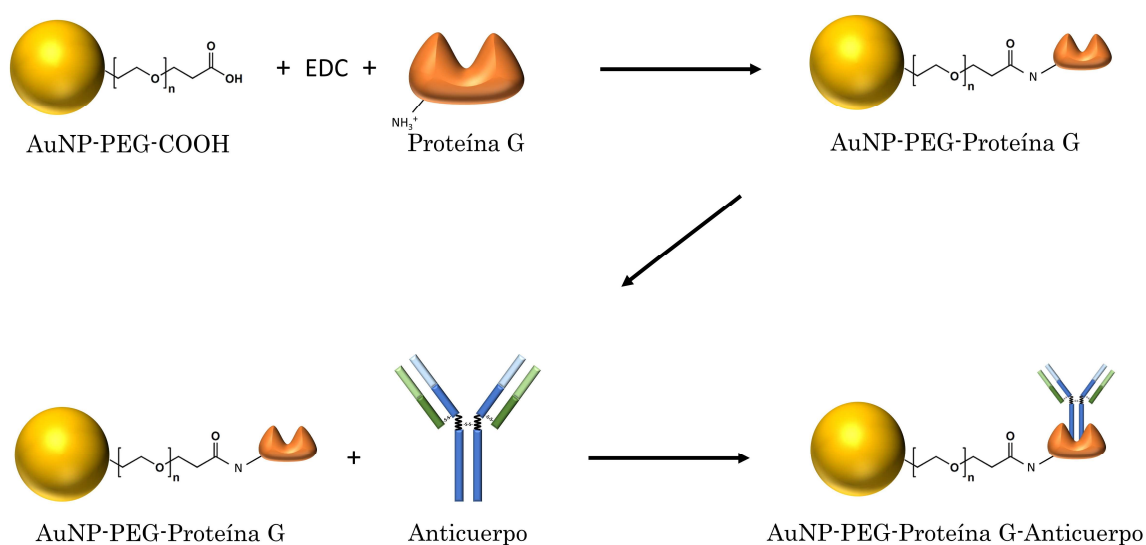


Figura 118. Biofuncionalización de AuNPs con proteína G, y unión de un anticuerpo a estas nanopartículas.

Como se observa en la Figura 119, a medida que aumenta la concentración de nanopartículas aumenta la señal específica. Sin embargo, se considera mejorable, ya que **no se aprecian diferencias entre los tiempos de incubación**; esta diferencia sí se observa en el caso de AuNPs con biotina.

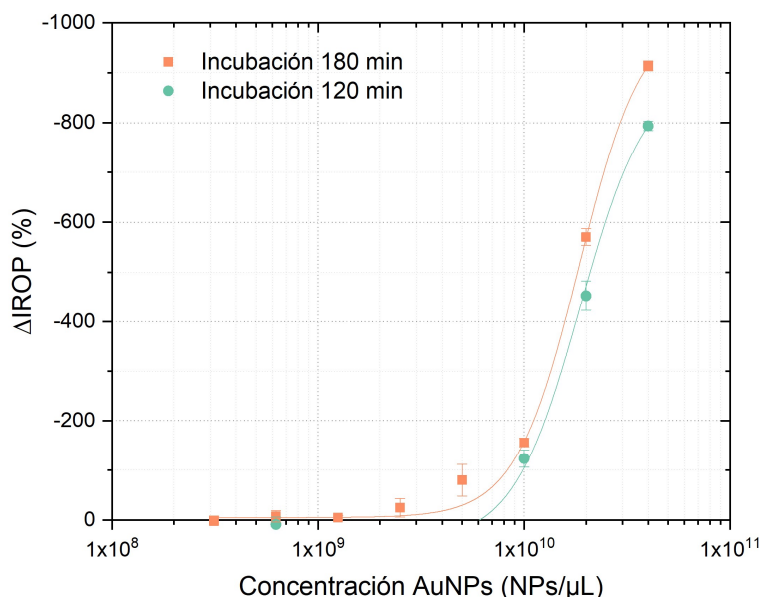


Figura 119. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF.

4.2.3.8. Estudio de especificidad de AuNPs con anti-LF por Lactoferrina

El primer paso en el proceso de optimización de la biofuncionalización de AuNPs para la detección de LF es cambiar la población de nanopartículas empleadas, es decir, se sintetizan **AuNPs con un mayor tamaño**. La finalidad de emplear una población mayor es poder alcanzar valores más altos en la señal de Δ IROP.

Esta población de nanopartículas presenta 25 nm de diámetro (Figura 120) y una concentración de 4.39×10^9 NPs/ μ L. Se incuban 40 mL de estas nanopartículas con 4.5 mg de PEG-COOH. Seguidamente, las AuNPs obtenidas se lavan y caracterizan, obteniendo una concentración de 8.07×10^9 NPs/ μ L.

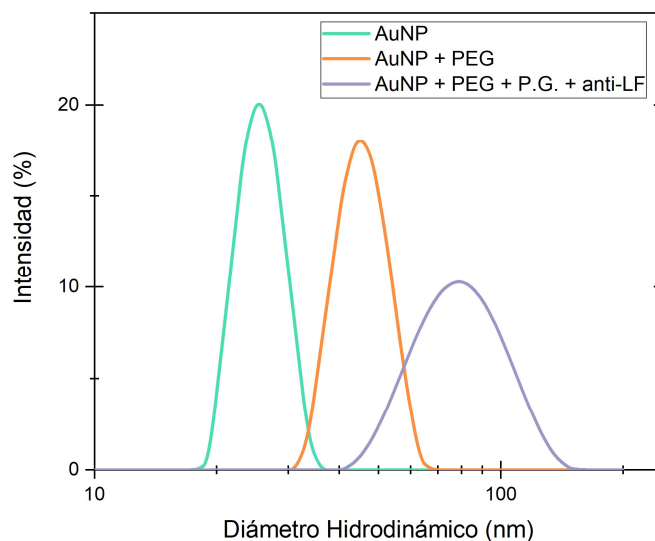


Figura 120. Distribución de tamaños observada por el DLS durante la biofuncionalización de AuNPs (adapta de Valle et al., 2023).

Se añaden 25 μL de EDC (500mM), además de 1200 μL de proteína G (1 mg/mL), a 1.5 mL de estas AuNPs-COOH. Esta cantidad de PG se debe a que, como se explica previamente, la proteína G se añade en exceso, y para tapizar por completo la superficie de las nanopartículas se necesitarían 900 μL .

Tras los lavados se analizan en el DLS y por espectrofotometría ultravioleta-visible (Tabla 14), obteniendo una concentración de 4.5×10^{10} NPs/ μL . Finalmente, se añade anti-LF no biotinilada en exceso.

	d_H (nm)	Grado de Polidispersidad	Potencial Zeta (mV)
AuNP	24.65 ± 0.95	0.119 ± 0.017	-32.95 ± 2.83
AuNP + PEG	49.20 ± 1.15	0.182 ± 0.013	-43.22 ± 1.51
AuNP + PEG + P.G.	44.30 ± 1.48	0.206 ± 0.014	-9.05 ± 3.15
AuNP + PEG + P.G. + anti-LF	76.83 ± 1.36	0.322 ± 0.049	-27.43 ± 3.58

Tabla 14. Caracterización durante el proceso de biofuncionalización de AuNPs (adapta de Valle et al., 2023).

Cabe señalar que el proceso de lavado no muestra un buen rendimiento, puesto que al centrifugar las AuNPs con anticuerpo (y por tanto mayor tamaño) parte de estas se aglomeraban, por lo que no se recuperan en su totalidad (Figura 121).



Figura 121. Nanopartículas aglomeradas durante una centrifugación.

Una vez caracterizadas estas nuevas AuNPs, se procede a realizar un nuevo ensayo de reconocimiento directo. Para ello, se inmoviliza la proteína Lactoferrina en kits con 65 biosensores interferométricos con superficie SU-8 durante 2 horas, y también se inmoviliza BSA como control negativo. A continuación, se incuban diferentes concentraciones de AuNPs sobre estos kits durante 45, 90 y 180 min; asimismo, la mayor concentración de nanopartículas utilizada se incuba sobre la proteína BSA. A continuación, se normalizan las medidas interferométricas con el valor del control negativo (Figuras 122 y 123).

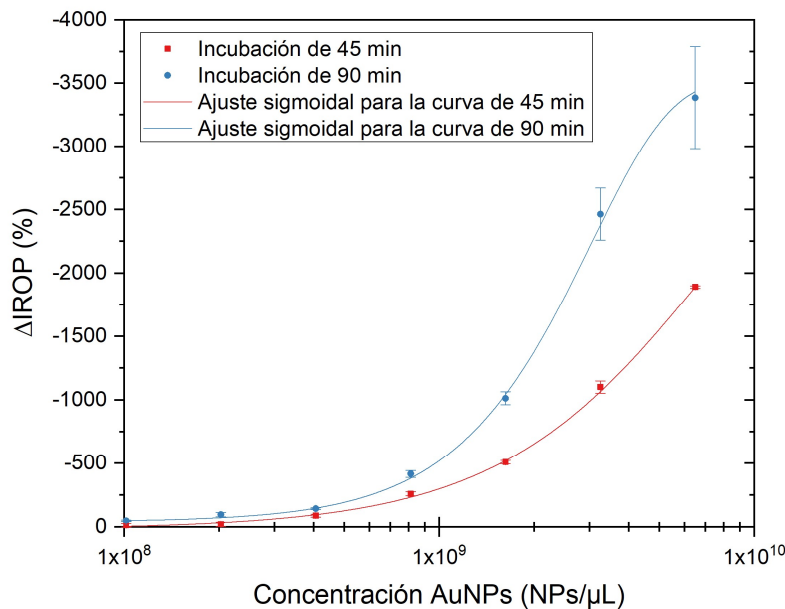


Figura 122. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF. Se realizan ajustes sigmoidales ("Logistic fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99977 en el ajuste de la curva de 45 min (en rojo), y de 0.99405 en el ajuste de la curva de 90 min (en azul) (adapta de Valle et al., 2023).

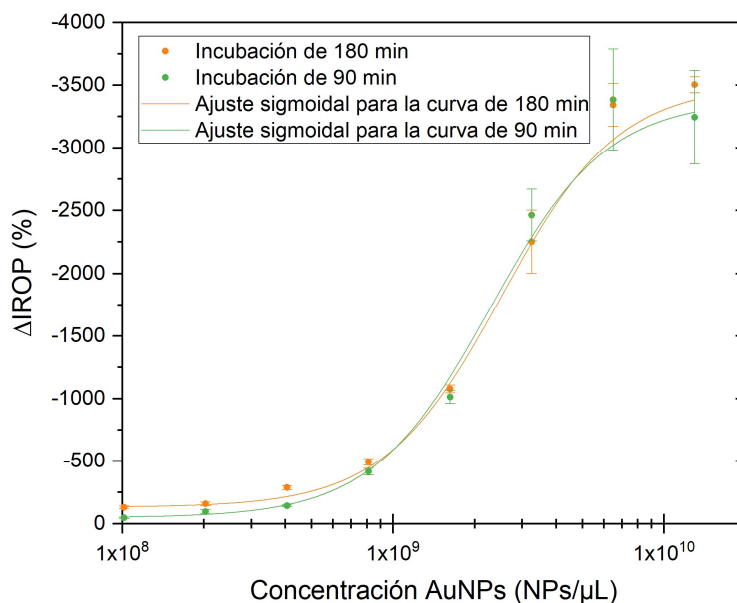


Figura 123. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF.

Una vez más, en la Figura 123 no se aprecian diferencias entre la incubación durante 90 minutos y la incubación durante 3 horas. Por el contrario, en la Figura 122 se puede observar que sí existen diferencias entre la incubación a 90 minutos y la incubación a 45 minutos. Además, esta figura muestra que la saturación de la curva se alcanza a una concentración de 6×10^9 NPs/ μ L a los 90 min. Dicha concentración es utilizada en los ensayos posteriores para calcular el límite de detección.

A continuación, mediante SEM se toman imágenes de los kits de diagnóstico empleados para obtener las señales de la Figura 122. Para ello se analiza una celda para cada concentración de AuNPs empleada.

Como se explica en la sección 3.2.3.1., mediante el uso del software ImageJ, se realiza un modelado 3D de la superficie observada por el SEM (Figura 124), con el objetivo de verificar que las señales obtenidas por el MOX se corresponden con el tapizado de la celda por las AuNPs.

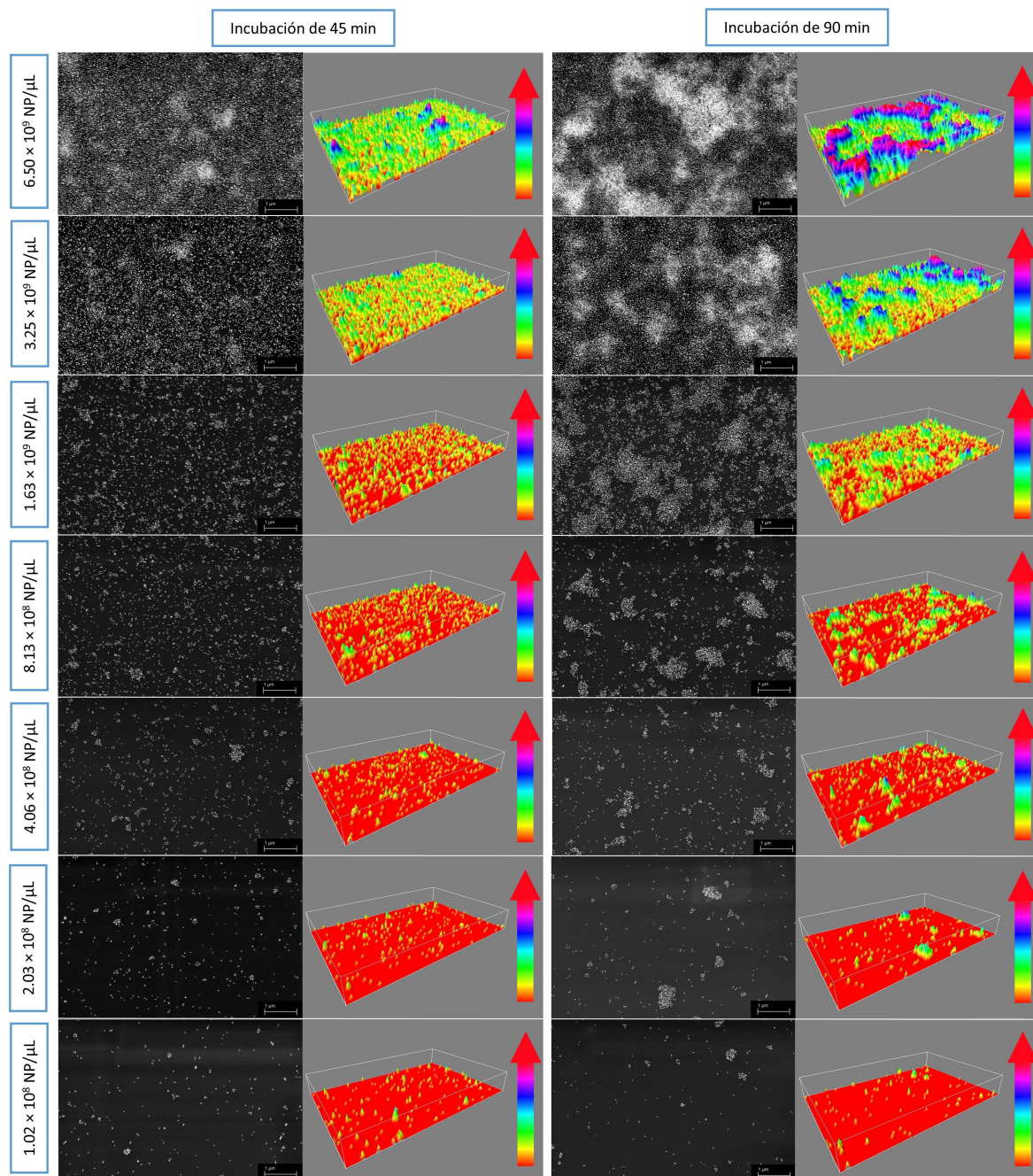


Figura 124. Imágenes del reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF (adapta de Valle et al., 2023).

Gracias al ImageJ se mide la fracción de área blanca (%) en cada imagen, y se representa en la figura 125 a la izquierda, en esta también se muestran los valores de señales obtenidos mediante IODM. La correlación entre las señales del MOX y el porcentaje de área tapizada se puede observar en la Figura 125 a la derecha.

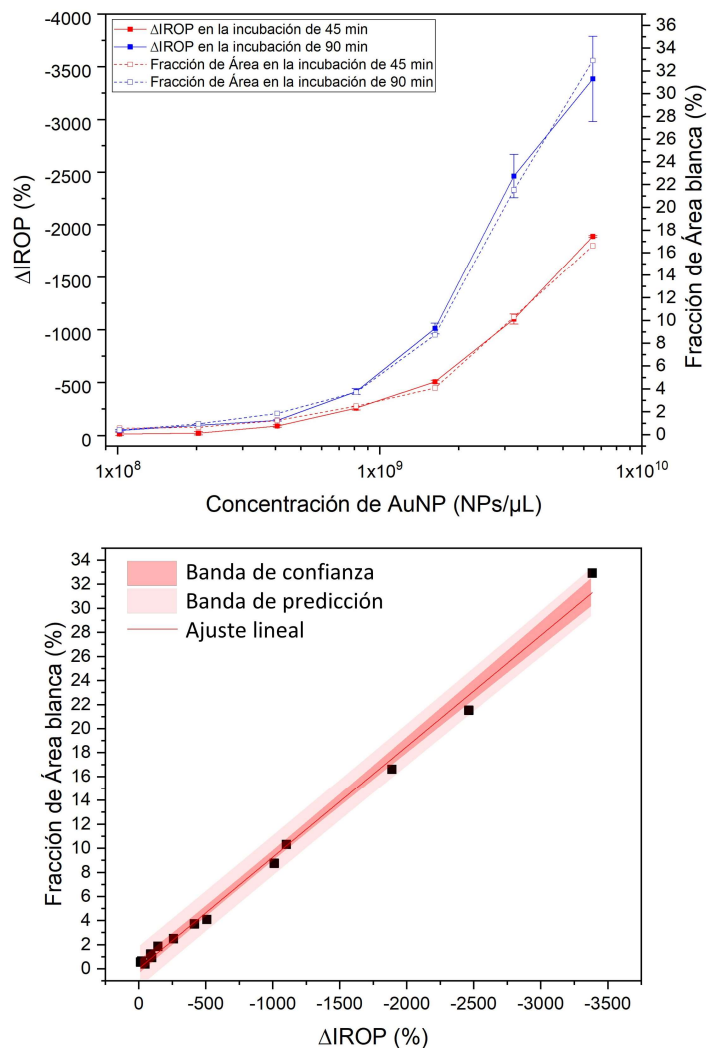


Figura 125. Comparación y correlación del análisis de las imágenes con la señal obtenida mediante interferometría. Se realiza un ajuste lineal utilizando Origin, obteniendo un R^2 de 0.99472 (adapta de Valle et al., 2023).

Por primera vez se reporta una relación entre las señales obtenidas mediante IODM y lo observado mediante SEM en un ensayo de reconocimiento directo gracias al empleo de nanopartículas con anticuerpos específicos en su superficie.

