



Universidad Autónoma  
de Madrid

Departamento de Física de la Materia Condensada  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid  
Programa en Física de la Materia Condensada, Nanociencia y Biofísica

# Desarrollo de Biosensores Nanomecánicos y Optoplasmónicos para la Detección Ultrasensible de Proteínas

Tesis para optar al grado de Doctor presentada por:

**Sergio García-López**

Dirigida por los Doctores:

**Francisco Javier Tamayo de Miguel**

**Priscila Kosaka Monteiro**

Tutelada por el Doctor:

**Julio Gómez Herrero**

Instituto de Micro y Nanotecnología  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Madrid, 2022

Este trabajo ha sido apoyado por el programa de investigación e innovación de la Unión Europea Horizon 2020 del European Research Council a través del proyecto Liquidmass (681275-LIQUIDMASS-ERC-CoG-2015), por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España a través del proyecto CELLTANGLE (RTI2018-099369-B-I00), por el proyecto de la Comunidad de Madrid iLUNG-CM (B2017/BMD-3884), por la Plataforma Telemática Interdisciplinar denominada Salud Global (PTI Salud Global) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) a través del proyecto Covid-19 (202050E156 - CSIC-COV19-035), por la fundación Fero (209376) y por la Asociación Elena Torres por la investigación contra el cáncer (201917019).

Agradecemos particularmente a los pacientes y al Biobanco del Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS (B.0000678) integrado en la Plataforma de Biobancos y Biomodelos del ISCIII y al Biobanco IBSP-CV (PT13/0010/0064) integrado en la Red Nacional de Biobancos y en la Red Valenciana de Biobancos su colaboración.

**© 2022**

**Sergio García-López**

Todos los derechos reservados / All rights reserved

A mi madre,  
a mi padre  
y a mi hermano

*“La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos, tarde o temprano, siempre se aplican”*

Severo Ochoa

## Agradecimientos

Es difícil resumir lo vivido en casi seis años en unas cuantas líneas.

Quiero agradecer a Javi y a Montse por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo. Aún recuerdo aquel 23 de diciembre de 2015 cuando conocí a Javi para entrevistarme, ese mismo día por la tarde recibí un email suyo dándome la bienvenida a su grupo.

A Priscila, gracias por enseñarme que la constancia, el esfuerzo y el trabajo duro no está reñido con las locuras, el reír, bailar y cantar. Gracias por tu “olfato” y aparecer en el momento adecuado antes de que hiciese algo mal. No solo me has ayudado y enseñado en lo profesional, sino también en lo personal; me has apoyado mucho en mis días buenos y, sobre todo, en los no tan buenos siempre has estado ahí tendiéndome la mano. Gracias.

Al resto de compañeros del grupo. Mi gallego preferido sin duda eres tú Óscar, me enseñaste a pedir un Licorca y desataste el reggaetonero que llevo dentro. Alberto, muchas gracias por resolverme todas las dudas para el depósito de la tesis (aún tengo en mente aquellos twerking sobre la silla). Gracias a Vero y a Álvaro, por aguantar todas las mañanas mi energía arrolladora y por ser mis BFF de despacho y junto con Carmen, soportarme el resto del día por escuchar mis películas. Al resto de personas; Edu, Joselo, Adri, Dani, Juan, Xavi, Alicia y Marina por el día a día en el laboratorio. A Carlos y a Roseli, por su compañía durante tantas horas en el laboratorio y todas las conversaciones locas. A Margarita, gracias en todo momento por tu ayuda desinteresada, “sin ti el barco se hunde”. A Ana, que, aunque hace tiempo que te fuiste a tierras gallegas, aún me acuerdo de las confidencias que compartíamos en el laboratorio de Química. A Carmen y a Joaquín, por esas comidas y esas cenas con vosotros que tanto echo de menos en Madrid, erais una gran compañía.

A mis compis de piso y sobre todo a María, han sido muchos años viviendo juntos, gracias por esas risas que nunca olvidaré y esas sesiones de psicología que tanto ayudaban. A mis mujersitas; María, como tu bien me dijiste “que gran descubrimiento el tuyo” y tu Raquel alimentas al 100% mi batería. A Cristina, Jesús y Pablo, mis moranginhos, gracias por cada risa y cada

situación que hemos vivido juntos. A Pelayo, gracias por aguantarme, enseñarme y aconsejarme. Eres un personal trainer de 100, pero eres más un verdadero amigo, ¡BRO!

A Fran, mi cohete, gracias por tu disponibilidad siempre para viajar de un sitio a otro, por aguantarme en mis días y hacerme reír. ¡Me encanta hacerte rabiar! Nunca pierdas esa sonrisa.

A mis Zamarros y en especial a Cristina por tus escuchas al otro lado del teléfono y por tu paciencia y tu sabiduría. A mis granadinos, Eli, Agus, Ana, Bea, Javi, Elena... echo de menos el Granero y también a vosotros.

A Rosa, por tenerte siempre que te he necesitado. A Laura, por poder contar contigo y estar al pie del cañón en todo momento.

A toda mi familia, y en especial a mis padres; Antonia y Francisco y a mi hermano Javier. Mamá y papá, sé que no os lo digo, pero estoy enormemente agradecido de teneros, gracias por apoyarme en cada decisión que doy, por cuidarme y protegerme y enseñarme los valores de la vida. Javi, mil gracias por ayudarme en la portada de esta tesis ☺. Os quiero a los tres.

A mis dos amores perrunos y negrunos; Milo y Nicki <3

Y a todas las personas que de una forma u otra han formado parte de mí en esta etapa, gracias a todos. Habéis sido la forma más bonita de escapar de la frustración que en ocasiones me ha generado esta tesis.

¡GRACIAS!

## Abreviaturas

**ACE2:** enzima convertidora de angiotensina 2

**AFM:** Atomic Force Microscope / microscopio de fuerzas atómicas

**AKT:** proteínas quinasa B

**ARNm:** ARN mensajero

**AuNPs:** nanopartículas de oro

**BSA:** albúmina de suero bovino

**CLIAs:** Chemiluminescence Immunoassays / inmunoensayos de quimioluminiscencia

**CTCs:** Células Tumorales Circulantes

**EDC:** N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato

**EIAs:** Enzyme Immunoassays / inmunoensayos enzimáticos

**ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

**ER:** Estrogen Receptor / receptor de estrógenos

**FBS:** suero bovino fetal

**FDA:** Food and Drug Administration / administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos

**FIAs:** Fluorescence Immunoassays / inmunoensayos de fluorescencia

**GDP:** guanosín difosfato

**GPTS:** (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano

**GTP:** guanosín trifosfato

**HER2:** receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

**HR:** hormona positivas

**IARC:** International Agency for Research on Cancer / Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer

**IL-11:** interleucina 11

**IUPAC:** International Union of Pure and Applied Chemistry

**LFA:** ensayos de flujo lateral

**LoD:** Limit of Detection/ límite de detección

**LSP:** Localized Surface Plasmon / plasmón de superficie localizado

**LSPR:** Localized Surface Plasmon Resonance/ resonancia de plasmón de superficie localizado

**MAPK:** proteínas quinasas activadas por mitógenos

**MES:** ácido 2-morfolino etano sulfónico

**MS:** Mass Spectrometry/ espectrometrías de masas

**NAAT:** Nucleic Acid Amplification Tests / pruebas de amplificación de ácido nucleico

**NaCl:** cloruro de sodio

**NaP:** fosfato de sodio

**NMSs:** Nanomechanical Systems/ sistemas nanomecánicos

**NTA:** N $\alpha$ N $\alpha$ -Bis(carboximetil)-L-lisina

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PBS:** Phosphate Buffer Saline / tampón fosfato salino

**PCR:** Polymerase Chain Reaction/ reacción en cadena de la polimerasa

**PEG:** polietilenglicol

**PI3K:** fosfatidilinositol-3-quinasa

**PIP2:** inositol 3, 4 difosfato

**PIP3:** fosfatidil inositol 3, 4, 5 trisfosfato

**POC:** Point Of Care / punto de atención

**PPD:** Plasma Proteome Database

**PR:** Progesterone Receptor / receptor de progesterona

**PSA:** Prostate-Specific Antigen/ Antígeno Prostático Específico

**PSD:** Position Sensitive Detection / Fotodetector Sensible a la Posición

**QCM:** Quartz Crystal Microbalance / microbalanza de cuarzo

**RAS:** Rat Sarcoma

**RBD:** dominio de unión al receptor

**RIA:** radioimmunoassay /  
radioinmunoensayos

**RT-PCR:** Reverse Transcription-  
Polymerase Chain Reaction

**SARS:** Severe Acute Respiratory  
Syndrome / síndrome respiratorio  
agudo grave

**SEM:** Scanning Electron  
Microscope / microscopio  
electrónico de barrido

**Ser473:** serina 473

**SERS:** Surface-Enhanced Raman  
Scattering/ espectrometría Raman  
de superficie

**SPR:** Surface Plasmon Resonance /  
resonancia de plasmón superficial

**TBS:** tampón tris salino

**TNBC:** Triple Negative Breast  
Cancer / cáncer de mama triple  
negativo

# Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1: Introducción .....</b>	<b>3</b>
1.1. Biosensores .....	5
1.1.1. Sensores mecánicos .....	7
1.1.1.1. Modos de operación de los sensores nanomecánicos .....	8
1.1.1.2. Sistemas de lectura empleados en los sensores nanomecánicos.	10
1.1.2. Sensores ópticos.....	12
1.1.2.1. Sensores ópticos no etiquetados .....	12
Método de resonancia de plasmón superficial (SPR) .....	12
Espectrometría Raman de superficie mejorada (SERS).....	13
Sensores colorimétricos basados en la agregación de nanopartículas..	13
1.1.2.2. Sensores ópticos etiquetados .....	14
Sensores ópticos basados en fluorescencia .....	14
Sensor optoplasmónico.....	15
1.2. Proteoma plasmático humano .....	16
1.2.1. ¿Por qué buscar proteínas? .....	17
1.2.2. Tecnologías actuales basadas en proteómica y su aplicación en la búsqueda de biomarcadores.....	18
1.2.3. Los desafíos en la exploración para el descubrimiento de biomarcadores .....	20
1.3. Detección de biomarcadores mediante biosensores nanomecánicos y optoplasmónicos .....	24
Bibliografía .....	27
<b>CAPÍTULO 2: Materiales y métodos .....</b>	<b>35</b>
2.1. Reactivos .....	37
2.2. Tampones y soluciones .....	37
2.3. Superficies de silicio .....	37
2.4. Biofuncionalización de las superficies de silicio .....	38
2.4.1. Limpieza y activación de las micropalanca y placas de silicio .....	39

2.4.2. Silanización y funcionalización de la superficie.....	39
2.4.3. Activación del grupo carboxilo .....	40
2.5. Inmovilización del anticuerpo de captura en la superficie de silicio ..	40
2.6. Bloqueo de la superficie .....	41
2.7. Conjugación del anticuerpo de detección a la nanopartícula de oro .	41
2.8. Inmunoensayo .....	43
Biliografía .....	45

**CAPÍTULO 3: Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido ..... 47**

3.1. Cáncer de mama .....	49
3.2. Diagnóstico del cáncer de mama .....	51
3.3. Patología y clasificación.....	52
3.4. Vía PI3K/AKT en cáncer de mama .....	54
3.5. Vía MAPK en el desarrollo del cáncer .....	56
3.6. Materiales y métodos .....	60
3.6.1. Células .....	60
3.6.2. Cultivos celulares.....	60
3.6.3. Muestras de pacientes con cáncer de mama.....	62
3.6.4. Preparación de células y análisis por Western Blot .....	64
3.6.5. Anticuerpos de captura y anticuerpos de detección usados .....	66
3.6.6. Inmunoensayo.....	67
3.7. Resultados y discusión .....	68
3.7.1. Métodos de transducción nanomecánica y optoplasmónica .....	68
3.7.2. Desarrollo y validación del nanosensor usando líneas celulares de cáncer de mama.....	74
3.7.3. Empleo del biosensor optoplasmónico utilizando muestras de suero de pacientes con cáncer de mama.....	82
3.8. Conclusiones.....	88
Bibliografía .....	89

**CAPÍTULO 4: Aplicación de un nanosensor optoplasmónico para la detección ultrasensible de proteínas de SARS-CoV-2 ..... 99**

4.1. SARS-CoV-2 y su origen .....	101
4.2. Estructura y genoma de SARS-CoV-2 .....	102
4.3. Ciclo de replicación de SARS-CoV-2 .....	104
4.4. Limitaciones de las técnicas actuales para el diagnóstico de SARS-CoV-2 y la necesidad del desarrollo de nuevas tecnologías .....	105
4.5. Materiales y métodos .....	110
4.5.1. Anticuerpos y proteínas usados en el inmunoensayo .....	110
4.5.2. Inmunoensayo.....	111
4.5.3. Sistema de la medida optoplasmónica de las superficies de silicio mediante AVAC .....	113
4.6. Resultados y discusión .....	113
4.6.1. Mecanismo optoplasmónico en placas de silicio con AVAC .....	113
4.6.2. Detección de las proteínas S1 y N.....	114
4.7. Conclusiones.....	122
Bibliografía .....	123
<b>APÉNDICE A: Detección de Interleucina 11 como biomarcador en enfermedades .....</b>	<b>131</b>
A.2. Materiales y métodos .....	134
A.2.1. Anticuerpos e IL-11 .....	134
A.2.2. Inmunoensayo .....	134
A. 3. Resultados.....	135
A.4. Conclusiones .....	137
Bibliografía .....	139
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>141</b>

## Resumen

La presente tesis doctoral titulada “Desarrollo de Biosensores Nanomecánicos y Optoplasmónicos para la Detección Ultrasensible de Proteínas” ha sido realizada en el laboratorio de Bionanomecánica del Instituto de Micro y Nanotecnología (IMN-CNM) perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) dirigida por el Profesor Doctor Francisco Javier Tamayo de Miguel y la Doctora Priscila Kosaka Monteiro (Instituto de Micro y Nanotecnología - CSIC) y bajo la tutela del Doctor Julio Gómez Herrero (Facultad de Ciencias, Departamento de Física de la Materia Condensada de la Universidad Autónoma de Madrid).

El principal objetivo de esta tesis doctoral ha sido el desarrollo de biosensores en los cuales, combinando dos tipos de transducciones; la transducción nanomecánica y la transducción optoplasmónica, se lleva a cabo la detección de proteínas. Para ello se ha estandarizado el protocolo para la funcionalización de micropalanca de silicio, el anclaje de anticuerpos a las mismas y la funcionalización de nanopartículas de oro de 100 nm con anticuerpos. Del mismo modo que las micropalanca, adaptando el protocolo según lo requería y haciendo uso de la transducción optoplasmónica, se han utilizado superficies de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> para su futura implementación en clínicas.

Esta tesis doctoral se divide en 4 capítulos y un apéndice A.

El primer capítulo consta de una introducción que abarca el estado del arte de los sensores utilizados en la detección de partículas biológicas, concretamente de los sensores nanomecánicos. Así mismo, se hace una revisión de las distintas técnicas empleadas en la actualidad para la detección de biomarcadores, haciendo hincapié en la importancia del desarrollo de nuevas tecnologías que sean capaces de descubrir nuevos marcadores que se encuentran en la parte desconocida del proteoma plasmático humano, como el uso de biosensores nanomecánicos y optoplasmónicos para el descubrimiento de dichas proteínas, para su utilización en enfermedades.

En el segundo capítulo se abordan los materiales y métodos empleados a lo largo de esta tesis doctoral. En dicho capítulo encontraremos los diferentes

reactivos, productos y equipos utilizados. Además de explicar con detalle en que consiste el proceso de funcionalización de las superficies de silicio para la realización del inmunoensayo en el proceso de bioreconocimiento.

El tercer capítulo se centra en el desarrollo y validez de un nanosensor híbrido para la detección de proteínas utilizando tres líneas celulares de cáncer de mama: MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231, siendo una línea sana, una tumoral y otra tumoral metastásica respectivamente. Así mismo, tras la validación del nanosensor, se utilizaron muestras de suero de pacientes con cáncer de mama como prueba de concepto en la detección de la proteína p-AKT (Ser473) y la mutación G13D en KRAS haciendo uso del nanosensor optoplasmónico.

Finalmente, en el último capítulo se aplican los métodos desarrollados a lo largo de la tesis utilizando superficies de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> para el desarrollo de un sensor optoplasmónico para la detección de las proteínas S1 y N del virus SARS-CoV-2 a concentraciones ultrabajas.

En el apéndice A se aborda la explicación del desarrollo del sensor optoplasmónico para la detección de la Interleucina 11 (IL-11) en suero.

# **CAPÍTULO 1: Introducción**

## 1.1. Biosensores

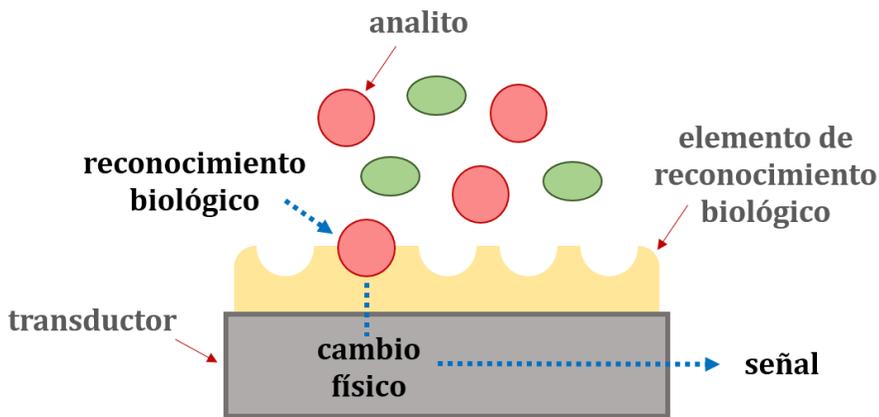
En las últimas décadas los biosensores han experimentado un crecimiento exponencial <sup>1</sup>. La historia de los biosensores es un claro ejemplo de como una simple y elegante idea puede fomentar un revolucionario avance en ciencia y tecnología, causando una gran influencia en todas las áreas de la vida como son la medicina, la farmacología, la agricultura, la seguridad nacional o la industria, entre otras, debido a su elevada capacidad para resolver un gran número de problemas y cambios que pueden ser aplicables a estos campos <sup>2</sup>.

El primer biosensor fue desarrollado por Clark y Lyons en 1962, al combinar un sensor electroquímico de oxígeno con la enzima glucosa oxidasa, demostrando la capacidad de medida cuantitativa de la glucosa en una solución <sup>3</sup>. Con el paso de los años y el avance en los estudios se fueron incluyendo elementos como anticuerpos, células y ácidos nucleicos y el término “electrodo enzimático” pasó a denominarse “biosensor” <sup>2</sup>.

Según la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) un biosensor es un dispositivo autónomo capaz de proveer información analítica específica, cuantitativa o semi-cuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con un transductor <sup>2</sup>, siendo su principal objetivo medir las propiedades de los componentes biológicos y sus interacciones en el dominio mecánico <sup>4-7</sup>.

Todos los biosensores están formados por dos componentes importantes. El primero de ellos es el elemento de reconocimiento biológico, que suelen ser macromoléculas tales como anticuerpos, antígenos, receptores enzimáticos o sistemas complejos, como por ejemplo una población de células bacterianas o células eucariotas, incluso tejidos de mamíferos o de plantas, los cuales se encuentran inmovilizados adecuadamente sobre el segundo elemento, el transductor. El primer elemento es el responsable de interactuar con el analito y generar una señal en forma de respuesta (entre las más estudiadas, destacan la hibridación de ácidos nucleicos y la interacción antígeno-anticuerpo). Esta señal es detectada por el transductor y es el encargado de transformar esta señal resultante de la interacción del analito con el elemento de bioreconocimiento en una señal que puede medirse y/o

cuantificarse. Dicha señal será procesada antes de ser mostrada usando un sistema de visualización electrónico (ordenador) <sup>1,8</sup>.



**Figura 1.1.** Esquema de los elementos que forman parte de un biosensor.

Los biosensores pueden ser clasificados basándose en la naturaleza de la señal de transducción en eléctricos, mecánicos y ópticos.

Entre los biosensores eléctricos, son los dispositivos electroquímicos los que tradicionalmente se han caracterizado más y recibido más atención, destacando el enorme potencial de estos dispositivos para ser incorporados a la práctica clínica <sup>9,10</sup>. Estos biosensores combinan la sensibilidad de los transductores electroquímicos con una elevada especificidad del proceso de reconocimiento biológico. Contienen un elemento de reconocimiento biológico que reacciona con el analito, produciendo una señal eléctrica relacionada con la concentración del mismo <sup>11</sup>. Suelen hacer uso de enzimas <sup>12,13</sup>, debido a la rápida catálisis de la reacción, la alta especificidad del sustrato y la estabilidad enzimática a largo plazo <sup>14</sup>. Sin embargo, muchas enzimas no consumen ni producen electrones, por lo que el transductor electroquímico no puede registrar de manera directa la reacción catalizada por las enzimas. Por esta razón, la disponibilidad de enzimas para el desarrollo de biosensores electroquímicos es limitada. Para resolver este inconveniente, se añade varias enzimas al elemento de bioreconocimiento del biosensor, mientras que solo es detectado el producto de una única reacción enzimática <sup>13</sup>. Algunas de estas enzimas catalizan las reacciones de analitos clínicamente importantes como

pueden ser la glucosa, el lactato, el colesterol, los aminoácidos, el urato, el piruvato, el glutamato o el alcohol, entre otros <sup>4</sup>.

A continuación, se detalla más acerca de los sensores mecánicos y de los sensores ópticos, que son los tipos de sensores usados en esta tesis doctoral.

### 1.1.1. Sensores mecánicos

Entre los sensores mecánicos, la microbalanza de cuarzo (QCM, *Quartz Crystal Microbalance*) es una de las técnicas mejor establecida <sup>15</sup>. Estos dispositivos se basan en resonadores de cristal de cuarzo piezoeléctrico, donde la medida de la frecuencia de resonancia es relacionada con el cambio de masa como consecuencia del proceso de reconocimiento del analito. Una clase de sensores mecánicos son los sistemas nanomecánicos (NMSs, *Nanomechanical Systems*) en los que al menos una de sus dimensiones se encuentra en la nanoescala y en los que las medidas de deformación y vibración se ven afectadas sensiblemente debido a la adsorción del analito sobre la superficie del mismo <sup>16</sup>. Arrays de ocho micropalanca o menos son utilizados por científicos a nivel mundial para aplicaciones que van desde la detección de gases hasta estudios de polímeros y de microbiología <sup>5</sup>.

La aparición del microscopio de fuerzas atómicas (AFM, *Atomic Force Microscope*) en 1986 <sup>17</sup> marca un importante suceso en el avance de la nanotecnología. Esta técnica consiste en una micropalanca que presenta en su extremo libre una punta cuyo funcionamiento se basa en la medida de la deflexión de la micropalanca cuando la punta de esta interacciona con una determinada muestra, pudiendo obtener la topografía de la superficie estudiada o medir fuerzas entre moléculas. Fue en 1994 <sup>18</sup>, cuando en el grupo de Thomas Thundat y colaboradores, del Oak Ridge National Laboratory (EEUU) empezaron a estudiar el comportamiento de las micropalanca de AFM como sensores físico – químicos, detectando cambios en la frecuencia de resonancia de las micropalanca a consecuencia de la masa añadida sobre la superficie de las mismas, originando nuevos campos de estudio en el ámbito de la nanotecnología, al poder emplear estas micropalanca para la detección

química y biológica de diferentes analitos. A partir de este momento aparecen numerosos estudios sobre el uso de las micropalanca como biosensores <sup>19</sup>.

En los últimos doce años, los sensores nanomecánicos han proporcionado importantes avances en la detección de biomoléculas y otras *targets* biológicas, en particular, la detección biológica de virus, antígenos, ADN y otras proteínas de gran interés <sup>20</sup>. Los biosensores nanomecánicos pueden ser usados para detectar la presencia o medir la concentración de una molécula en una solución, medir una propiedad física de la molécula, identificarla o clasificarla u observar, caracterizar o analizar un proceso biológico particular. Los experimentos con sensores nanomecánicos pueden ser diseñados para seguir una respuesta mecánica a tiempo real, o bien, las señales mecánicas pueden ser medidas antes y después de la incubación del sensor en la muestra para llevar a cabo una detección “*end-point*” de la biomolécula a detectar, siendo más práctica para aplicaciones clínicas, donde se necesita detectar la presencia de una biomolécula y determinar su concentración <sup>5</sup>, siendo esta última la empleada en la presente tesis doctoral.

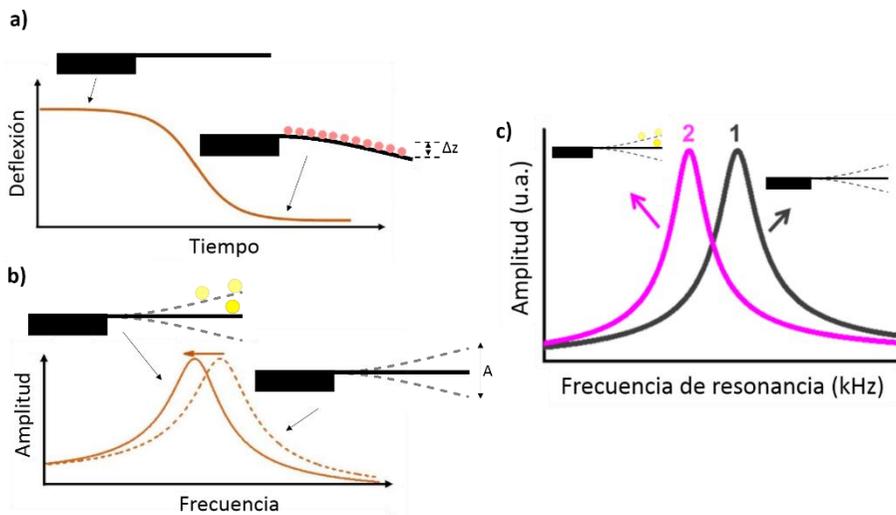
#### 1.1.1.1. Modos de operación de los sensores nanomecánicos

Los resonadores nanomecánicos pueden operar en dos modos: modo estático y modo dinámico, dependiendo de si es la deformación o la vibración del sistema nanomecánico la que se mide, respectivamente. En el modo estático (figura 1.2a), se origina una tensión diferencial entre las dos caras (superior e inferior) de la micropalanca, que origina una deflexión medible de la micropalanca ( $\Delta z$ ). El modo estático es usado para medir interacciones de biomoléculas en solución sobre la superficie del sensor. Además, también ha sido empleado para la detección de distintos tipos de analitos; siendo usado para la detección de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* y la resistencia a rifampicina <sup>21</sup>. También ha sido usado para la detección de diferentes tipos de antibióticos en suero, como es la oritavancina y la vancomicina usadas para el tratamiento de infecciones en la piel y la colitis, respectivamente <sup>22-24</sup>, para la detección y cuantificación de ADN <sup>25</sup>, para la detección de marcadores cardiacos como la creatina quinasa y la mioglobina para el diagnóstico precoz

de infarto agudo de miocardio <sup>26</sup> o la expresión de ARNm del gen 1-8U, un marcador potencial en la progresión del cáncer o en infecciones virales <sup>27</sup>. En cambio, el modo dinámico (figura 1.2b) mide las variaciones de la frecuencia de resonancia ( $f$ ), que viene dada por la ecuación:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (1.1)$$

siendo  $k$  la constante elástica y  $m$  la masa de la micropalanca. Dichas variaciones en la frecuencia de resonancia se deben al cambio de masa originado por la adsorción de cualquier elemento biológico sobre su superficie. El modo dinámico ha sido usado tradicionalmente como sensores de masa, operando de tal forma que cuando una biomolécula se deposita sobre el extremo libre de la micropalanca, la frecuencia de resonancia disminuye de manera proporcional a la ratio entre la masa añadida y la masa del sensor, es decir, la frecuencia disminuye de manera directamente proporcional a la masa añadida sobre la micropalanca (figura 1.2c).



**Figura 1.2. Representación esquemática de los distintos modos de operación de los sensores nanomecánicos en una micropalanca. a) modo estático. b) modo dinámico. c) esquema del efecto de la masa añadida sobre la superficie de la micropalanca.**

Aunque el uso de ambos modos de operación surge a mediados de los 90, en la actualidad el modo dinámico engloba el 80% de las investigaciones de

sensores para aplicaciones biológicas <sup>28</sup>, utilizando este cambio en la frecuencia de resonancia como una oportunidad para la identificación de biomoléculas.

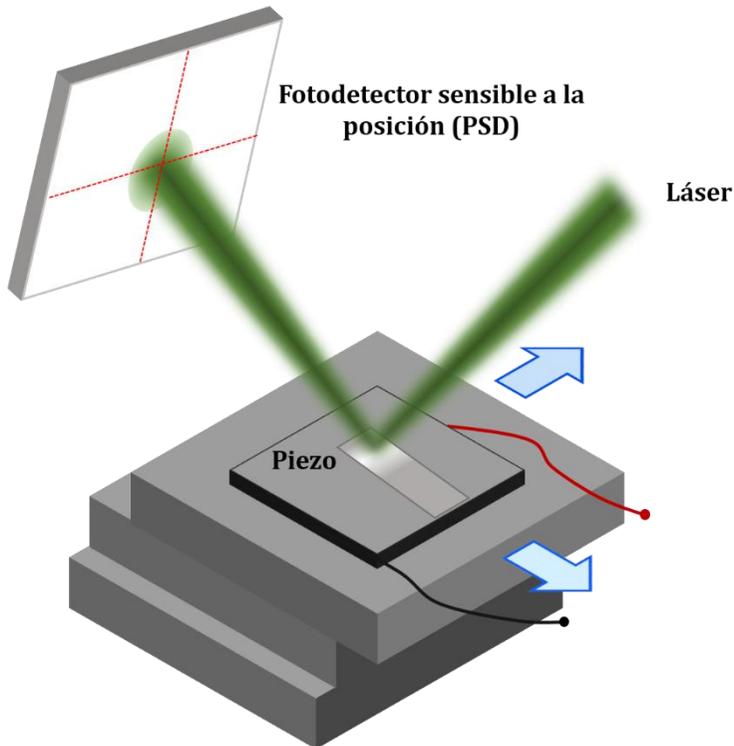
### 1.1.1.2. Sistemas de lectura empleados en los sensores nanomecánicos

Los sistemas de lectura deben de ser capaces de monitorizar el movimiento de la palanca a tiempo real y con resolución sub-nanométrica. Desplazamientos desde los angstroms hasta los cientos de nanómetros en los biosensores nanomecánicos pueden ser medidos por técnicas eléctricas y ópticas con una sensibilidad de al menos  $0.1 \text{ nm Hz}^{-1/2}$  <sup>4</sup>, clasificándose en sistemas de lectura eléctricos y ópticos.

Entre los métodos de lectura eléctricos, el más extendido es la detección piezoresistiva <sup>29,30</sup>, integrando un elemento piezoresistivo durante la fabricación del sistema nanomecánico, el cual se encuentra localizado cerca de la región fija de la micropalanca (soporte) <sup>31</sup>, midiendo el cambio de resistividad de un material debido a la deformación sufrida. El segundo más usado, son los métodos capacitivos, basados en la medida de la capacidad entre el sensor y un electrodo en paralelo <sup>32,33</sup>. Y los piezoeléctricos, que presentan una capa de material piezoeléctrico, que al doblarse la palanca se inducen cargas transitorias que son medidas <sup>34,35</sup>. Las técnicas de detección mediante métodos de lectura eléctricos conllevan una mayor complejidad en la fabricación y en la restricciones respecto al tamaño, geometría y materiales usados <sup>4</sup>.

El método de lectura más usado en los sensores nanomecánicos es el óptico <sup>36</sup>, debido a su facilidad para implementarlo en vacío, aire y líquidos (medio natural biológico). Este método se basa en la deflexión de un haz de luz sobre el extremo libre de la micropalanca por medio de un fotodetector sensible a la posición (PSD, *Position Sensitive Detection*) <sup>37</sup>. El fotodetector convierte la energía luminosa recibida en una señal eléctrica. Cuando la micropalanca vibra, el haz de luz que es reflejado por la superficie de la misma

e incide en el centro del fotodetector, se desplaza por la superficie de este provocando un cambio en la señal eléctrica que genera el fotodetector, permitiendo calcular la deflexión de la micropalanca. Este método se conoce como “*beam deflection technique*”.



**Figura 1.3.** Esquema de la técnica de medida de deflexión de haz con sistema de microposicionamiento para la medida de micropalancas.

En esta tesis doctoral se ha empleado este sistema de lectura haciendo uso de un láser el cual se enfoca en el extremo libre de la micropalanca. Mediante un fotodetector sensible a la posición se mide la desviación del haz reflejado como consecuencia de la vibración de la micropalanca. La señal eléctrica medida por el fotodetector permite la determinación de las coordenadas del haz reflejado en el fotodetector y por lo tanto la deflexión de la micropalanca. La micropalanca es impulsada por un actuador piezoeléctrico que se encuentra ubicado debajo de la base de arrays de micropalancas, permitiendo el desplazamiento del haz reflejado en las direcciones perpendicular y paralela de la micropalanca. La amplitud de vibración frente a la frecuencia se ajusta al

modelo de oscilador armónico para derivar la frecuencia de resonancia ( $f$ ) y el factor de calidad ( $Q$ ) de la micropalanca.

### 1.1.2. Sensores ópticos

Entre los biosensores ópticos podemos diferenciar entre los sensores ópticos no etiquetados, conocidos coloquialmente como “*label-free*” y los sensores ópticos etiquetados.

#### 1.1.2.1. Sensores ópticos no etiquetados

En los sensores ópticos no etiquetados, el analito no es marcado ni alterado por lo que es detectado en su estado natural, donde la señal detectada es generada directamente por la interacción del analito con el transductor. Mención especial se atribuyen a los biosensores plasmónicos, entre los que destacan el método de resonancia de plasmón superficial, SPR (*Surface Plasmon Resonance*) y la espectrometría Raman de superficie (SERS, *Surface-Enhanced Raman Scattering*). En los que los plasmones de superficie hace referencia a las oscilaciones colectivas de la nube de electrones en la superficie de un metal excitado por la radiación electromagnética incidente <sup>38</sup>.

##### **Método de resonancia de plasmón superficial (SPR)**

El método SPR es el método más popular entre los biosensores ópticos no etiquetados <sup>4,39</sup>, caracterizándose por su uso para medir la unión e interacción entre moléculas en tiempo real sin la utilización de marcadores <sup>40</sup>. Los desafíos de los métodos basados en SPR implican entre otros un alto poder de excitación, la toxicidad (exceptuando el oro) y el alto coste de fabricación <sup>38</sup>.

### **Espectrometría Raman de superficie mejorada (SERS)**

El descubrimiento de la SERS tuvo lugar en la década de los 70 <sup>41</sup>. Esta técnica se caracteriza debido a su potencial de adquirir imágenes volumétricas profundas y de alta resolución de los tejidos biológicos <sup>42</sup>. Sin embargo, presenta desafíos de toxicidad y poca estabilidad como consecuencia de la degradación enzimática <sup>43</sup>.

### **Sensores colorimétricos basados en la agregación de nanopartículas**

Los sensores colorimétricos pueden detectar la presencia de un compuesto particular a través del cambio de color fácilmente observado a simple vista o mediante un detector óptico <sup>44</sup>. Debido a su fácil uso, instrumentación sencilla (no se requiere equipos sofisticados) y bajo coste, son útiles en pruebas en el punto de atención (POC, *Point Of Care*) <sup>45-47</sup>.

Son las nanopartículas de oro (AuNPs) uno de los materiales más comunes y empleados en este tipo de biosensores debido a sus propiedades físico-químicas, ya que su color puede ser manipulado por partículas que se encuentren en una orientación agregada o no agregada <sup>48</sup>. La agregación de AuNPs induce una interacción y acoplamiento eléctrico dipolo-dipolo entre los plasmones de las partículas vecinas, causando un cambio de color de morado a azul. Desafortunadamente, los biosensores colorimétricos basados en la agregación de nanopartículas encuentran restringida su aplicación para el análisis de muestras reales como son las muestras de sangre; donde el color de la suspensión se vuelve incolora debido al asentamiento por el deseo intrínseco de las nanopartículas de agregarse en presencia de impurezas <sup>49</sup>.

Basándose en el principio de agregación de nanopartículas de oro, de la Rica *et al.*, desarrollaron una ELISA plasmónica para la detección ultrasensible de PSA y p24 en suero, alcanzando un límite de detección de 1 ag/mL <sup>50</sup>. Para el cual hacen uso de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), generando soluciones de nanopartículas de diferentes tonalidades. La acción biocatalítica de la catalasa, cuya concentración está relacionada con la concentración de analito debido a la especificidad del anticuerpo, disminuye la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favoreciendo la generación de una solución de nanopartículas de color azul. A

pesar del bajo límite de detección que logran, la señal colorimétrica puede ser medida únicamente entre 10 y 30 minutos después de la reacción, volviéndose inestable transcurrido dicho tiempo, lo que puede generar resultados falsos positivos, por ejemplo.

En las últimas dos décadas, el uso de nanopartículas de oro ha ganado mucha importancia en el campo de la nanomedicina y nanotecnología, haciéndolas válidas para aplicaciones médicas. Además, su comportamiento relativamente no tóxico hace que sean las nanopartículas metálicas más biocompatibles. Su gran área de superficie permite su conjugación con diferentes productos químicos, haciéndolas buenas candidatas para diferentes funciones terapéuticas en el diseño de nuevos biomateriales para la investigación de sistemas biológicos<sup>51,52</sup>.

### 1.1.2.2. Sensores ópticos etiquetados

#### **Sensores ópticos basados en fluorescencia**

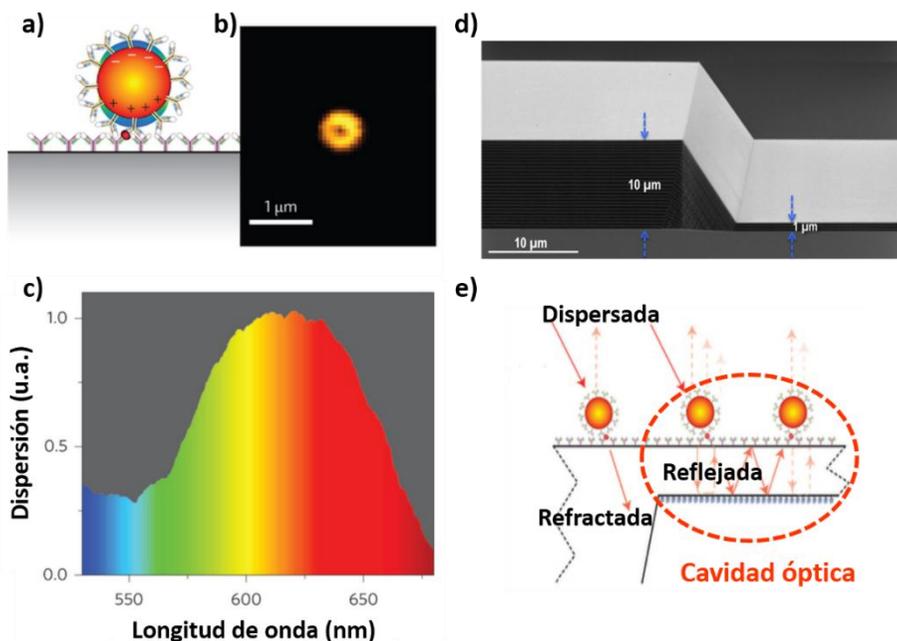
Los sensores ópticos basados en fluorescencia se caracterizan por el marcaje, que consiste en la modificación química del analito, usando fluorescencia, enzimas o radioisótopos<sup>53</sup>. En estos sensores la intensidad de la señal fluorescente indica la cantidad de analito unido, caracterizándose por su elevada sensibilidad. A pesar de ello la eficacia del marcaje puede variar de un fluoróforo a otro, provocando una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida por una determinada sustancia (*quenching*). En procesos en los que únicamente se hace uso de un fluoróforo no todas las moléculas reciben la misma cantidad de marcaje, como ocurre en el caso de la amplificación del ADN durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). En la cual uno de los nucleótidos es reemplazado por uno marcado, sin embargo, no todas las moléculas de ADN estarán marcadas con un solo fluoróforo, sino que algunas no estarán marcadas con ninguno y otras con más de uno<sup>54</sup>. Además, el uso de fluoróforos se ve minimizado por su fácil degradación, tratándose de procesos costosos y laboriosos, que alteran la función de la biomolécula marcada y las características de las interacciones proteína-ligando<sup>55,56</sup>.

### **Sensor optoplasmónico**

Las nanopartículas de oro esféricas presentan un rango de colores (por ejemplo: marrón, naranja, rojo y morado) en soluciones acuosas a medida que aumenta su tamaño de 1 a 100 nm, mostrando un pico de absorción relativo a su tamaño. Esta absorción se debe a la oscilación colectiva de los electrones de conducción de la nanopartícula como consecuencia de la excitación de los fotones incidentes <sup>57</sup>. Una de las propiedades físicas más importantes de las nanopartículas de oro es definida por el plasmón de superficie localizado (LSP, *Localized Surface Plasmon*). Tanto la intensidad y la posición del LSP depende del tamaño, forma y composición de la nanoestructura metálica <sup>58</sup>. Cuando un LSP está confinado en una nanopartícula y las dimensiones de ésta son menores que la longitud de onda de la luz que incide sobre la misma se origina el fenómeno óptico resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR, *Localized Surface Plasmon Resonance*) <sup>59</sup> generando oscilaciones colectivas de los electrones de superficie de la nanopartícula <sup>60</sup>.

Recientemente Kosaka *et al.*, <sup>61</sup> desarrollaron un nuevo método de detección optoplasmónico alcanzando una gran sensibilidad. El mecanismo del método basado en la lectura optoplasmónica se encuentra recogido en la figura 1.4. Esta técnica detecta la amplificación del LSPR de las nanopartículas de oro causada por su plasmón de superficie localizado, pudiendo visualizar nanopartículas de oro con un microscopio óptico en el modo campo oscuro. En la figura 1.4c, se muestra el análisis espectral de la luz dispersada por una sólo nanopartícula de oro, la cual tiene su pico máximo en una longitud de onda de 620 nm, lo que hace característico el color anaranjado que se puede observar en la figura 1.4b. En este método de detección la micropalanca funciona como una cavidad óptica <sup>62</sup> en donde las dos superficies de la micropalanca que actúan como espejos semi-transparentes aumentan la reflectividad de la micropalanca para determinadas longitudes de onda. Cuando una nanopartícula se encuentra en la superficie de la micropalanca (cavidad óptica), los modos de la cavidad óptica se acoplan con los modos del LSPR de la nanopartícula de oro de 100 nm formando un modo súper híbrido cavidad-plasmón que causará una resolución espectral mejorada de la nanopartícula y un aumento de la dispersión de la nanopartícula por la cavidad óptica. Gracias a estos dos fenómenos, el sensor optoplasmónico es capaz de

detectar cantidades mínimas de analito en la muestra alcanzando límites de detección en el rango del ag/mL. Este método, junto a la transducción nanomecánica, serán empleados en el desarrollo de esta tesis.



**Figura 1.4. Plasmon de resonancia de la nanopartícula de oro y cavidad óptica de la micropalanca.** **a)** esquema de las oscilaciones colectivas de los electrones de conducción de la nanopartícula de oro. **b)** imagen óptica en campo oscuro de una nanopartícula de oro de 100 nm de diámetro tras el inmunoensayo. **c)** espectro de dispersión correspondiente a un área de 40 μm de diámetro que contiene una única nanopartícula de oro. **d)** imagen en SEM del perfil de una micropalanca donde se aprecia el grosor de la zona del soporte (10 μm) y el grosor de la micropalanca (1 μm). **e)** esquema de las múltiples vías de la dispersión de la luz generada en la cavidad óptica debido a las nanopartículas de oro que se encuentran sobre la superficie de la micropalanca <sup>61</sup>.

## 1.2. Proteoma plasmático humano

Cada célula del cuerpo deja un registro de su estado fisiológico en los productos que vierte a la sangre. La composición de proteínas en sangre contiene información de todos los órganos por contacto a través de una red de arterias, venas y capilares. Los patrones de expresión de proteínas

plasmáticas pueden ofrecer una imagen clara del estado de salud de un individuo. El proteoma plasmático representa el proteoma más completo para la detección precoz de enfermedades fatales, por ese motivo, muchos grupos de investigación están trabajando en el desarrollo de nuevas tecnologías para el descubrimiento de nuevas proteínas que puedan ser usadas como posibles firmas inequívocas del desarrollo de una patología. En 1998, el National Institute of Health Biomarkers Definitions Working Group definió biomarcador como una característica que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal o patogénico, o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica <sup>63</sup>.

La amplitud del proteoma plasmático humano, junto a su fácil acceso y recolección simple, hace que el plasma sea el fluido corporal de elección para futuras pruebas de detección temprana de enfermedades. Sin embargo, la caracterización del proteoma plasmático humano es un gran desafío debido al gran contenido de proteínas altamente abundantes que dominan su contenido, dificultando así el descubrimiento de proteínas poco abundantes. Por lo tanto, la exploración de la región más profunda del proteoma plasmático donde se encuentran las proteínas aún por descubrir, es un bien de información diagnóstica lista para ser explorada por herramientas ultrasensibles basadas en la nanotecnología.

### 1.2.1. ¿Por qué buscar proteínas?

Existen alrededor de 19.000 genes que codifican aproximadamente 30.000 proteínas <sup>64</sup>, de las cuales 2.200 pasan al torrente sanguíneo, donde los patrones de expresión de proteínas plasmáticas informan de múltiples procesos como diferentes estados de salud, riesgo de enfermedades futuras y comportamientos en el estilo de vida <sup>65</sup>.

Las proteínas son los efectores primarios de la función biológica, siendo fundamental el conocimiento completo de su estructura y propiedades en la investigación básica y traslacional. Dicho conocimiento es un pilar para todos los complejos biológicos y las redes que controlan la biología, sin embargo, sigue siendo en gran parte desconocido <sup>66</sup>, por lo que es importante poder

completar la información genética sobre el cáncer con el estudio del contenido proteico del genoma, conocido como proteoma. En comparación con los ácidos nucleicos, las proteínas reflejan con mayor precisión el estado fisiológico de las células y de los tejidos, revelando las claves de los elementos que afectan el desarrollo, progresión y respuesta terapéutica de la enfermedad <sup>67</sup>.

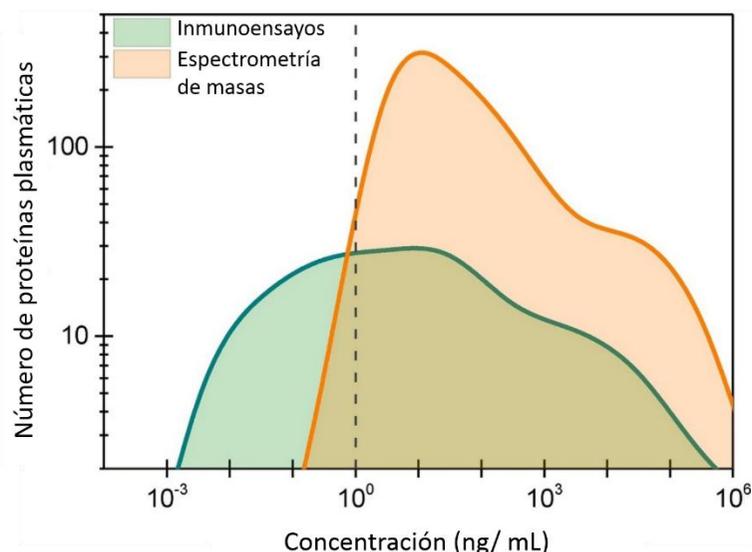
A diferencia del ADN, que está sujeto a una forma importante de modificación (metilación), las proteínas son estructuras más complejas que sufren varios tipos de modificaciones postraduccionales (cambio químico de la proteína después de su síntesis por los ribosomas), como la fosforilación, acetilación, glicosilación o escisión <sup>68</sup> que desempeñan un papel fundamental en la función de las proteínas y pueden ocasionar un cambio funcional que afecte al desarrollo, progresión y respuesta terapéutica de la enfermedad.

En el caso de enfermedades infecciosas, el ARN es muy propenso a sufrir mutaciones debido a la naturaleza de la retrotranscriptasa viral, originando como consecuencia una rápida generación de nuevas e impredecibles mutaciones virales <sup>69</sup>; lo que hace que el desarrollo de ensayos basados en la amplificación de ácidos nucleicos que detecte todas las variantes del virus sea un desafío. Así, las proteínas virales que son en promedio cinco veces más estables que el ARNm (ARN mensajero) y más abundantes en la partícula viral, surgen como un biomarcador muy atractivo para la detección fiable y específica de infecciones virales.

### 1.2.2. Tecnologías actuales basadas en proteómica y su aplicación en la búsqueda de biomarcadores

Las tecnologías en proteómica encargadas de la detección de proteínas pueden ser divididas en dos clases: tecnologías basadas en espectrometrías de masas (*MS, Mass Spectrometry*) y las basadas en inmunoensayos, como los ELISA, las cuales se han desarrollado durante los últimos años con mejoras en sus límites de detección (*LoD, Limit of Detection*). Como se observa en la figura 1.5, las tecnologías basadas en espectrometría de masas son las más

dominantes en el descubrimiento de proteínas plasmáticas, aunque el número de proteínas detectadas mediante esta tecnología disminuye por debajo de concentraciones del ng/mL. En cambio, proteínas cercanas al pg/mL pueden llegar a ser detectadas mediante inmunoensayos, en el mejor de los casos.



**Figura 1.5. Contribución de dos tecnologías en proteómica para la cuantificación de proteínas plasmáticas.** <http://plasmaproteomedatabase.org/index.html>

Actualmente, los ensayos utilizados para el análisis de muestras de suero y plasma incluyen radioinmunoensayos (RIA, *radioimmunoassay*)<sup>70</sup>, inmunoensayos enzimáticos (EIAs, *enzyme immunoassays*)<sup>71</sup>, inmunoensayos de fluorescencia (FIAs, *fluorescence immunoassays*)<sup>72</sup> e inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA, *chemiluminescence immunoassays*)<sup>73</sup>. Entre todos estos, la técnica más común y utilizada para la medida de la concentración de proteínas en plasma es la ya nombrada anteriormente ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)<sup>74,75</sup> que es un tipo de EIA. En esta técnica el antígeno es detectado mediante un anticuerpo que se encuentra enlazado a una enzima, generando un producto detectable como es un cambio de color que es usado como señal de detección<sup>76</sup>. Esta técnica presenta una elevada especificidad y sensibilidad, cuyo límite de detección depende del antígeno, oscilando desde 0.001 a 0.1 ng/mL<sup>68</sup>.

A parte de las tecnologías basadas en proteómica, otra de las técnicas más comunes usadas en los laboratorios es el western blot <sup>77</sup>. Es una herramienta analítica para identificar una proteína de interés en una muestra biológica completa. Es usado como método semicuantitativo para determinar y comparar la expresión de proteínas específicas en células y tejidos <sup>78</sup>, pudiendo llegar a detectar niveles de proteína en picogramos en una muestra <sup>79</sup>. Aunque el western blot también puede ser utilizado para la cuantificación absoluta <sup>80</sup>, esto requiere de una curva patrón de la proteína purificada a detectar. En este caso la proteína debe de encontrarse en nuestro homogeneizado dentro del rango de la curva patrón, por lo que dicha técnica es raramente usada para la cuantificación absoluta <sup>81</sup>. Sin embargo, varios descubrimientos recientes sugieren que las transferencias de western podrían no ser tan fiables como se suponía anteriormente. Por ejemplo, proteínas pequeñas (< 10 kDa) podrían no ser retenidas por la membrana, mientras que proteínas de alto peso molecular (> 140 kDa) podrían no ser transferidas a la membrana en el proceso de transferencia <sup>81</sup>.