4.2.3.9. Cálculo del LoD de Lactoferrina en un ensayo tipo Sándwich

Para calcular el límite de detección obtenido mediante el empleo de AuNPs, se realiza un ensayo tipo Sándwich. Para ello, previamente se realiza un ensayo en el que se tapiza un kit de 65 celdas con diferentes concentraciones de Lactoferrina, sobre las cuales se reconoce con una misma concentración de AuNPs con anti-Lactoferrina (Figura 126). La concentración seleccionada de AuNPs es de 5×10^9 NPs/ μL , ya que en los ensayos anteriores a dicha concentración se obtiene una señal suficientemente alta para incubaciones de 90 min.

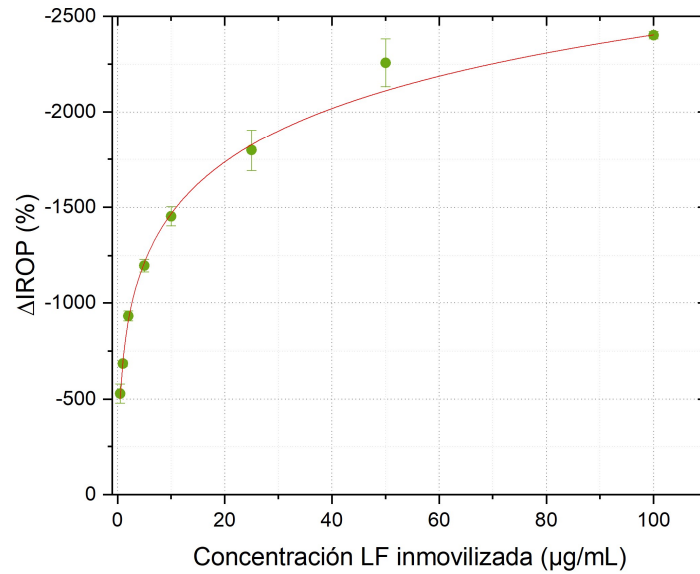


Figura 126. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF.

Este ensayo permite determinar qué ordenes de magnitud se deben emplear en el ensayo tipo Sándwich. Dado que posteriormente se correlaciona con ELISA, no se emplea concentración, sino cantidad (ng) empleada de proteína, ya que en la técnica ELISA se usan volúmenes 100 veces más altos que los empleados en los kits de diagnóstico. En la Figura 127 puede observarse que la LF a una concentración de 0.5 μg/mL presenta una señal similar a la obtenida con 1 μg/mL, puesto que en la incubación se emplean 1.5 μL, esto equivale a 0.75 ng. Por otro lado, la saturación parece alcanzarse a 50 μg/mL, lo que equivale a 75 ng.

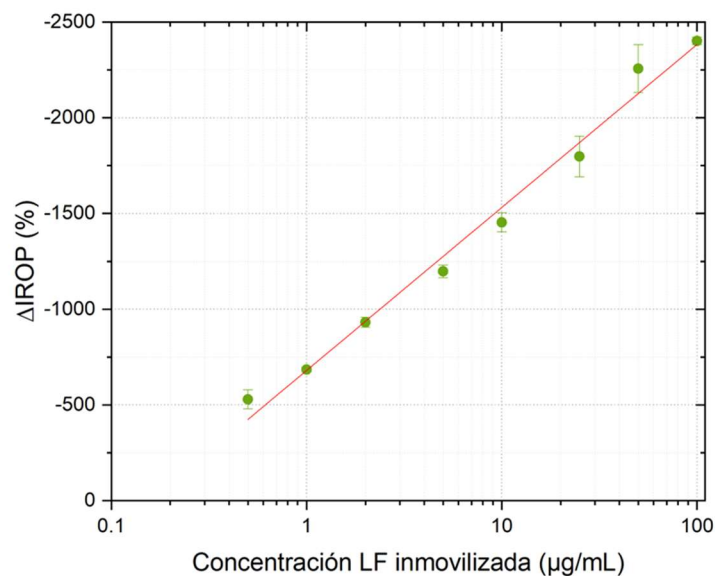


Figura 127. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-LF sobre LF.

Como se indica previamente, el siguiente ensayo para calcular el límite de detección de las AuNPs recubiertas de anticuerpos consiste en realizar un ensayo de reconocimiento Sándwich, que posteriormente se compara con un ensayo ELISA Sándwich.

Para ello, por un lado, cada pocillo de la placa ELISA se incuba con un anticuerpo anti-LF no biotinilado (150 ng en 100 μ L) a 4 °C durante 20 horas, y se bloquea la superficie con BSA a 37 °C durante 1 hora en movimiento. A continuación, se incuban diferentes cantidades de Lactoferrina en cada pocillo: 150, 75, 37.5, 15, 6, 1.5, 0.6, 0.15 y 0 ng 100 μ L, a 37 °C durante 2 horas. Seguidamente se incuban 150 ng en 100 μ L de anti-LF biotinilado a 37 °C durante 90 min en movimiento. Tras lo cual se incuban 375 ng en 100 μ L de estreptavidina-HRP a 37 °C durante 1 hora en movimiento en oscuridad. Finalmente, se revela con TMB durante 10 minutos a 25 °C en oscuridad, se detiene la reacción con 50 μ L de HCl 2N, y se recogen las señales de absorbancia a 450 nm.

Por el otro lado, en los kits de diagnóstico, se inmovilizan 1.5 μ L a 250 μ g/mL de STV a 4 °C durante 20 horas dentro de cada biosensor interferométrico. Tras lo cual, las celdas se incuban con 1.5 μ L a 100 μ g/mL de un anticuerpo anti-Lactoferrina biotinilado a 37 °C durante 2 horas. A continuación, se incuban 1.5 μ L de diferentes cantidades de Lactoferrina en cada celda: 150, 75, 37.5, 15, 6, 1.5, 0.6, 0.15 y 0 ng a 37 °C durante 2 horas. Para finalizar el ensayo tipo Sándwich, se emplean 1.5 μ L de AuNPs recubiertas con anti-LF a una concentración de 6×10^9 NPS/ μ L para amplificar la señal de lectura de los kits de diagnóstico, esta incubación se realiza a 37 °C durante 90 min.

En cuanto al ensayo Sándwich para la detección de Lactoferrina por IODM (Figura 128), se observa una señal de saturación de las AuNPs menor que en el reconocimiento de LF inmovilizada directamente en el kit. Una posibilidad de este descenso de señal puede ser debido a que en el ensayo tipo Sándwich se inmoviliza primero un anticuerpo, que capta LF, lo cual supone mucha menos superficie de unión de la LF. No sucede así en el caso del reconocimiento directo, ya que se puede recubrir toda la superficie de la celda. Este cambio en la señal de saturación se puede observar mediante imágenes SEM en la Figura 129 (Valle et al., 2023).

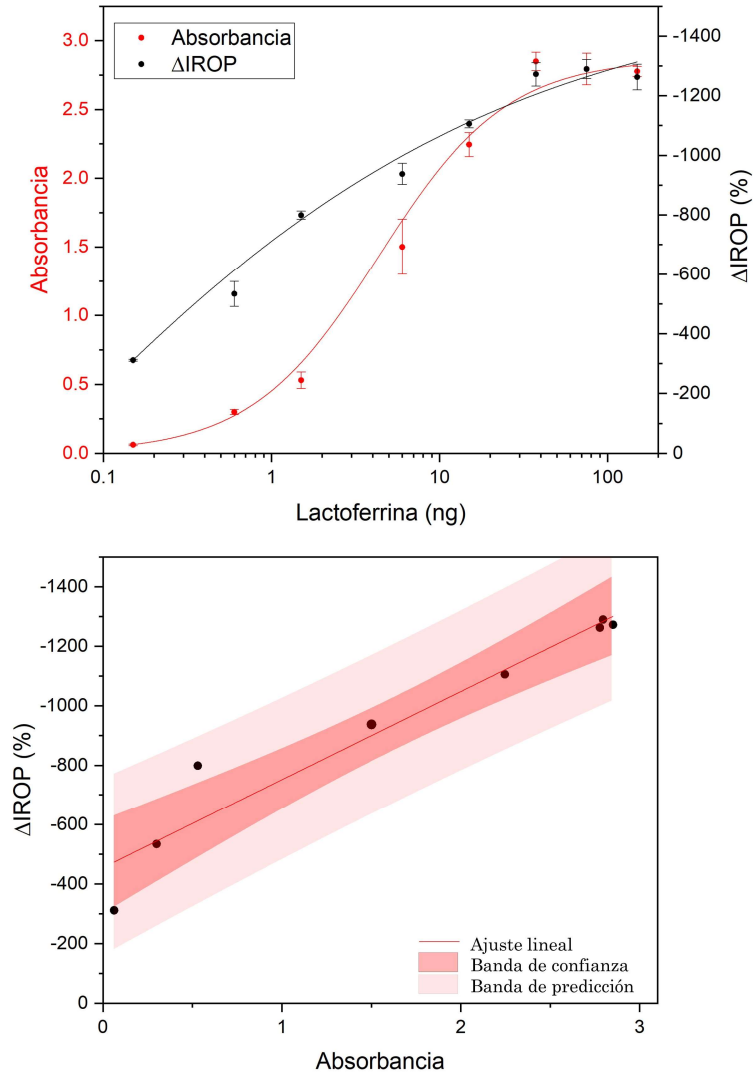


Figura 128. A la izquierda, ensayo tipo Sándwich de AuNPs con anti-LF sobre LF, se realizan ajustes sigmoïdales ("Hill1") utilizando Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99772 en el ajuste de la curva ELISA (en rojo), y de 0.99795 en el ajuste de la curva IODM (en negro). A la derecha, correlación entre los dos ensayos, se realiza un ajuste lineal utilizando Origin, obteniendo un R^2 de 0.93225 (adapta de Valle et al., 2023).

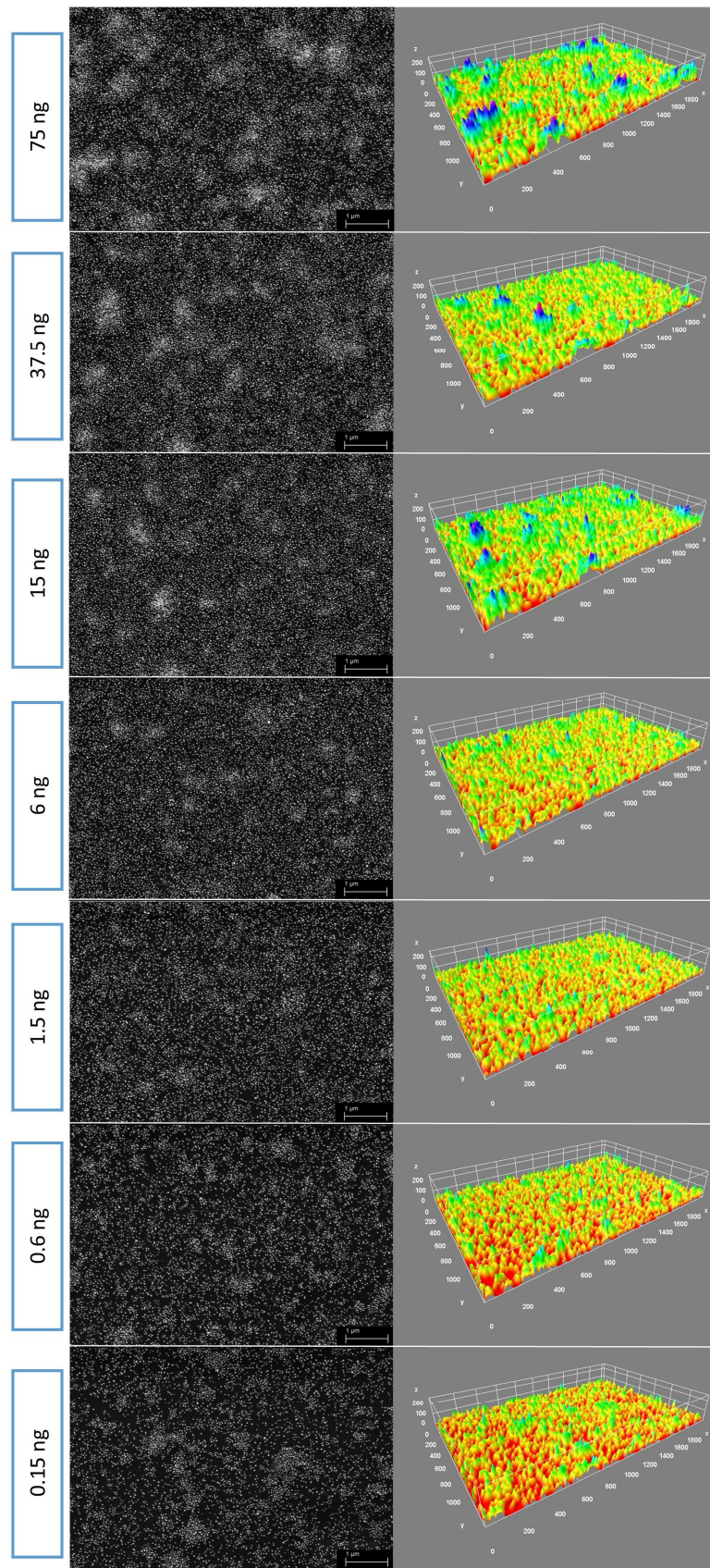


Figura 129. Imágenes del ensayo tipo Sándwich de AuNPs con anti-LF sobre LF (adapta de Valle et al., 2023).

Como se realiza en el ensayo directo, se obtiene la fracción de área blanca (%) de cada imagen del ensayo tipo Sándwich utilizando el ImageJ. Esta fracción, junto a los valores de señales obtenidos mediante IODM se representan en la Figura 130.

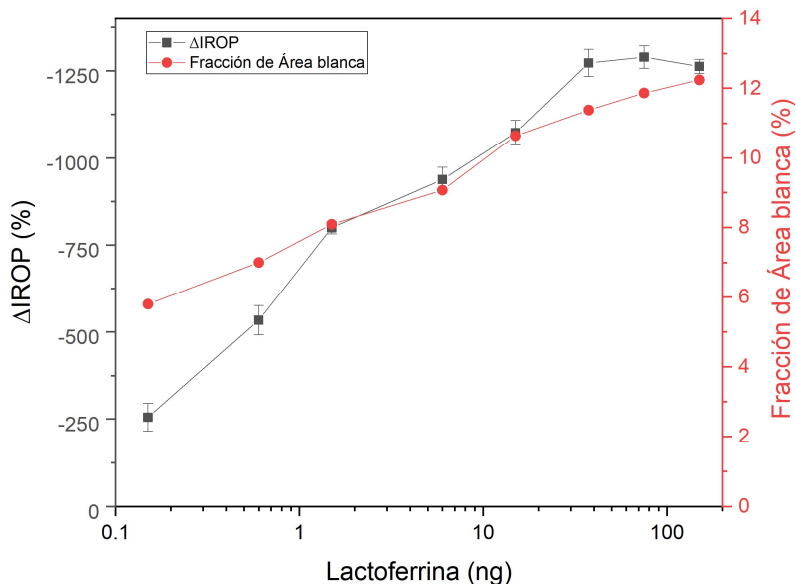


Figura 130. Comparación del análisis de las imágenes con la señal obtenida mediante interferometría.

En la Figura 128 se aprecia que la pendiente (“m”) obtenida mediante ELISA es más pronunciada que la obtenida por IODM, lo cual implica una mayor sensibilidad en ese rango. Para poder comparar con precisión la técnica ELISA y el método IODM, se utiliza el Límite de Detección (LoD). Para calcular el LoD se emplea la siguiente ecuación (De Vicente et al., 2020; Lavín et al., 2018):

$$LoD = \frac{U}{m}$$

En este sentido, “m” es la pendiente, y “U” representa la incertidumbre. Esta incertidumbre se calcula con un factor de cobertura de 3, tal como recomienda la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (Ellison & Williams, 2012; JCGM, 2008):

$$U = 3 u_t$$

Siendo “ u_t ” la incertidumbre estándar total, cuyo cuadrado se calcula como la suma cuadrática de las diferentes incertidumbres parciales, como recomienda la Guía para la expresión de la incertidumbre en la medición.

En estos ensayos en particular, la incertidumbre asociada a la resolución puede considerarse como despreciable en comparación con la incertidumbre estadística “ u_s ”, la cual se calcula:

$$u_t^2 = \sum_{i=1}^k u_i^2 \approx u_s^2 = \frac{S^2}{n}$$

En esta ecuación, “ S ” es la desviación típica del número de mediciones repetidas “ n ”. La incertidumbre estándar de medida es igual a la desviación estándar dividida por la raíz cuadrada del número de medidas repetidas realizadas durante los experimentos.

Los LoD obtenidos finalmente son 0.0237 ng y 0.1078 ng para IODM y ELISA respectivamente (Tabla 15) (Valle et al., 2023).

	<i>Número de medidas (n)</i>	<i>Incertidumbre (U)</i>	<i>Pendiente (m)</i>	<i>Rango dinámico (ng)</i>	<i>LoD (ng)</i>
IODM	7	9.3659	395.4508	0.15 - 37.5	0.0237
ELISA	3	0.1807	1.6772	1.5 - 37.5	0.1078

Tabla 15. Comparación entre las técnicas ELISA e IODM (adapta de Valle et al., 2023).

En conclusión, gracias al empleo de nanopartículas de oro que amplifican la señal obtenida en kits interferométricos se consigue mejorar la sensibilidad del biosensor. Concretamente, se detecta la Lactoferrina en un rango dinámico de detección de 0.15-375 ng. Según la bibliografía, mediante la técnica ELISA este rango es de 5-600 ng/mL (Liu et al., 2014), mientras que en nuestro ensayo se consigue un rango de 1.5-375 ng en 100 μ L, lo que equivale a 15-375 ng/mL. Cabe señalar, que en la sección 4.2.3.6. se puede observar que la Lactoferrina deja de ser detectable sin el empleo de AuNPs a 2 μ g/mL en la técnica de IDOM, lo que equivale a 3 ng de proteína, cantidad que es detectada empleando estas nanopartículas tapizadas con anticuerpo.

Además, en el ensayo ELISA el LoD obtenido es de 0.1078 ng, aunque en la literatura se alcanza 3.23 ng/mL (en 100 μ L equivale a 0.323 ng); mientras que en los kits de diagnóstico con AuNPs se obtiene 0.0237 ng utilizando muy poco volumen de muestra (Valle et al., 2023). Para poner en contexto, mediante el empleo de la técnica μ PAD, en la que se utilizan 2 μ L de muestra, se alcanza un LoD de 0.1 mg/mL, equivalente a un LoD de 200 ng (Yamada et al., 2015).

El empleo de estas nanopartículas de oro supone un gran avance en la tecnología IODM y suponen una mejora respecto a las nanopartículas magnéticas de hierro (Tabla 16).