### 1.2.3. Los desafíos en la exploración para el descubrimiento de biomarcadores

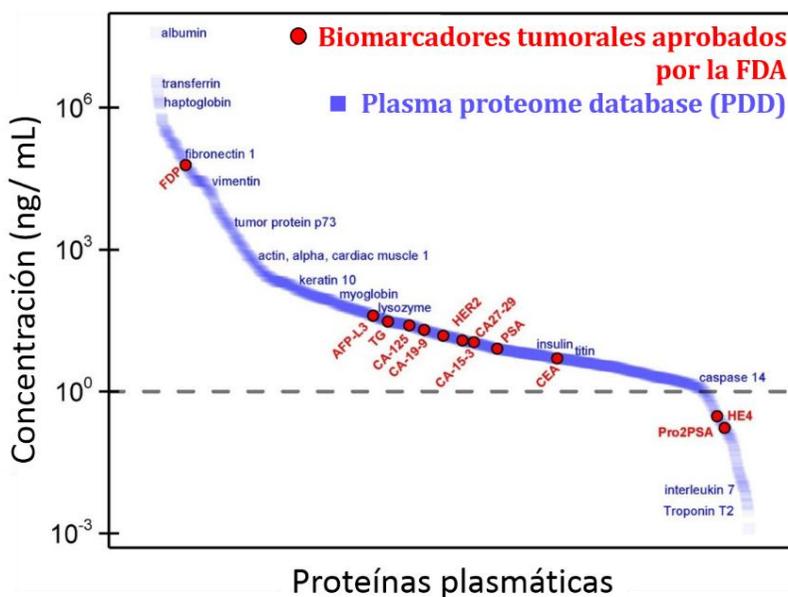
El hecho de que las proteínas derivadas de los tumores se encuentren a concentraciones mayores en zonas cercanas al tumor, podría suponer una gran ventaja para las tecnologías que existen en la actualidad, las cuales detectarían estas proteínas en los tejidos tumorales y en los fluidos próximos al tumor. Sin embargo, este hecho no es del todo aceptado y no garantiza el descubrimiento de biomarcadores en estadios iniciales que puedan ser detectados con un análisis de sangre. Las proteínas de un tumor, pueden estar en circulación, asociadas con otras proteínas o sujetas a modificaciones postraduccionales. En ocasiones ocurre que los niveles de proteínas en el tejido tumoral pueden no correlacionarse con su concentración en sangre; como ocurre con el Antígeno Prostático Específico (PSA, *Prostate-Specific Antigen*). Aunque la transcripción del gen está regulada negativamente en el cáncer de próstata, los niveles de PSA en sangre aumentan en los estadios

iniciales de la enfermedad (de 0.5-2 ng/mL a 4-10 ng/mL) debido a la destrucción del tejido tisular <sup>68</sup>. Por todo ello, los biomarcadores de cáncer pueden no ser los mismos en etapas iniciales de la enfermedad que en etapas más avanzadas, donde la mayoría de las biopsias son realizadas, lo que conlleva técnicas más invasivas para el paciente, en comparación con un simple análisis de sangre.

A pesar del gran esfuerzo derivado de las últimas dos décadas, solo algunos biomarcadores han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) para análisis de sangre <sup>82,83</sup>, aunque muchos de estos biomarcadores aprobados por la FDA no son exitosos en la detección temprana del cáncer <sup>84</sup>. Esto, sumado a la baja reproducibilidad, baja sensibilidad analítica de las tecnologías basadas en proteómica, la falta en la calidad de las muestras y la mala interpretación de los grandes datos generados en proteómica por parte de las herramientas bioinformáticas <sup>85</sup>, lleva a que no se avance en el descubrimiento de nuevos biomarcadores para la detección temprana y que los que son propuestos se desechen cuando son testados para su uso clínico. Además, la detección de proteínas a bajas concentraciones las cuales coexisten con otras en una mezcla compleja, plantea la resolución de problemas como la adsorción no específica, el ruido biológico y el límite de difusión <sup>86,87</sup>.

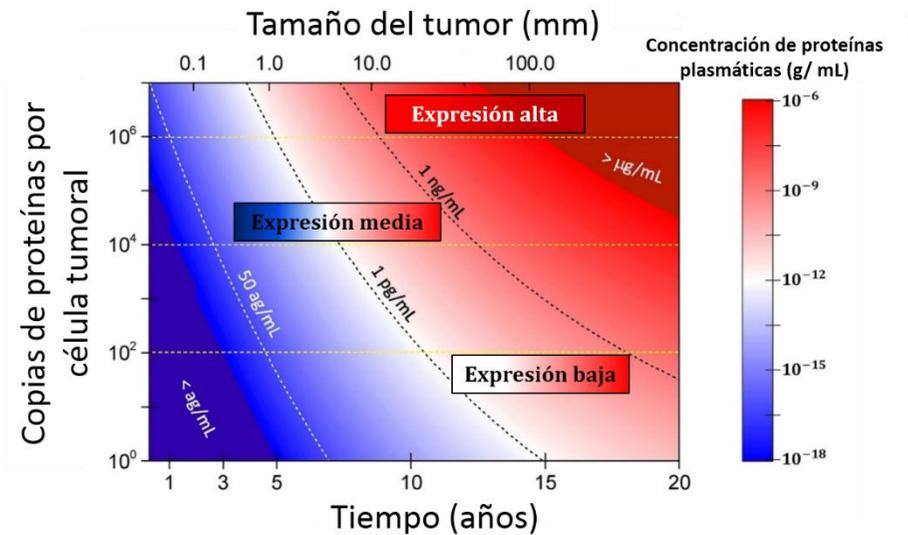
Debido a la baja concentración de proteínas (< 1 pg/mL) que derivan de los tumores en los estadios iniciales y que circulan por el torrente sanguíneo, las actuales tecnologías en proteómica no son capaces de identificar y detectar proteínas en sangre por debajo de este rango (pg/mL), dada la competencia de una mezcla de más de 10.000 proteínas algunas de ellas con órdenes de magnitud once veces mayor, donde probablemente se encuentren las proteínas que puedan ser usadas como futuros biomarcadores de cáncer para la detección precoz de la enfermedad y el cribado de la población <sup>68</sup>. En la actualidad, aproximadamente el 99% del plasma contiene proteínas muy abundantes entre las que se encuentran la albúmina (55%), inmunoglobulinas, transferrinas y haptoglobinas <sup>88,89</sup>. La concentración de proteínas más abundantes en el plasma abarca desde los 10 µg/mL hasta los 10 mg/mL aproximadamente. En el 1% restante existen más de 10.000 proteínas, en las

que se incluyen las proteínas derivadas de tejidos (como los biomarcadores usados en clínica) en el rango de los ng/mL y las citoquinas e interleuquinas por debajo del pg/mL. Según el *Plasma Proteome Database* (PPD) son 1.278 las proteínas cuya concentración es conocida (<http://www.plasmaproteomedatabase.org/>). En la figura 1.6, se observa como aumenta el número de proteínas identificadas cercanas a 1 ng/mL, mientras que por debajo de esta concentración el número de proteínas conocidas disminuye drásticamente.



**Figura 1.6. Concentración de los biomarcadores tumorales aprobados por la FDA.** Modificado de P. M. Kosaka *et al.*, 2018 <sup>68</sup>.

En la figura 1.7, se estiman los niveles de proteína en sangre en función del tamaño del tumor, el tiempo transcurrido después de la génesis de la célula tumoral inicial y el número de copias de proteínas por célula. Para este modelo matemático, asumen una proteína con un peso molecular de 44 kDa (media en células de mamíferos), tomando el crecimiento del tumor según la función de Gompertz; que ha descrito con éxito el crecimiento de tumores sólidos <sup>90,91</sup>.



**Figura 1.7.** Representación del modelo matemático de la concentración de proteínas plasmáticas secretadas por el tumor en función del tiempo y cantidad de proteínas en las células tumorales. Modificado de P. M. Kosaka *et al.*, 2018<sup>68</sup>.

Como se observa en la figura 1.7, el tumor alcanza un tamaño de unos 20 mm en unos 10 años desde su inicio. Conociendo que las técnicas actuales, como son la espectrometría de masas y los inmunoensayos, tienen un límite de detección en 1 ng/mL y 1 pg/mL respectivamente, con este modelo podemos observar que si la concentración de las proteínas es alta ( $< 10^6$  copias), el tumor podría ser detectado con un tamaño de unos 12 mm a los 9 años de su inicio mediante espectrometría de masas y con un tamaño de 1 mm después de haber transcurrido 5 años desde su inicio mediante inmunoensayos. En el caso de proteínas con una expresión intermedia, el tumor sería detectado por espectrometría de masas e inmunoensayos con un tamaño de 50 mm y 5 mm, doce años y medio y siete años y medio después de su inicio, respectivamente. En cambio, cuando la expresión de las proteínas es baja (100 copias por célula) el tumor podría ser detectado únicamente por inmunoensayos, pero con el hándicap de haber transcurrido 10 años después del inicio de su formación.

### 1.3. Detección de biomarcadores mediante biosensores nanomecánicos y optoplasmónicos

Inmunoensayos basados en sensores nanomecánicos y optoplasmónicos han mostrado una gran sensibilidad en la detección de proteínas a bajas concentraciones en el orden de 50 ag/mL<sup>61,92</sup>. Para este caso, en el que el límite de detección se encuentra en los 50 ag/mL, según el modelo explicado anteriormente (figura 1.7), las proteínas secretadas por el tumor a una concentración alta, media y baja podrían ser detectadas cuando el tumor tiene un tamaño de 50, 200 y 800  $\mu\text{m}$  respectivamente, no llegando a los cinco años desde que se originó la formación del tumor. En este punto, muchos cánceres podrían ser tratados de forma personalizada en función de la evolución de la respuesta del paciente y curados de forma eficaz.

Debido a que los biomarcadores de proteínas aprobados actualmente en clínica se encuentran en el plasma a concentraciones de ng/mL, es clara la exigencia por el desarrollo de técnicas ultrasensibles capaces de explorar la profundidad del proteoma plasmático humano. La combinación de distintas disciplinas puede llegar a albergar hitos que eran desconocidos, por ello, la aplicación de biosensores nanomecánicos y optoplasmónicos debido a su gran potencial como herramienta para la detección de proteínas en plasma cuya concentración se encuentre por debajo del rango de pg/mL y que puedan ser usadas como futuros biomarcadores de cáncer, han demostrado un gran interés en la comunidad biomédica<sup>93</sup>, donde la detección de biomarcadores, células tumorales circulantes (CTCs) o vesículas derivadas del tumor (como por ejemplo los exomas) que son liberados en estadios tempranos desde el tumor al torrente sanguíneo, permitirían un cambio drástico en los porcentajes de mortalidad y morbilidad de la enfermedad<sup>94</sup>, siendo una buena idea para cubrir las carencias en los límites de detección de las tecnologías actuales.

En la presente tesis doctoral se han utilizado matrices de silicio con ocho micropalancas actuando cada una de ellas como resonadores nanomecánicos y nanopartículas de oro de 100 nm de diámetro que actúan como señal optoplasmónica para el desarrollo de un nanobiosensor híbrido para la

detección de biomoléculas. Las cavidades ópticas presentes en las micropalanca junto con las nanopartículas de oro desempeñan un importante papel en la detección de proteínas a bajas concentraciones. La tecnología utilizada en esta tesis se basa en el inmunoensayo nanomecánico y optoplasmónico en formato sándwich desarrollado en el grupo de Bionanomecánica en el año 2014 <sup>61</sup>. Este método opera en el modo dinámico (ver apartado “1.1.1.1. Modos de operación de los sensores nanomecánicos”). La superficie de la micropalanca es funcionalizada (ver “capítulo 2: materiales y métodos”), para posteriormente inmovilizar un anticuerpo de captura, gracias al cual se captura la proteína objeto de estudio. A continuación, la matriz de ocho micropalanca es incubada en una solución con un anticuerpo de detección anclado a nanopartículas de oro.

La inmovilización de bioreceptores en la superficie de un sensor, es un papel fundamental en los procesos de detección, dedicándose enormes esfuerzos a la formulación de nuevas estrategias de biofuncionalización <sup>95,96</sup>. Una buena inmovilización debería asegurar una eficiente cobertura entre la superficie del sensor con los bioreceptores, manteniendo sus propiedades naturales. En lo que se refiere al diagnóstico clínico, es necesario una superficie bien definida con las biomoléculas para prevenir adsorciones no específicas mientras que se lleva a cabo el proceso de bioreconocimiento de una muestra compleja, siendo siempre la activación química de la superficie del sensor un paso necesario previo a la inmovilización.

La viabilidad de inmovilizar anticuerpos en una matriz con el fin de capturar y analizar antígenos fue demostrada por primera vez a finales de los 90 <sup>97,98</sup>. El uso de una capa de biorreconocimiento con alta eficiencia de captura junto con los modos de transducción nanomecánica y optoplasmónica lleva a una elevada especificidad y sensibilidad para la detección de proteínas a bajas concentraciones.

Para el capítulo 4 y el apéndice A de esta tesis doctoral, el uso de arrays de ocho micropalanca de silicio fue sustituido por placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup>. Este cambio está fundamentado en la dificultad del manejo de los arrays de ocho micropalanca debido a su pequeño tamaño, ya que pueden romperse mientras se están manipulando lo que lleva a una pérdida de datos. Además,

el amplio tiempo consumido debido a las medidas realizadas, al tratamiento de datos y el hecho de únicamente poder desarrollar unos 8 o 16 arrays por semana también enfatizan este cambio.

Con el uso de placas de silicio, la alta reproducibilidad y la baja variabilidad del ensayo las hacen idóneas para poder ser empleadas en estudios clínicos y en el campo de la investigación de uso clínico. La necesidad que surge a través de poder medir varias muestras en un mismo ensayo o un panel de diferentes biomarcadores aborda también la utilización de placas de silicio. En este caso, con la utilización de placas de silicio hemos llegado a desarrollar 48 o 96 muestras en una semana, a diferencia de lo que ocurre con el uso de arrays de ocho micropalancas. Para estos ensayos únicamente hicimos uso del método de transducción optoplasmónico, ya que como veremos más adelante es más sensible que el método de transducción nanomecánica, no interfiriendo en el límite de detección alcanzado. Haciendo uso de un sistema denominado AVAC, realizamos las medidas de manera automatizada (en el capítulo 4, en el apartado “4.6.1. Mecanismo optoplasmónico en placas de silicio con AVAC” se detalla más acerca del funcionamiento de AVAC), disminuyendo los posibles errores humanos.

## Bibliografía

1. Chakraborty, M. & Hashmi, M. S. J. An Overview of Biosensors and Devices. *Ref. Modul. Mater. Sci. Mater. Eng.* 1–24 (2017). doi:10.1016/b978-0-12-803581-8.10316-9
2. Kirsch, J., Siltanen, C., Zhou, Q., Revzin, A. & Simonian, A. Biosensor technology: Recent advances in threat agent detection and medicine. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 8733–8768 (2013).
3. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 29–45 (1962).
4. Tamayo, J., Kosaka, P. M., Ruz, J. J., Paulo, Á. S. & Calleja, M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 1287–1311 (2013).
5. Calleja, M., Kosaka, P. M., San Paulo, Á. & Tamayo, J. Challenges for nanomechanical sensors in biological detection. *Nanoscale* **4**, 4925–4938 (2012).
6. Buchapudi, K. R., Huang, X., Yang, X., Ji, H. F. & Thundat, T. Microcantilever biosensors for chemicals and bioorganisms. *Analyst* **136**, 1539–1556 (2011).
7. Eom, K., Park, H. S., Yoon, D. S. & Kwon, T. Nanomechanical resonators and their applications in biological/chemical detection: Nanomechanics principles. *Phys. Rep.* **503**, 115–163 (2011).
8. Parkhey, P. & Mohan, S. V. *Biosensing Applications of Microbial Fuel Cell. Microbial Electrochemical Technology* (Elsevier B.V., 2019). doi:10.1016/b978-0-444-64052-9.00040-6
9. Wang, J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis* **17**, 7–14 (2005).
10. Mathew, D. G. *et al.* Electrochemical Detection of Tumor-Derived Extracellular Vesicles on Nanointerdigitated Electrodes. *Nano Lett.* **20**, 820–828 (2020).
11. Ronkainen, N. J., Halsall, H. B. & Heineman, W. R. Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1747–1763 (2010).
12. Liu, C. *et al.* Enzyme Biosensors for Point-of-Care Testing. *MEMS Sensors - Des. Appl.* **Chapter 3**, 49–70 (2018).
13. Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D. & Kim, M. Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials (Basel)*. **12**, 1–34 (2019).

14. Reyes-De-Corcuera, J. I., Olstad, H. E. & García-Torres, R. Stability and Stabilization of Enzyme Biosensors: The Key to Successful Application and Commercialization. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **9**, 293–322 (2018).
15. Dixon, M. C. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: Enabling real-time characterization of biological materials and their interactions. *J. Biomol. Tech.* **19**, 151–158 (2008).
16. Ma, S. & Wang, X. The impact of adsorbate mass on a nanomechanical resonator. *Microsyst. Technol.* **25**, 3837–3846 (2019).
17. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *J. Japan Soc. Precis. Eng.* **56**, 930–933 (1986).
18. Thundat, T., Warmack, R. J., Chen, G. Y. & Allison, D. P. Thermal and ambient-induced deflections of scanning force microscope cantilevers. *Appl. Phys. Lett.* **64**, 2894–2896 (1994).
19. Thundat, T., Oden, P. I. & Warmack, R. J. Microcantilever sensors. *Microscale Thermophys. Eng.* **1**, 185–199 (1997).
20. Waggoner, P. S. & Craighead, H. G. Micro- and nanomechanical sensors for environmental, chemical, and biological detection. *Lab Chip* **7**, 1238–1255 (2007).
21. Dominguez, C. M. *et al.* Label-free dna-based detection of mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance through hydration induced stress in microcantilevers. *Anal. Chem.* **87**, 1494–1498 (2015).
22. Ndieyira, J. W. *et al.* Nanomechanical detection of antibiotic-mucopeptide binding in a model for superbug drug resistance. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 691–696 (2008).
23. Ndieyira, J. W., Watari, M. & McKendry, R. A. Nanomechanics of drug-target interactions and antibacterial resistance detection. *J. Vis. Exp.* 1–9 (2013). doi:10.3791/50719
24. Ndieyira, J. W. *et al.* Surface-stress sensors for rapid and ultrasensitive detection of active free drugs in human serum. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 225–232 (2014).
25. McKendry, R. *et al.* Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9783–9788 (2002).
26. Arntz, Y. *et al.* Label-free protein assay based on a nanomechanical

- cantilever array. *Nanotechnology* **14**, 86–90 (2003).
27. Zhang, J. *et al.* Rapid and label-free nanomechanical detection of biomarker transcripts in human rna. *Nat. Nanotechnol.* **1**, 214–220 (2006).
  28. Ruz, J. J. *et al.* A review on theory and modelling of nanomechanical sensors for biological applications. *Processes* **9**, 1–25 (2021).
  29. Boisen, A., Thaysen, J., Jensenius, H. & Hansen, O. Environmental sensors based on micromachined cantilevers with integrated read-out. *Ultramicroscopy* **82**, 11–16 (2000).
  30. Oden, P. I., Datskos, P. G., Thundat, T. & Warmack, R. J. Uncooled thermal imaging using a piezoresistive microcantilever. *Appl. Phys. Lett.* **69**, 3277–3279 (1996).
  31. Boisen, A., Dohn, S., Keller, S. S., Schmid, S. & Tenje, M. Cantilever-like micromechanical sensors. *Reports Prog. Phys.* **74**, (2011).
  32. K. Baxter, L. Capacitive Sensors. *Ann Arbor* **6**, 4630–4636 (2000).
  33. Goeders, K. M., Colton, J. S. & Bottomley, L. A. Microcantilevers: Sensing chemical interactions via mechanical motion. *Chem. Rev.* **108**, 522–542 (2008).
  34. DeVoe, D. L. & Pisano, A. P. Modeling and optimal design of piezoelectric cantilever microactuators. *J. Microelectromechanical Syst.* **6**, 266–270 (1997).
  35. Lee, J. H., Yoon, K. H. & Kim, T. S. Characterization of resonant behavior and sensitivity using micromachined PZT cantilever. *Integr. Ferroelectr.* **50**, 43–52 (2010).
  36. Meyer, G. & Amer, N. M. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **53**, 1045–1047 (1988).
  37. Tamayo, J. *et al.* Imaging the surface stress and vibration modes of a microcantilever by laser beam deflection microscopy. *Nanotechnology* **23**, 1–8 (2012).
  38. Maddali, H., Miles, C. E., Kohn, J. & O’Carroll, D. M. Optical Biosensors for Virus Detection: Prospects for SARS-CoV-2/COVID-19. *ChemBioChem* **22**, 1176–1189 (2021).
  39. Long, F., Zhu, A. & Shi, H. Recent advances in optical biosensors for environmental monitoring and early warning. *Sensors (Switzerland)* **13**, 13928–13948 (2013).

40. Karlsson, R. SPR for molecular interaction analysis: A review of emerging application areas. *J. Mol. Recognit.* **17**, 151–161 (2004).
41. Albrecht, M. G. & Creighton, J. A. Anomalously Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5215–5217 (1977).
42. Gandra, N. & Singamaneni, S. Bilayered raman-intense gold nanostructures with hidden tags (BRIGHTs) for high-resolution bioimaging. *Adv. Mater.* **25**, 1022–1027 (2013).
43. Lim, D. K. *et al.* Highly uniform and reproducible surface-enhanced Raman scattering from DNA-tailorable nanoparticles with 1-nm interior gap. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 452–460 (2011).
44. Song, Y., Wei, W. & Qu, X. Colorimetric biosensing using smart materials. *Adv. Mater.* **23**, 4215–4236 (2011).
45. Stewart, M. E. *et al.* Nanostructured plasmonic sensors. *Chem. Rev.* **108**, 494–521 (2008).
46. Soper, S. A. *et al.* Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1932–1942 (2006).
47. De, M., Ghosh, P. S. & Rotello, V. M. Applications of nanoparticles in biology. *Adv. Mater.* **20**, 4225–4241 (2008).
48. Jazayeri, M. H., Aghaie, T., Avan, A., Vatankhah, A. & Ghaffari, M. R. S. Colorimetric detection based on gold nano particles (GNPs): An easy, fast, inexpensive, low-cost and short time method in detection of analytes (protein, DNA, and ion). *Sens. Bio-Sensing Res.* **20**, 1–8 (2018).
49. Zhang, M. *et al.* Dual-responsive gold nanoparticles for colorimetric recognition and testing of carbohydrates with a dispersion-dominated chromogenic process. *Adv. Mater.* **25**, 749–754 (2013).
50. De La Rica, R. & Stevens, M. M. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 821–824 (2012).
51. Aminabad, N. S., Farshbaf, M. & Akbarzadeh, A. Recent Advances of Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: State of the Art. *Cell Biochem. Biophys.* **77**, 123–137 (2019).
52. Daniel, M. C. & Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **104**, 293–346 (2004).

53. Sun, Y. S. Optical biosensors for label-free detection of Biomolecular interactions. *Instrum. Sci. Technol.* **42**, 109–127 (2014).
54. Niu, S. & Saraf, R. F. An approach to sequence DNA without tagging. *Smart Mater. Struct.* **11**, 778–782 (2002).
55. Kodadek, T. Protein microarrays: Prospects and problems. *Chem. Biol.* **8**, 105–115 (2001).
56. MacBeath, G. Protein microarrays and proteomics. *Nat. Genet.* **32**, 526–532 (2002).
57. Jones, M. R., Osberg, K. D., MacFarlane, R. J., Langille, M. R. & Mirkin, C. A. Templated techniques for the synthesis and assembly of plasmonic nanostructures. *Chem. Rev.* **111**, 3736–3827 (2011).
58. Yi-Cheun Yeh, Brian Creran, V. M. R. Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. *Nanos* **4**, 1871–1880 (2012).
59. Petryayeva, E. & Krull, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. *Anal. Chim. Acta* **706**, 8–24 (2011).
60. Li, M., Cushing, S. K. & Wu, N. Plasmon-Enhanced Optical Sensors: A Review Ming. *Analyst* **140**, 386–406 (2016).
61. Kosaka, P. M. *et al.* Detection of cancer biomarkers in serum using a hybrid mechanical and optoplasmonic nanosensor. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 1047–1053 (2014).
62. Kippenberg, T. J. & Vahala, K. J. Cavity optomechanics. *Science (80-. )*. **321**, 1172–1176 (2008).
63. Atkinson, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89–95 (2001).
64. Ezkurdia, I. *et al.* Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 5866–5878 (2014).
65. Williams, S. A. *et al.* Plasma protein patterns as comprehensive indicators of health. *Nat. Med.* **25**, 1851–1857 (2019).
66. Smith, L. *et al.* The Human Proteoform Project: A Plan to Define the Human Proteome. *Preprints* 1–18 (2020).
67. Ósz, Á., Lániczky, A. & Gyórfy, B. Survival analysis in breast cancer using

- proteomic data from four independent datasets. *Sci. Rep.* **11**, (2021).
68. Kosaka, P. M., Calleja, M. & Tamayo, J. Optomechanical devices for deep plasma cancer proteomics. *Semin. Cancer Biol.* **52**, 26–38 (2018).
  69. Abram, M. E. *et al.* Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase Affect the Errors Made in a Single Cycle of Viral Replication. *J. Virol.* **88**, 7589–7601 (2014).
  70. Aponte, J. J. *et al.* Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial. *Lancet* **370**, 1543–1551 (2007).
  71. Okitsu, S. L. *et al.* Structure-Activity-Based Design of a Synthetic Malaria Peptide Eliciting Sporozoite Inhibitory Antibodies in a Virosomal Formulation. *Chem. Biol.* **14**, 577–587 (2007).
  72. Sarr, J. *et al.* Assessment of exposure to *Plasmodium falciparum* transmission in a low endemicity area by using multiplex fluorescent microsphere-based serological assays. *Parasites and Vectors* **4**, 212 (2011).
  73. Kumar, S. *et al.* A chemiluminescent-western blot assay for quantitative detection of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *J. Immunol. Methods* **390**, 99–105 (2013).
  74. Fredolini, C. *et al.* Immunocapture strategies in translational proteomics. *Expert Rev. Proteomics* **13**, 83–98 (2016).
  75. Wingren, C. Antibody-based proteomics. *Adv. Exp. Med. Biol.* **926**, 163–179 (2016).
  76. Engvall, E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–874 (1971).
  77. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350–4354 (1979).
  78. Kurien, B. T. & Scofield, R. H. Western blotting. *Methods* **38**, 283–293 (2006).
  79. Coorsen, J. R. *et al.* Quantitative femto- to attomole immunodetection of regulated secretory vesicle proteins critical to exocytosis. *Anal. Biochem.* **307**, 54–62 (2002).
  80. Murphy, R. M., Larkins, N. T., Mollica, J. P., Beard, N. A. & Lamb, G. D. Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca<sup>2+</sup>

- storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat. *J. Physiol.* **587**, 443–460 (2009).
81. Ghosh, R., Gilda, J. E. & Gomes, A. V. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev. Proteomics* **11**, 549–560 (2014).
  82. Borrebaeck, C. A. K. Precision diagnostics: Moving towards protein biomarker signatures of clinical utility in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 199–204 (2017).
  83. Frantzi, M., Bhat, A. & Latosinska, A. Clinical proteomic biomarkers: relevant issues on study design & technical considerations in biomarker development. *Clin. Transl. Med.* **3**, 1–22 (2014).
  84. Parker, C. E. & Borchers, C. H. Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation - Quality assurance and control of protein biomarker assays. *Mol. Oncol.* **8**, 840–858 (2014).
  85. Diamandis, E. P. Cancer biomarkers: Can we turn recent failures into success? *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 1462–1467 (2010).
  86. Kosaka, P. M. *et al.* Tackling reproducibility in microcantilever biosensors: A statistical approach for sensitive and specific end-point detection of immunoreactions. *Analyst* **138**, 863–872 (2013).
  87. Kelley, S. O. *et al.* Advancing the speed, sensitivity and accuracy of biomolecular detection using multi-length-scale engineering. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 969–980 (2014).
  88. Anderson, N. L. & Anderson, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. proteomics* **1**, 845–867 (2002).
  89. Nanjappa, V. *et al.* Plasma Proteome Database as a resource for proteomics research: 2014 update. *Nucleic Acids Res.* **42**, 959–965 (2014).
  90. Laird, A. K. Dynamics of tumor growth. *Br. J. Cancer* **18**, 490–502 (1964).
  91. Vogel, C. & Marcotte, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 227–232 (2012).
  92. Kosaka, P. M., Pini, V., Calleja, M. & Tamayo, J. Ultrasensitive detection of HIV-1 p24 antigen by a hybrid nanomechanical-optoplasmonic platform with potential for detecting HIV-1 at first week after infection.