Tipo de NP	Síntesis	Señal máxima	Propiedades
AuNP	Propia	-3000% Δ IROP	<ul style="list-style-type: none">• Facilidad de funcionalización• Caracterización por espectroscopía
MNP	Externa	-1000% Δ IROP	<ul style="list-style-type: none">• Manipulables por campos magnéticos

Tabla 16. Comparación entre nanopartículas de oro y nanopartículas magnéticas

4.3. Tecnología *Organ-on-a-chip* como modelo de cáncer de colon

Finalmente, tras comprobar que se dispone de kits de diagnósticos multiplexados, capaces de realizar de una gran cantidad de ensayos en poco tiempo, y de alcanzar límites de detección superiores a los alcanzados por la técnica ELISA, se propone el diseño de un **sistema de diagnóstico *in vitro*** para **cáncer colorrectal**.

Mediante este ensayo se pretende sentar las bases para la fabricación de un sistema de diagnóstico y testado de fármacos para diferentes cánceres, ya que esta metodología puede adaptarse en un futuro a otro tipo de cáncer con las características que demande.

Para realizar este ensayo, se emplean muestras de cáncer de colon cedidas por el **Biobanco** del IdISSC con el objetivo de desarrollar una prueba de concepto para la detección de biomarcadores en un caso clínico. Estas muestras pertenecen a pacientes previamente informados a través de un Consentimiento Informado y se clasifican en dos tipos de biopsia:

- **Biopsia tumoral.** Se trata de una muestra seleccionada por un patólogo especializado a partir de a una sección de la cirugía del paciente en la cual el tejido se diagnostica como adenocarcinoma de colon.
- **Biopsia no tumoral.** Esta biopsia pertenece al mismo paciente del que se extrae la biopsia tumoral, pero en tejido no cancerígeno, es decir, se obtiene tejido cercano al tumoral durante la misma cirugía. Este tejido es seleccionado por un patólogo especializado y catalogado como no tumoral, ya que no se puede asegurar que se trate de tejido sano.

4.3.1. Ensayos con Biopsias en Chips microfluídicos

Empleando la tecnología *Organ-on-a-chip* presentada en el artículo (Herreros et al., 2021, 2022) se fabrica un sistema microfluídico en el cual **cultivar biopsias** de cáncer de colon. Para ello, se realiza un primer ensayo con 8 chips microfluídicos (anteriormente mencionados en la sección 3.3.3.1.1.), que poseen una entrada y una salida de medio de cultivo y una cámara donde depositar la biopsia sobre una **membrana** permeable al medio de cultivo. En dicha membrana se deposita la biopsia correspondiente y se tapa el chip.

Para el cultivo de biopsias de cáncer de colon se disponen 4 biopsias tumorales en 4 chips microfluídicos y 4 biopsias no tumorales sobre otros 4 chips microfluídicos (Figura 131 izquierda).



Figura 131. Preparación del primer ensayo con biopsias.

Una vez cerrados los chips se les coloca el *tubbing*, se colocan dentro del incubador a 37 °C y 5% de CO₂ (Figura 131 derecha) y se establece un flujo de 0.5 μL/min en la bomba de perfusión que suministra el medio de cultivo.

Tras el primer día de incubación se observa que los tubos en los que se recoge el eluyente del cultivo se encuentran vacíos, indicando que los chips no están en perfectas condiciones y fugan.

Como se puede observar en la Figura 131, existen zonas en las que los chips no se han cerrado correctamente, debido al gran tamaño de las biopsias suministradas. Además, son transportadas en medio de cultivo hasta el laboratorio donde se procesan el cultivo, por lo que al entrar en contacto con el PDMS este se impregna de medio de cultivo impidiendo su correcto cierre.

Por tanto, se repite el ensayo, no sin antes realizar unas modificaciones de diseño sobre los chips microfluídicos. Como se describe anteriormente en la sección 3.3.3.2 estos chips son fabricados y diseñados por el Grupo de Óptica, Fotónica y Biofotónica, por lo que estos cambios de diseño pueden ser rápidamente implementados:

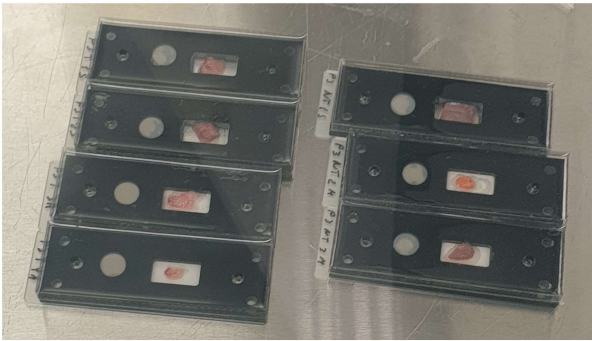
- **Aumentar la altura del chip microfluídico.** Dado que para la fabricación de estos chips se emplean capas de vinilos superpuestas se decide aumentar en un 67% el número de capas de la parte superior.

- **Desarrollar un chip alternativo** en el cual no se requiera de membrana. Así, durante el montaje del chip microfluídico no se coloca una membrana sobre la que deposita la biopsia, sino que el medio cubre la biopsia entera. Como las biopsias se encuentran sumergidas en el medio de cultivo se evitan posibles fugas, además, tendrán un mejor suministro de nutrientes a costa de disminuir el suministro de oxígeno.
- **Cambios del tamaño** de biopsias, se solicita a los patólogos del Hospital Clínico San Carlos biopsias de un tamaño menor.

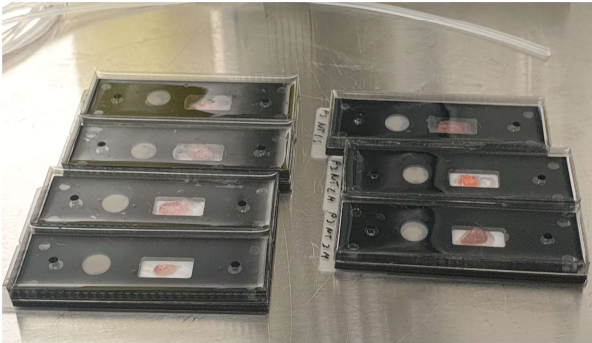
Para este segundo ensayo se dispone de 4 biopsias tumorales y 3 no tumorales, las cuales se reparten en 7 chips microfluídicos: 3 de ellos sin membrana y 4 con membrana. En la Tabla 17 se puede observar cómo se identifica a cada uno de ellos según la muestra que tienen en su interior (Figura 132).

Chip	Biopsia	Tipo de Chip
T1S	Tumoral	Sin membrana
T2S	Tumoral	Sin membrana
T3M	Tumoral	Con membrana
T4M	Tumoral	Con membrana
NT1S	No tumoral	Sin membrana
NT2M	No tumoral	Con membrana
NT3M	No tumoral	Con membrana

Tabla 17. Leyenda de los distintos chips empleados.



PDMS



Tubing



Figura 132. Preparación del **segundo** ensayo con biopsias.

Durante el proceso de cebado, el chip NT1S sufre una obturación en el canal de salida, por lo que la cámara se hincha y acaba fugando el chip. Puesto que no se usa membrana se debe tener en cuenta que puede desprenderse alguna parte de la biopsia taponando el conducto de salida.

En ninguno de los chips de este ensayo se observan los problemas anteriores durante su cierre por lo que los cambios implementados funcionan aparentemente.

Durante los siguientes 4 días se observa que los chips T2S, T3M, NT2M y NT3M comienzan a fugar por la conexión entre el *tubbing* de salida y el PDMS.

Tras 15 días de incubación de los chips con las biopsias T1S y T4M se detiene el suministro en continuo. Tras esto, las biopsias se fijan con formaldehído al 4%, y son enviadas al servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos para su estudio.

Tras la inclusión en parafina de las biopsias se realizan secciones de las biopsias incluidas. Posteriormente, se realiza una tinción de hematoxilina-eosina. Lamentablemente, tras el análisis de las biopsias, estas se encuentran necrosadas, posiblemente por un aporte de **medio de cultivo insuficiente** debido a un flujo bajo.

La dificultad de establecer un flujo correcto que aporte suficiente nutrientes al tejido, y las complicaciones con las presiones dentro de los chips con muestras de tanto volumen, obligan a diseñar un nuevo experimento basado en la generación de organoides a partir de biopsias similares a las empleadas en este apartado, y en la detección de biomarcadores de cáncer de colon mediante el empleo de nanopartículas de oro.

4.3.2. Ensayos de Organoides

Con el objetivo de replicar un modelo de cáncer de colon con el que poder estudiar biomarcadores de esta patología se realiza una búsqueda bibliográfica. Para evitar complicaciones en la presión dentro de los chips, como ocurrió en los ensayos con biopsias, se selecciona la generación de organoides como alternativa al cultivo de biopsias. Estos organoides se cultivan en una matriz 3D denominada Matrigel.

Para la realización de este experimento se ha utilizado otro tipo de chip microfluídico. En el ensayo con biopsias se emplean chips basados en vinilo, pero para la realización de este ensayo se emplean chips basados en PDMS.

Como se puede observar en la Figura 133, una gota de **Matrigel** de 50 μL se amolda perfectamente en un chip microfluídico. Los cuales, además, se encuentran completamente cubiertos de PDMS, para evitar posibles puntos de fuga, como ocurría en los anteriores chips microfluídicos debido a las múltiples capas de vinilo empleadas.

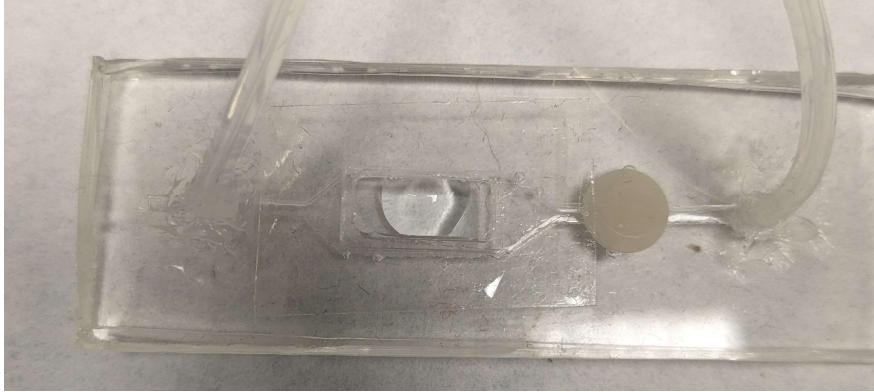


Figura 133. Inclusión de una gota de 50 μL de Matrigel en un chip microfluídico.

Como primera aproximación a la incubación de organoides derivados de cáncer colorrectal, se realiza un experimento empleando 2 tipos de **chips microfluídicos de PDMS: chips con tapa y chips sin tapa** (Figura 134).

Cada chip cuenta con una metodología propia para introducir la matriz. Por un lado, en el chip microfluídico con tapa, se introduce la matriz utilizando una pipeta, y cerrando con la tapa de PDMS el chip posteriormente para que se mantenga estanco. Por otro lado, en el chip sin tapa se inyecta a través del tapón de teflón como se describe en la sección 3.3.3.1.2.

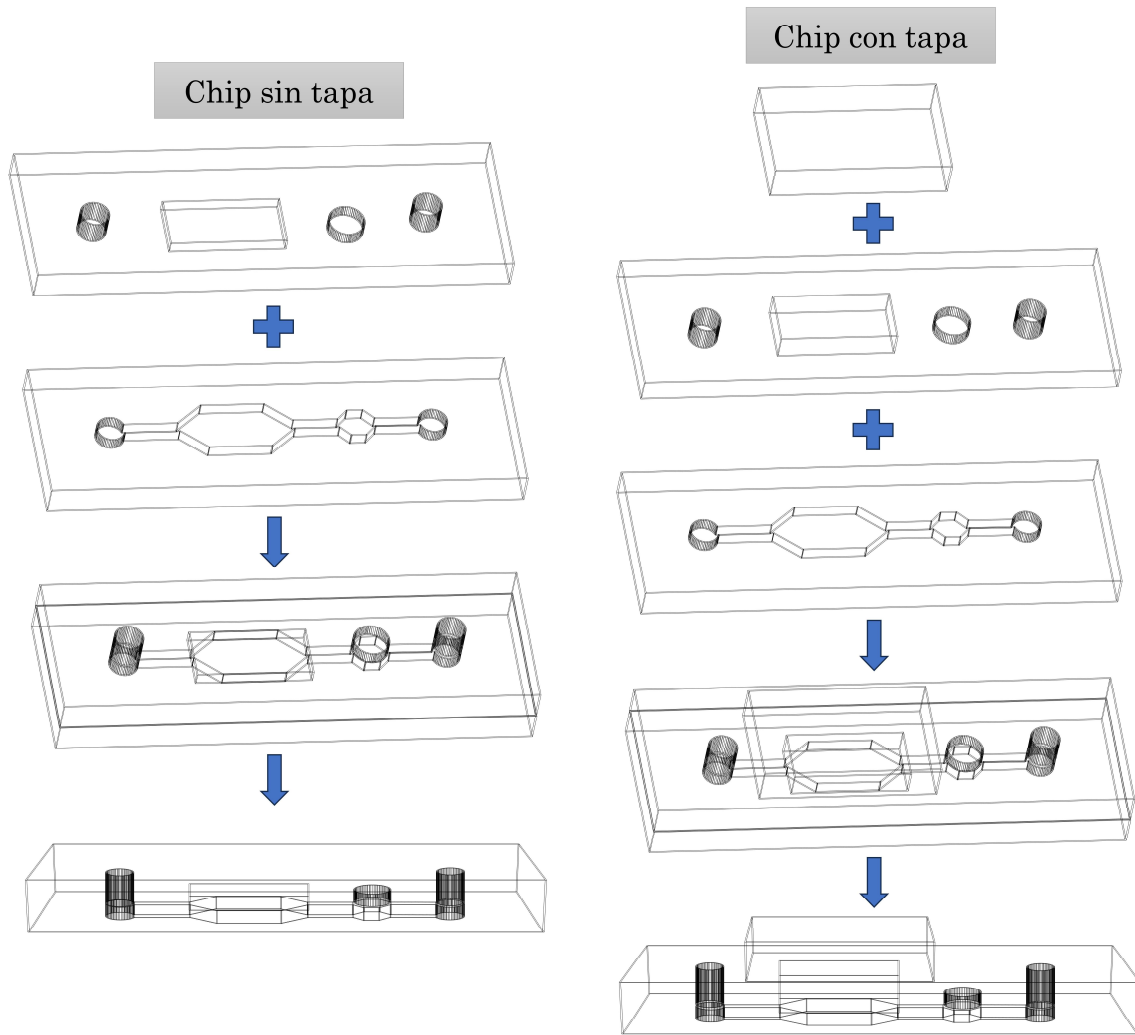


Figura 134. Proceso de ensamblaje de los dos tipos de chips microfluídicos de PDMS.

Como se puede observar en la Figura 135, en el caso del chip microfluídico sin tapa se forman burbujas, que dificultarían la correcta incubación de los organoides. Por ello se selecciona el chip microfluídico con tapa para la realización del ensayo con organoides.

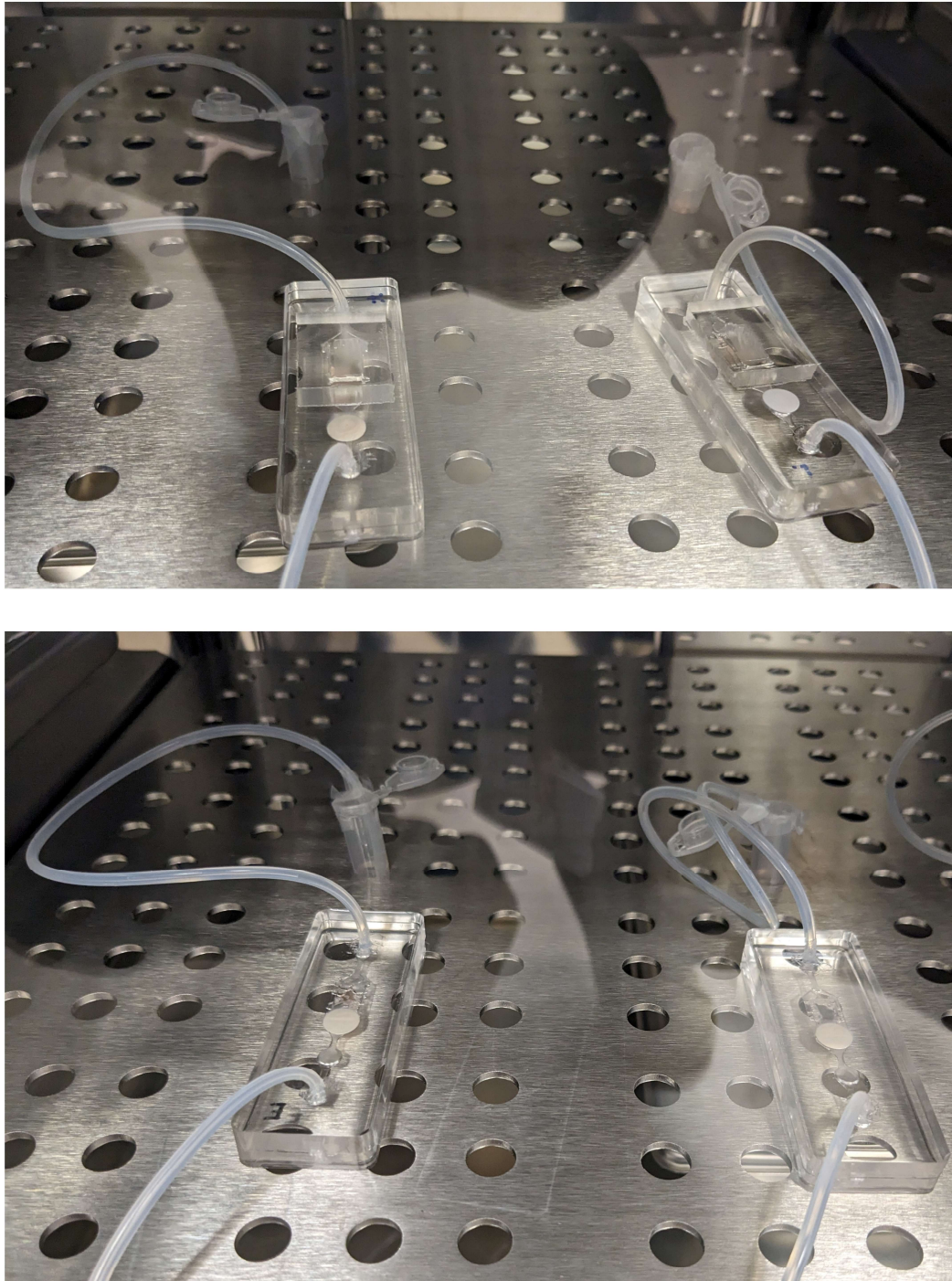


Figura 135. En la parte superior se puede observar dos chips microfluídicos con tapa. En la parte inferior se puede observar dos chips microfluídicos sin tapa.

Mediante esta primera aproximación se extrae otra conclusión: a la hora de cebar el chip microfluídico con el medio de cultivo, empleando un flujo de $50 \mu\text{L}/\text{min}$, se arrastra la matriz, impidiendo una buena visualización. Por ello, en el ensayo con organoides se decide emplear un flujo de $5 \mu\text{L}/\text{min}$.

Finalmente se realiza un ensayo con tejido procedente de un paciente con cáncer colorrectal, cuyo cultivo se mantiene durante de 10 días según lo desarrollado en la sección 3.3.3.3.