- PLoS One* **12**, 1–13 (2017).
93. Cheng, M. M. C. *et al.* Nanotechnologies for biomolecular detection and medical diagnostics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 11–19 (2006).
  94. Salvati, E., Stellacci, F. & Krol, S. Nanosensors for early cancer detection and for therapeutic drug monitoring. *Nanomedicine* **10**, 3495–3512 (2015).
  95. Foubert, A., Beloglazova, N. V., Hedström, M. & De Saeger, S. Antibody immobilization strategy for the development of a capacitive immunosensor detecting zearalenone. *Talanta* **191**, 202–208 (2019).
  96. Fernandes, E. *et al.* Functionalization of single-layer graphene for immunoassays. *Appl. Surf. Sci.* **480**, 709–716 (2019).
  97. Rowe, C. A., Scruggs, S. B., Feldstein, M. J., Golden, J. P. & Ligler, F. S. An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes. *Anal. Chem.* **71**, 433–439 (1999).
  98. Guschin, D. *et al.* Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. *Anal. Biochem.* **250**, 203–211 (1997).

## **CAPÍTULO 2: Materiales y métodos**

En este capítulo se engloban los reactivos y procesos que son comunes en la sección de “materiales y métodos” para los capítulos 3 y 4 y el apéndice A. Mientras que las particularidades (anticuerpos usados, biomoléculas detectadas, sistema de medidas, técnicas específicas, etc.) son detalladas en cada capítulo según corresponda.

## 2.1. Reactivos

Los reactivos tolueno, metanol, etanol, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), tolueno seco 99.8%, (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano (GPTS), N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC), N-hidroxisulfosuccinimida sal sódica (sulfo-NHS), polietilenglicol (PEG), Tween® 20, albúmina de suero bovino (BSA), insulina, cloruro de sodio (NaCl) y fosfato de sodio (NaP) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (España). El ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) de Panreac (España). El  $N\alpha N\alpha$ -Bis(carboximetil)-L-lisina (NTA) de bioWORLD (EEUU) y las nanopartículas de oro de 100 nm de diámetro (AuNPs) de Nanopartz (EEUU).

## 2.2. Tampones y soluciones

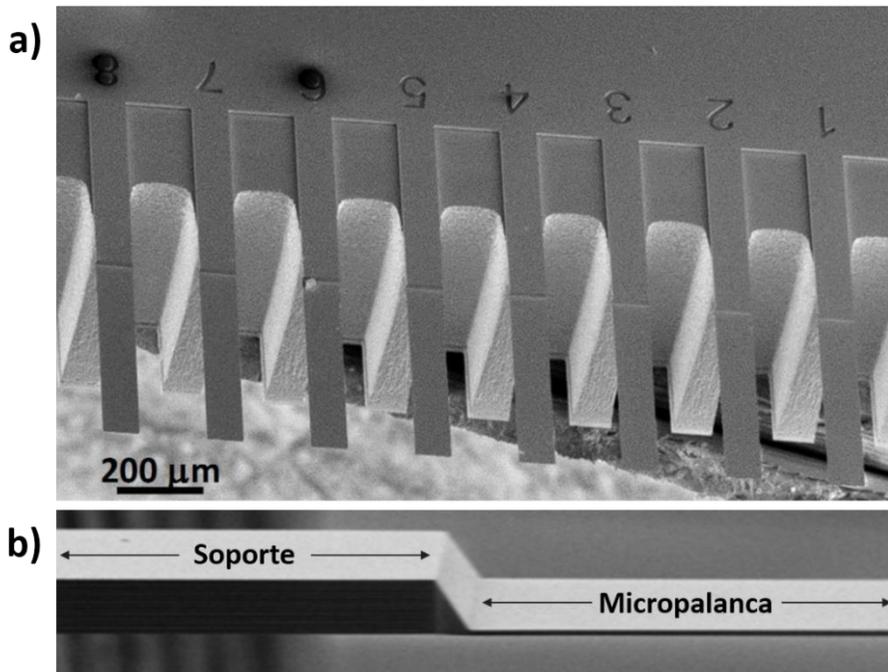
El tampón fosfato salino (PBS), ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES) y tampón bicarbonato fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (España) y preparados utilizando agua Milli-Q® (18.2M $\Omega$ -cm a 25°C). El PBS se ajustó a pH 7.4, el tampón MES 10 mM a pH 5.2 y el tampón bicarbonato 50 mM a pH 9.7. Al igual que con el resto de tampones, el tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 8.0) con cloruro de sodio 0.3 M también se preparó con agua Milli-Q®.

## 2.3. Superficies de silicio

Las matrices de silicio fueron obtenidas de Micromotive GmbH (Alemania). Cada una consta de ocho micropalanca con un tamaño de 500  $\mu$ m de largo,

90  $\mu\text{m}$  de ancho y 1  $\mu\text{m}$  de espesor (figura 2.1). Las placas de silicio de 5 x 5  $\text{mm}^2$  fueron adquiridas en Sil'tronix Silicon Technologies (Francia).

En el capítulo 3 se hizo uso de las matrices de silicio de ocho micropalanca, en cambio para el capítulo 4 y el apéndice A se utilizaron placas de silicio de 5 x 5  $\text{mm}^2$ .



**Figura 2.1.** Imágenes tomadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope). **a)** vista de una matriz de ocho micropalanca usada en el capítulo 3 de esta tesis doctoral. **b)** vista del perfil de una micropalanca donde se observa la frontera entre el soporte de la micropalanca de 10  $\mu\text{m}$  de espesor y la micropalanca con un espesor de 1  $\mu\text{m}$ .

## 2.4. Biofuncionalización de las superficies de silicio

El mismo protocolo se siguió para las matrices de ocho micropalanca y las placas de silicio de 5 x 5  $\text{mm}^2$ , utilizándose placas de 48 pocillos (VWR) para las incubaciones y los lavados de las micropalanca y las placas de silicio.

### 2.4.1. Limpieza y activación de las micropalancas y placas de silicio

Las micropalancas o placas de silicios fueron sumergidos en solución piraña (3 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 15 minutos a temperatura ambiente con extremada precaución, debido a que la solución piraña es extremadamente corrosiva, reactiva y potencialmente explosiva. Este paso se llevó a cabo para activar los grupos hidroxilo (OH-) de la superficie y eliminar todos los residuos orgánicos presentes en la misma. Finalizados los 15 minutos, las micropalancas o los silicios se lavaron abundantemente con agua Milli-Q® y se secaron bajo un flujo de nitrógeno (N<sub>2</sub>) seco.

### 2.4.2. Silanización y funcionalización de la superficie

Las matrices de ocho micropalancas o placas de silicios fueron sumergidas en 2 mL de solución 0.2% de GPTS en tolueno seco durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante. La incorporación de los grupos epoxisilanos, por parte del GPTS, se llevó a cabo en presencia de tolueno seco para evitar la polimerización de los silanos. Terminada la incubación las matrices de ocho micropalancas fueron lavadas con tolueno, metanol y agua Milli-Q® durante 15 minutos a 25°C y 300 rpm con cada disolvente y secadas bajo un flujo de N<sub>2</sub>. En cambio, los silicios de 5 x 5 mm<sup>2</sup> fueron lavados durante 5 minutos con tolueno, 5 minutos con metanol y 5 minutos con agua Milli-Q® usando un baño de ultrasonidos y secados finalmente bajo un flujo de N<sub>2</sub>.

A continuación, las micropalancas o placas de silicios fueron incubadas con 600 µL de solución de NTA 100 mM en tampón bicarbonato 50 mM (pH 9.5) durante toda la noche a 25°C bajo agitación. La incorporación del grupo amino (NH<sub>2</sub>) del NTA abre los grupos epoxi, para lo cual tiene lugar la rotura del grupo epoxi, concretamente en el enlace que conecta el átomo de oxígeno con el carbono terminal (que es el átomo de C que está menos impedido) del grupo epoxi. A continuación, el nitrógeno de la amina se enlaza con el carbono del grupo epoxi, perdiendo a su vez uno de sus nitrógenos que se enlaza con el

oxígeno del grupo epoxi, formando un grupo carboxilo. Terminada la incubación durante toda la noche del NTA, las matrices o placas de silicio fueron lavadas con tampón bicarbonato 50 mM (pH 9.5) y agua Milli-Q®.

### 2.4.3. Activación del grupo carboxilo

Los grupos carboxilo presentes en la superficie de las micropalancas o placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> se activaron incubándose durante 45 minutos a 37°C con agitación en una solución mixta de 300 µL de EDC 100 mM y 300 µL de sulfo-NHS 150 mM, ambos disueltos en tampón MES 10 mM (pH 5.2). Posteriormente, las micropalancas o placas de silicio fueron lavadas con tampón MES 10 mM (pH 5.2) y agua Milli-Q®.

## 2.5. Inmovilización del anticuerpo de captura en la superficie de silicio

Las micropalancas o placas de silicio se funcionalizaron adaptando un procedimiento que no requiere modificación previa del anticuerpo y permite una forma eficiente de unir los anticuerpos a la superficie sin involucrar las regiones de unión al antígeno <sup>1</sup>. Los anticuerpos se orientan en el plano aprovechando las diferencias cinéticas entre los procesos de adsorción iónica y las reacciones covalentes. El procedimiento de inmovilización mantiene la actividad biológica de la mayoría de los anticuerpos.

Las micropalancas o placas de silicio fueron sumergidas en 200 µL de solución 50 µg/mL de anticuerpo de captura (en cada capítulo se detallan los anticuerpos de captura usados) en tampón MES 10 mM (pH 5.2) durante 2 horas a 37°C bajo una leve agitación. La unión estable y orientada que se establece entre el anticuerpo de captura y los grupos carboxilo del NTA, es una unión de tipo covalente, asegurando una unión fuerte entre la biomolécula y la superficie. A continuación, los arrays de ocho micropalancas o las placas de silicio fueron incubadas en 600 µL de tampón NaP 10 mM (pH 8.0) con NaCl

0.3 M durante 45 minutos a 37°C y agitación, con el objetivo de eliminar los anticuerpos no unidos covalentemente en la superficie de las micropalanca o placas de silicio.

Para los experimentos controles negativos, el anticuerpo de captura usado fue sustituido por un IgG *anti-Goat/ Sheep* (G2904, Sigma) no específico a ninguna de las proteínas a detectar (en cada capítulo se detalla más acerca de los experimentos controles negativos realizados). El anticuerpo de detección anclado a las nanopartículas de oro se mantuvo para dichos experimentos.

## 2.6. Bloqueo de la superficie

Como ocurre en otros biosensores basados en la inmovilización superficial de moléculas biológicas, los espacios libres en la superficie del dispositivo deben ser bloqueados para evitar interacciones no específicas y así evitar resultados falsos positivos. El bloqueo fue realizado mediante la incubación de las micropalanca o placas de silicio en 2 mL en una solución 1 mg/mL PEG (MW 5.000) en MES 10 mM (pH 5.2) al 0.05% de Tween® 20 durante 1 hora a 25°C bajo agitación. A continuación, se incubó durante 2 horas a 4°C bajo agitación y finalmente fueron almacenadas a 4°C hasta su uso al día siguiente.

## 2.7. Conjugación del anticuerpo de detección a la nanopartícula de oro

El anticuerpo de detección (en cada capítulo se detallan los anticuerpos de detección usados) se inmovilizó sobre la superficie de las nanopartículas de oro recubiertas con polímero de carboxilo de 100 nm de diámetro. En primer lugar, se preparó una solución con 500 µL de agua Milli-Q®, 50 µL de anticuerpo de detección a 1 mg/mL en agua Milli-Q® y 50 µL de nanopartículas de oro a 3.25 mg/mL en agua Milli-Q®. La solución resultante se agitó durante 1 minuto a 25°C y se añadió 50 µL de 1 mg/mL de EDC en agua Milli-Q®. La solución se incubó a 25°C durante 1 hora y a continuación, se centrifugó a 4°C

y 6.000 rcf durante 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y la solución restante se resuspendió en 600  $\mu$ L de PBS (este paso fue repetido 2 veces más). Finalizados los tres lavados, se añadió 600  $\mu$ L de solución de bloqueo 1 mg/mL de BSA en PBS (pH 7.4) al 0.05% de Tween® 20 para bloquear los espacios libres presentes en la superficie de las nanopartículas de oro y evitar así interacciones no específicas, incubándose nuevamente durante 1 hora a 25°C. Terminada la incubación, la solución se centrifugó a 4°C y 6.000 rcf durante 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y la solución restante se mezcló en 600  $\mu$ L de PBS. Este paso se repitió dos veces más.

La concentración de las nanopartículas de oro después de la conjugación con el respectivo anticuerpo de detección se determinó usando el diámetro de las nanopartículas de oro ( $d$ ) con la absorbancia medida a 450 nm, haciendo uso de un BioEspectrofotómetro de Eppendorf (Alemania) y se almacenó a 4°C hasta su uso. Para medir la concentración de las nanopartículas de oro se utilizó la siguiente ecuación 2.1. <sup>1</sup>:

$$N = \frac{A_{450} \times 10^{14}}{d^2 \left\{ -0,295 + 1,36 \exp \left[ - \left( \frac{d-96,8}{78,2} \right)^2 \right] \right\}} \quad (2.1)$$

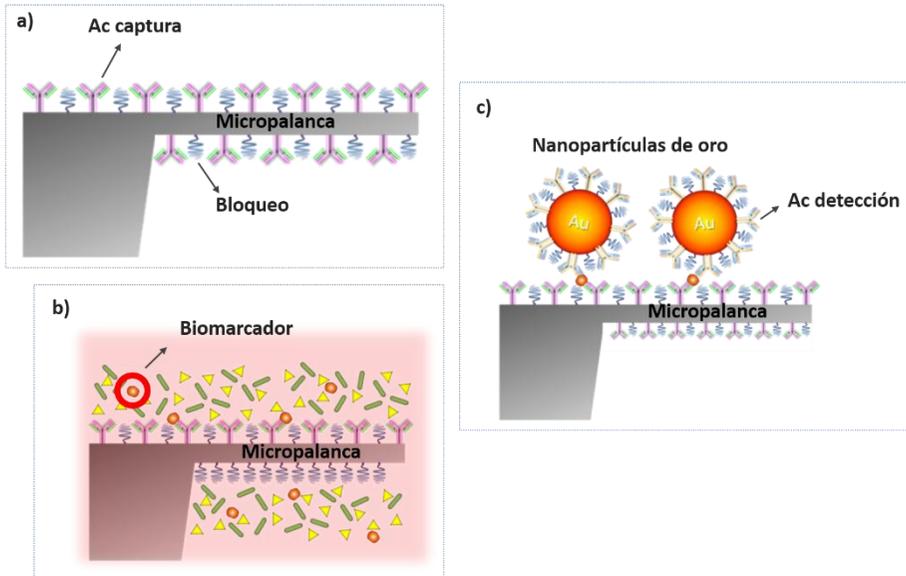
Donde  $N$  es la densidad numérica de nanopartículas en nanopartículas/mL (nps/mL) y  $A_{450}$  es la absorción a 450 nm. Haiss <sup>2</sup> encuentra que esta ecuación tiene una precisión de  $\sim 6\%$ . A partir de esta ecuación se puede encontrar el valor de la concentración ( $Wt$ ) en  $\mu$ g/mL usando la siguiente ecuación 2.2. <sup>3</sup>:

$$Wt = N \times \frac{\frac{4}{3} \pi r^3 \text{ cm}^3 \times \frac{19,28 \times 10^{-21} \text{ g}}{\text{cm}^3}}{nps} \times \frac{10^6 \mu\text{g}}{\text{g}} \quad (2.2)$$

donde  $r$  es el radio de la nanopartícula de oro.

## 2.8. Inmunoensayo

El proceso de inmunoensayo engloba solo dos pasos de bioreconocimiento que se siguen para aumentar la selectividad y amplificar la respuesta del nanosensor. En el primer paso, las micropalanca o placas de silicio funcionalizadas previamente fueron sumergidas en 1 mL de solución que contiene el biomarcador a detectar (el rango de concentraciones o cantidades estudiadas están detalladas en cada capítulo) y se incubaron durante 1 hora a 37°C bajo agitación. A continuación, las micropalanca o placas de silicio se lavaron dos veces durante 15 minutos a 25°C y bajo agitación por cada lavado (en cada capítulo se especifican los detalles de los lavados realizados). En el segundo paso, las micropalanca o placas de silicio fueron sumergidas en 1 mL de solución 10 µg/mL de nanopartículas de oro conjugadas con el anticuerpo de detección (las condiciones del proceso de incubación con las nanopartículas de oro se detallan en la sección de “materiales y métodos” de cada capítulo). Finalmente, las micropalanca o placas de silicio se lavaron durante 4 horas con MES 10 mM (pH 5.2) al 0.5% de Tween® 20 y con agua Milli-Q®, para eliminar las nanopartículas de oro unidas de forma no específica sobre la superficie, secándose bajo un flujo de nitrógeno seco.



**Figura 2.2. Representación esquemática de los diferentes pasos llevado a cabo en el inmunoensayo (se representa una micropalanca como ejemplo). a)** inmovilización del anticuerpo de captura y bloqueo de la superficie de silicio. **b)** reconocimiento por parte de los anticuerpos de captura con el biomarcador. **c)** detección del biomarcador por parte de los anticuerpos de detección que se encuentran anclados a las nanopartículas de oro. Dicho esquema es válido tanto para las micropalanca como para las placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup>.

## Bibliografía

1. Puertas, S. *et al.* Taking Advantage of Unspecific Interactions to Produce Highly Active Conjugates. *ACS Nano* **5**, 4521–4528 (2011).
2. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. & Fernig, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal. Chem.* **79**, 4215–4221 (2007).
3. Nanopartz. Using UV-VIS as a tool to determine size and concentration of spherical gold nanoparticles (SGNPs) from 5 to 100 nm. *Nanopartz Tech. Note* 1–3

**CAPÍTULO 3: Detección de  
proteínas en líneas celulares y  
muestras de pacientes con cáncer  
de mama mediante un nanosensor  
híbrido**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un grupo largo de enfermedades que se puede originar en cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando existe un crecimiento celular descontrolado, invadiendo partes contiguas del cuerpo y/o extendiéndose a otros órganos, dando lugar al proceso conocido como metástasis, siendo este la mayor causa de muerte por cáncer. El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) en su base de datos GLOBOCAN, estimó en el año 2020 diecinueve millones de nuevos casos por cáncer y casi diez millones de muertes a nivel mundial <sup>1</sup>

La iniciación y progresión del cáncer se basa en un proceso de múltiples pasos, en los cuales se observan alteraciones genéticas que conducen a la transformación de una célula humana normal en derivados malignos, observándose mutaciones, amplificaciones o deleciones, entre otros. Los cambios que llevan a convertir una célula sana en una célula maligna se ven reflejados en alteraciones genómicas y en la expresión de proteínas de las células tumorales, siendo estas proteínas secretadas por los tumores, una señal específica de presencia de la enfermedad <sup>2</sup>.

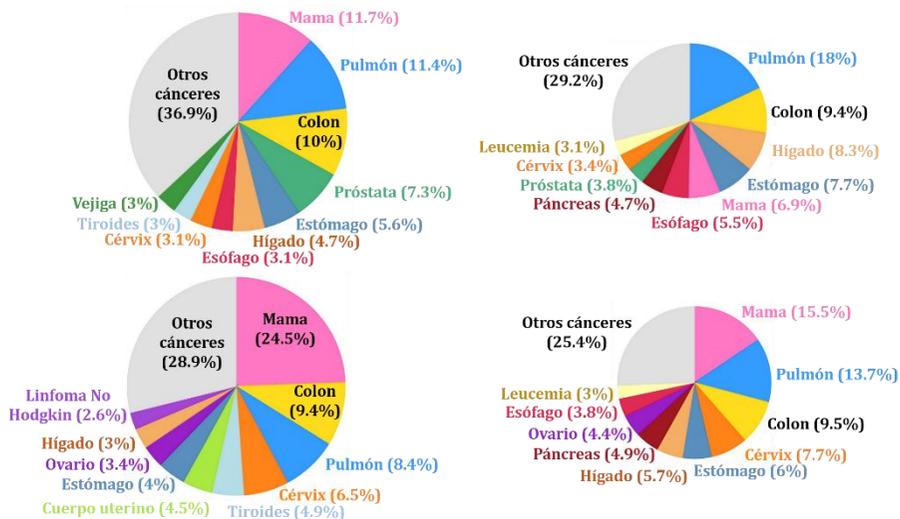
La identificación de biomarcadores es crucial para la detección de la enfermedad, la elección de una terapia óptima y un pronóstico más preciso en la progresión de la enfermedad <sup>3</sup>. La detección temprana del cáncer ha demostrado ser una estrategia en la lucha contra el mismo; siendo de vital importancia el cribado de la población para detectar la enfermedad cuando los individuos no presentan síntomas y por lo tanto el tamaño del tumor es pequeño y se encuentra bien localizado, aumentando considerablemente la posibilidad de cura.

### 3.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama, que hasta el año 2018 era el segundo más común diagnosticado (11.6%) <sup>4</sup>, pasó a ser en el año 2020 el cáncer más común diagnosticado, con 2.3 millones de nuevos casos (11.7%) y una incidencia de 684.996 muertes (6.9%) para ambos sexos, siendo la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (15.5%) y el más común (24.5%) para este sexo <sup>1</sup>.

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

Expertos predicen 3.2 millones de casos nuevos de cáncer de mama para el año 2050 <sup>5</sup>.



**Figura 3.1. Estadística global de cáncer 2020.** Estimación de la incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer por GLOBOCAN. Modificado de Bray et al., 2021 <sup>1</sup>.

La media de casos de cáncer de mama es más alta en países desarrollados, donde entre el 50 – 80% de los casos son diagnosticados en estadios avanzados, cuando los tratamientos son menos eficaces <sup>6</sup>, sin embargo, esta ratio está incrementando en casi todas las regiones del mundo. La supervivencia de cáncer de mama es mayor cuando este es detectado en estadios tempranos y donde el tratamiento es más efectivo.

El cáncer de mama es una enfermedad variable y heterogénea basada en parámetros clínicos y genéticos <sup>7</sup>. Las células de cáncer de mama forman un tumor que a menudo puede ser observado por rayos X o puede sentirse como un bulto en la mama. Si se disemina fuera de la mama a través de los vasos sanguíneos y vasos linfáticos llega a convertirse en cáncer de mama avanzado. Cuando el cáncer de mama se extiende a otros órganos del cuerpo (como el hígado, pulmones, huesos o cerebro) se denomina cáncer de mama metastásico (Union for International Cancer Control, UICC, 2021).

### 3.2. Diagnóstico del cáncer de mama

El control integral del cáncer abarca desde la prevención, la detección precoz, el diagnóstico y tratamiento del paciente, la rehabilitación y los cuidados paliativos. La detección precoz para mejorar el pronóstico y la supervivencia del cáncer de mama siguen siendo hoy en día la piedra angular del control de este tipo de cáncer <sup>8</sup>. En la actualidad son dos los métodos de detección en el cáncer de mama; el diagnóstico temprano y el cribado.

El diagnóstico temprano es el conocimiento de los primeros signos y síntomas en la población sintomática, para facilitar el diagnóstico y el tratamiento temprano. El objetivo es incrementar la proporción de casos identificados de cáncer de mama en estadios iniciales de la enfermedad, permitiendo poder adaptar el tratamiento de la forma más efectiva al paciente y reducir el riesgo por muerte de cáncer de mama (Organización Mundial de la Salud).

Por otro lado, el cribado consiste en una serie de técnicas en donde se evalúan a una población aparentemente asintomática para identificar el cáncer antes de que aparezcan los síntomas. Su objetivo es detectar a las personas que presenten anomalías indicativas de cáncer. Son varios los métodos usados, entre los que destacan la mamografía, que aunque es el único método de cribado que se ha revelado eficaz para el diagnóstico de cáncer de mama reduciendo los ratios de mortalidad entre un 30 – 40% <sup>9</sup>, presenta una sensibilidad limitada (25 – 29%) para la detección de tumores en tejido mamario denso <sup>10</sup>, además de presentar un alto ratio de falsos negativos (entre 4 y 34%) y falsos positivos, lo que conlleva a realizar biopsias de manera innecesaria <sup>11-13</sup>. Todo esto supone que siga existiendo un interés continuo en mejorar la detección temprana y el pronóstico de dicha enfermedad <sup>14</sup>.