A lo largo de esos 10 días se realiza un recuento cada dos días del número de organoides visualizados a través del microscopio: en la Figura 136 se aprecian las imágenes de algunos organoides cultivados en chip microfluídico, y en la Figura 137 algunos cultivados en placa.

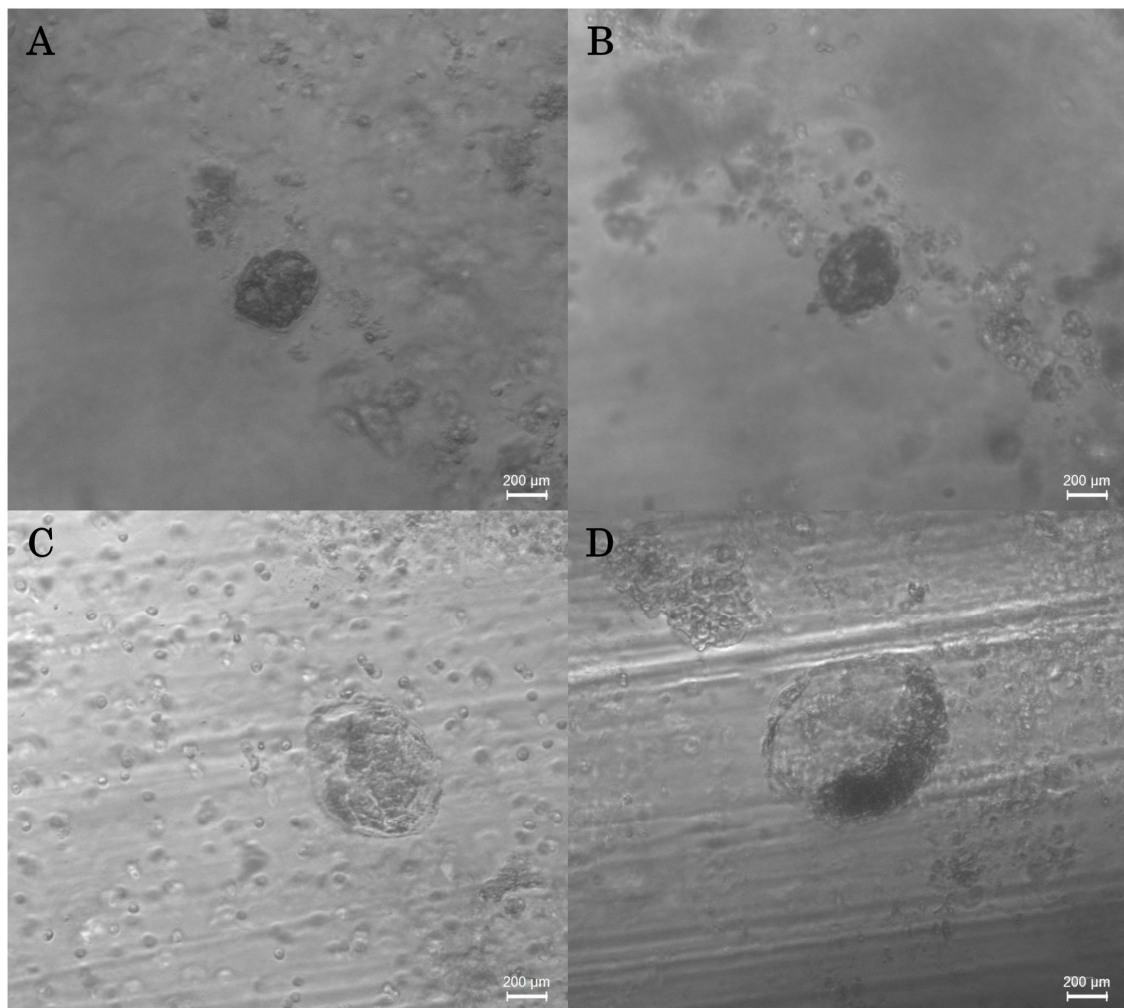


Figura 136. Organoides cultivados en chips microfluídicos. A y B corresponden a organoides derivados de tejido tumoral, C y D derivados de tejido no tumoral.

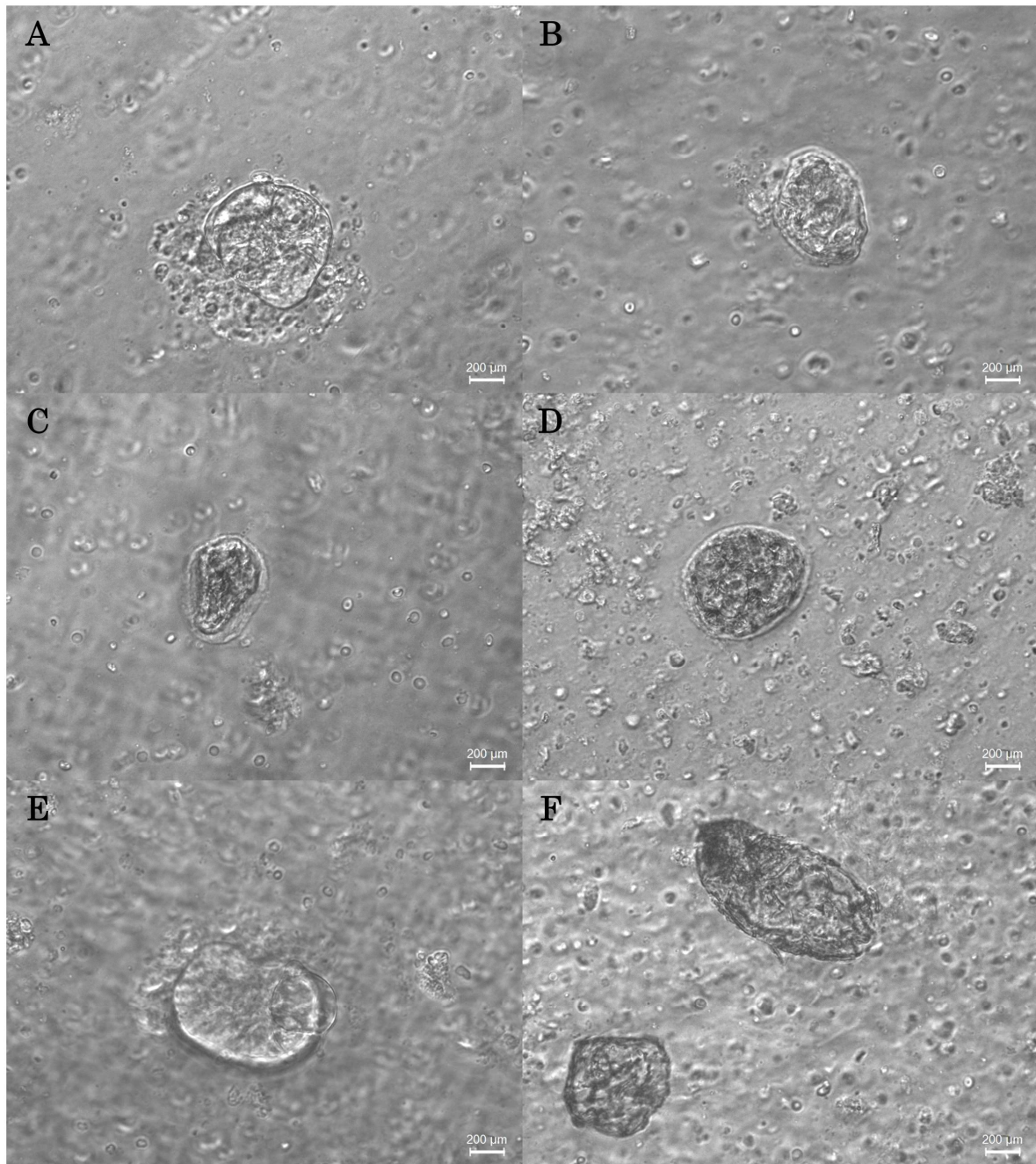


Figura 137. Organoides cultivados en placa. A, B y C corresponden a organoides derivados de tejido no tumoral, D, E y F derivados de tejido tumoral.

Cabe remarcar que la visualización en los chips microfluídicos de PDMS es más compleja, ya que la matriz no se expande al introducirla, lo cual sí se produce en los pocillos de la placa de cultivos, ya que son más hidrofílicos. Además, dado que el PDMS es translúcido, hace más difícil la visualización. Por todo esto se trabaja en un chip con la parte inferior de vidrio para la visualización mediante un microscopio invertido.

Como se puede observar en la Tabla 18, el número de organoides visualizados en placa derivados de **tejido no tumoral es menor** que en el caso de los derivados de **tejido tumoral**.

Pocillo		Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
NT	B2	1	1	1	3	7
	C2	1	2	2	3	7
	C3	1	2	2	4	8
	Media	1	1.67	1.67	3.66	7.33
T	B4	1	1	1	2	3
	B5	1	1	2	4	15
	C5	1	2	3	7	18
	Media	1	1.33	2	4.66	12

Tabla 18. Recuento del número de organoides visualizados cada 2 días.

Como se observa en la Tabla 18, el pocillo B4 no presenta apenas crecimiento de organoides, sin embargo, el resto pocillos tumorales (B5 y C5) muestran un gran crecimiento, lo cual se confirma mediante la visualización de la proteína Ki-67 en el microscopio de fluorescencia.

Es importante señalar que en el caso de algunos organoides derivados de tejido tumoral se observa una conformación menos esférica, lo cual puede deberse a invaginaciones, características del tejido intestinal (Figura 138).

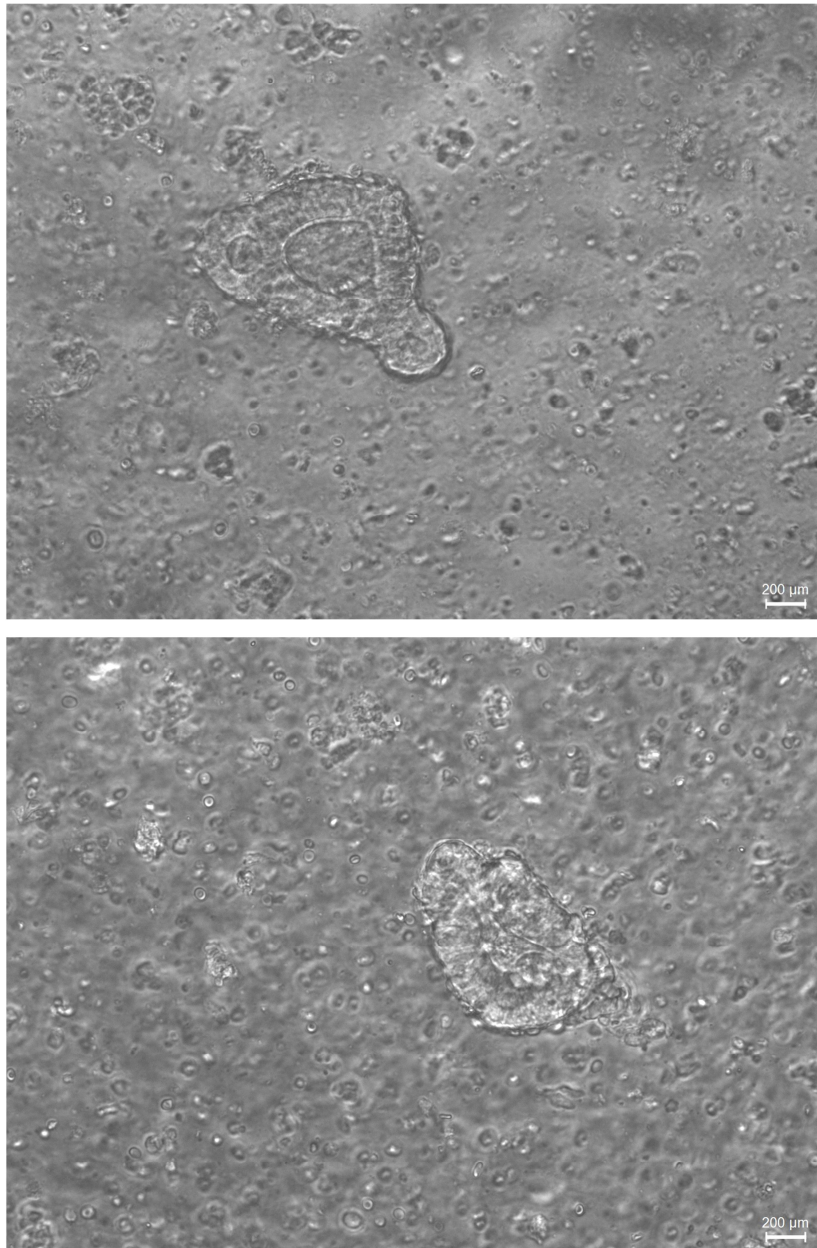


Figura 138. Organoides tumorales con una estructura aparentemente más compleja.

En definitiva, se generan estructuras tridimensionales organizadas, destacando un mayor crecimiento en el caso de los organoides derivados de tejido cancerígeno respecto al tejido no cancerígeno. En el siguiente apartado se confirma si dichas estructuras proceden de tejido colorrectal.

4.3.2.1. Caracterización de los organoides derivados de cáncer colorrectal

Tras realizar el cultivo de organoides derivados de tejido intestinal, existe la necesidad de confirmar que, en efecto, los organoides que se han visualizado son de este tipo de tejido. Como se explicó en la sección 3.3.3.3.1., la proteína CK20 es característica de tejido intestinal, por lo que mediante un ensayo de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-CK20, se puede confirmar si se trata de este tipo de tejido (**marcaje verde**).

Asimismo, se emplea otro anticuerpo, el anti-Ki67 (**marcaje rojo**) que revela la proteína Ki-67, presente en los organoides, permitiendo visualizar aquellos núcleos en los que se producen señales de proliferación. Por último, todos los núcleos se observan marcados en azul gracias a la tinción con Hoechst.

En la Figura 139 se muestran las imágenes de los organoides cultivados en chip microfluídico recogidas con el microscopio de fluorescencia. Resulta extremadamente difícil enfocar en el microscopio: por lo que, aunque se aprecian núcleos próximos en azul, el marcaje verde no se distingue del fondo de la muestra.

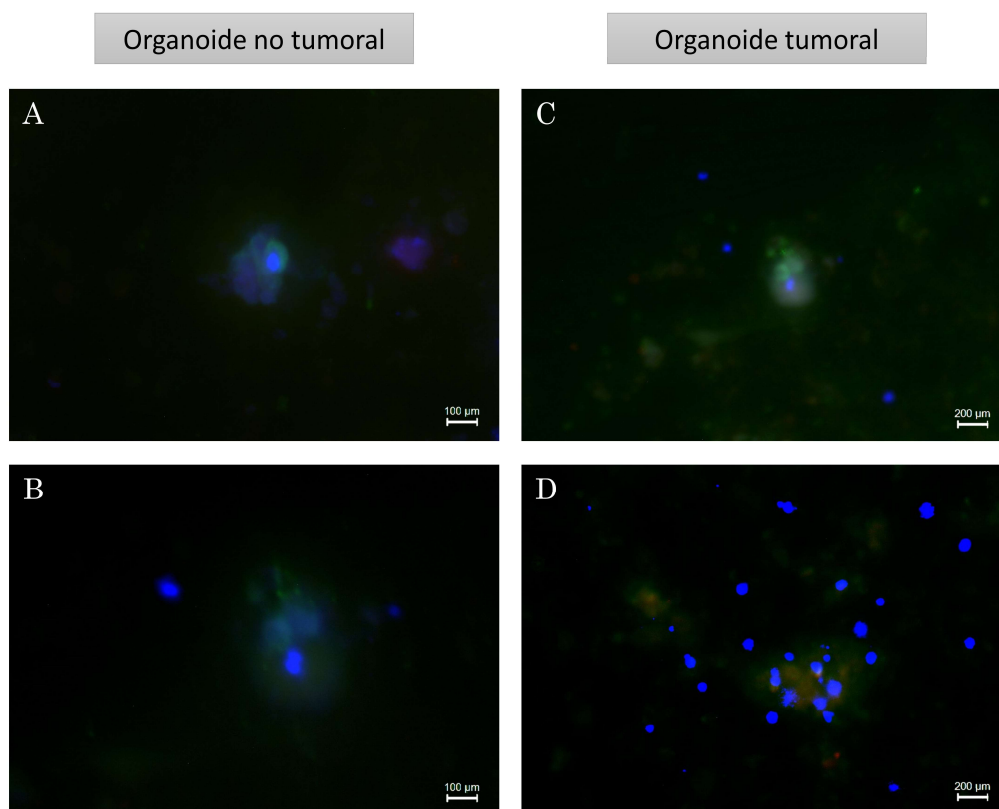


Figura 139. Imagen de fluorescencia de organoides cultivados en chips microfluídicos. A y C corresponden a organoides derivados de tejido no tumoral, B y D derivados de tejido tumoral.

En la Figura 140 se pueden observar las imágenes de los organoides cultivados en placa obtenidas por el microscopio de fluorescencia. Es importante señalar que, al contrario de lo observado en los organoides derivados de tejido no tumoral, en los organoides tumorales sí se observa **expresión de la proteína Ki-67**.

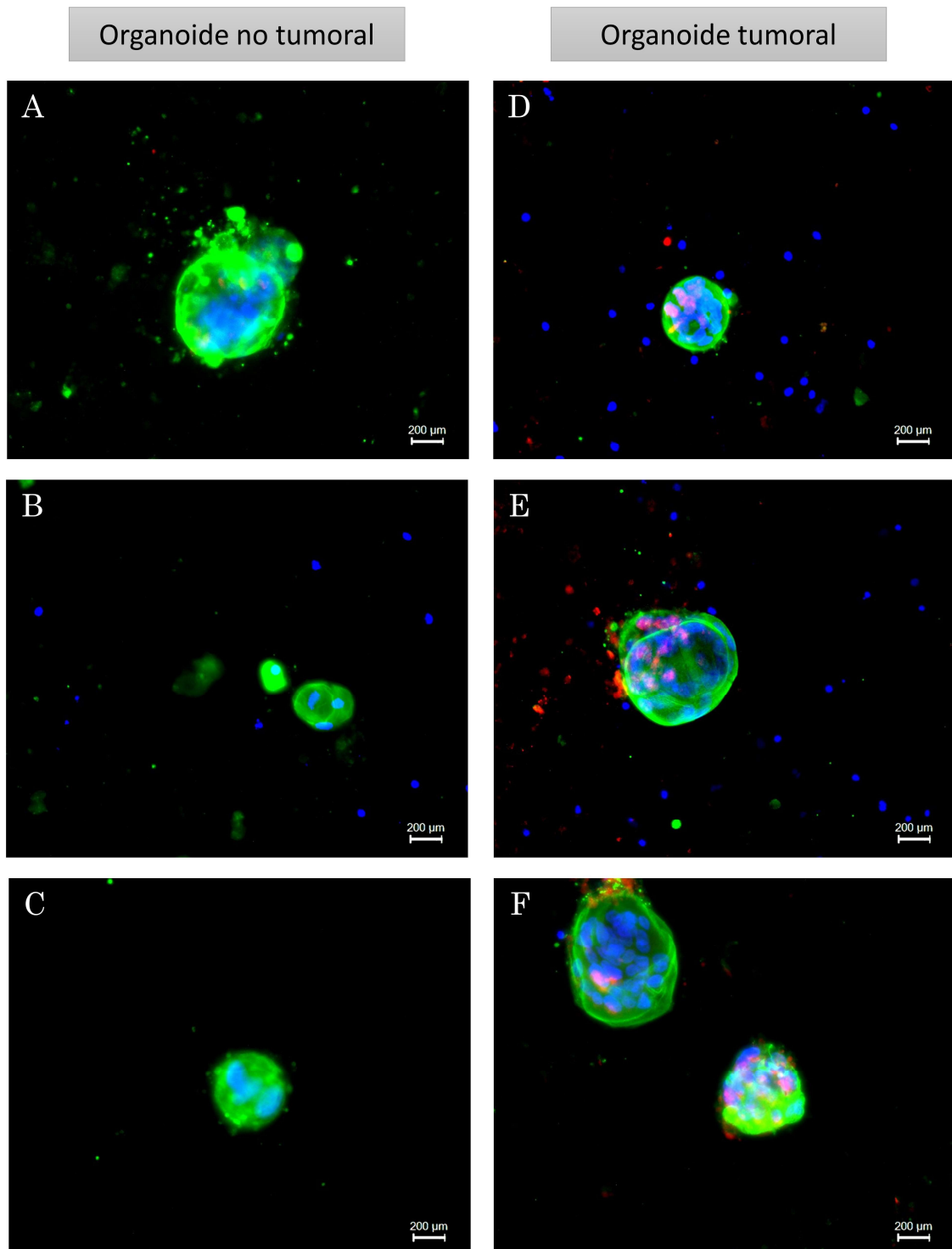


Figura 140. Imagen de fluorescencia de organoides cultivados en placa. A, B y C corresponden a organoides no tumorales, D, E y F a organoides tumorales.

Por último, estas mismas muestras se visualizan en un microscopio **confocal**, el cual permite mayor precisión de la imagen. El caso de un organoide no tumoral se pueden observar en la Figura 141, y el caso de uno tumoral en la Figura 142.

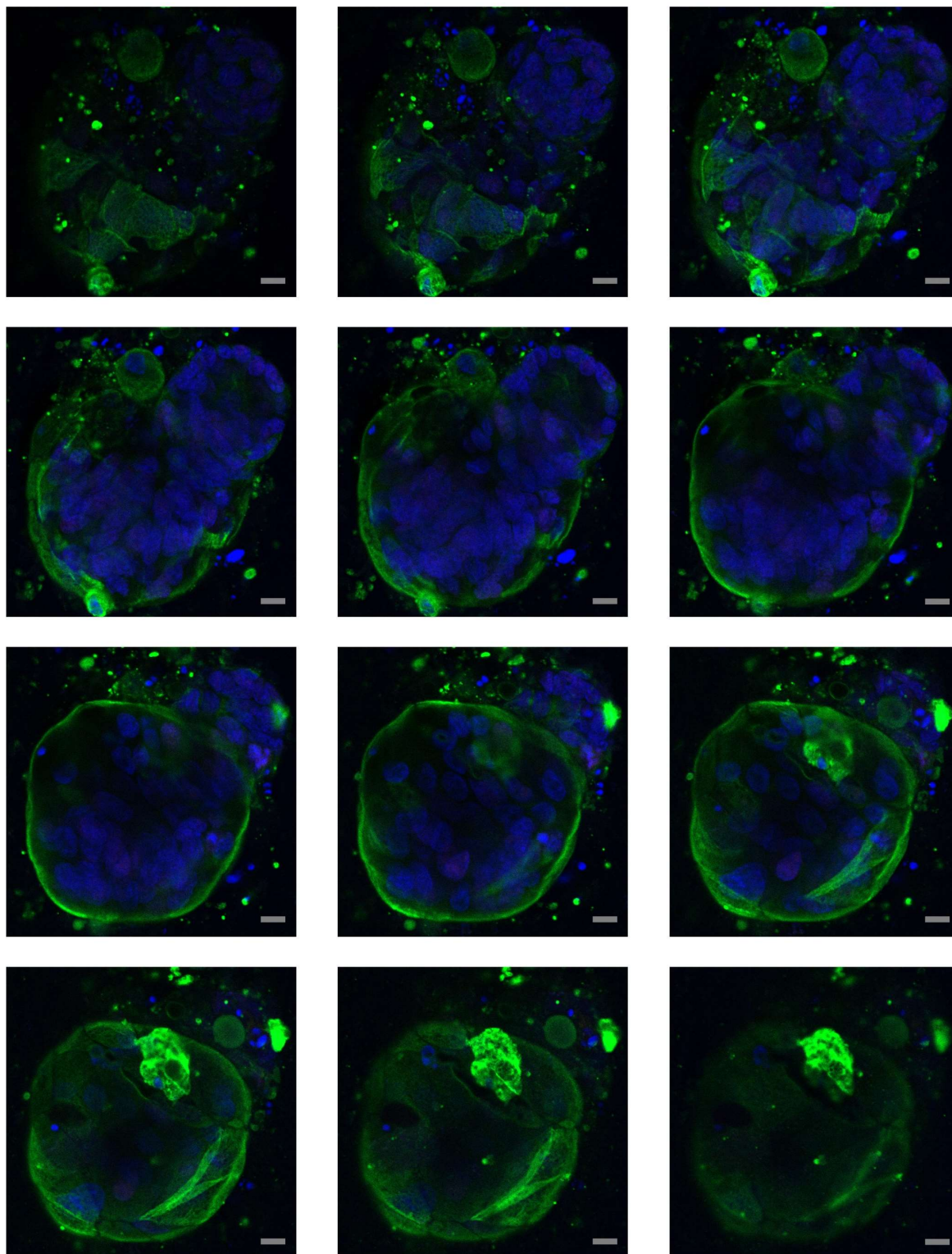


Figura 141. Imágenes de un organoide no tumoral tomadas con un microscopio confocal. La distancia entre secciones es de $1.06\ \mu\text{m}$. La escala gris es de $10\ \mu\text{m}$.

Estas imágenes obtenidas con el microscopio confocal **corroboran** lo observado anteriormente, se observa una **mayor expresión de la proteína Ki-67 en los organoides derivados de tejido tumoral**.

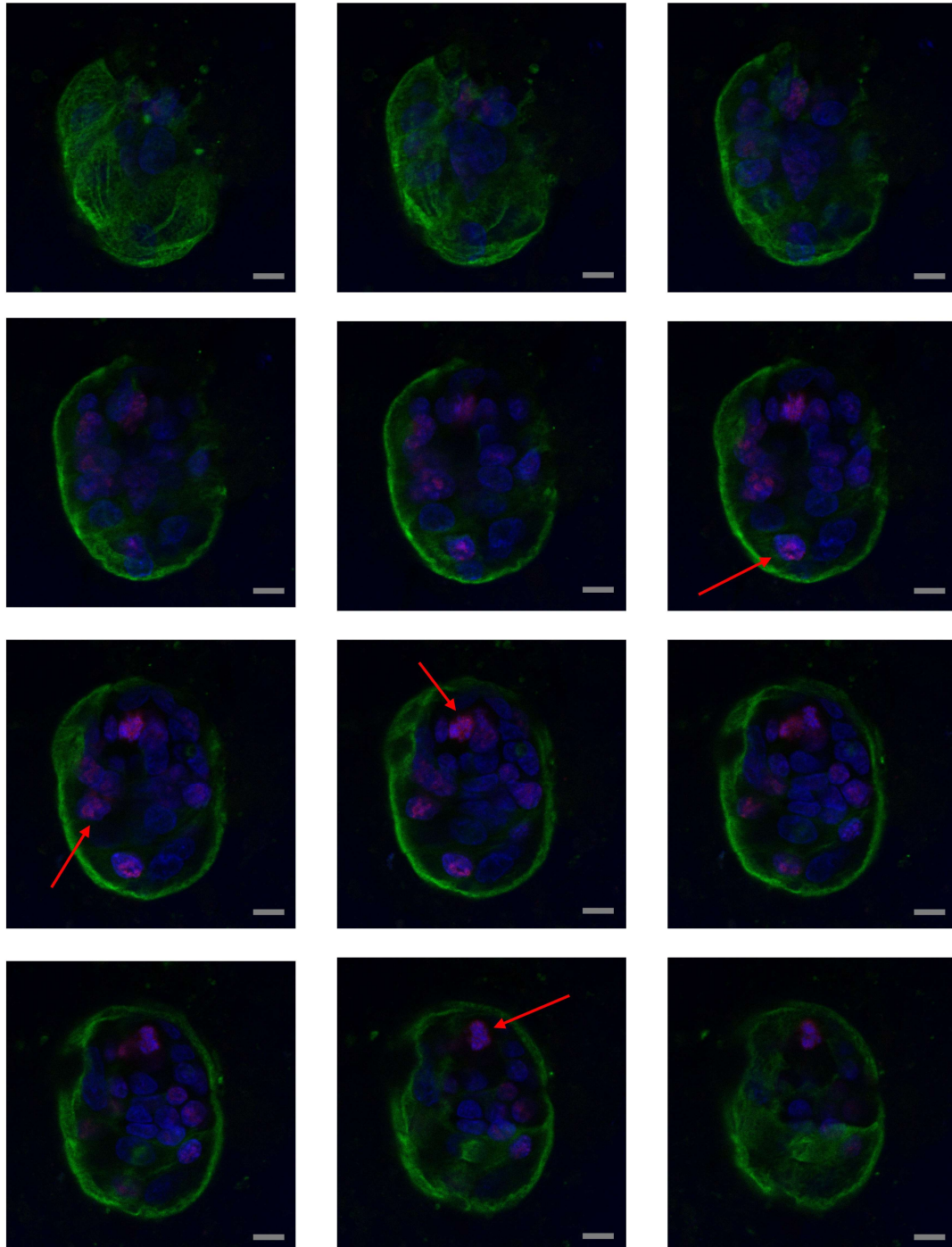


Figura 142. Imágenes de un organoide tumoral tomadas con un microscopio confocal. La distancia entre secciones es de 1.06 μm . La escala gris es de 10 μm .

Para recapitular esta sección, se consigue cultivar organoides derivados de tejido intestinal, que aumentan en número al cabo de 10 días, destacando que en el caso de los organoides tumorales se observa una mayor expresión de la proteína de proliferación Ki-67, lo cual concuerda con una mayor presencia estructuras tridimensionales visualizadas.

4.3.2.2. Detección de Biomarcadores en organoides derivados de cáncer colorrectal mediante AuNPs

Una vez establecido este modelo de cáncer de colon, se procede a poner a punto la detección de biomarcadores relacionados con el cáncer de colon. Entre los biomarcadores más empleados en esta patología destaca el CEA (Alkan et al., 2021; Binefa et al., 2014; Duffy et al., 2007), sin embargo, se propone emplear la proteína IGFBP2. La principal ventaja de utilizar este último biomarcador es que se trata de una proteína **secretable**, facilitando su detección en el medio de cultivo, mientras que el CEA se encuentra unido a la membrana celular.

Por tanto, se selecciona la proteína **IGFBP2** para llevar a cabo una primera aproximación en la detección de biomarcadores en organoides derivados de cáncer colorrectal mediante AuNPs. Cabe señalar que se han observado mayores niveles de este marcador en sangre en pacientes de cáncer colorrectal que en controles sanos (Das et al., 2017; Vocka et al., 2019).

4.3.2.2.1 Evaluación de la inmovilización de la proteína IGFBP2

El primer paso para establecer la detección del biomarcador seleccionado en organoides es la realización de una curva de inmovilización de la proteína IGFBP2, para asegurar un tapizado completo de la superficie en los ensayos posteriores. Para ello se incuban concentraciones crecientes de esta proteína sobre los kits de diagnóstico de 64 celdas pipeteando 1.5 μL por celda, en un total de 8 celdas por condición. La incubación se realiza durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda. Como se observa en la Figura 143, la saturación de la curva se alcanza a 100 $\mu\text{g/mL}$.

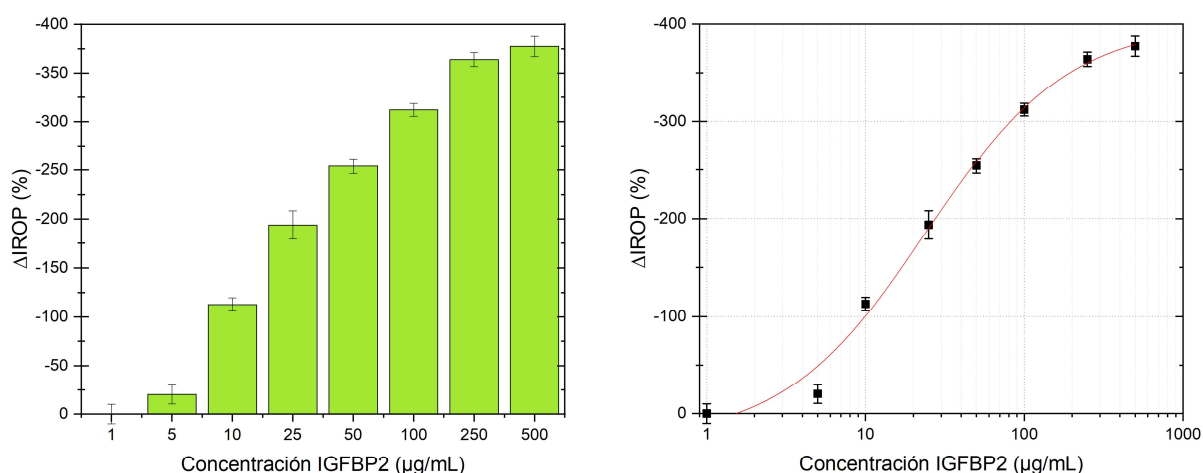


Figura 143. Incubación de la proteína IGFBP2. Se realiza un ajuste sigmoidal ("Hill1 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99307.

A continuación, se lleva a cabo una comprobación de la afinidad del anticuerpo por la superficie cubierta de IGFBP2. Para ello, se tapiza un kit de 64 celdas por completo con IGFBP2 a $65 \mu\text{g/mL}$ durante 2 horas a 37°C en una cámara húmeda. Seguidamente se reconoce con el anticuerpo anti-IGFBP2 a emplear en el ensayo con nanopartículas de oro. Durante este ensayo se incuban concentraciones crecientes de este anticuerpo en 8 celdas por condición y se incuban durante 2 horas a 37°C en una cámara húmeda. En la Figura 144 se observa la saturación de la curva a $75 \mu\text{g/mL}$.

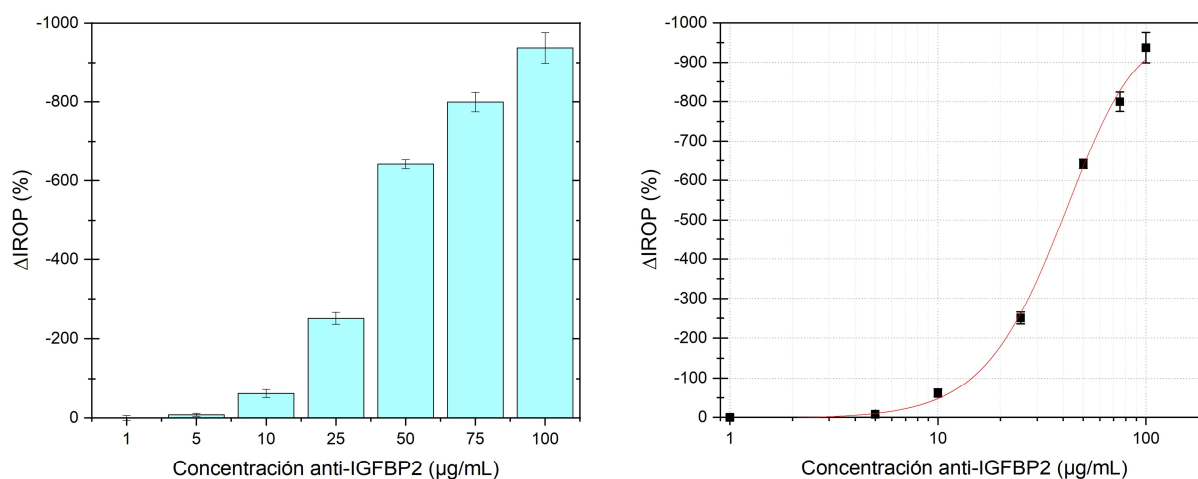


Figura 144. Reconocimiento de la proteína IGFBP2. Se realiza un ajuste sigmoidal ("Logistic5 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99883.

4.3.2.2.2 Estudio de especificidad de AuNPs con anti-IGFBP2 por IGFBP2

Para el ensayo de detección de IGFBP2 en organoides se sintetizan AuNPs de 22 nm de diámetro según espectroscopía. Seguidamente, 125 mL de AuNPs a 6.29×10^8 NPs/ μ L se incuban con 14 mg de PEG-COOH, se centrifugan y nuevamente se caracterizan.

Debido a los problemas de aglomeración observados previamente (Figura 121), a la hora de centrifugar las AuNPs se realizan unos cambios en el protocolo de biofuncionalización, ya que la cantidad de anticuerpo comercial anti-IGFBP2 es muy escasa. Por tanto, para disminuir el tamaño de las AuNPs con anticuerpo no se tapiza la superficie con PG en exceso, sino que se añade el equivalente para tapizar un 25% de la superficie de las AuNPs.

Se añade 32 μ L de EDC (10 mg/mL), 64 μ L de Sulfo-NHS y 160 MES (0.1M) a 50 μ L de AuNPs-COOH a 4.09×10^{10} NPs/ μ L. Tras centrifugar y resuspender en agua, se añaden 38 μ L de proteína G (1 mg/mL), teniendo en cuenta que para tapizar por completo la superficie de las nanopartículas se necesitan 150 μ L.

Tras 4 horas de incubación con PG se añade Tris 0.5 M hasta que en la solución final estuviese a 0.1 M, esta incubación dura 20 horas asegurando que los grupos carboxilos se encuentren bloqueados, por lo que se une menos cantidad de anticuerpo a las nanopartículas y no se aglomeran. Tras caracterizar estas nanopartículas se encuentran a una concentración de 4×10^{10} NPs/ μ L, con ligeros cambios en el d_H como se muestra en la Tabla 19.

	d_H (nm)	Grado de polidispersión
AuNP	27.71 ± 0.08	0.137 ± 0.011
AuNP + PEG	47.89 ± 0.62	0.160 ± 0.002
AuNP + PEG + PG	49.58 ± 0.27	0.158 ± 0.010
AuNP + PEG + PG + anti-IGFBP2	52.06 ± 0.64	0.199 ± 0.008

Tabla 19. Tamaño de las poblaciones de AuNPs en el protocolo de biofuncionalización mediante DLS.

Parte de estas AuNPs recubiertas con PG (a una concentración de 5×10^9 NPs/ μ L) son depositadas sobre el kit de diagnóstico en el que cual se realizó el reconocimiento con anti IGFBP2. Mediante el análisis de este kit se puede determinar si la proteína G de las AuNPs es capaz de unir el anticuerpo. La

incubación de AuNPs se realiza durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda. Como se observa en la Figura 145, a medida que aumenta la concentración de anticuerpo en la superficie del sensor, aumenta la amplificación de la señal por parte de las AuNPs.