Además de la mamografía, son varios los métodos de diagnóstico para prevenir, detectar y diagnosticar pacientes con cáncer de mama. La resonancia magnética (RM) presenta una elevada sensibilidad en la detección de tumores primarios de pequeño tamaño, siendo útil en tejidos mamaros densos. Sin embargo, los falsos positivos, el alto coste y la prohibición de realizar RM a pacientes que presenten materiales metálicos en su cuerpo son

factores que influyen en la detección del cáncer de mama por RM <sup>15</sup>. El ultrasonido es usado dependiendo de la morfología y la condición del tumor, no siendo útil para tejidos tumorales de tamaño pequeño. Presenta elevada especificidad (34%), pero una baja sensibilidad y baja resolución de imagen. La técnica por ultrasonidos detecta los tumores mediante ondas acústicas en el tejido mamario, pero cuando las propiedades acústicas del tejido mamario benigno y tumoral son similares dicha técnica pierde resolución <sup>16</sup>. La tomografía por emisión de positrones (TEP) presenta muchas ventajas como alta sensibilidad en la detección de pacientes con cáncer de mama recurrente y metastásico, siendo útil en la detección de tumores de pequeño tamaño (> 0.5 cm). Sin embargo, no es recomendada como método de cribado debido a su alto coste y a la utilización de radiación ionizante y radioactiva que podría provocar daños en los pacientes <sup>17</sup>.

Aunque todas estas técnicas nos permitan realizar un cribado de la población, estos métodos son capaces de detectar la enfermedad solo cuando están presentes las manifestaciones fisiológicas, siendo en ocasiones demasiado tarde <sup>18</sup>. Todo ello no quita la importancia de llevar a cabo un examen clínico de la mama y la autoexploración de la misma, siendo un factor importante para fomentar la toma de conciencia entre las mujeres en situación de riesgo, a pesar de no tener datos acerca del efecto del cribado mediante autoexploración de la mama (Organización Mundial de la Salud).

### 3.3. Patología y clasificación

La glándula mamaria es un órgano complejo constituido por dos tejidos; el epitelio y el estroma, los cuales se someten a ciclos de proliferación, diferenciación y apoptosis en respuesta a las señales locales y endocrinas. El estado de los receptores hormonales en varias líneas celulares es usado como marcador molecular para el diagnóstico del cáncer de mama <sup>19</sup>.

Las células de cáncer de mama tienen receptores en su superficie, en su citoplasma y en el núcleo, que pueden ser usados para su clasificación molecular por histopatología y procedimientos inmunohistoquímicos. Estos receptores son el receptor de estrógenos (ER, *Estrogen Receptor*), el receptor

de progesterona (PR, *Progesterone Receptor*) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, también conocido como ERBB2). A su vez, han sido subdivididas en los siguientes grupos: luminal A (ER<sup>+</sup>/PR<sup>alto</sup>/HER2<sup>-</sup>), luminal B (ER<sup>+</sup>/PR<sup>bajo</sup>/HER2<sup>-</sup>), HER2 positivo (ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup>) y basal o triple negativo (ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>)<sup>7</sup>. Cuando las células de cáncer de mama expresan el receptor de estrógenos, estas dependen de estrógenos para su crecimiento, por lo que son tratadas con fármacos como el tamoxifeno, para bloquear el efecto de los estrógenos en el ER. Este tipo de cáncer expresa normalmente un mejor pronóstico. La mayoría de células co-expresan ER y PR, lo que indican que las células expresan uno o ambos tipos de receptores y se consideran hormono positivas (HR<sup>+</sup>)<sup>20</sup>. Las células que expresan HER2<sup>+</sup> responden a fármacos como el trastuzumab usado en combinación con quimioterapia convencional<sup>21</sup>. En cambio, las células que no expresan ninguno de estos tres tipos de receptores reciben el nombre de triples negativas (TNBC, *Triple Negative Breast Cancer*), caracterizándose por no responder a la terapia hormonal, sino a fármacos citotóxicos quimioterapéuticos como posible opción de tratamiento, aunque los resultados y eficacia de dichos tratamientos siguen siendo relativamente bajos<sup>22</sup>. Este tipo de cáncer es el más maligno y agresivo, representando el 24% de las neoplasias de mama diagnosticadas<sup>23</sup>. Los pacientes con cáncer de mama triple negativo se caracterizan por presentar un peor pronóstico. En Julio de 2021, la FDA aprobó Keytruda (pembrolizumab) en combinación con quimioterapia para el cáncer de mama triple negativo<sup>24</sup>.

Son muchos los factores causantes que pueden influir en el desarrollo del cáncer de mama. La ruta del factor de crecimiento fibroblástico o FGF (*Fibroblastic Growth Factor*) induce proliferación de células cancerosas, inhibición de la apoptosis, fenotipo invasivo e inducción de angiogénesis. La activación de la ruta está asociada con una activación en la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) / proteínas quinasa B (AKT) y en la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

En esta tesis doctoral hemos estudiado dos proteínas: p-AKT (Ser473) y la mutación G13D en KRAS involucradas en las vías PI3K/AKT y MAPK, en tres líneas celulares de cáncer de mama MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231.

### 3.4. Vía PI3K/AKT en cáncer de mama

En cáncer de mama existen importantes interacciones entre factores genómicos y no genómicos del receptor de estrógenos y las quinasas de membrana y citoplasmáticas, incluyendo a los miembros de la vía PI3K que juegan un papel en la resistencia anti-estrogénica <sup>25</sup>. El estado de activación de la vía contribuye a la resistencia tumoral ante ciertas terapias, al igual que ante la quimio y radioterapia <sup>26</sup>.

La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR está involucrada en procesos de regulación celular en cáncer de mama, entre los que destacan el metabolismo, la proliferación, síntesis de proteínas y supervivencia celular. La desregulación de esta vía podría ser un evento clave en el inicio del desarrollo del cáncer <sup>27</sup>.

Mutaciones en la vía PI3K/AKT ocurren aproximadamente en el 35% de los cánceres de mama hormono positivos, entre un 20 – 25% de los cánceres de mama que sobreexpresan HER2 y con baja frecuencia en los cánceres de mama triple negativos <sup>28,29</sup>. La evidencia de la actividad tumorigénica mamaria preclínica de PI3K/AKT y la desregulación de la vía en cáncer de mama han aumentado el interés de estudio de esta vía en tumores mamarios <sup>30</sup> presentando un 20 – 55% de activación de AKT.

Esta vía de señalización es estimulada por una variedad de oncogenes y receptores de factores de crecimiento como es el receptor de insulina tirosina quinasa, el receptor del factor de crecimiento de la insulina (IGF, *Insulin Growth Factor*) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*). Las principales proteínas involucradas en esta vía son PI3K y AKT <sup>31,32</sup>.

Cuando PI3K/AKT es activada por factores de crecimiento como por ejemplo la insulina, conlleva a la activación de receptores de membrana tirosina quinasa, los cuales se autofosforilan a la vez que fosforilan el sustrato de receptor de la insulina (IRS, *Insulin Receptor Substrate*). IRS fosforila la subunidad p85 de la PI3K que conlleva a un cambio conformacional de dicha proteína y conduce a la unión de la subunidad catalítica p110. PI3K es un blanco frecuente de activación mutacional <sup>33</sup>. Las aberraciones genéticas más frecuentes en cáncer de mama son las mutaciones somáticas (por ejemplo, la mutación E545K) en el gen que codifica p110 (PIK3CA). PI3K activada fosforila

el inositol 3, 4 difosfato (PIP<sub>2</sub>), convirtiéndolo en el segundo mensajero; fosfatidil inositol 3, 4, 5 trisfosfato (PIP<sub>3</sub>), el cual activa a la proteína AKT.

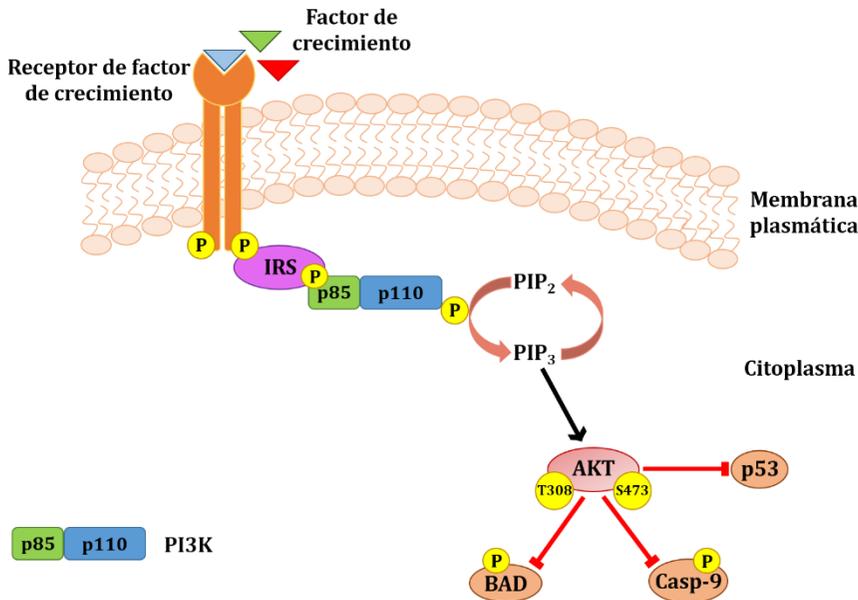


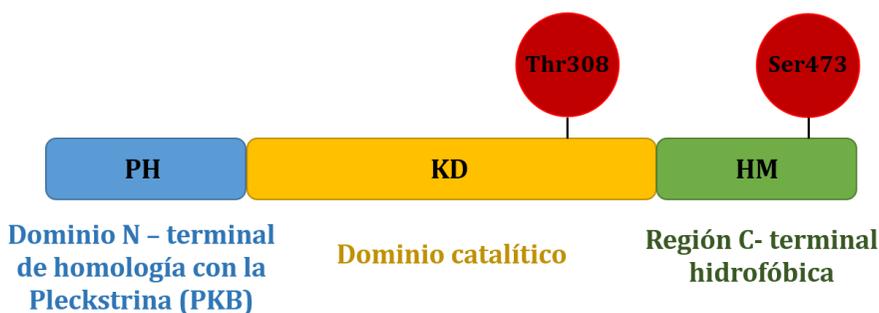
Figura 3.2. Esquema de la vía de señalización fosfatidil inositol 3 quinasa y activación de AKT.

AKT, mediante la inactivación del gen supresor de tumor p53, favorece la supervivencia celular. Esto se debe a la habilidad de AKT de fosforilar y activar directamente a MDM2, una proteína que regula negativamente a p53. Cuando la vía PI3K/AKT se encuentra en un estado activo permanente (hiperactivación), permite a la célula resistir a la apoptosis por lo que sobrevive y prolifera contribuyendo a la inestabilidad cromosómica <sup>34</sup>. Las alteraciones genéticas más conocidas asociadas a esta vía en cáncer de mama son la activación de mutaciones en PI3K, mutación en AKT y la pérdida de la actividad de PTEN <sup>30</sup>. PTEN es una proteína que regula la señal de supervivencia celular dependiente e independiente de la vía PI3K/AKT. Esta proteína supresora de tumores se expresa cuando se origina daño celular, bloqueando la supervivencia de la célula mediante p53. La actividad fosfatasa de PTEN le permite desfosforilar a PIP<sub>3</sub> a PIP<sub>2</sub>, inhibiendo el proceso de activación de AKT y el proceso de inactivación de p53; por lo que p53 se

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

mantiene activo para inhibir la proliferación celular y promover los procesos de reparación o apoptosis <sup>35</sup>.

AKT pertenece a la subfamilia AGC de la superfamilia de proteínas quinasa. En mamíferos existen tres isoformas de AKT: AKT1, AKT2 y AKT3, las cuales comparten una estructura conservada. AKT está compuesta por tres dominios (figura 3.3). La activación completa de AKT es un proceso de múltiples pasos, siendo el paso final la fosforilación de AKT en dos residuos; treonina 308 (Thr308) y serina 473 (Ser473) <sup>36</sup>, siendo esta última (p-Ser473) la estudiada en esta tesis doctoral en líneas celulares de cáncer de mama.



**Figura 3.3. Estructura de la proteína AKT.** AKT presenta tres dominios; un dominio amino terminal de homología a Pleckstrina (PH) que permite su reclutamiento a la membrana plasmática para unirse a PIP3, un dominio C – terminal que contiene una región regulatoria hidrofóbica (HM) y un dominio central catalítico (KD).

Existen numerosos estudios en los que se demuestran el efecto regulador de AKT modulado por fosfatasa de lípidos y proteínas, para el control del crecimiento celular, la proliferación, supervivencia y estabilidad genómica entre otras <sup>37-40</sup>, sin embargo, la actividad de estas fosfatasa en cáncer a menudo se inactiva originando una hiperactivación de AKT.

### 3.5. Vía MAPK en el desarrollo del cáncer

Otras de las vías nombradas en el desarrollo del cáncer es la vía de las proteínas quinasa activadas por mitógenos/ Extracellular signal-Regulated Kinases (MAPK/ERK). Las proteínas RAS (*Rat Sarcoma*) pertenece a la superfamilia de GTPasas pequeñas que regulan el crecimiento celular, la

proliferación y la diferenciación <sup>41</sup>. Mutaciones en la familia de proto-oncogenes RAS (HRAS, KRAS y NRAS) es una de las características más frecuentes del cáncer mutacional, siendo KRAS el miembro más mutado (más del 20% en los cánceres humanos) <sup>42</sup>.

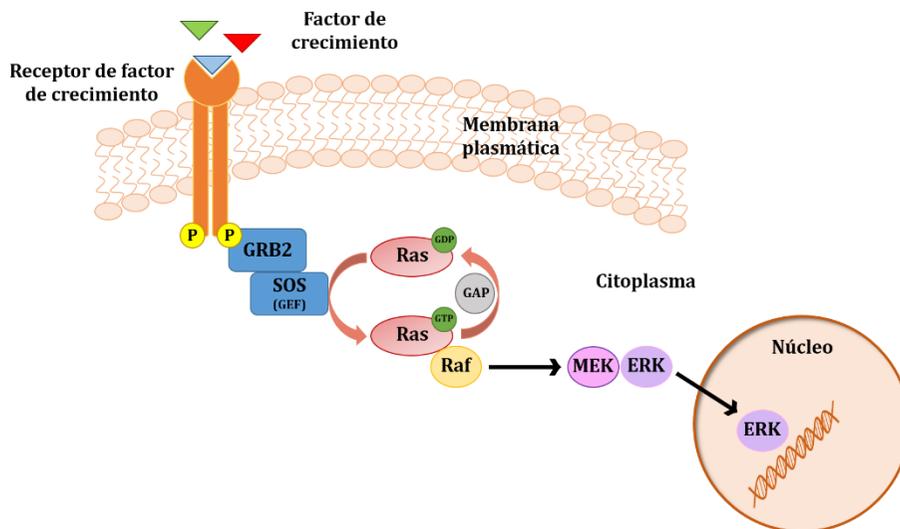


**Figura 3.4. Estructura de la proteína RAS.** RAS presenta un dominio catalítico amino-terminal muy conservado en todas sus formas (90 – 100%) entre los aminoácidos 1 – 165. Desde los aminoácidos 166 al 188/189 se encuentra el dominio hipervariable carboxil-terminal <sup>43</sup>.

KRAS se encuentra involucrada en la vía de señalización MAPK/ERK. Esta vía puede ser activada tras la unión de factores de crecimiento a los receptores de la superficie celular, como son los receptores tirosina quinasa, los cuales se encuentran acoplados a proteínas G, como puede ser por ejemplo KRAS. Cuando el receptor tirosina quinasa es activado por un factor de crecimiento conlleva la autofosforilación de los residuos de tirosina (Tyr) en el dominio intracelular. Los residuos fosforilados se unen a la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento, GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*). La unión de GRB2 a la proteína SOS (*Son Of Sevenless*) también conocida como GEF (*Guanine Exchange Factor*) media la activación de KRAS, como resultado del intercambio de GDP (guanósín difosfato) por GTP (guanósín trifosfato) unido a KRAS.

Esta actividad catalítica se encuentra regulada y en equilibrio mediante la unión con la proteína GAP (*GTPase-Accelerating Proteins*). Mientras que GEF promueve la activación de KRAS (KRAS-GTP), GAP hidroliza la forma activa de KRAS a su forma inactiva (KRAS-GDP), siendo el balance entre GAP y GEF un mecanismo crucial para el estado de activación de KRAS y sirviendo como un “interruptor” molecular para mediar en la transducción y amplificación de señales <sup>42,44</sup>. Cuando aparece una mutación en KRAS, esta cambia su conformación haciendo que GAP no pueda ejercer su función, provocando la estabilización de KRAS con GTP, derivando en la activación crónica de KRAS.

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

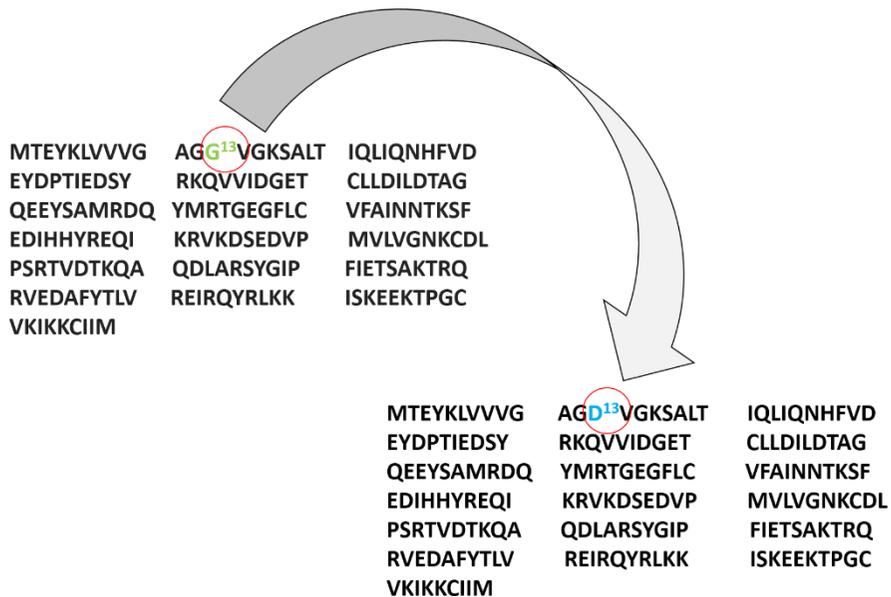


**Figura 3.5. Representación de la vía de señalización celular MAPK y activación de RAS.**

Las mutaciones más comunes en KRAS se encuentran en los codones 12 y 13 (exón 2) y en ocasiones en el codón 61 (exón 3). Las mutaciones en KRAS en cáncer de mama son poco comunes, sin embargo, algunos estudios han informado la asociación entre KRAS y el subtipo de cáncer de mama. Se demostró que KRAS tiene un papel crucial en el mantenimiento de los fenotipos mesenquimales y la capacidad metastásica del cáncer de mama triple negativo mediante experimentos moleculares que utilizan líneas celulares de cáncer de mama <sup>45</sup>. Según el análisis de supervivencia, usando el método Kaplan-Meier <sup>46</sup>, pacientes que presentan altos niveles de expresión de KRAS tienen peor pronóstico de cáncer de mama, siendo la expresión de KRAS un factor de riesgo para dichos pacientes <sup>47</sup>. La expresión de KRAS puede promover la tumorigénesis; estudios previos han mostrado que la expresión de ARNm de KRAS se asoció con el pronóstico del cáncer de mama y un alto nivel de expresión desempeñó un papel clave en la promoción del desarrollo del cáncer de mama <sup>48</sup>.

La mutación en el codón 13 denominada G13D, se origina como consecuencia de una sustitución de una glicina (G) en posición 13 por un ácido aspártico (D) <sup>49</sup>, siendo la mutación estudiada en esta tesis a través de la línea

celular de cáncer de mama MDA-MB-231, la cual presenta dicha mutación <sup>49-51</sup>.



**Figura 3.6. Representación de la mutación G13D en KRAS por la sustitución de una glicina por un ácido aspártico.**

La activación de las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK son eventos importantes en la formación de un tumor. Ambas vías pueden ser activadas por factores de crecimiento, pudiendo ocurrir que exista transferencia no deseada entre ambas vías (*cross-talk*). La proteína RAS unida a GTP (RAS activa) podría activar directamente a PI3K <sup>52</sup>. Numerosas líneas celulares de cáncer de mama muestran mutaciones en las vías de PI3K o RAS (54% y 25%, respectivamente) <sup>51</sup>.

## 3.6. Materiales y métodos

### 3.6.1. Células

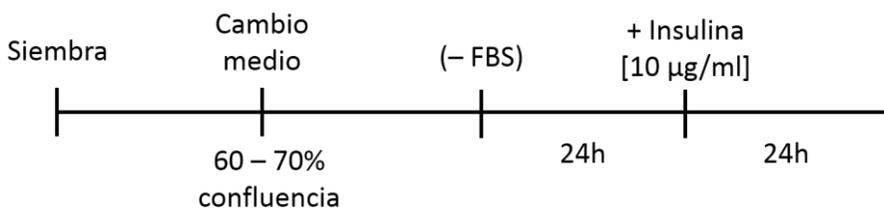
Las líneas celulares utilizadas en esta tesis fueron tres: MCF-10A (ATCC® CRL-10317™, Manassas, USA), MCF-7 (ATCC® HTB-22™, Manassas, USA) y MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™, Manassas, USA) de tipo adherente, pertenecientes a la glándula mamaria, siendo MCF-10A la línea celular sana y MCF-7 y MDA-MB-231 la línea celular tumoral y la línea celular tumoral metastásica respectivamente. Las células se encontraban criopreservadas en nitrógeno líquido con DMSO al 5% en FBS en el caso de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231, mientras que la línea MCF-10A se almacenaba con DMSO al 7.5% en su medio completo.

### 3.6.2. Cultivos celulares

No existe un método sencillo para determinar el número máximo de pases de una determinada línea celular<sup>53</sup>. Las líneas celulares con un alto número de pases experimentan alteraciones en la expresión de proteínas, en comparación con líneas celulares a pases más bajos<sup>54</sup>, por lo que el número máximo de pases utilizado fue seis. Para los cultivos celulares las células se cultivaron en un frasco de cultivo con tapón dotado de filtro (ThermoFisher Scientific) para permitir el intercambio de gases, de 75 cm<sup>2</sup> de superficie. La línea celular MCF-10A se mantuvo en medio DMEM-F12 (Dulbeccó's Modified Eagles Medium) suplementando con un 5% de suero de caballo estéril (Gibco, New Zealand) con L-Glutamina 15 mM Hepes (BioWest), 500 UI/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomycin (Cultek), 100 mg/mL EGF humano (Sigma-Aldrich), 1 mg/mL hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 1 mg/mL cólera toxina (Sigma-Aldrich) y 10 mg/mL de insulina (Sigma-Aldrich). Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 fueron mantenidas en medio DMEM rico en glucosa con L-Glutamine con sodio piruvato (BioWest), suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco) y 500 UI/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomycin (Cultek).

Las células fueron incubadas a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Se les cambió el medio cada 48 – 72 horas, hasta alcanzar una confluencia del 60 – 70%. Una vez alcanzada esta confluencia se realizaron subcultivos y/o se sembraron los respectivos experimentos, despegando para ello las células con tripsina (Gibco).

Para los experimentos, las células fueron sembradas en frascos de cultivo con tapón dotado de filtro (Eppendorf Ibérica) para permitir el intercambio de gases, de 25 cm<sup>2</sup> de superficie a distintas densidades (10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> células/mL). Una vez sembradas, se les cambió el medio cada 48 – 72 horas y se dejaron crecer hasta un 60 – 70% de confluencia. Alcanzada esta confluencia se las privó de suero y se les retiró el medio con FBS y se mantuvieron en medio libre de suero 24 horas previas al tratamiento con 10 µg/mL de insulina (Sigma-Adrich). Las células fueron recogidas 24 horas después del tratamiento con insulina. Para ello, se les retiró el medio y se añadió PBS para lavar las células. Tras el lavado, el PBS fue descartado y se añadió 1 – 2 mL de tripsina dejando los frascos de cultivo en el incubador a 37°C durante 2 – 3 minutos. A continuación, se añadió 3 – 5 mL de medio de cultivo con FBS para inhibir el efecto de la tripsina y se centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 rpm a temperatura ambiente. Seguidamente, el pellet fue resuspendido en 1 mL de PBS y centrifugado de nuevo, almacenándose el pellet resultante a - 80°C hasta su uso.



**Figura 3.7. Representación esquemática del tratamiento con insulina.**

### 3.6.3. Muestras de pacientes con cáncer de mama

Entre las muestras cedidas pertenecientes a pacientes sin metástasis, encontramos cuatro hormono positivas (ER+/PR+/HER2-) (clasificadas en grado I) y cinco muestras Triples Negativas (TN) (clasificadas en grado III). Todas las muestras hormono positivas usadas (AAA2622843, AAA3182426, CMAMA14\_2013 y CMAMA15\_2013) y una de las triples negativas presentaban diagnóstico anatomopatológico (AAA1116133), mientras que del resto de muestras triples negativas no disponíamos información de ellas (CMAMA1\_2013, CMAMA8\_2013, CMAMA43\_2013, CMAMA54\_2014). Además de las muestras citadas anteriormente, se incluyeron seis muestras de pacientes sanos; siendo cinco de ellas no portadoras de la mutación familiar BRCA1 o BRCA2 (28041389, AAA0027786, AAA0021149, AAA1351273), aunque dicha información no estaba disponible para la muestra 207035. La media de edad era de 64 años y el tamaño del tumor variaba de los 1,2 cm a los 1,8 cm.

Las muestras y datos de los pacientes incluidos en esta tesis doctoral fueron proporcionados por el Biobanco IBSP-CV (PT13/0010/0064) integrado en la red de Biobancos Valenciana y por el Biobanco del Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS (Registro Nacional de Biobancos B.0000678), integrado en la Plataforma de Biobancos y Biomodelos del Instituto de Salud Carlos III (PT20/00045), ambos Biobancos integrados en la Red Nacional de Biobancos Españoles, siguiendo los procedimientos de operación estándar con la aprobación de los comités científicos y éticos. Cabe destacar, que las muestras proporcionadas para la realización de estos experimentos son muestras sobrantes de otros proyectos de investigación que fueron incorporadas a la colección de muestras de los Biobancos. La información disponible de cada muestra se recoge en la tabla 3.1.

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

Biobanco	Código	Edad	Clasificación	Volumen	Diagnóstico anatomopatológico
La Fe	207035	61	Sano	3 mL	
La Fe	CMAMA14_2013	63	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup>	1 mL	
La Fe	CMAMA15_2013	62	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup>	1 mL	
La Fe	CMAMA1_2013	65	TN	1 mL	
La Fe	CMAMA8_2013	65	TN	1 mL	
La Fe	CMAMA43_2013	70	TN	1 mL	
La Fe	CMAMA54_2014	48	TN	1 mL	
Ramón y Cajal	28041389	49	Sano	500 µL	No portadora de la mutación familiar BRCA1
Ramón y Cajal	AAA0027786	70	Sano	500 µL	No portadora de la mutación familiar BRCA2
Ramón y Cajal	AAA0021149	64	Sano	500 µL	No portadora de la mutación familiar BRCA2
Ramón y Cajal	AAA1351273	54	Sano	500 µL	No portadora de la mutación familiar BRCA1
Ramón y Cajal	AAA2622843	74	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup>	500 µL	Mama derecha: carcinoma ductal infiltrante (grado I) de 1,4 cm de diámetro. Ganglios linfáticos negativos para metástasis (OSNA < 250 copias)
Ramón y Cajal	AAA3182426	72	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup>	500 µL	Mama derecha: carcinoma ductal infiltrante (grado I) de 1,2 cm de diámetro. Piel y pezón sin lesiones. Ganglio centinela negativo para metástasis (OSNA < 250 copias)
Ramón y Cajal	AAA1116133	72	TN	500 µL	Mama izquierda: carcinoma ductal infiltrante (grado III) de 1,8 cm de diámetro. Dos ganglios linfáticos centinelas axilares izquierdos negativos para metástasis (OSNA < 250 copias)

**Tabla 3.1. Información de las muestras cedidas utilizadas en esta tesis doctoral.**

### 3.6.4. Preparación de células y análisis por Western Blot

En un primer momento los pellets celulares que se encontraban congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  fueron lisados en tampón de lisis RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS) (ThermoFisher Scientific) para liberar las proteínas intracelulares. Junto con la rotura de las células, se liberan al medio enzimas proteasas que pueden degradar la proteína de interés, para evitarlo se añadió inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasas (ThermoFisher Scientific). A continuación, las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo y finalmente los pellets fueron centrifugados durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y 14.000 rpm. El sobrenadante fue almacenado en hielo hasta su uso para evitar la degradación de las proteínas.

Tras la lisis de las muestras, se llevó a cabo la cuantificación de proteínas utilizando el método de Bradford y usando albúmina sérica bovina (BSA) para establecer una recta patrón y poder estimar por interpolación la concentración proteica de las muestras. La medida se llevó a cabo en un BioEspectrofotómetro de Eppendorf (Alemania) a una longitud de onda de 595 nm.

El western blot es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de proteínas. Descrita por primera vez en 1979 por Harry Towbin et al <sup>55</sup> permite la identificación de una proteína de interés en una muestra determinada mediante la utilización de un anticuerpo primario que reconoce un epítipo de la proteína. Con el western blot podemos estimar el tamaño de la proteína, confirmar la presencia de modificaciones postraduccionales, como, por ejemplo, la fosforilación y comparar cuantitativamente los niveles de proteínas entre diferentes muestras <sup>56</sup>. La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es la técnica analítica empleada para separar proteínas en función de su peso molecular. Por un lado, la mezcla de acrilamida/bis-acrilamida forma una especie de red compleja en polimerizar, a través de la cual migran las proteínas cuando se les aplica un campo eléctrico, por otro lado, la presencia del detergente Dodecilsulfato Sódico (SDS), un detergente anfipático que desnaturaliza las proteínas, les confiere una densidad de carga

global negativa, permitiendo así separar a las proteínas en función de su peso molecular.

Para ello, previamente las muestras fueron calentadas durante 5 minutos a 95°C con tampón de carga Laemmli (277.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, 44.4% (v/v) glicerol, 4.4% LDS, 0.02% azul de bromofenol) (Bio-Rad, España). Se cargaron entre 10 – 50 µg de proteína de cada muestra y se corrieron usando geles de poliacrilamida del 4 – 20% de Bio-Rad durante 1 hora a un voltaje constante de 150 V en tampón de electroforesis 1X (100 mL de Tris/Glicina/SDS 10X de Bio – Rad en 900 mL de agua destilada). Las proteínas fueron transferidas a unas membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) durante 1 hora a 100 V utilizando Criterion Blotter de Bio-Rad. Para la cual se usó tampón de transferencia 1X (100 mL de Tris/Glicina 10X de Bio – Rad en 700 mL de agua destilada y 20% de metanol).

Acabada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante en tampón de bloqueo TBS-T (leche en polvo al 5% diluida en tampón tris salino (TBS) de Bio-Rad + 0.1% Tween® 20) y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido en BSA al 5% diluida en tampón tris salino (TBS) de Bio-Rad + 0.1% Tween® 20 durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios usados para el western blot fueron los mismos que se usaron como anticuerpos de captura y anticuerpos de detección en el inmunoensayo de las micropalanca (en la tabla 3.2 se detallan las especificaciones de los anticuerpos primarios). Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas con TBS – Tween® 20 al 0.1% por 3 veces 10 minutos cada lavado y, seguidamente, se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. Los anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (AP) se utilizaron según las instrucciones del fabricante. La tabla 3.3 refleja los anticuerpos secundarios usados.

Finalmente, la detección de las proteínas se llevó a cabo usando el kit *Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante y la imagen se digitalizó con el equipo Gel Doc™ EZ System de Bio-Rad.

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>	<b>Descripción</b>
Anti-pSer473	Enzo Life Sciences	11E6	1:1000	Monoclonal de ratón
Anti-AKT	Enzo Life Sciences	5C10	1:1000	Monoclonal de ratón
Anti-RAS G13D	Creative Diagnostic	CABT-L410R	1:1000	Policlonal de conejo
Anti-KRAS	Abcam	180772	1:1000	Policlonal de conejo
Anti- $\beta$ -Actina	Sigma-Aldrich	A5441	1:1000	Monoclonal de ratón

**Tabla 3.2. Relación de los anticuerpos primarios empleados para Western Blot.**

<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
Goat Anti – Mouse IgG – AP	Bio-Rad	1706520
Goat Anti – Rabbit IgG – AP	Bio-Rad	1706518

**Tabla 3.3. Relación de anticuerpos secundarios para Western Blot.**

### 3.6.5. Anticuerpos de captura y anticuerpos de detección usados

Tras la activación de la superficie de las micropalancas, se inmovilizó el anticuerpo de captura sobre las mismas y se conjugó el anticuerpo de detección con las nanopartículas de oro (ver capítulo 2, apartado “2.5. Inmovilización del anticuerpo de captura sobre la superficie de silicio” y apartado “2.7. Conjugación del anticuerpo de detección a la nanopartícula de oro”). En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos de captura y de detección usados en este capítulo:

	<b>Anticuerpo de captura</b>	<b>Anticuerpo de detección</b>
<b>pSer473</b>	(pSer473) AKT anticuerpo monoclonal (Enzo Life Sciences, 11E6)	AKT anticuerpo monoclonal (Enzo Life Sciences, 5C10)
<b>G13D</b>	Anti-RAS policlonal (mutación G13D) (Creative Diagnostic, CABT-L410R)	Anticuerpo Anti-KRAS (Abcam, 180772)

**Tabla 3.4. Anticuerpos de captura y anticuerpos de detección usados.**

Para AKT, el anticuerpo de captura reconoce el aminoácido fosforilado serina en posición 473 presente en la región C – terminal hidrofóbica de la proteína AKT y el anticuerpo de detección reconoce la región C – terminal (aminoácidos 466 – 480). Mientras que para G13D, el anticuerpo de captura reconoce la proteína G13D y el anticuerpo de detección Anti-KRAS reconoce la secuencia de KRAS comprendida entre los aminoácidos 30 – 189.

### 3.6.6. Inmunoensayo

Dependiendo de la muestra a utilizar, se siguió diferentes procesos en el tratado de la muestra, previo al inmunoensayo.

En el caso de los cultivos celulares, tras su lisis, el lisado fue transferido a unas columnas de centrifugación de 2 mL las cuales fueron centrifugadas durante 25 minutos a 4°C y 3.000 rcf, obteniendo un volumen final de entre 15 – 70 µL. En los lisados para detectar p-AKT (Ser473) se utilizaron columnas de 50 KDa y para G13D columnas de 10 KDa (UFC205024 y UFC201024, Fisher Scientific) respectivamente. Finalizada la centrifugación, el tubo de filtrado fue invertido y se centrifugó durante 2 minutos a 4°C y 1.000 rcf para obtener el concentrado, añadiendo 1 mL de PBS y almacenándose a 4°C hasta su uso.

Para las muestras de suero de pacientes, el protocolo de lisado fue igual al descrito para las células. Una vez lisadas las muestras, el filtrado fue transferido a columnas de centrifugación de 2 mL de 100 KDa (UCF210024, Fisher Scientific) y se centrifugó durante 45 minutos a 4°C y 3.000 rcf. Debido a que el volumen obtenido era pequeño (15 – 70 µL), este fue resuspendido en 1 mL de PBS para ser utilizado posteriormente, el cual se dividió en 500 µL

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

que fueron utilizados para la detección de p-AKT (Ser473) y 500  $\mu$ L para la detección de la mutación G13D en KRAS.

A continuación, el arrays de micropalanca previamente biofuncionalizadas fue incubado en 1 mL de lisado celular o muestra de suero durante 1 hora a 37°C bajo agitación. Terminada la hora, las micropalanca fueron lavadas con MES 10 mM (pH 5.5) al 0.5% de Tween® 20 durante 15 minutos a 25°C bajo agitación (este paso se repitió una vez más), lavándose con agua Milli Q y secadas bajo un flujo de nitrógeno seco. En este momento, se midió la frecuencia de resonancia mediante la técnica “*beam deflection*” descrita en la introducción.

El inmunoensayo se llevó a cabo sumergiendo las micropalanca durante 1 hora a 37°C bajo agitación en 1 mL de solución de nanopartículas de oro 10  $\mu$ g/mL, funcionalizadas con el anticuerpo de detección y preparada en MES 10 mM (pH 5.5) al 0.1% de Tween® 20. Finalmente, las micropalanca fueron incubadas en 4 mL de MES 10 mM (pH 5.5) al 0.5% de Tween® 20 durante 4 horas a 25°C bajo agitación, lavadas con agua Milli Q y secadas bajo un flujo de nitrógeno seco. Las micropalanca fueron fotografiadas midiendo también su frecuencia de resonancia al finalizar el inmunoensayo.

### 3.7. Resultados y discusión

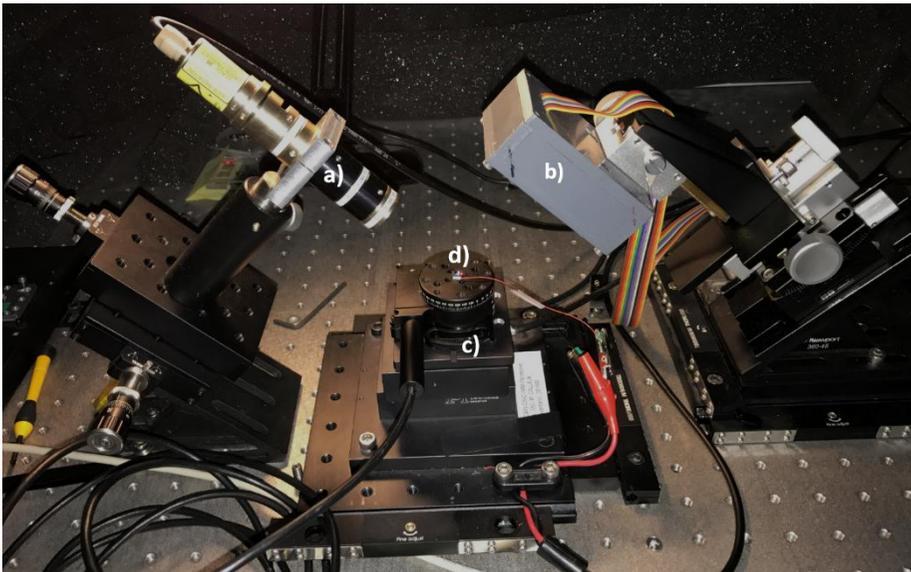
#### 3.7.1. Métodos de transducción nanomecánica y optoplasmónica

Como se ha descrito previamente, las matrices de ocho micropalanca y las nanopartículas de oro de 100 nm fueron biofuncionalizadas con anticuerpos de captura y anticuerpos de detección, respectivamente. Las nanopartículas de oro actúan como masa y etiqueta plasmónica, ambas características son detectadas a través de las micropalanca de silicio que hacen la función de resonador mecánico “pesando” la masa de las nanopartículas de oro capturadas y gracias a la cavidad óptica, que mejora la señal plasmónica de las

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

nanopartículas. Cada condición se llevó a cabo al menos con 4 arrays de ocho micropalancas cada array.

El primer método de transducción empleado es el nanomecánico, en el que las medidas de la frecuencia de resonancia se llevaron a cabo únicamente en las matrices de ocho micropalancas. En la transducción nanomecánica, se mide la vibración de las micropalancas mediante la técnica “*beam deflection*”<sup>57,58</sup> descrita en la introducción (capítulo 1, apartado “1.1.1.2. Sistemas de lectura empleados en los sensores nanomecánicos”). La técnica de lectura combina el método “*beam deflection*” con el escaneo 2D automatizado del láser sobre el extremo libre de la micropalanca. Se utilizó un láser de diodo verde con una potencia  $\leq 10$  mW (Schäfter+Kirchhoff GmbH, 520 nm), siendo el tamaño del spot del láser de  $\approx 1$   $\mu\text{m}$  y un actuador móvil para el escaneo (Physik Instrumente GmbH & Co.) (figura 3.8.).



**Figura 3.8. Sistema de lectura empleado para las medidas de las frecuencias de resonancia. a) láser de diodo, b) fotodetector, c) dispositivo piezoeléctrico y d) arrays de ocho micropalancas.**

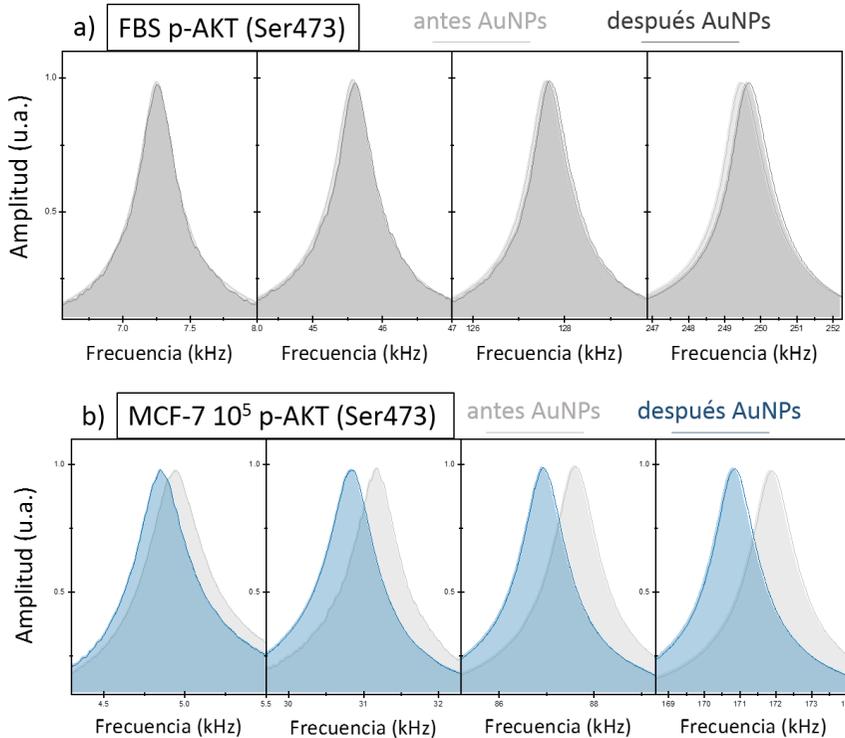
La frecuencia de resonancia perteneciente a los cuatro primeros modos de vibración de las micropalancas fue medida en aire antes y después de la detección con las nanopartículas de oro conjugadas con el anticuerpo de detección. Asumiendo que la distribución de masa añadida sobre la superficie

de la micropalanca es uniforme, la variación relativa de la frecuencia de resonancia viene dada por la ecuación <sup>59</sup>:

$$\frac{\Delta f_n}{f_n} = -\frac{1}{2} \frac{\Delta m}{m} \quad (3.1)$$

donde  $f_n$  es la frecuencia de resonancia del enésimo modo de vibración en aire después de la captura del biomarcador,  $\Delta f_n$  es el cambio de la frecuencia de resonancia después del inmunoensayo,  $m$  es la masa de la micropalanca y  $\Delta m$  es el incremento de la masa de la micropalanca debido a los pasos del inmunoensayo. Las medidas tardan menos de 10 minutos con el fin de mantener la actividad biológica de las proteínas en la superficie de las micropalanca. Los datos obtenidos fueron procesados por un software desarrollado en Wolfram Mathematica<sup>®</sup>.

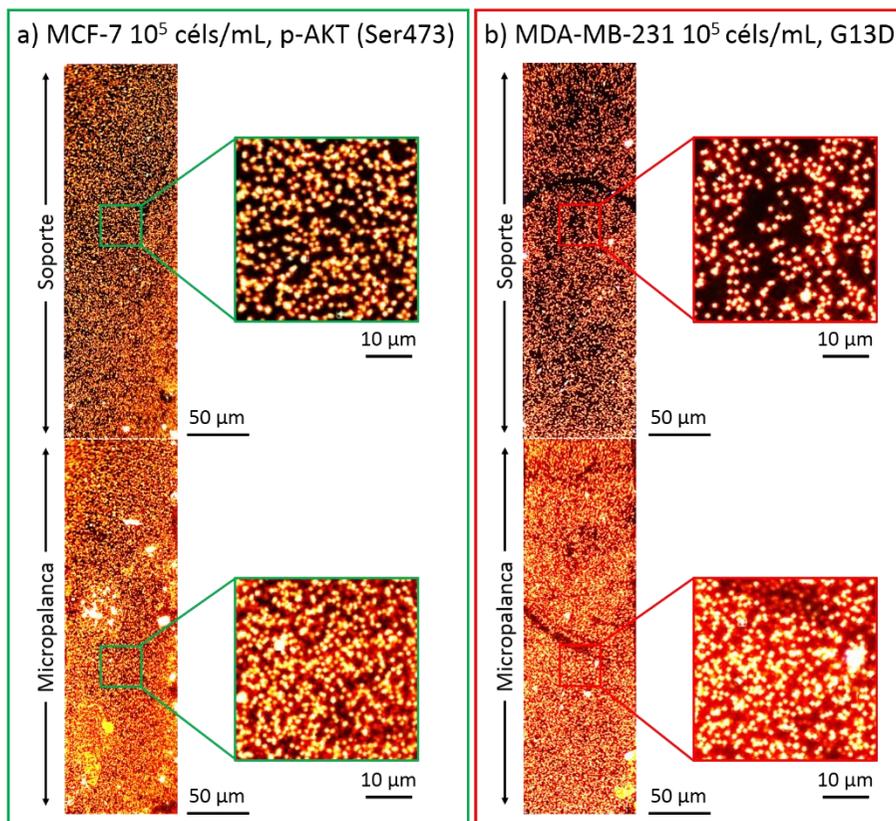
En la figura 3.9 se muestra un ejemplo de las curvas de las frecuencias de resonancia de los cuatro primeros modos de vibración, antes y después de la realización del inmunoensayo usando FBS y la línea celular MCF-7 a una concentración de  $10^5$  células/mL para la detección de p-AKT (Ser473). Se observa como en el caso de la línea celular MCF-7  $10^5$  células/mL (figura 3.9b) las frecuencias de resonancia disminuyen debido a la masa añadida sobre la micropalanca como consecuencia de la detección de p-AKT (Ser473) por parte de los anticuerpos de detección anclados a las nanopartículas de oro. Sin embargo, para el FBS (figura 3.9a) el cambio es mínimo y las frecuencias se mantienen. Las líneas celulares MCF-10A y MDA-MB-231 presentan cambios en la frecuencia de resonancia de alrededor  $-0.32 \pm 0.17 \%$  y  $-0.64 \pm 0.36 \%$ , respectivamente, mientras que en el caso de la línea celular MCF-7 el cambio se reduce a  $-0.87 \pm 0.14 \%$ . La señal de fondo observada para MCF-10A y MDA-MB-231 proviene de contaminantes, interacciones no específicas con otras proteínas presentes en el lisado celular y de reacción cruzada anticuerpo-anticuerpo del inmunoensayo.



**Figura 3.9. Curvas de las frecuencias de resonancia de los cuatro primeros modos de vibración antes y después de la incubación con las nanopartículas de oro para la detección de p-AKT (Ser473). a)** inmunoensayo control negativo con FBS y en **b)** inmunoensayo de detección con la línea celular MCF-7 10<sup>5</sup> células/mL. Se observa como la frecuencia de resonancia disminuye debido a la masa añadida sobre la superficie de las micropalanca.

El segundo mecanismo de transducción es el optoplasmónico<sup>60</sup> explicado en la introducción (ver capítulo 1 apartado “1.1.2.2. Sensores ópticos etiquetados: sensor optoplasmónico”). Aunque usando este método alcanzamos una elevada sensibilidad, el rango dinámico es muy limitado y no somos capaces de cuantificar o diferenciar cantidad de biomarcador. Además, la amplificación de la señal plasmónica debido al modo super híbrido cavidad-plasmón generado depende en gran parte del grosor de las micropalanca, y una pequeña diferencia en este parámetro afecta gravemente al rendimiento del nanosensor. Para superar estas limitaciones, hicimos uso de la amplificación localizada que se genera en las nanopartículas metálicas cuando se depositan sobre un material dieléctrico<sup>61</sup>, para discriminar con alta

precisión las nanopartículas de oro en el soporte de la micropalanca (figura 3.10).

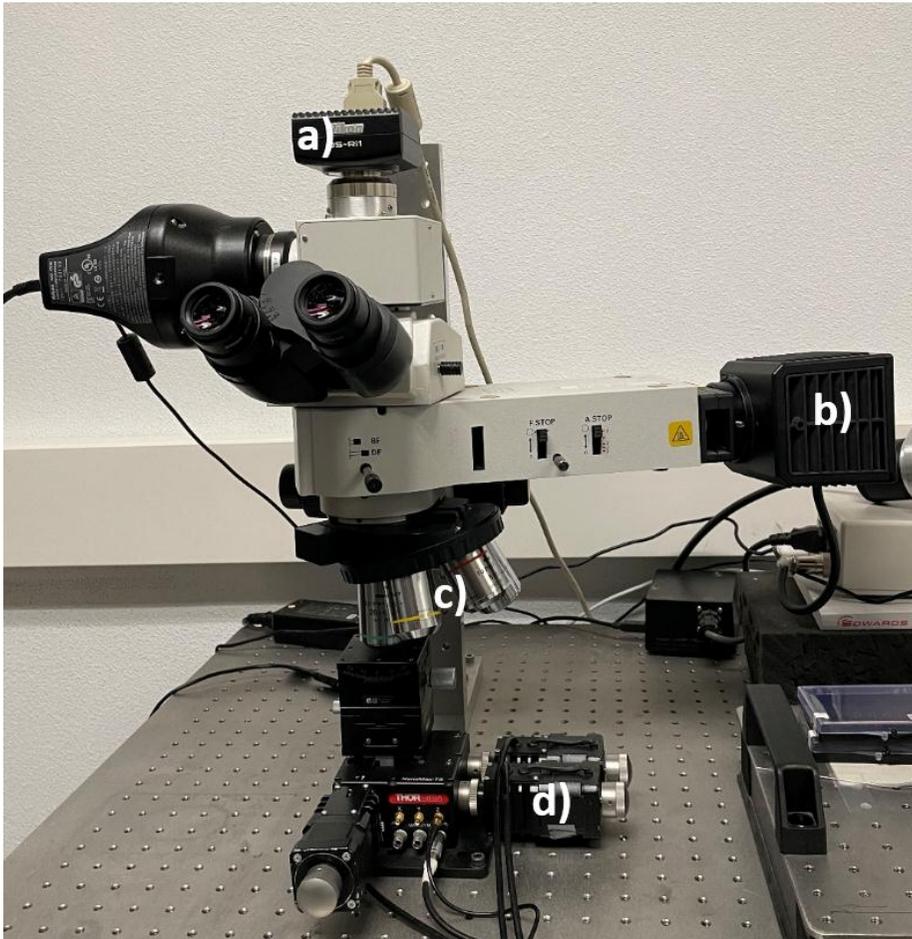


**Figura 3.10. Imágenes de campo oscuro de las micropalancas y el soporte. a)** inmunoensayo referente a la detección de p-AKT (Ser473) en la línea celular MCF-7 10<sup>5</sup> células/mL y **b)** inmunoensayo para la detección de la mutación G13D en la línea celular MDA-MB-231 10<sup>5</sup> células/mL. Haciendo uso del soporte podemos distinguir de manera más fácil la densidad de nanopartículas de oro que utilizando las micropalancas.

Finalizado el inmunoensayo, la señal dispersada por las nanopartículas de oro en el soporte de la micropalanca fue medida usando un microscopio óptico (Nikon Eclipse, Japón) de campo oscuro. Éste está equipado con una cámara de color Peltier-cooled CCD (DSRi, Nikon-Japón) conectado al ordenador a través de un controlador (DS-U3, Nikon-Japón) y con un objetivo 50X (N.A. 0.8, LU Plan Flour, Nikon- Japón). Las imágenes tomadas con el microscopio fueron procesadas con un software desarrollado en Wolfram Mathematica®. El programa cuantifica ópticamente la intensidad de la luz roja

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

dispersada en cada imagen, pudiendo ser correlacionada la intensidad del color con una mayor o menor cantidad de biomarcador.