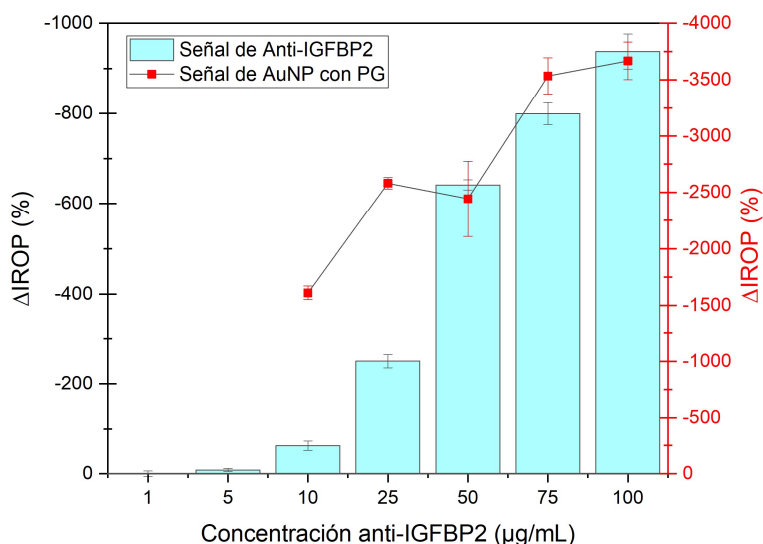


Figura 145. Comprobación de la afinidad de la PG por el anti-IGFBP2.

Dado que se parte de 100 μL de anticuerpo anti-IGFBP2 a 0.2 mg/mL, y las AuNPs se encuentran a 4×10^{10} NPS/mL con un diámetro de 50 nm, para tapizar 25 μL de estas nanopartículas son necesarios 85 μL de anticuerpo a 0.2 mg/mL, considerando que un anticuerpo tiene un tamaño de 150 kDa y aproximadamente $14.5 \text{ nm} \times 8.5 \text{ nm} \times 4.0 \text{ nm}$ (Tan et al., 2008).

Por tanto, se incuban 25 μL de estas nanopartículas con 100 μL de anticuerpo a 0.2 mg/mL (un 20% en exceso). Tras lavar se obtienen 100 μL de AuNPs a 1×10^{10} NPS/μL, por lo que mediante este protocolo se evita la aglomeración durante la centrifugación recuperando todas las AuNPs, según las medidas de concentración en el espectrofotómetro.

Se inmoviliza la proteína IGFBP2 en un kit con 64 biosensores interferométricos con polímero SU-8 en superficie durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda, también se inmoviliza BSA como control negativo. A continuación, se incuban diferentes concentraciones de AuNPs sobre este kit durante 90 min, asimismo, se incubaba la mayor concentración de nanopartículas utilizada sobre la proteína BSA. Seguidamente, se obtienen las medidas interferométricas, restando el valor del

control negativo del resto de medidas. En la Figura 146 se observa que no se alcanza la saturación de la curva en estas concentraciones y tiempo de incubación.

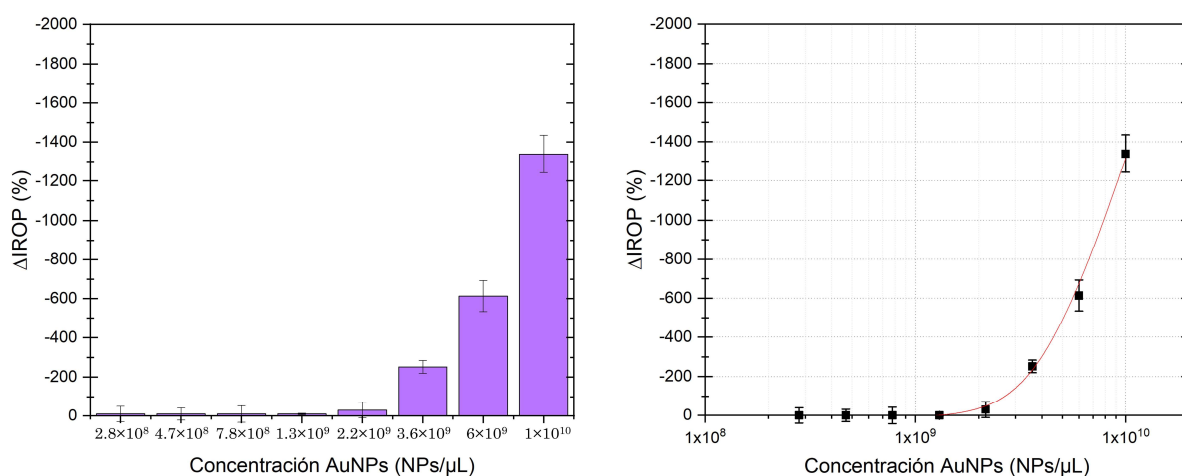


Figura 146. Ensayo de reconocimiento directo de AuNPs con anti-IGFBP2 sobre IGFBP2. Se realiza un ajuste sigmoideal ("Logistic5 fit") utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99514 en el ajuste de la curva (en rojo).

4.3.2.2.3 Ensayo competitivo para la detección de IGFBP2 en medio de cultivo

Puesto que la casa comercial suministra poca cantidad de anticuerpo, no se dispone de muchas nanopartículas tapizadas con dicho anticuerpo. Por ello se selecciona la concentración de 5×10^9 NPs/ μL para realizar un ensayo competitivo con el cual detectar cantidades muy bajas de IGFBP2 en estos organoides derivados de cáncer de colon, esperando obtener señales alrededor de -500 % de $\Delta IROP$ con esta concentración.

Para este ensayo competitivo se seleccionan 6 concentraciones diferentes de IGFBP2 para realizar una curva de calibrado a partir de la cual extrapolar la concentración de este posible biomarcador en los medios de cultivo. Las concentraciones elegidas son 0.1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1000 ng/mL y 10000 ng/mL.

Se emplea el mismo medio de cultivo que el utilizado en el desarrollo de organoides (medio Intesticult). En concreto se utiliza 0.75 mL de este medio cebado con las concentraciones anteriormente mencionadas de IGFBP2. A los que posteriormente se les añade 8 μL de AuNPs tapizadas con el anticuerpo anti-IGFBP2. Asimismo, se añaden 8 μL de AuNPs tapizadas con el anticuerpo anti-IGFBP2 a 3 alícuotas de medio de cultivo obtenidas del cultivo de organoides tumorales y a otras 3 alícuotas procedentes del cultivo de organoides no tumorales.

Tanto la incubación de las AuNPs con los medios de cultivo cebados, como con los medios de cultivo de organoides, se realiza a 4 °C en movimiento constante durante 72 horas, con el objetivo de prevenir el posible efecto Vroman a la hora de capturar la molécula objetivo. Este efecto provoca que las primeras partículas en unirse a las nanopartículas son aquellas de menor tamaño, debido a su mayor movilidad, pero con el tiempo las moléculas con más afinidad desplazan estas moléculas inespecíficas.

Tras estas 72 horas, las AuNPs son centrifugadas y resuspendidas en 8 μ L, para posteriormente disponerlas sobre un kit de 64 celdas tapizado con la proteína IGFBP2. Se incuban 1.5 μ L de AuNPs por celda, utilizando 5 celdas por condición, durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda (Figura 147).

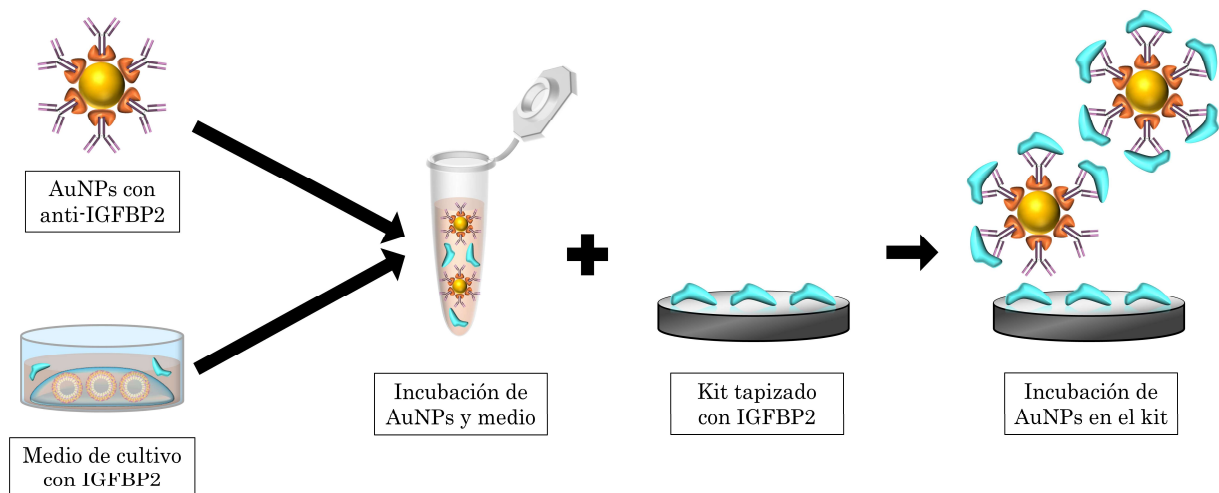


Figura 147. Ensayo competitivo para la detección de IGFBP2 en medio de cultivo.

La curva de calibrado no muestra diferencias en las concentraciones de 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1000 ng/mL y 10000 ng/mL, obteniendo únicamente diferencias entre los valores de 0.1 ng/mL, 1 ng/mL y 10 ng/mL (Figura 148).

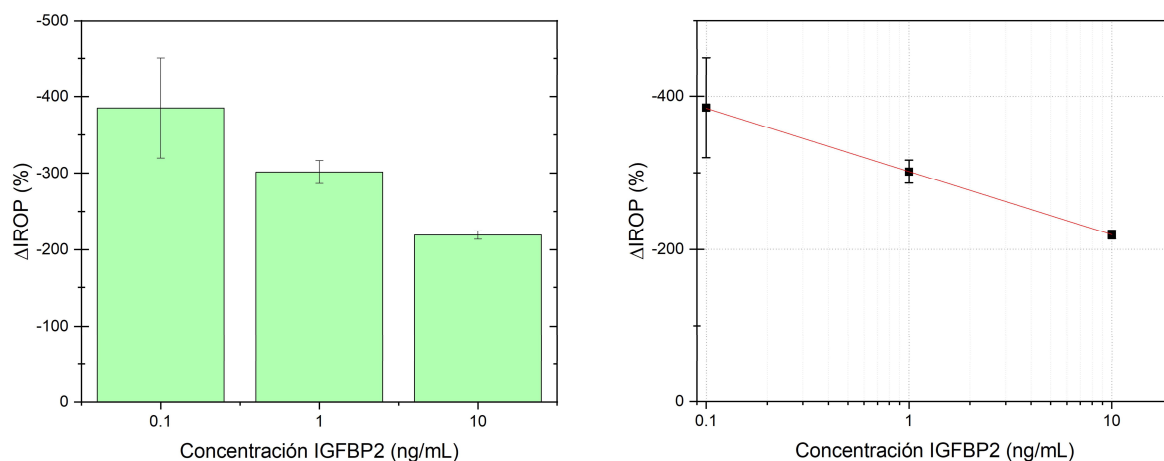


Figura 148. Curva de calibrado del ensayo competitivo con AuNPs tapizadas con anti-IGFBP2 capturando IGFBP2. Se realiza un ajuste lineal utilizando el software Origin, obteniéndose un R^2 de 0.99999 en el ajuste de la curva (en rojo).

Aunque se trata de una primera aproximación, y son necesarios futuros ensayos, se halla la ecuación de la recta de calibrado:

$$y = 36.038 \ln(x) - 302.06$$

En el caso de las AuNPs incubadas con los medios de cultivos de organoides tumorales se obtienen valores que se ajustan dentro de la gráfica para las alícuotas de los días 2 y 10, no así en el día 6. Mientras que en el caso del cultivo de organoides no tumorales los valores tampoco se encuentran dentro del rango de la recta de calibrado (Figura 149).

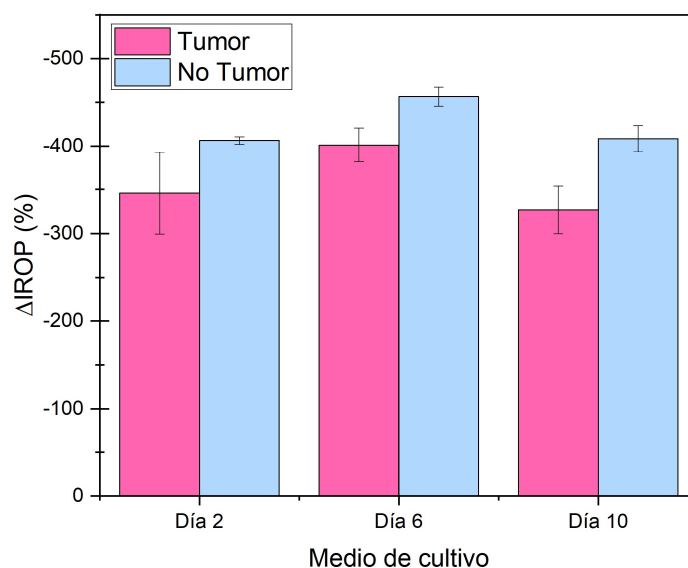


Figura 149. Señal de las AuNPs incubadas con el medio de cultivo de organoides tumorales (rosa) y no tumorales (azul).

Una vez recogidas las señales de las AuNPs incubadas en el medio de cultivo de los organoides, se interpolan en la ecuación de la recta de calibrado obtenida previamente. En el caso actual únicamente las señales de la primera y de la última alícuota de un organoide tumoral se encuentran dentro de dicha recta, por lo que solo esos datos pueden ser interpolados (Tabla 20).

	Tumoral			No Tumoral		
	Primera toma	Toma intermedia	Toma final	Primera toma	Toma intermedia	Toma final
IROP (%)	-345.74	-401.12	-326.73	-406.42	-456.71	-408.40
ng/mL	0.30	Fuera de rango	0.50	Fuera de rango	Fuera de rango	Fuera de rango

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.

Puesto que se trata de un ensayo preliminar para el cultivo de organoides derivados de tejido tumoral con el que poder detectar biomarcadores, no se puede asegurar que los resultados obtenidos sean correctos debido a la incertidumbre de los datos. Sin embargo, sí pueden ser utilizados para establecer la metodología a desarrollar en los siguientes experimentos dentro del proyecto con el fin de hallar la concentración de los biomarcadores de esta patología en el medio de cultivo.

5. Conclusiones

Es innegable la gran importancia que tiene la investigación en el tratamiento de enfermedades, en el caso de esta tesis se investiga el desarrollo de biosensores y la detección de biomarcadores relacionados con tres enfermedades con amplio impacto social. El objetivo principal de esta tesis es la adaptación de kits de diagnóstico a diferentes enfermedades, siendo capaces de detectar diversos biomarcadores. A continuación, se exponen las principales conclusiones a las que se han llegado durante el transcurso de esta tesis:

- Durante el estudio de la COVID-19 se consigue adaptar los kits de diagnóstico para detectar diferentes biomarcadores en suero de pacientes que cursan la enfermedad: ferritina, proteína C reactiva, IgGs, IgMs e IgAs. En concreto, durante el estudio de sueros de pacientes con la enfermedad de COVID-19 se analizan dichos biomarcadores en las muestras de 72 pacientes con diferentes grados de la enfermedad. Se observa un mayor nivel de IgTs en sueros de pacientes graves comparado con lo observado en los sueros de los pacientes moderados y leves. A su vez, existen diferencias también en los niveles de IgGs, IgMs y FER, lo cual no ocurre en el caso de CRP. Con esta información se realiza un modelo de regresión múltiple que relaciona la influencia de estos biomarcadores con la gravedad de los pacientes con la COVID-19 con un R^2 de 73,01%. Asimismo, estos kits de diagnóstico permiten realizar un estudio piloto voluntario en la UPM para la detección de IgAs en saliva. A lo largo de este estudio se analizan las muestras de salivas cedidas por los casi 200 voluntarios cada 10-12 días gracias a los kits de diagnóstico desarrollados. Cada kit de diagnóstico permite medir la cantidad de IgAs en 7 muestras de saliva distintas en 24 horas, realizando más de 120 kits durante los dos meses y medio del estudio. Ambos estudios, llevados a cabo en muestra real para el análisis de la COVID-19, demuestran la capacidad de multiplexado que presentan los kits de diagnóstico, puesto que son capaces de detectar diferentes biomarcadores y analizar distintos pacientes en cada kit.

- En el caso del estudio de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer se desarrollan kits en los que detectar diferentes marcadores biológicos: Lactoferrina y diferentes fragmentos de la proteína Tau. Cabe señalar que se han analizado diferentes anticuerpos y antígenos desarrollados por Lincbiotech y la afinidad entre ellos. Para la optimización de estos kits de detección se emplean dos tipos de nanopartículas: de oro y magnéticas de óxido de hierro. Mediante la biofuncionalización de estas NPs se recubre su superficie con anticuerpos específicos frente a Lactoferrina y Tau. Los diferentes pasos seguidos en estos procesos de biofuncionalización son validados mediante el caracterizado de las nanopartículas por DLS, SEM o espectroscopía UV-Visible. Finalmente, se seleccionan las nanopartículas de oro, ya que se puede controlar el tamaño mediante la síntesis en el laboratorio y se puede conocer la concentración mediante espectroscopía, pudiendo detectar con estas NPs la proteína Lactoferrina con un límite de detección mayor que mediante un ensayo ELISA. Por primera vez, se valida la señal interferométrica mediante el sistema de medida IODM, correlacionándola con el área recubierta del sensor mediante SEM. Por un lado, el rango dinámico de detección mediante la técnica ELISA es de 1.5-375 ng, por otro lado, utilizando nanopartículas en el método IODM se obtiene un rango dinámico de detección de 0.15-375 ng. El LoD obtenido en esta tesis mediante IODM es de 0.0237 ng, y de 0.1078 ng mediante técnica ELISA.
- Para realizar un modelo de cáncer de colon con el cual evaluar biomarcadores de la enfermedad, se emplean chips microfluídicos basados en la tecnología *Organ-on-a-chip*. En un principio, mediante estos chips no se logra la incubación directa de biopsias de tejido catalogadas por patólogos especializados como cáncer de colon. Sin embargo, con un nuevo diseño de chips microfluídicos, finalmente se consigue el cultivo de organoides derivados de este tipo de biopsias. Se desarrolla un método de caracterización que confirma que los organoides generados son, efectivamente, derivados de colon; de hecho, se observa una alta presencia de células en proliferación características de los estados neoplásicos respecto a tejido no tumoral. Para la detección de un biomarcador específico de cáncer colorrectal, se proponen las nanopartículas de oro junto con los kits de diagnóstico empleados como técnica de seguimiento de la enfermedad, a través del análisis de biomarcadores del modelo de cáncer de colon

desarrollado. Se lleva a cabo un ensayo preliminar utilizando la proteína IGFBP2 como marcador biológico para comprobar la posibilidad de realizar este ensayo, cuantificando esta proteína en el medio de cultivo proveniente del cultivo de organoides.