**Figura 3.11. Microscopio óptico usado para la realización de las imágenes de campo oscuro de los soportes de las micropalanca. a) cámara de color, b) fuente de iluminación, c) objetivo 50X y d) posicionadores.**

Debido al pequeño valor del coeficiente de extinción ( $k$ ) del  $\text{SiO}_2$ <sup>61</sup>, el fondo de reflectividad de la superficie del soporte de la micropalanca es bajo, permitiendo de manera más fácil discriminar y aislar la señal de dispersión provocada por las nanopartículas de oro presentes en la superficie (figura 3.10).

La sensibilidad analítica alcanzada con este nuevo método de medida de la señal optoplasmónica no se vio comprometido cuando es comparado con el

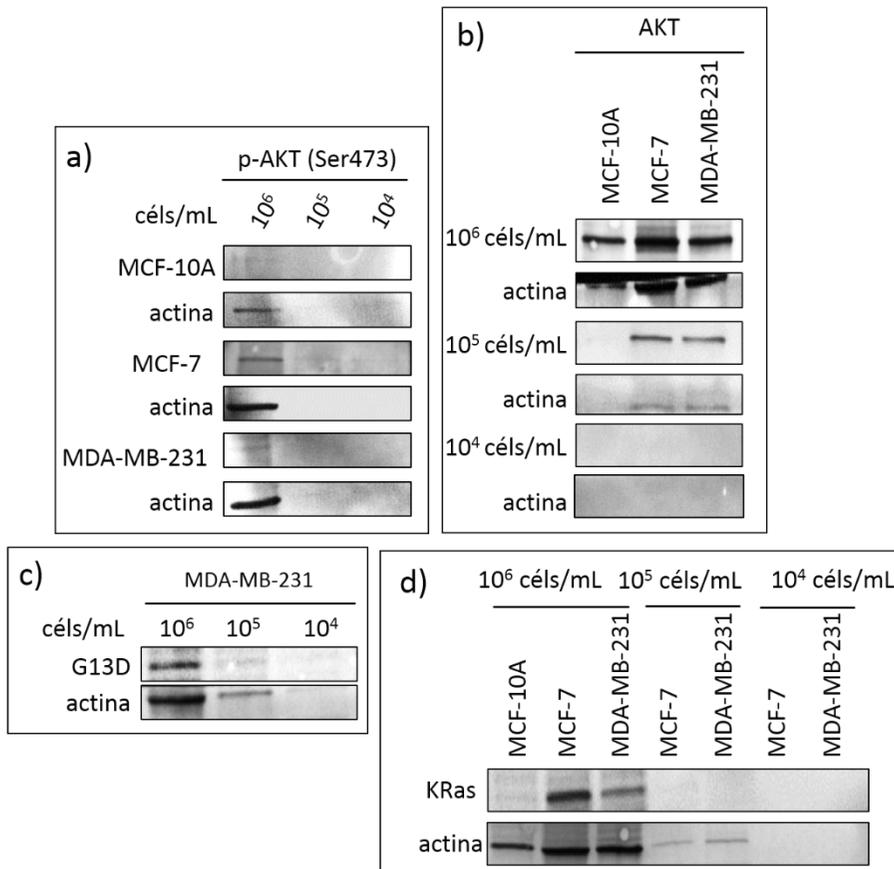
método usando la cavidad óptica de la micropalanca <sup>60</sup>. Además, usando el soporte de la micropalanca como nuevo método para la medida optoplasmónica nos aseguramos que cada muestra sea medida mediante alguno de los dos métodos de transducción empleados, ya que la fragilidad y el difícil manejo de las micropalancas debido a su pequeño tamaño hace que puedan romperse fácilmente en cualquier punto del inmunoensayo. Haciendo que esta tecnología sea más robusta para el análisis de muestras reales en ensayos clínicos.

### 3.7.2. Desarrollo y validación del nanosensor usando líneas celulares de cáncer de mama

Un aspecto clave en el desarrollo del biosensor nanomecánico y optoplasmónico es el uso de anticuerpos. La elección de una pareja adecuada de anticuerpos es crucial para evitar reacción cruzada, la cual surge principalmente de la unión no específica entre los anticuerpos de captura, anticuerpos de detección y proteínas, contribuyendo a un incremento del ruido de fondo, disminuye el límite de detección y en el peor de los casos, puede generar resultados falsos positivos <sup>62,63</sup>.

Para ello, se realizó un western blot con los anticuerpos usados (figura 3.12). El anticuerpo de captura que reconoce la fosforilación de la Ser473 de AKT se usó en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 (figura 3.12a) y el anticuerpo de captura que reconoce la mutación G13D en KRAS se usó en la línea celular MDA-MB-231 (figura 3.12c) ya que es la única línea de este estudio que presenta dicha mutación <sup>49</sup>. Como se observa en la figura 3.12a, en MCF-7  $10^6$  células/mL, el anticuerpo de captura usado detecta p-AKT (Ser473), en cambio, en la línea celular MCF-10A  $10^6$  células/mL no se observa ninguna banda. En la línea celular MDA-MB-231  $10^6$  células/mL, se distingue una banda muy tenue. Para concentraciones de  $10^5$  células/mL y  $10^4$  células/mL la fosforilación de la serina 473 no se observa para ninguna línea celular. La mutación G13D en KRAS se observa en la línea celular MDA-MB-231 para una concentración de  $10^6$  células/mL, pero no para concentraciones de

$10^5$  células/mL y  $10^4$  células/mL (figura 3.12c). Los anticuerpos de detección también fueron usados en western blot. En la figura 3.12b se observa una banda referente a AKT para  $10^6$  células/mL y  $10^5$  células/mL en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Mientras que para el anticuerpo KRAS, se observa en  $10^6$  células/mL, tanto para MCF-7 como para MDA-MB-231, no observándose para densidades inferiores (figura 3.12d).



**Figura 3.12. Imagen representativa de los western blot realizados en las líneas celulares.** Las células fueron cultivadas y posteriormente se llevaron a cabo los western blot para observar la presencia o ausencia de p-AKT (Ser473) y G13D en los lisados celulares con los diferentes anticuerpos de captura usados en el inmunoensayo (a) para la captura de p-AKT (Ser473), (c) para la captura de la mutación G13D y con los anticuerpos de detección (b) para la detección de AKT y (d) para la detección de KRAS.

Ya que nuestro objetivo es detectar proteínas que estén por debajo del límite de detección de las tecnologías en proteómica que existen en la actualidad, por esta razón, en los experimentos mostrados a continuación con el biosensor nanomecánico y optoplasmónico usamos concentraciones por debajo de  $10^6$  células/mL, en concreto usamos  $10^5$  células/mL y  $10^4$  células/mL.

La señal nanomecánica y la señal optoplasmónica de las diferentes densidades en las líneas celulares usadas se observa en las figuras 3.13 y 3.14, respectivamente. Los resultados presentados engloban un total de 432 micropalancas funcionalizadas.

Usando el mecanismo de transducción nanomecánica (figura 3.13), se puede observar un mayor incremento en la expresión de p-AKT (Ser473) en la línea celular MCF-7 a una densidad de  $10^5$  células/mL en comparación con las líneas celulares MCF-10A y MDA-MB-231. En cambio, para la mutación G13D en KRAS, desafortunadamente, el incremento en la expresión en la línea celular MDA-MB-231 que cabría esperar no se observa en ninguna de las densidades estudiadas cuando se mide la frecuencia de resonancia en las micropalancas.

Aunque los cambios relativos de frecuencia de resonancia se deben probablemente a la masa añadida de nanopartículas sobre la superficie de las micropalancas, la existencia de mecanismos no lineales inducidos por la tensión de las micropalancas, podrían afectar a la frecuencia de resonancia y, por ende, disminuir la sensibilidad de la masa añadida. Además, la masa añadida debido a adsorciones no específicas y a los posibles contaminantes provocan un ruido de fondo que conlleva a limitar la sensibilidad y especificidad del bionanosensor. Todas estas características dificultan la detección de p-AKT (Ser473) o la mutación G13D en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 cuando hacemos uso del método de transducción nanomecánico. Sin embargo, con el uso del método de transducción optoplasmónico, gracias a la toma de imágenes, la señal que proviene de la contaminación es filtrada de manera eficaz por el uso de máscaras desarrolladas en el software usado. La mejora en la sensibilidad y especificidad

del método de transducción optoplasmónico es atribuido a la elevada especificidad del uso de las nanopartículas de oro.

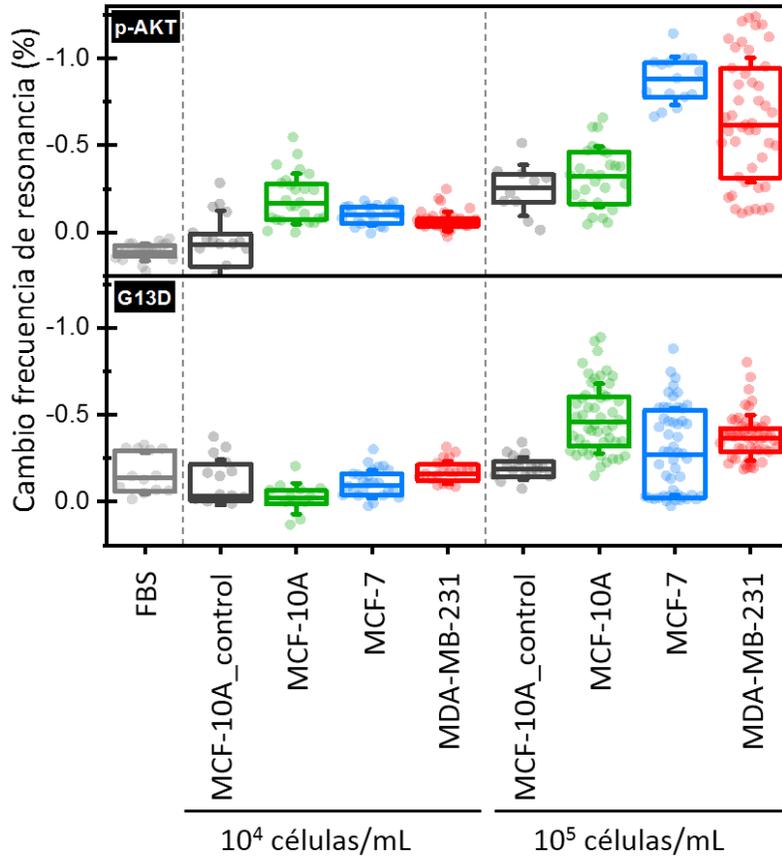


Figura 3.13. Representación gráfica de la señal obtenida mediante el método de transducción nanomecánica.

En los resultados obtenidos usando el mecanismo de transducción optoplasmónico (figura 3.14), se observa un ligero incremento en la expresión de p-AKT (Ser473) en la línea celular MCF-7 para 10<sup>4</sup> células/mL y 10<sup>5</sup> células/mL, en comparación con el resto de líneas celulares. En cambio, en el caso de la mutación G13D en KRAS se puede observar claramente en la línea celular MDA-MB-231 en 10<sup>5</sup> células/mL en comparación con la expresión obtenida en las líneas celulares MCF-10A y MCF-7 para dicha mutación.

En las figuras 3.15 y 3.16, correspondientes a la detección de p-AKT (Ser473) y la mutación G13D, respectivamente, se observan las imágenes en campo oscuro del soporte de las micropalanca usando las líneas celulares a diferentes densidades tras la detección de las proteínas por parte del anticuerpo de detección.

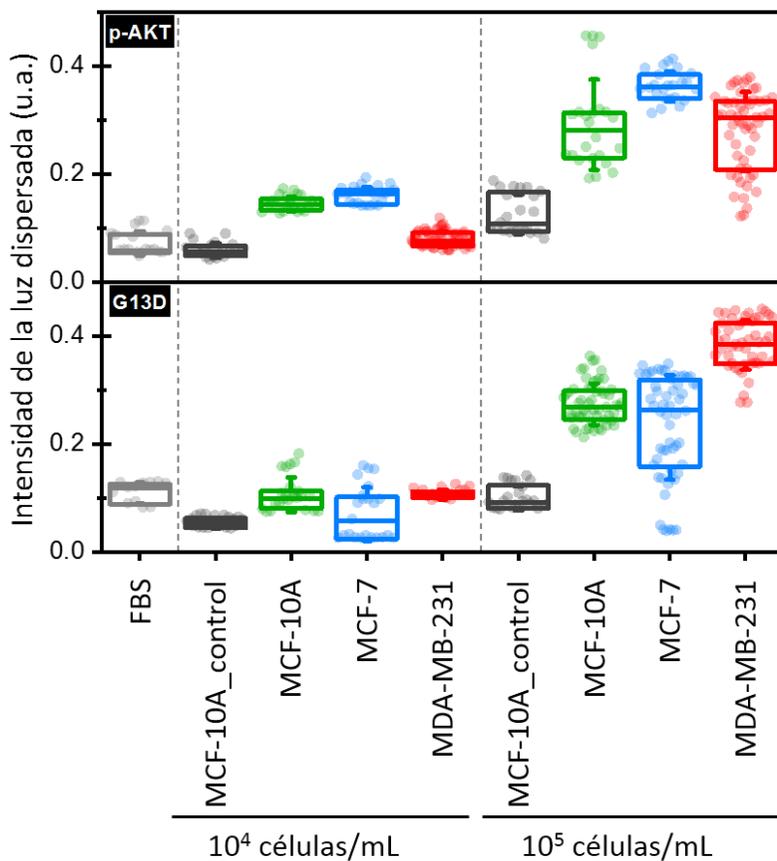


Figura 3.14. Representación gráfica de la señal obtenida mediante el método de transducción optoplasmónica.

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

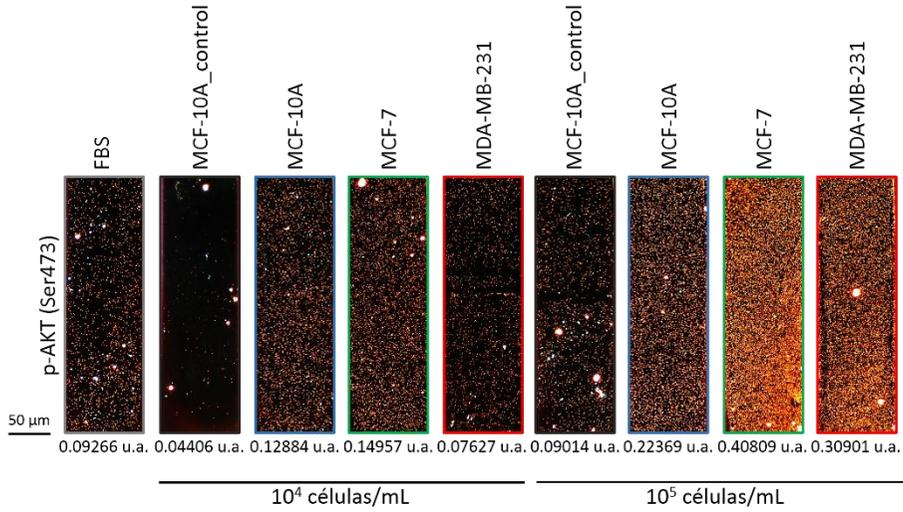


Figura 3.15. Imágenes ópticas en campo oscuro de los soportes de las micropalancas después de finalizar el inmunoensayo en la detección de p-AKT (Ser473).

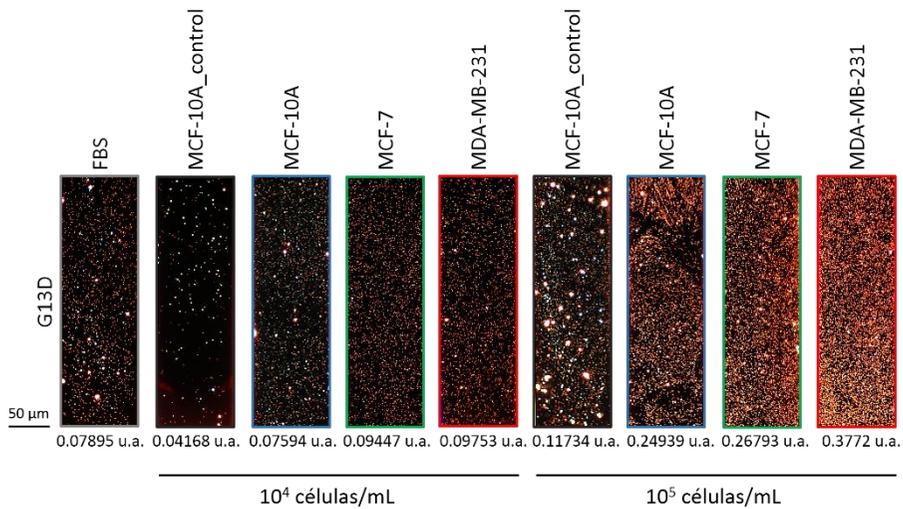


Figura 3.16. Imágenes ópticas en campo oscuro de los soportes de las micropalancas después de finalizar el inmunoensayo en la detección de la mutación G13D.

Para descartar señales de bioreconocimiento por interacciones no específicas que pudiesen afectar al límite de detección del bionanosensor o que pudiesen generar resultados falsos positivos, se realizaron dos tipos de inmunoensayos con controles negativos.

En el primer caso se utilizó FBS en sustitución al lisado celular de MCF-10A como muestra control para los arrays funcionalizados con los anticuerpos de captura para la fosforilación de la Ser473 o la mutación G13D. En el FBS podemos encontrar proteínas, lípidos, carbohidratos y enzimas, entre otros, en cambio, en un lisado celular podemos encontrar restos intracelulares como ADN, ARN, proteínas y otros orgánulos pertenecientes a las células; presentando componentes diferentes en el FBS y el lisado celular. El uso del FBS como muestra nos podría aportar información de la existencia de posibles interacciones inespecíficas con otras proteínas presentes en la muestra en nuestro inmunoensayo. El cambio en la frecuencia de resonancia es de  $0.12 \pm 0.05$  % y para la señal de la luz dispersada (en unidades arbitrarias) de  $0.07 \pm 0.02$  (u.a.) para p-AKT (Ser473) y de  $-0.16 \pm 0.11$  % en la frecuencia de resonancia y de  $0.10 \pm 0.02$  (u.a.) para G13D. Estos resultados indican la existencia de interacciones con proteínas inespecíficas presentes en el FBS, lo que genera una señal de fondo en el inmunoensayo para ambos métodos de transducción.

En segundo lugar, el anticuerpo de captura fue sustituido por un IgG *anti-Goat/Sheep* (G2904, Sigma) el cual no reconoce la fosforilación de la serina 473 de AKT ni la mutación G13D en KRAS. Además, no reacciona con los anticuerpos de detección anclados a las nanopartículas de oro, los cuales se mantuvieron para dichos experimentos. Para estos experimentos, los arrays fueron incubados en lisados celulares de la línea celular MCF-10A a  $10^4$  células/mL y  $10^5$  células/mL. En este caso podemos observar un cambio de frecuencia de  $0.10 \pm 0.22$  % y  $-0.24 \pm 0.15$  % para  $10^4$  células/mL y  $10^5$  células/mL, respectivamente cuando usamos el anticuerpo de detección que reconoce a p-AKT (Ser473) y de  $-0.11 \pm 0.13$  % y  $-0.19 \pm 0.06$  % para  $10^4$  células/mL y  $10^5$  células/mL, respectivamente, con el uso del anticuerpo de detección para la mutación G13D. La respuesta obtenida en el método de transducción optoplasmónico para la detección de p-AKT (Ser473) es de  $0.06 \pm 0.01$  (u.a.) para  $10^4$  células/mL y de  $0.12 \pm 0.04$  (u.a.) para  $10^5$  células/mL,

mientras que para la mutación G13D es de  $0.05 \pm 0.01$  (u.a.) para  $10^4$  células/mL y de  $0.10 \pm 0.02$  (u.a.) para  $10^5$  células/mL. En este experimento control, donde hicimos uso de un anticuerpo de captura que no reacciona con los anticuerpos de detección, la baja señal obtenida en estos experimentos se debe a las interacciones no específicas de los anticuerpos de detección con otras biomoléculas presentes en los lisados celulares de MCF-10A de  $10^4$  células/mL y  $10^5$  células/mL.

De cualquier modo, en ambos experimentos con controles negativos observamos que la señal que surge no enmascara a la señal obtenida en nuestro inmunoensayo para la detección de p-AKT (Ser473) y la mutación G13D en KRAS.

La línea celular MCF-7 presenta una mutación en PIK3CA-E545K<sup>64,65</sup> presentando altos niveles de fosforilación de AKT en la Thr308 y en la Ser473, en cambio, en las líneas celulares de cáncer de mama que son *wild-type*, como es el caso de la línea celular MDA-MB-231, los niveles de fosforilación de AKT son bajos<sup>66</sup>.

En el método optoplasmónico, en el caso de  $10^4$  células/mL, para la línea celular MCF-10A se observa una mayor señal en la detección de p-AKT (Ser473) que para la línea celular MDA-MB-231 (figura 3.14). Esto podría deberse a una mayor interacción inespecífica de proteínas presentes en el lisado celular de MCF-10A o debido a que la expresión de p-AKT (Ser473) en la línea celular MDA-MB-231 fuese menor que en la línea celular MCF-10A, para la cual se han notificado niveles bajos de fosforilación de la Ser473 de AKT<sup>67</sup>. Sin embargo, para densidades de  $10^5$  células/mL en las líneas celulares MCF-10A y MDA-MB-231 no se observan diferencias en la expresión de p-AKT (Ser473), como consecuencia de la cantidad de proteínas presentes en dichos lisados celulares que podrían reaccionar de forma cruzada con los anticuerpos de detección anclados en las nanopartículas de oro, originando un fondo más ruidoso en la detección. No obstante, a pesar del fondo generado para estas dos líneas, es posible distinguir una expresión más elevada de p-AKT (Ser473) en la línea celular MCF-7.

La línea celular MDA-MB-231 presenta la mutación G13D<sup>49-51</sup>. En la figura 3.14, se observa la detección de la mutación G13D en la línea celular MDA-

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

MB-231 a  $10^5$  células/mL, al usar el método de transducción optoplasmónico como método de detección. En cambio, la señal obtenida mediante la transducción optoplasmónica es similar para las líneas celulares MCF-10A y MCF-7 ya que ambas líneas no portan la mutación G13D y como consecuencia se espera que presenten respuestas comparables en la señal optoplasmónica; siendo de  $0.11 \pm 0.03$  (u.a.) y  $0.07 \pm 0.05$  (u.a.) para MCF-10A y MCF-7, respectivamente, en el caso de  $10^4$  células/mL y de  $0.27 \pm 0.04$  y  $0.23 \pm 0.10$  para MCF-10A y MCF-7, respectivamente, en el caso de  $10^5$  células/mL. La señal originada en MCF-10A y MCF-7 podría ser debido a interacciones no específicas con otras proteínas presentes en los lisados de ambas líneas y a la reacción cruzada entre los anticuerpos de captura y los anticuerpos de detección, ya que la señal obtenida en estos casos es mayor en comparación con la señal obtenida para los experimentos controles negativos donde el anticuerpo de captura fue sustituido y no reconoce la mutación G13D ni reacciona con los anticuerpos de detección anclados a las nanopartículas de oro.

### 3.7.3. Empleo del biosensor optoplasmónico utilizando muestras de suero de pacientes con cáncer de mama

Tras finalizar los experimentos de desarrollo y validación del sensor para la detección de p-AKT (Ser473) y la mutación G13D en KRAS usando líneas celulares de cáncer de mama, el bionanosensor fue usado por primera vez para testar la tecnología desarrollada previamente con muestras de suero de pacientes con cáncer de mama.

Debido a que el método de transducción nanomecánica no obtuvo ninguna mejora significativa ni relevancia en la detección de p-AKT (Ser473) o en la mutación G13D en las líneas celulares, las muestras de suero de pacientes con cáncer de mama solo fueron testadas usando el método de transducción optoplasmónico.

En la figura 3.17 se observa el inmunoensayo para la detección de p-AKT (Ser473), donde se percibe una clara tendencia al alza en las muestras

hormonas positivas (HR+) de pacientes. Estos resultados están en acuerdo con los resultados obtenidos con las líneas celulares, donde la línea celular MCF-7, una línea hormono positiva (ER+/PR+/HER2-) con la mutación E545K en el gen PIK3CA, expresa más p-AKT (Ser473) que el resto de líneas celulares estudiadas. En los cánceres de mama hormono positivos, la vía PI3K es una de las vías más alteradas, relacionándose con mutaciones en PIK3CA, pérdida en la función de PTEN o la fosforilación de proteínas<sup>68,69</sup>. Investigaciones previas<sup>70-72</sup> basadas en el estudio de líneas celulares de cáncer de mama y tumores mamarios, han demostrado que la existencia de mutaciones en PIK3CA es mayor en cánceres de mama hormono positivos (42% - 31%) frente a las encontradas en cánceres de mama triple negativos (8.3% - 16%). Una tendencia similar se puede observar en los resultados aquí obtenidos (figura 3.17) usando el biosensor optoplasmónico, donde p-AKT (Ser473) fue detectada en las muestras hormono positivas. El ruido de señal obtenido en las muestras sanas para la detección de p-AKT (Ser473) podría estar asociado a interacciones inespecíficas o a que la alteración de la vía PI3K/AKT está alterada en otras enfermedades como son la diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurológicas, pero la información recibida de las muestras sanas no descarta otra patología que no sea cáncer de mama.