6. Futuras líneas de investigación

Esta tesis supone un avance en varios aspectos dentro del campo de detección de biomarcadores, concretamente en los biosensores ópticos interferómetros, a través del empleo de nanopartículas capaces de amplificar la señal obtenida en los diversos ensayos. Esto abre la puerta a la búsqueda de otras enfermedades en las que aplicar la tecnología de los kits de diagnósticos multiplexados.

Se ha conseguido la estandarización de un protocolo para biofuncionalizar nanopartículas de oro, permitiendo que se mantengan estables y que el rendimiento no se vea afectado durante este proceso. En un principio se emplean nanopartículas magnéticas de óxido de hierro, y en un futuro se plasmará lo aprendido en la optimización del protocolo de biofuncionalización de nanopartículas de oro permitiendo emplear estas nanopartículas magnéticas también, ya que presentan propiedades magnéticas de gran interés en el ámbito de los biosensores.

La línea de investigación más clara en la que se pretende trabajar es la fabricación de un modelo de cáncer de colon mediante el cual analizar biomarcadores. Aunque se han visualizado organoides tanto en chip microfluídicos como en placa, la visualización de los chips es deficiente. Para solucionar esta problemática se propone modificar los chips microfluídicos de PDMS, como se puede observar en la Figura 150. Se realizarán ensayos en los que el bloque de PDMS que incluye el canal fluídico se encuentra unido a un vidrio totalmente transparente, facilitando la observación mediante un microscopio invertido.

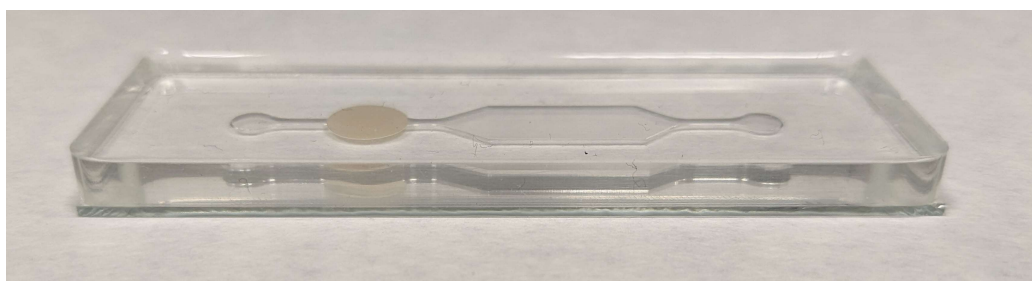


Figura 150. Último diseño de chip microfluídico, en el cual se puede observar una parte inferior de vidrio y una parte superior de PDMS.

A pesar de haber observado el desarrollo de organoides, este protocolo necesita ser optimizado para aumentar la cantidad de estos organoides. Además, existen numerosos ensayos a los que se puede aplicar esta tecnología, como el estudio morfológico de los organoides en sus diferentes estadios, o el análisis farmacológico ante el uso de anticancerígenos.

La importancia de optimizar los protocolos de cultivo de organoides radica no solo en detectar biomarcadores de cáncer de colon o estudiar la evolución de estos organoides, sino también en desarrollar una tecnología *Organ-on-a-chip* que permita adaptar los chips a otras enfermedades. Es decir, una vez estandarizado el protocolo de cultivo de organoides derivados de tejido colorrectal en chips microfluídicos, se podrá desarrollar organoides derivados de otros tejidos en estos chips, permitiendo el estudio de múltiples enfermedades.

7. Artículos publicados por el autor

Murillo, A. M.M., Tomé-Amat, J., Ramírez, Y., Garrido-Arandia, M., Valle, L. G., Hernández-Ramírez, G., Tramarin, L., Herreros, P., Santamaría, B., Díaz-Perales, A., & Holgado, M. (2021). Developing an Optical Interferometric Detection Method based biosensor for detecting specific SARS-CoV-2 immunoglobulins in Serum and Saliva, and their corresponding ELISA correlation. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 345. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130394>

Pioz, M.J.; Espinosa, R.L.; Laguna, M.F.; Santamaria, B.; Murillo, A.M.M.; Hueros, Á.L.; Quintero, S.; Tramarin, L.; Valle, L.G.; Herreros, P.; et al. A review of Optical Point-of-Care devices to Estimate the Technology Transfer of These Cutting-Edge Technologies. *Biosensors* 2022, 12, 1091. <https://doi.org/10.3390/bios12121091>

Murillo, Ana María M., Valle, L. G., Ramírez, Y., Sánchez, M. J., Santamaría, B., Molina-Roldan, E., Ortega-Madueño, I., Urcelay, E., Tramarin, L., Herreros, P., Díaz-Perales, A., Garrido-Arandia, M., Tome-Amat, J., Hernández-Ramírez, G., Espinosa, R. L., Laguna, M. F., & Holgado, M. (2022). Integration of Multiple Interferometers in Highly Multiplexed Diagnostic KITS to Evaluate Several Biomarkers of COVID-19 in Serum. *Biosensors*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/bios12090671>

Murillo, A.M.M.; Laguna, M.F.; Valle, L.G.; Tramarin, L.; Ramirez, Y.; Lavín, Á.; Santamaría, B.; Holgado, M. A New Optical Interferometric Biosensing System Enhanced with Nanoparticles for Alzheimer's Disease in Serum. *Biosensors* 2023, 13, 707. <https://doi.org/10.3390/bios13070707>

Valle LG, Santamaría B, Lavín A, Laguna MF, Rodriguez-Lorenzo L, Espiña B, Holgado M. Developing an improved optical biosensing system based on gold nanoparticles acting as interferometric enhancers in Lactoferrin detection. *Analyst*. 2023 Oct 23;148(21):5445-5455. <https://doi.org/10.1039/D3AN01328F>

8. Referencias

- Abeyasinghe, A. A. D. T., Deshapriya, R. D. U. S., & Udawatte, C. (2020). Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions. In *Life Sciences* (Vol. 256, p. 117996). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117996>
- Alkan, A., Hofving, T., Angenete, E., & Yrlid, U. (2021). Biomarkers and cell-based models to predict the outcome of neoadjuvant therapy for rectal cancer patients. *Biomarker Research*, *9*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00313-9>
- Alkharaan, H., Bayati, S., Hellström, C., Aleman, S., Olsson, A., Lindahl, K., Bogdanovic, G., Healy, K., Tsilingaridis, G., De Palma, P., Hober, S., Månberg, A., Nilsson, P., Pin, E., & Sällberg Chen, M. (2021). Persisting salivary IgG against SARS-CoV-2 at 9 months after mild COVID-19: A complementary approach to population surveys. *Journal of Infectious Diseases*, *224*(3), 407–414. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab256>
- Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., O Nguyen, T. H., Chromikova, V., McMahan, M., Jiang, K., Asthagiri Arunkumar, G., Jurczynszak, D., Polanco, J., Bermudez-Gonzalez, M., Kleiner, G., Aydillo, T., Miorin, L., Fierer, D. S., Amarilis Lugo, L., Milunka Kojic, E., Stoeber, J., H Liu, S. T., ... Krammer, F. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5>
- Avvakumova, S., Colombo, M., Tortora, P., & Prospero, D. (2014). Biotechnological approaches toward nanoparticle biofunctionalization. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 32, Issue 1, pp. 11–20). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.006>
- Azimzadeh, A., & Van Regenmortel, M. H. V. (1990). Antibody affinity measurements. *Journal of Molecular Recognition*, *3*(3), 108–116. <https://doi.org/10.1002/jmr.300030304>
- Barré-Sinoussi, F., & Montagnutelli, X. (2015). Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Science OA*. <https://doi.org/10.4155/FSO.15.63>

- Bergenheim, F., Fregni, G., Buchanan, C. F., Riis, L. B., Heulot, M., Touati, J., Seidelin, J. B., Rizzi, S. C., & Nielsen, O. H. (2020). A fully defined 3D matrix for ex vivo expansion of human colonic organoids from biopsy tissue. *Biomaterials*, *262*(December 2019), 120248. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120248>
- Bermejo-Pareja, F., del Ser, T., Valentí, M., de la Fuente, M., Bartolome, F., & Carro, E. (2020). Salivary lactoferrin as biomarker for Alzheimer's disease: Brain-immunity interactions. *Alzheimer's and Dementia*, *16*(8), 1196–1204. <https://doi.org/10.1002/alz.12107>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Binefa, G., Rodríguez-Moranta, F., Teule, À., & Medina-Hayas, M. (2014). Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(22), 6786–6808. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i22.6786>
- Carro, E., Bartolomé, F., Bermejo-Pareja, F., Villarejo-Galende, A., Molina, J. A., Ortiz, P., Calero, M., Rabano, A., Cantero, J. L., & Orive, G. (2017). Early diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on salivary lactoferrin. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, *8*, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2017.04.002>
- Carvalho, M. R., Yan, L. P., Li, B., Zhang, C. H., He, Y. L., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2023). Gastrointestinal organs and organoids-on-a-chip: advances and translation into the clinics. *Biofabrication*, *15*(4). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/acf8fb>
- Cervia, C., Nilsson, J., Zurbuchen, Y., Valaperti, A., & Schreiner, J. (2020). *Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. January.*
- Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., & Gilliland, G. L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies*, *8*(55). <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
- Dadfar, S. M., Roemhild, K., Drude, N. I., & Von, S. (2020). *Europe PMC Funders Group Iron Oxide Nanoparticles: Diagnostic, Therapeutic and Theranostic Applications.* 302–325. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.005.Iron>

- d'Aldebert, E., Quaranta, M., Sébert, M., Bonnet, D., Kirzin, S., Portier, G., Duffas, J. P., Chabot, S., Lluet, P., Allart, S., Ferrand, A., Alric, L., Racaud-Sultan, C., Mas, E., Deraison, C., & Vergnolle, N. (2020). Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory Bowel Disease Patients. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(June). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00363>
- Dan, J. M., Mateus, J., Kato, Y., Hastie, K. M., Yu, E. D., Faliti, C. E., Grifoni, A., Ramirez, S. I., Haupt, S., Frazier, A., Nakao, C., Rayaprolu, V., Rawlings, S. A., Peters, B., Krammer, F., Simon, V., Saphire, E. O., Smith, D. M., Weiskopf, D., ... Crotty, S. (2021). Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 371(6529). <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
- Das, V., Kalita, J., & Pal, M. (2017). Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 87, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.064>
- De Vicente, J., Lavín, Á., Holgado, M., Laguna, M. F., Casquel, R., Santamaría, B., Quintero, S., Hernández, A. L., & Ramírez, Y. (2020). The uncertainty and limit of detection in biosensors from immunoassays. *Measurement Science and Technology*, 31(4), 044004. <https://doi.org/10.1088/1361-6501/ab49ec>
- Dobaño, C., Alonso, S., Fernández de Sevilla, M., Vidal, M., Jiménez, A., Pons Tomas, G., Jairoce, C., Melé Casas, M., Rubio, R., Hernández García, M., Ruiz-Olalla, G., Girona-Alarcón, M., Barrios, D., Santano, R., Mitchell, R. A., Puyol, L., Mayer, L., Chi, J., Rodrigo Melero, N., ... Jordan, I. (2021). Antibody conversion rates to SARS-CoV-2 in saliva from children attending summer schools in Barcelona, Spain. *BMC Medicine*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02184-1>
- Dobaño, C., Alonso, S., Vidal, M., Jiménez, A., Rubio, R., Santano, R., Barrios, D., Pons Tomas, G., Melé Casas, M., Hernández García, M., Girona-Alarcón, M., Puyol, L., Baro, B., Millat-Martínez, P., Ajanovic, S., Balanza, N., Arias, S., Rodrigo Melero, N., Carolis, C., ... Moncunill, G. (2022). Multiplex Antibody Analysis of IgM, IgA and IgG to SARS-CoV-2 in Saliva and Serum From Infected Children and Their Close Contacts. *Frontiers in Immunology*, 13(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.751705>

- Drummond, E., Pires, G., Macmurray, C., Askenazi, M., Nayak, S., Bourdon, M., Safar, J., Ueberheide, B., & Wisniewski, T. (2020). Phosphorylated tau interactome in the human Alzheimer's disease brain. *Brain*, *143*, 2803–2817. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa223>
- Duffy, M. J., van Dalen, A., Haglund, C., Hansson, L., Holinski-Feder, E., Klapdor, R., Lamerz, R., Peltomaki, P., Sturgeon, C., & Topolcan, O. (2007). Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *European Journal of Cancer*, *43*(9), 1348–1360. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.03.021>
- Ebell, M. H., Forgacs, D., Shen, Y., Ross, T. M., Hulme, C., Bentivegna, M., Hanley, H. B., Jefferson, A. M., & Hainess, L. (2022). High Prevalence of Both Previous Infection with SARS-CoV-2 and Persistent Symptoms. *The Journal of the American Board of Family Medicine*, *35*(3), 570–578. <https://doi.org/10.3122/jabfm.2022.03.210348>
- Ellison, S. L. R., & Williams, A. (2012). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements. In *EURACHEM/CITAC*. <https://doi.org/10.3329/jbas.v41i2.35494>
- Enüstün, B. V., & Turkevich, J. (1963). Coagulation of Colloidal Gold. *Journal of the American Chemical Society*, *85*(21), 3317–3328. <https://doi.org/10.1021/ja00904a001>
- Erickson, H. P. (2009). Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological Procedures Online*, *11*(1), 32–51. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>
- Fan, J., Cheng, Y., & Sun, M. (2020). Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. *Chemical Record*, *20*(12), 1474–1504. <https://doi.org/10.1002/tcr.202000087>
- Farhang Doost, N., & Srivastava, S. K. (2024). A Comprehensive Review of Organ-on-a-Chip Technology and Its Applications. *Biosensors*, *14*(5). <https://doi.org/10.3390/bios14050225>
- Figueiredo-Campos, P., Blankenhaus, B., Mota, C., Gomes, A., Serrano, M., Ariotti, S., Costa, C., Nunes-Cabaço, H., Mendes, A. M., Gaspar, P., Pereira-Santos, M. C., Rodrigues, F., Condeço, J., Escoval, M. A., Santos, M., Ramirez, M., Melo-Cristino, J., Simas, J. P., Vasconcelos, E., ... Veldhoen, M. (2020).

- Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in COVID-19 patients and healthy volunteers up to 6 months post disease onset. *European Journal of Immunology*, *50*(12), 2025–2040. <https://doi.org/10.1002/eji.202048970>
- Fung, K. Y. C., Tabor, B., Buckley, M. J., Priebe, I. K., Purins, L., Pompeia, C., Brierley, G. V., Lockett, T., Gibbs, P., Tie, J., McMurrick, P., Moore, J., Ruszkiewicz, A., Nice, E., Adams, T. E., Burgess, A., & Cosgrove, L. J. (2015). Blood-based protein biomarker panel for the detection of colorectal cancer. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120425>
- Galateanu, B., Hudita, A., Biru, E. I., Iovu, H., Zaharia, C., Simsensohn, E., Costache, M., Petca, R. C., & Jinga, V. (2022). Applications of Polymers for Organ-on-Chip Technology in Urology. *Polymers*, *14*(9). <https://doi.org/10.3390/polym14091668>
- García-Abellán, J., Padilla, S., Fernández-González, M., García, J. A., Agulló, V., Andreo, M., Ruiz, S., Galiana, A., Gutiérrez, F., & Masiá, M. (2021). Antibody Response to SARS-CoV-2 is Associated with Long-term Clinical Outcome in Patients with COVID-19: a Longitudinal Study. *Journal of Clinical Immunology*, *41*(7), 1490–1501. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01083-7>
- Ghasemi, A., Rabiee, N., Ahmadi, S., Hashemzadeh, S., Lolasi, F., Bozorgomid, M., Kalbasi, A., Nasserri, B., Dezfuli, A. S., Aref, A. R., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2018). Optical Assays Based on Colloidal Inorganic Nanoparticles. *Analyst*, *143*(14), 3249–3283. <https://doi.org/10.1039/c8an00731d>
- González-Guerrero, A. B., Maldonado, J., Herranz, S., & Lechuga, L. M. (2016). Trends in photonic lab-on-chip interferometric biosensors for point-of-care diagnostics. *Analytical Methods*, *8*(48), 8380–8394. <https://doi.org/10.1039/c6ay02972h>
- Graves, J., Byerly, J., Priego, E., Makkapati, N., Parish, S. V., Medellin, B., & Berrondo, M. (2020). A Review of Deep Learning Methods for Antibodies. *Antibodies*, *9*(12). <https://doi.org/10.3390/antib9020012>
- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2015). Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV - Vis Spectra. *Analytical Chemistry*, *79*(October), 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>

- Herreros, P., Ballesteros-Esteban, L. M., Laguna, M. F., Leyva, I., Sendiña-Nadal, I., & Holgado, M. (2021). Neuronal circuits on a chip for biological network monitoring. *Biotechnology Journal*, *16*(7), 1–7. <https://doi.org/10.1002/biot.202000355>
- Herreros, P., Tapia-González, S., Sánchez-Olivares, L., Heras, M. F. L., & Holgado, M. (2022). Alternative Brain Slice-on-a-Chip for Organotypic Culture and Effective Fluorescence Injection Testing. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052549>
- Holgado Bolaños, M., Sanza Gutierrez, F. J., Laguna Heras, M.-F., Lavin Hueros, A., & Casquel del Campo, R. (2012). *Interferometric detection method*. *1*(19), 1–36.
- Holgado, M., Barrios, C. A., Ortega, F. J., Sanza, F. J., Casquel, R., Laguna, M. F., Bañuls, M. J., López-Romero, D., Puchades, R., & Maquieira, A. (2010). Label-free biosensing by means of periodic lattices of high aspect ratio SU-8 nanopillars. *Biosensors and Bioelectronics*, *25*(12), 2553–2558. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.042>
- Holgado, M., Maigler, M. V., Santamaría, B., Hernandez, A. L., Lavín, A., Laguna, M. F., Sanza, F. J., Granados, D., Casquel, R., Portilla, J., & Riesgo, T. (2016). Towards reliable optical label-free point-of-care (PoC) biosensing devices. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *236*, 765–772. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.06.047>
- Holgado, M., Sanza, F. J., López, A., Lavín, Á., Casquel, R., & Laguna, M. F. (2014). Description of an advantageous optical label-free biosensing interferometric read-out method to measure biological species. *Sensors (Switzerland)*, *14*(2), 3675–3689. <https://doi.org/10.3390/s140203675>
- Horie, K., Barthélemy, N. R., Mallipeddi, N., Li, Y., Franklin, E. E., Perrin, R. J., Bateman, R. J., & Sato, C. (2020). Regional correlation of biochemical measures of amyloid and tau phosphorylation in the brain. *Acta Neuropathologica Communications*, *8*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01019-z>
- Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M., & Martínez-Chapa, S. O. (2018). Advantages, Disadvantages and Modifications of Conventional ELISA. In *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): From A to Z* (pp. 67–115). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6766-2_5

- Howes, P. D., Chandrawati, R., & Stevens, M. M. (2014). Colloidal nanoparticles as advanced biological sensors. *Science*, *346*(6205). <https://doi.org/10.1126/science.1247390>
- Huang, N., Pérez, P., Kato, T., Mikami, Y., Okuda, K., Gilmore, R. C., Conde, C. D., Gasmi, B., Stein, S., Beach, M., Pelayo, E., Maldonado, J. O., Lafont, B. A., Jang, S. I., Nasir, N., Padilla, R. J., Murrah, V. A., Maile, R., Lovell, W., ... Byrd, K. M. (2021). SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nature Medicine*, *27*(5), 892–903. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01296-8>
- Isho, B., Abe, K. T., Zuo, M., Jamal, A. J., Rathod, B., Wang, J. H., Li, Z., Chao, G., Rojas, O. L., Bang, Y. M., Pu, A., Christie-Holmes, N., Gervais, C., Ceccarelli, D., Samavarchi-Tehrani, P., Guvenc, F., Budyłowski, P., Li, A., Paterson, A., ... Gingras, A. C. (2020). Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Science Immunology*, *5*(52), 1–20. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe5511>
- Islam, M. R., Ali, M. M., Lai, M.-H., Lim, K.-S., & Ahmad, H. (2014). Chronology of Fabry-Perot Interferometer Fiber-Optic Sensors and Their Applications: A Review. *Sensors*, *14*, 7451–7488. <https://doi.org/10.3390/s140407451>
- JCGM. (2008). Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. In *International Organization for Standardization Geneva ISBN*.
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, *20*(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
- Kang, H., Buchman, J. T., Rodriguez, R. S., Ring, H. L., He, J., Bantz, K. C., & Haynes, C. L. (2019). Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities [Review-article]. *Chemical Reviews*, *119*(1), 664–699. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00341>
- Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. (2015). Introduction to Biosensors. In *Biosensors and Bioelectronics* (pp. 1–68). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>
- Kim, D., & Herr, A. E. (2013). Protein immobilization techniques for microfluidic assays. *Biomicrofluidics*, *7*(4), 41501. <https://doi.org/10.1063/1.4816934>

- Kowalczyk, P., Kaczyńska, K., Kleczkowska, P., Bukowska-oško, I., Kramkowski, K., & Sulejczak, D. (2022). The Lactoferrin Phenomenon—A Miracle Molecule. *Molecules*, *27*(9), 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules27092941>
- Kowalczyk, P., Sulejczak, D., Kleczkowska, P., Bukowska-Oško, I., Kucia, M., Popiel, M., Wietrak, E., Kramkowski, K., Wrzosek, K., & Kaczyńska, K. (2021). Mitochondrial oxidative stress—a causative factor and therapeutic target in many diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 13384. <https://doi.org/10.3390/ijms222413384>
- Kruzel, M. L., Zimecki, M., & Actor, J. K. (2017). Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology. *Frontiers in Immunology*, *8*(NOV), 1438. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01438>
- Laguna, M. F., Holgado, M., Santamaría, B., López, A., Maigler, M., Lavín, A., de Vicente, J., Soria, J., Suarez, T., Bardina, C., Jara, M., Sanza, F. J., Casquel, R., Otón, A., & Riesgo, T. (2015). Performance evaluation for different sensing surface of BICELLS bio-transducers for dry eye biomarkers. *Nanoscale Imaging, Sensing, and Actuation for Biomedical Applications XII*, 9337, 93370J. <https://doi.org/10.1117/12.2077174>
- Laguna, M. F., Sanza, F. J., Soria, J., Jara, M., Lavín, Á., Casquel, R., López, A., Suarez, T., & Holgado, M. (2014). Label-free biosensing by means of BICELLS for dry eye. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *203*, 209–212. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.06.114>
- Laguna, M., Holgado, M., Hernandez, A. L., Santamaría, B., Lavín, A., Soria, J., Suarez, T., Bardina, C., Jara, M., Sanza, F. J., & Casquel, R. (2015). Antigen-antibody affinity for dry eye biomarkers by label free biosensing. Comparison with the ELISA technique. *Sensors (Switzerland)*, *15*(8), 19819–19829. <https://doi.org/10.3390/s150819819>
- Lakshmpriya, T., & Gopinath, S. C. B. (2018). An introduction to biosensors and biomolecules. In *Nanobiosensors for Biomolecular Targeting* (pp. 1–21). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813900-4.00001-4>
- Lavín, Á., de Vicente, J., Holgado, M., Laguna, M. F., Casquel, R., Santamaría, B., Victoria Maigler, M., Hernández, A. L., & Ramírez, Y. (2018). On the Determination of Uncertainty and Limit of Detection in Label-Free Biosensors. *Sensors*, *18*(7), 2038. <https://doi.org/10.3390/s18072038>

- Li, B., Zhang, B., Liu, X., Zheng, Y., Han, K., Liu, H., Wu, C., Li, J., Fan, S., Peng, W., Zhang, F., & Liu, X. (2022). The effect of lactoferrin in aging: Role and potential. *Food and Function*, *13*(2), 501–513. <https://doi.org/10.1039/d1fo02750f>
- Li, Y. Q., & Guo, C. (2021). A review on lactoferrin and central nervous system diseases. In *Cells* (Vol. 10, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/cells10071810>
- Liu, L., Kong, D., Xing, C., Zhang, X., Kuang, H., & Xu, C. (2014). Sandwich immunoassay for lactoferrin detection in milk powder. *Analytical Methods*, *6*(13), 4742–4745. <https://doi.org/10.1039/c4ay00321g>
- Loewa, A., Feng, J. J., & Hedtrich, S. (2023). Human disease models in drug development. *Nature Reviews Bioengineering*, *1*(8), 545–559. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00063-3>
- López-Romero, D., Barrios, C. A., Holgado, M., Laguna, M. F., & Casquel, R. (2010). High aspect-ratio SU-8 resist nano-pillar lattice by e-beam direct writing and its application for liquid trapping. *Microelectronic Engineering*, *87*(4), 663–667. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2009.09.007>
- Lumley, S. F., O'Donnell, D., Stoesser, N. E., Matthews, P. C., Howarth, A., Hatch, S. B., Marsden, B. D., Cox, S., James, T., Warren, F., Peck, L. J., Ritter, T. G., de Toledo, Z., Warren, L., Axten, D., Cornall, R. J., Jones, E. Y., Stuart, D. I., Screatton, G., ... Eyre, D. W. (2021). Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *New England Journal of Medicine*, *384*(6), 533–540. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2034545>
- Lyketsos, C. G., Carrillo, M. C., Ryan, J. M., Khachaturian, A. S., Trzepacz, P., Amatniek, J., Cedarbaum, J., Brashear, R., & Miller, D. S. (2011). Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, *7*(5), 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.05.2410>
- MacMullan, M. A., Chellamuthu, P., Mades, A., Das, S., Turner, F., Slepnev, V. I., & Ibrayeva, A. (2021). Detection of SARS-CoV-2 antibodies in oral fluid obtained using a rapid collection device. *Journal of Clinical Microbiology*, *59*(2), 1–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.02510-20>
- Masoudi, S., Zhong, L., Raftery, M. J., Stapleton, F. J., & Willcox, M. D. (2014). Method development for quantification of five tear proteins using selected reaction monitoring (SRM) mass spectrometry. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *55*(2), 767–775. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12777>

- Mastrangeli, M., & van den Eijnden-van Raaij, J. (2021). Organs-on-chip: The way forward. *Stem Cell Reports*, *16*(9), 2037–2043. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.06.015>
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications - A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, *6*(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T. P., & Wuttke, S. (2019). Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Advanced Materials*, *31*(32), 1–26. <https://doi.org/10.1002/adma.201901556>
- Mohamed, W. A., Salama, R. M., & Schaalán, M. F. (2019). A pilot study on the effect of lactoferrin on Alzheimer's disease pathological sequelae: Impact of the p-Akt/PTEN pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *111*(December 2018), 714–723. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.118>
- Monošík, R., Stredanský, M., & Šturdík, E. (2012). Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, *5*(1), 109–120. <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z>
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, *10*, 12871. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>
- Murillo, A. M. M., Tomé-Amat, J., Ramírez, Y., Garrido-Arandia, M., Valle, L. G., Hernández-Ramírez, G., Tramarin, L., Herreros, P., Santamaría, B., Díaz-Perales, A., & Holgado, M. (2021). Developing an Optical Interferometric Detection Method based biosensor for detecting specific SARS-CoV-2 immunoglobulins in Serum and Saliva, and their corresponding ELISA correlation. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *345*, 130394. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130394>
- Murillo, A. M. M., Valle, L. G., Ramírez, Y., Sánchez, M. J., Santamaría, B., Molina-Roldan, E., Ortega-Madueño, I., Urcelay, E., Tramarin, L., Herreros, P., Díaz-Perales, A., Garrido-Arandia, M., Tome-Amat, J., Hernández-Ramírez, G., Espinosa, R. L., Laguna, M. F., & Holgado, M. (2022). Integration of Multiple Interferometers in Highly Multiplexed Diagnostic KITS to Evaluate Several Biomarkers of COVID-19 in Serum. *Biosensors*, *12*(9), 671. <https://doi.org/10.3390/bios12090671>

- Oliveira, A. E. F., Pereira, A. C., Resende, M. A. C., & Ferreira, L. F. (2023). Gold Nanoparticles: A Didactic Step-by-Step of the Synthesis Using the Turkevich Method, Mechanisms, and Characterizations. *Analytica*, *4*(2), 250–263. <https://doi.org/10.3390/analytica4020020>
- Papaccio, F., García-Mico, B., Gimeno-Valiente, F., Cabeza-Segura, M., Gambardella, V., Gutiérrez-Bravo, M. F., Alfaro-Cervelló, C., Martínez-Ciarpaglini, C., Rentero-Garrido, P., Zúñiga-Trejos, S., Carbonell-Asins, J. A., Fleitas, T., Roselló, S., Huerta, M., Sánchez del Pino, M. M., Sabater, L., Roda, D., Tarazona, N., Cervantes, A., & Castillo, J. (2023). “Proteotranscriptomic analysis of advanced colorectal cancer patient derived organoids for drug sensitivity prediction.” *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *42*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02591-z>
- Pioz, M. J., Espinosa, R. L., Laguna, M. F., Santamaria, B., Murillo, A. M. M., Hueros, Á. L., Quintero, S., Tramarin, L., Valle, L. G., Herreros, P., Bellido, A., Casquel, R., & Holgado, M. (2022). A review of Optical Point-of-Care devices to Estimate the Technology Transfer of These Cutting-Edge Technologies. *Biosensors*, *12*(12), 1091. <https://doi.org/10.3390/bios12121091>
- Pisanic, N., Randad, P. R., Kruczynski, K., Manabe, Y. C., Thomas, D. L., Pekosz, A., Klein, S. L., Betenbaugh, M. J., Clarke, W. A., Laeyendecker, O., Caturegli, P. P., Larman, H. B., Detrick, B., Fairley, J. K., Sherman, A. C., Roupheal, N., Edupuganti, S., Granger, D. A., Granger, S. W., ... Heaney, D. (2020). COVID-19 Serology at Population Scale: SARS-CoV-2-Specific Antibody Responses in Saliva. *Journal of Clinical Microbiology*, *October*, 1–13.
- Post, N., Eddy, D., Huntley, C., van Schalkwyk, M. C. I., Shrotri, M., Leeman, D., Rigby, S., Williams, S. V., Bermingham, W. H., Kellam, P., Maher, J., Shields, A. M., Amirthalingam, G., Peacock, S. J., & Ismail, S. A. (2020). Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS ONE*, *15*(12), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244126>
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's and Dementia*, *9*(1), 63-75.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
- Ramanathan, K., Antognini, D., Combes, A., Paden, M., Zakhary, B., Ogino, M., Maclaren, G., & Brodie, D. (2020). Dynamics of SARS-CoV-2 neutralising

- antibody responses and duration of immunity: a longitudinal study. *Lancet Microbe*, *January*, 19–21.
- Ramesh, R., Chadha, T. S., Hadad, K., & Biswas, P. (2016). Perspective on nanoparticle technology for biomedical use. *Physiology & Behavior*, *176*(1), 139–148.
- Ramirez, J. C., Grajales García, D., Maldonado, J., & Fernández-Gavela, A. (2022). *Current Trends in Photonic Biosensors: Advances towards Multiplexed Integration*. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10100398>
- Rascón-Cruz, Q., Espinoza-Sánchez, E. A., Siqueiros-Cendón, T. S., Nakamura-Bencomo, S. I., Arévalo-Gallegos, S., & Iglesias-Figueroa, B. F. (2021). Lactoferrin: A glycoprotein involved in immunomodulation, anticancer, and antimicrobial processes. *Molecules*, *26*(1), 205.
- Ritchie, H., Ortiz-Ospina, E., Beltekian, D., Mathieu, E., Hasell, J., Macdonald, B., Giattino, C., & Roser, M. (2020). *Total COVID-19 tests per 1,000 people, Sep 28, 2020*. Global Change Data Lab. <https://ourworldindata.org/grapher/full-list-cumulative-total-tests-per-thousand-map?time=2020-02-20..latest®ion=Europe>
- Rodríguez-Lorenzo, L., Rafiee, S. D., Reis, C., Milosevic, A., Moore, T. L., Balog, S., Rothen-Rutishauser, B., Ruegg, C., & Petri-Fink, A. (2018). A rational and iterative process for targeted nanoparticle design and validation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *171*(January), 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.066>
- Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M. S., Paesano, R., & Valenti, P. (2017). Lactoferrin: A natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091985>
- Rostami, A., Sepidarkish, M., Leeflang, M. M. G., Riahi, S. M., Nourollahpour Shiadeh, M., Esfandyari, S., Mokdad, A. H., Hotez, P. J., & Gasser, R. B. (2021). SARS-CoV-2 seroprevalence worldwide: a systematic review and meta-analysis. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 27, Issue 3, pp. 331–340). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.10.020>
- Ruiz, A., Alpízar, A., Beola, L., Rubio, C., Gavilán, H., Marciello, M., Rodríguez-Ramiro, I., Ciordia, S., Morris, C. J., Del, M., & Morales, P. (2019). Understanding the Influence of a Bifunctional Polyethylene Glycol Derivative

- in Protein Corona Formation around Iron Oxide Nanoparticles. *Materials*. <https://doi.org/10.3390/ma12142218>
- Santamaría, B., Laguna, M. F., López-Romero, D., Hernandez, A. L., Sanza, F. J., Lavín, Á., Casquel, R., Maigler, M. V., Espinosa, R. L., & Holgado, M. (2017). Development towards Compact Nitrocellulose-Based Interferometric Biochips for Dry Eye MMP9 Label-Free In-Situ Diagnosis. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *17*(5), 1158. <https://doi.org/10.3390/s17051158>
- Santamaría, B., Lopez-Romero, D., López-Hernandez, A., Sanza, F. J., Lavín, Á., Casquel, R., Maigler, M. V., Laguna Heras, M.-F., & Holgado, M. (2018). *Development towards compact nitrocellulose interferometric biochips for dry eye diagnosis based on MMP9, S100A6 and CST4 biomarkers using a Point-of-Care device*. *1047424*(February), 76. <https://doi.org/10.1117/12.2288257>
- Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., Van Es, J. H., Van Den Brink, S., Van Houdt, W. J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P. D., & Clevers, H. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, *141*(5), 1762–1772. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>
- Scarabelli, L., Grzelczak, M., & Liz-marzán, L. M. (2013). Tuning Gold Nanorod Synthesis Through Pre-reduction with Salicylic Acid. *Chemistry of Materials*, *25*(21), 4232–4238. <https://doi.org/10.1021/cm402177b>
- Scheltens, P., Strooper, B. De, Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & Flier, W. M. Van Der. (2022). Alzheimer ' s disease. *The Lancet*, *397*(10284), 1577–1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4).
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 SUPPL. 2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Singh, A. K., Mittal, S., Das, M., Saharia, A., & Tiwari, M. (2023). Optical biosensors: a decade in review. In *Alexandria Engineering Journal* (Vol. 67, pp. 673–691). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.12.040>
- Sinjab, F., Liao, Z., & Notingher, I. (2019). Applications of Spatial Light Modulators in Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, *73*(7), 727–746. <https://doi.org/10.1177/0003702819834575>

- Slagle, K. M., & Ghosn, S. J. (1996). Immunoassays: Tools for Sensitive, Specific, and Accurate Test Results. *Laboratory Medicine*, *27*(3), 177–183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/labmed/27.3.177>
- Smit, W. L., van Tol, S., Wal, S. van der, van Vulpen, F., la Grouw, S., van Lelyveld, L., Limonard, G., Bossink, A., Godeke, G. J., Shrestha, S., Reimerink, J., Eggink, D., Reusken, C., Heron, M., & Thijsen, S. (2022). Heterologous Immune Responses of Serum IgG and Secretory IgA Against the Spike Protein of Endemic Coronaviruses During Severe COVID-19. *Frontiers in Immunology*, *13*(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.839367>
- Smith, D. A., & Germolec, D. R. (1999). Introduction to Immunology and Autoimmunity. *Environmental Health Perspectives*, *107*.
- Sterlin, D., Malaussena, A., & Gorochoy, G. (2021). IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 virus. *Medecine/Sciences*, *37*(11), 968–970. <https://doi.org/10.1051/medsci/2021154>
- Sündermann, F., Fernandez, M. P., & Morgan, R. O. (2016). An evolutionary roadmap to the microtubule-associated protein MAP Tau. *BMC Genomics*, *17*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2590-9>
- Tan, Y. H., Liu, M., Nolting, B., Go, J. G., Gervay-Hague, J., & Liu, G. (2008). A Nanoengineering Approach for Investigation and Regulation of Protein Immobilization. *ACS Nano*, *2*(11), 2374–2384. <https://doi.org/10.1021/nn800508f>
- Uskoković, V. (2012). Dynamic Light Scattering Based Microelectrophoresis: Main Prospects and Limitations. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *33*(12), 1762–1786. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.625523>
- Valle, L. G., Santamaría, B., Lavín, A., Laguna, M. F., Rodríguez-Lorenzo, L., Espiña, B., & Holgado, M. (2023). Developing an improved optical biosensing system based on gold nanoparticles acting as interferometric enhancers in Lactoferrin detection. *Analyst*, *148*(21), 5445–5455. <https://doi.org/10.1039/d3an01328f>
- Van De Wetering, M., Francies, H. E., Francis, J. M., Bounova, G., Iorio, F., Pronk, A., Van Houdt, W., Van Gorp, J., Taylor-Weiner, A., Kester, L., McLaren-Douglas, A., Blokker, J., Jaksani, S., Bartfeld, S., Volckman, R., Van Sluis, P., Li, V. S. W., Seepo, S., Sekhar Pdamallu, C., ... Clevers, H. (2015).

- Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*, 161(4), 933–945. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.053>
- Vocabulario Internacional de Metrología*. (2012). <https://doi.org/10.1021/ja01341a021>
- Vocka, M., Langer, D., Fryba, V., Petryl, J., Hanus, T., Kalousova, M., Zima, T., & Petruzela, L. (2019). Novel serum markers HSP60, CHI3L1, and IGFBP-2 in metastatic colorectal cancer. *Oncology Letters*, 18(6), 6284–6292. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10925>
- Yamada, K., Henares, T. G., Suzuki, K., & Citterio, D. (2015). Distance-Based Tear Lactoferrin Assay on Microfluidic Paper Device Using Interfacial Interactions on Surface-Modified Cellulose. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(44), 24864–24875. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b08124>
- Zhang, L., & Guo, H. (2020). Biomarkers of COVID-19 and technologies to combat SARS-CoV-2. *Advances in Biomarker Sciences and Technology*, 2, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.abst.2020.08.001>