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

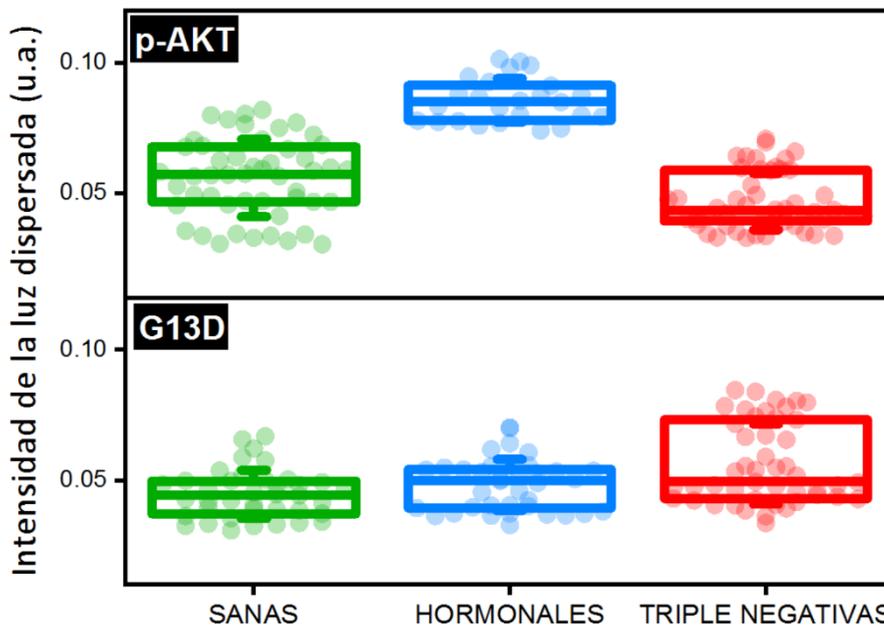
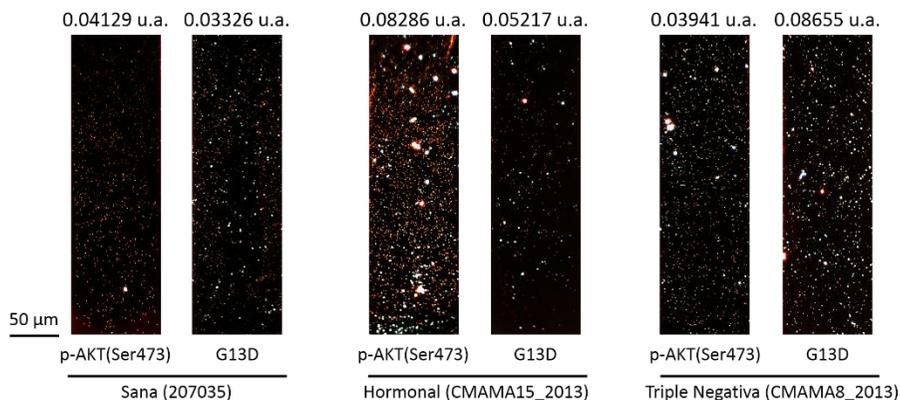


Figura 3.17. Gráfica de la detección de p-AKT (Ser473) y G13D en muestras de pacientes con cáncer de mama empleando el método de transducción optoplasmónico.

En la figura 3.18 podemos observar imágenes representativas en campo oscuro de los soportes de las micropalanca para la detección de p-AKT (Ser473) y la mutación G13D en muestras reales de pacientes con cáncer de mama. Se observa como en el caso de la muestra hormonal CMAMA15\_2013 la señal obtenida para la detección de la p-AKT (Ser473) (0.08286 u.a.) es más elevada que para G13D (0.05217 u.a.). En cambio, en la muestra triple negativa CMAMA8\_2013 la señal es mayor para la detección de G13D (0.08655 u.a.). En el caso de la muestra sana 207035, la señal de la detección obtenida es similar tanto para p-AKT (Ser473) como para G13D.

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido



**Figura 3.18.** Imágenes ópticas en campo oscuro de los soportes de las micropalancas después de finalizar el inmunoensayo en la detección de p-AKT (Ser473) y la mutación G13D en la muestras de suero sanas, hormonales y triples negativas.

Hasta el momento, los únicos ensayos clínicos con evaluación positiva frente a pacientes con cáncer de mama hormono positivos han sido BOLERO-2 (en 2012) y SOLAR-1 (en 2019), los cuales hacen uso de los fármacos Everolimus y Alpelisib, respectivamente. Además de estos inhibidores, existen otros muchos que son prometedores en el uso de esta vía, sin embargo, su desarrollo se encuentra limitado debido a la toxicidad que generan; principalmente cutánea (erupciones), digestiva (diarrea) y endocrina (diabetes)<sup>73</sup>. Por otro lado, el análisis por inmunohistoquímica (IHQ) de p-AKT es ampliamente utilizado, sin embargo, la fijación de proteínas fosforiladas en muestras de tejido es inestable<sup>74-76</sup>. Recientemente, la detección de proteínas fosforiladas se ha llevado a cabo en plasma en vesículas extracelulares de pacientes con cáncer de mama<sup>77</sup>, aunque demostrando su uso como posibles biomarcadores, un cuello de botella surge de la necesidad de aislar una buena cantidad de vesículas extracelulares con alta reproducibilidad para su aplicación.

Cuando observamos la señal obtenida en las muestras triples negativas para G13D muestra un patrón mucho más disperso que el observado para las muestras hormono positivas y sanas (figura 3.17). Alrededor del 19% de los cánceres presenta mutaciones en RAS, siendo mínima la incidencia de este tipo de mutaciones en cáncer de mama a comparación con otros tipos de cánceres<sup>78</sup>. Este hecho podría explicar los resultados obtenidos en la

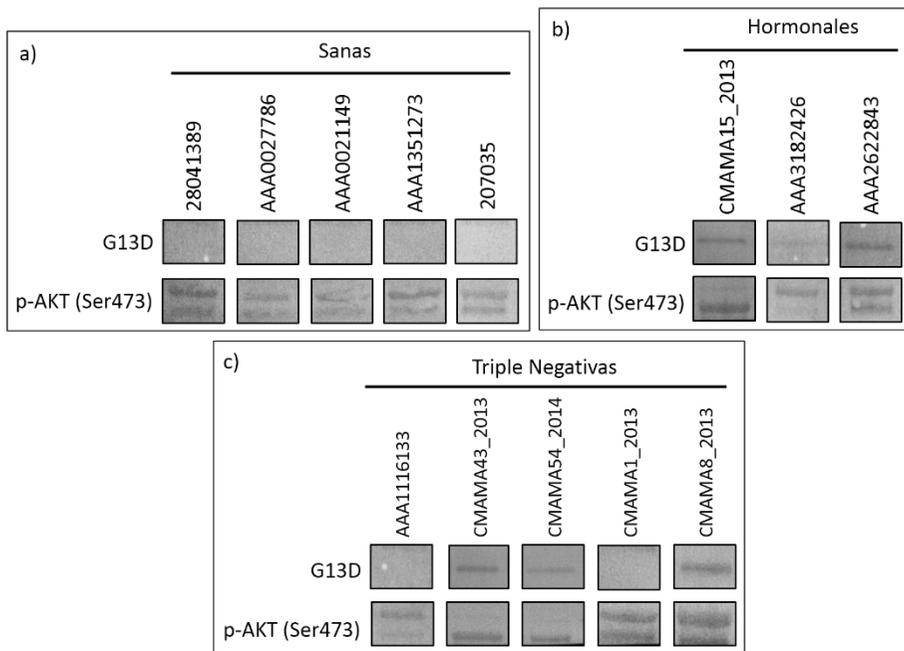
detección de G13D para las muestras triples negativas, donde se observa un solapamiento con las muestras hormono positivas pudiendo estar relacionado con una baja tasa de mutación en KRAS en las muestras de cáncer de mama. A pesar de ello, la tendencia observada en las muestras triple negativas sugiere que mutaciones en KRAS son más comunes en cánceres triples negativos que en los hormono positivos. Algunos estudios sugieren que mutaciones en PIK3CA están asociadas a mutaciones en KRAS <sup>79,80</sup>, hecho que podría explicar la respuesta de la señal obtenida en las muestras hormono positivas en comparación con las muestras de los pacientes sanos.

Entre las técnicas de detección de KRAS se incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que necesita de la extracción de ADN mediante métodos manuales o automatizados de muestras tumorales fijadas en formol e incluidas en parafina <sup>81</sup>. Han sido varios los estudios que se han centrado en la detección de mutaciones en KRAS; Gutiérrez *et al.*, detectaron mutaciones en KRAS en células tumorales circulantes de sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal metastásico mediante PCR cuantitativa <sup>82</sup>, Miyano *et al.*, consiguieron detectar mutaciones en KRAS con una sensibilidad del 61.5% tras la purificación de ADN en 3 mL de sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal <sup>83</sup>. Todo ello debido a que la proteína RAS es considerada como un objetivo claro para los tumores con mutaciones en RAS. La aprobación de Lumakras (en 2021) para el tratamiento de la mutación G12C en KRAS para pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, *Non-Small Cell Lung Carcinoma*) <sup>84</sup> hace que éste sea el primer inhibidor aprobado por parte de la FDA para mutaciones en KRAS.

El estado mutacional de KRAS ha demostrado que puede ser un indicativo del éxito o no a la respuesta de la terapia del receptor del factor de crecimiento anti-epidérmico (anti-EGFR) en pacientes con cáncer colorrectal. Los pacientes con mutaciones en KRAS en el exón 2, no se benefician de la terapia anti-EGFR o en combinación con quimioterapia. Sin embargo, parece observarse que existe una excepción en pacientes con la mutación G13D en KRAS los cuales se benefician del Cetuximab <sup>85,86</sup>.

La detección de mutaciones en KRAS mediante métodos mínimamente invasivos y relativamente económicos, como un análisis de sangre o una biopsia líquida, indicarían al paciente cual es el tratamiento más eficaz acorde a su enfermedad pudiendo tener una visión clara del estado de la patología.

Como en la información aportada por los Biobancos se desconocía si las muestras de los pacientes presentaban p-AKT (Ser473) y/o la mutación G13D, se realizó un western blot con las muestras para ver si nos proporcionaba alguna información acerca de la existencia de p-AKT (Ser473) y/o G13D. Como se puede observar en la figura 3.19 no se detectó la mutación G13D en las muestras de los pacientes sanos, sin embargo, se observa unas bandas débiles para el caso de la detección de p-AKT (Ser473) en dichas muestras. En la mayoría de las muestras hormono positivas se aprecian bandas para p-AKT (Ser473) y solo en dos muestras para G13D. En las muestras triples negativas se muestra un patrón de bandas para p-AKT (Ser473), pero para G13D las bandas no se observan en todas las muestras triples negativas.



**Figura 3.19. Imagen representativa de los western blot realizados en las muestras de pacientes. (a) muestras de pacientes sanos, (b) muestras hormonales y (c) muestras de pacientes con cáncer de mama triple negativo.**

### 3.8. Conclusiones

En este capítulo se ha mostrado la posibilidad de detectar y comparar expresión de una única mutación en la secuencia de aminoácidos de una proteína, como es el caso de la mutación G13D en KRAS, o detectar modificaciones postraduccionales, como es la fosforilación en la serina 473 de AKT, en líneas celulares de cáncer de mama usando una tecnología que combina dos métodos de transducción en el mismo inmunoensayo. La tecnología aquí desarrollada podría ser de fácil empleo y utilidad para ayudar a comprender la base molecular del cáncer de mama.

Así mismo, los resultados obtenidos utilizando el bionanosensor optoplasmónico para la detección de diferentes expresiones de p-AKT (Ser473) y G13D en muestras de pacientes con cáncer de mama, demuestra que esta tecnología es una herramienta poderosa para clasificar a pacientes con cáncer de mama utilizando una técnica no invasiva. Con el uso de una única tecnología optoplasmónica capaz de detectar proteínas fosforiladas o mutaciones en 500  $\mu$ L de muestra de pacientes con cáncer usando un inmunoensayo que involucra únicamente dos pasos de bioreconocimiento; se da luz a la universalidad del bionanosensor potenciando su uso en aplicaciones para el descubrimiento de proteínas circulantes en el torrente sanguíneo y que puedan usarse como biomarcadores de cáncer para la detección y el diagnóstico del mismo en un futuro.

## Bibliografía

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2021).
2. Taguchi, A. & Hanash, S. M. Unleashing the power of proteomics to develop blood-based cancer markers. *Clin. Chem.* **59**, 119–126 (2013).
3. Kulasingam, V. & Diamandis, E. P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **5**, 588–599 (2008).
4. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
5. Tao, Z. Q. *et al.* Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem. Biophys.* **72**, 333–338 (2015).
6. Unger-Saldaña, K. Challenges to the early diagnosis and treatment of breast cancer in developing countries. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 465–477 (2014).
7. Fragomeni, S. M., Sciallis, A. & Jeruss, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **27**, 95–120 (2018).
8. Anderson, B. O. & Jakesz, R. Breast cancer issues in developing countries: An overview of the Breast Health Global Initiative. *World J. Surg.* **32**, 2578–2585 (2008).
9. Ayer, T. Inverse optimization for assessing emerging technologies in breast cancer screening. *Ann. Oper. Res.* **230**, 57–85 (2015).

10. He, Z. *et al.* A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues. *Cell Prolif.* **53**, 1–16 (2020).
11. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, Jong RA, H. G. & Chiarelli A, Minkin S, Y. M. Mammographic Density and the Risk and Detection of Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **18**, 364–365 (2007).
12. Pultz, B. dos A. *et al.* Far beyond the usual biomarkers in breast cancer: A review. *J. Cancer* **5**, 559–571 (2014).
13. Núñez, C. Blood-based protein biomarkers in breast cancer. *Clin. Chim. Acta* **490**, 113–127 (2019).
14. Kazarian, A. *et al.* Testing breast cancer serum biomarkers for early detection and prognosis in pre-diagnosis samples. *Br. J. Cancer* **116**, 501–508 (2017).
15. Mann, R. M., Kuhl, C. K. & Moy, L. Contrast-enhanced MRI for breast cancer screening. *J. Magn. Reson. Imaging* **50**, 377–390 (2019).
16. Wang, L. Early diagnosis of breast cancer. *Sensors (Switzerland)* **17**, (2017).
17. Plecha, D. M. & Faulhaber, P. PET/MRI of the breast. *Eur. J. Radiol.* **94**, A26–A34 (2017).
18. Salvati, E., Stellacci, F. & Krol, S. Nanosensors for early cancer detection and for therapeutic drug monitoring. *Nanomedicine* **10**, 3495–3512 (2015).
19. Carels, N., Spinassé, L. B., Tilli, T. M. & Tuszynski, J. A. Toward precision medicine of breast cancer. *Theor. Biol. Med. Model.* **13**, 7 (2016).
20. Brisken, C. & Rajaram, R. D. Alveolar and lactogenic differentiation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **11**, 239–248 (2006).

21. Romond, E. H. *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1673–1684 (2005).
22. Mittal, P., Singh, S., Singh, A. & Singh, I. K. Current advances in drug delivery systems for treatment of triple negative breast cancer (TNBC). *Chem. Biol. Lett.* **7**, 1–12 (2020).
23. Borri, F. & Granaglia, A. Pathology of triple negative breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* **72**, 136–145 (2021).
24. FDA. FDA approves pembrolizumab for high-risk early-stage triple-negative breast cancer. *Food Drug Adm.* 1–2 (2021).
25. Stoica, G. E. *et al.* Effect of estradiol on estrogen receptor- $\alpha$  gene expression and activity can be modulated by the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* **22**, 7998–8011 (2003).
26. Bachman, K. E. *et al.* The PIK3CA Gene is Mutated with High Frequency Bio sci MATERIALS AND METHODS No t D ist r ibu te. *Therapy* **3**, 772–775 (2004).
27. Noorolyai, S., Shajari, N., Baghbani, E., Sadreddini, S. & Baradaran, B. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer. *Gene* **698**, 120–128 (2019).
28. Lee, J. J. X., Loh, K. & Yap, Y. S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol. Med.* **12**, 342–354 (2015).
29. Faridi, J., Wang, L., Endemann, G. & Roth, R. A. Expression of constitutively active Akt-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsivity of these cells in vivo. *Clin. Cancer Res.* **9**, 2933–2939 (2003).

30. Castaneda, C. A., Cortes-Funes, H., Gomez, H. L. & Ciruelos, E. M. The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 751–759 (2010).
31. Fruman, D. A. *et al.* The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* **170**, 605–635 (2017).
32. Brazil, D. P. & Hemmings, B. A. Ten years of protein kinase B signalling: A hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 657–664 (2001).
33. Samuels, Y. *et al.* High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science (80-. ).* **304**, 554 (2004).
34. Pinzón, C. E., Serrano, M. L. & Sanabria, M. C. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Rev. Ciencias la Salud* **7**, 47–66 (2009).
35. Zhou, M., Gu, L., Findley, H. W., Jiang, R. & Woods, W. G. PTEN reverses MDM2-mediated chemotherapy resistance by interacting with p53 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res.* **63**, 6357–6362 (2003).
36. Yang, Z. Y. *et al.* The prognostic value of phosphorylated Akt in breast cancer: A systematic review. *Sci. Rep.* **5**, 1–9 (2015).
37. Dummler, B. A. & Hemmings, B. A. Activation of protein kinase B  $\beta$  and  $\gamma$  isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro : comparison with protein kinase B  $\alpha$ . *Biochem. J.* **331**, 299–308 (1998).
38. Meier, R., Alessi, D. R., Cron, P., Andjelković, M. & Hemmings, B. A. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B $\beta$ . *J. Biol. Chem.* **272**, 30491–30497 (1997).
39. Franke, T. F. *et al.* The protein kinase encoded by the Akt proto-

- oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81**, 727–736 (1995).
40. Recabarren, D. & Alarcón, M. Gene networks in neurodegenerative disorders. *Life Sci.* **183**, 83–97 (2017).
  41. Malumbres, M. & Barbacid, M. RAS oncogenes: The first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 459–465 (2003).
  42. Tahir, R. *et al.* Mutation-Specific and Common Phosphotyrosine Signatures of KRAS G12D and G13D Alleles. *J. Proteome Res.* **20**, 670–683 (2021).
  43. Hancock, J. F. Ras proteins: Different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 373–384 (2003).
  44. Samatar, A. A. & Poulikakos, P. I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: Promises and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 928–942 (2014).
  45. Kim, R. K. *et al.* Activation of KRAS promotes the mesenchymal features of Basal-type breast cancer. *Exp. Mol. Med.* **47**, e137-9 (2015).
  46. Kaplan, E. L. & Meier, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J. Am. Stat. Assoc.* **53**, 457–481 (1958).
  47. Liang, H., Zhou, G., Lv, L., Lu, J. & Peng, J. KRAS expression is a prognostic indicator and associated with immune infiltration in breast cancer. *Breast Cancer* (2020). doi:10.1007/s12282-020-01170-4
  48. Hwang, K. T. *et al.* Prognostic role of KRAS mRNA expression in breast cancer. *J. Breast Cancer* **22**, 548–561 (2019).
  49. C.kozma, S. *et al.* The human c-kirsten ras gene is activated by a novel mutation in codon 13 in the breast carcinoma cell line MDA-MB231. *Nucleic Acids Res.* **15**, 5963–5971 (1987).

50. Azoitei, N. *et al.* Targeting of KRAS mutant tumors by HSP90 inhibitors involves degradation of STK33. *J. Exp. Med.* **209**, 697–711 (2012).
51. Hollestelle, A., Elstrodt, F., Nagel, J. H. A., Kallemeijn, W. W. & Schutte, M. Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Mol. Cancer Res.* **5**, 195–201 (2007).
52. Rodriguez-Viciana, P. *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras. *Nature* **370**, 527–532 (1994).
53. ATCC. Passage Number Effects In Cell Lines - Technical Document. *Am. Type Cult. Collect.* (2021).
54. Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H. & Gelber, C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: How much more data do we need? *Biotechniques* **43**, 575–586 (2007).
55. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350–4354 (1979).
56. Análisis de Proteínas. Electroforesis, Transferencia e Inmunodetección. *Advansta Corp.* (2011).
57. Tamayo, J. *et al.* Imaging the surface stress and vibration modes of a microcantilever by laser beam deflection microscopy. *Nanotechnology* **23**, 1–8 (2012).
58. Martínez, N. F. *et al.* High throughput optical readout of dense arrays of nanomechanical systems for sensing applications. *Rev. Sci. Instrum.* **81**, (2010).
59. Tamayo, J., Kosaka, P. M., Ruz, J. J., Paulo, Á. S. & Calleja, M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 1287–1311

(2013).

60. Kosaka, P. M. *et al.* Detection of cancer biomarkers in serum using a hybrid mechanical and optoplasmonic nanosensor. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 1047–1053 (2014).
61. Hutter, T., Elliott, S. R. & Mahajan, S. Interaction of metallic nanoparticles with dielectric substrates: Effect of optical constants. *Nanotechnology* **24**, 1–8 (2013).
62. Juncker, D., Bergeron, S., Laforte, V. & Li, H. Cross-reactivity in antibody microarrays and multiplexed sandwich assays: Shedding light on the dark side of multiplexing. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **18**, 29–37 (2014).
63. Matson, R. S. Well-Based Antibody Arrays. *Methods Mol. Biol.* **2237**, 11–38 (2021).
64. Beaver, J. A. *et al.* PIK3CA and AKT1 mutations have distinct effects on sensitivity to targeted pathway inhibitors in an isogenic luminal breast cancer model system. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5413–5422 (2013).
65. Usary, J. *et al.* Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene* **23**, 7669–7678 (2004).
66. She, Q. B. *et al.* Breast tumor cells with P13K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One* **3**, 1–10 (2008).
67. Kim, S. H., Miller, F. R., Tait, L., Zheng, J. & Novak, R. F. Proteomic and Phosphoproteomic Alterations in Benign, Premalignant and Tumor Human Breast Epithelial Cells and Xenograph Lesions: Biomarkers of Progression. *Int. J. Cancer* **124**, 2813–2828 (2009).
68. Sobral-Leite, M. *et al.* Cancer-immune interactions in ER-positive

- breast cancers: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res.* **21**, 1–12 (2019).
69. Miricescu, D. *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: From molecular landscape to clinical aspects. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–24 (2021).
70. Martínez-Saéz, O. *et al.* Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **22**, 1–9 (2020).
71. Samuels, Y. *et al.* Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* **7**, 561–573 (2005).
72. Stemke-Hale, K. *et al.* An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* **68**, 6084–6091 (2008).
73. Rusquec, P. du, Blonz, C., Frenel, J. S. & Campone, M. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in estrogen-receptor positive HER2 negative advanced breast cancer Pauline. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **12**, 1–12 (2020).
74. Baker, A. F. *et al.* Stability of phosphoprotein as a biological marker of tumor signaling. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4338–4340 (2005).
75. Pinhel, I. F. *et al.* Extreme loss of immunoreactive p-Akt and p-Erk1/2 during routine fixation of primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, 1–7 (2010).
76. Robbins, H. L. & Hague, A. The PI3K/Akt pathway in tumors of endocrine tissues. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **6**, 1–22 (2016).
77. Chen, I. H. *et al.* Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 3175–3180

(2017).

78. Chen, K., Zhang, Y., Qian, L. & Wang, P. Emerging strategies to target RAS signaling in human cancer therapy. *J. Hematol. Oncol.* **14**, 1–23 (2021).
79. Janku, F. *et al.* PIK3CA mutations frequently coexist with ras and braf mutations in patients with advanced cancers. *PLoS One* **6**, 1–8 (2011).
80. De Roock, W. *et al.* Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* **11**, 753–762 (2010).
81. Cree, I. A. Diagnostic RAS mutation analysis by polymerase chain reaction (PCR). *Biomol. Detect. Quantif.* **8**, 29–32 (2016).
82. Gutiérrez, C., Rodríguez, J., Patiño-García, A., García-Foncillas, J. & Salgado, J. KRAS mutational status analysis of peripheral blood isolated circulating tumor cells in metastatic colorectal patients. *Oncol. Lett.* **6**, 1343–1345 (2013).
83. Miyano, S., Hanazawa, K., Kitabatake, T., Fujisawa, M. & Kojima, K. Detecting KRAS mutations in peripheral blood of colorectal cancer patients by peptide nucleic acid clamp PCR. *Exp. Ther. Med.* **4**, 790–794 (2012).
84. FDA. INDICATIONS AND USAGE LUMAKRAS. *Food Drug Adm.* (2021).
85. McFall, T. *et al.* A systems mechanism for KRAS mutant allele-specific responses to targeted therapy. *Sci. Signal.* **12**, 1–30 (2019).
86. Sree Kumar, S. *et al.* KRAS G13D mutation and sensitivity to cetuximab or panitumumab in a colorectal cancer cell line model. *Gastrointest.*

Detección de proteínas en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer de mama mediante un nanosensor híbrido

*Cancer Res.* **7**, 23–26 (2014).

**CAPÍTULO 4: Aplicación de un  
nanosensor optoplasmónico para  
la detección ultrasensible de  
proteínas de SARS-CoV-2**

En este capítulo se presenta el desarrollo de un sensor optoplasmónico mediante el uso de placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> de superficie. La utilización de placas de silicio como sustitución a los arrays de ocho micropalancas utilizados en el capítulo 3 de esta tesis doctoral, se encuentra justificada como una necesidad en la que la detección de proteínas en tiempos de pandemia debe ser rápida, fiable y ultrasensible. Minimizando así la posible pérdida de datos como consecuencia de la rotura de las micropalancas en el proceso de manipulación y disminuyendo el tiempo de tratamiento de datos y obtención de los resultados.

#### 4.1. SARS-CoV-2 y su origen

El 31 de diciembre de 2019, la Comisión Municipal de Salud de Wuhan (provincia de Hubei, China) informa de un conjunto de casos de neumonía detectados en la ciudad de Wuhan por un nuevo coronavirus; SARS-CoV-2 que causa el Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS, *Severe Acute Respiratory Syndrome*) (<https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unknown-cause-china/en/>). Desde ese momento, la enfermedad (Covid-19) provocada por este nuevo coronavirus, el SARS-CoV-2, comenzó a extenderse rápidamente por todo el mundo, declarándose el 30 de enero de 2020 emergencia de salud pública de importancia internacional (ESPII) por el Comité de Emergencias de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a su rápida expansión <sup>1</sup>. El 11 de marzo de 2020 la OMS determina en su evaluación que la infección por SARS-CoV-2 puede caracterizarse como una pandemia debido a la propagación de la misma en otras regiones como Asia, Europa, Norteamérica, Sudamérica, África y Oceanía (OMS, 2020). Desde el primer caso positivo en diciembre de 2019, la OMS ha reportado más de 280 millones de casos confirmados incluyendo más de 5.4 millones de muertes (a 28 diciembre 2021) (Panel de control de Covid-19, OMS, <https://covid19.who.int/>), con un ritmo reproductivo básico ( $R_0$ ) de 2.5 en la cepa original hasta casi 7 para la variante Delta <sup>2,3</sup>.

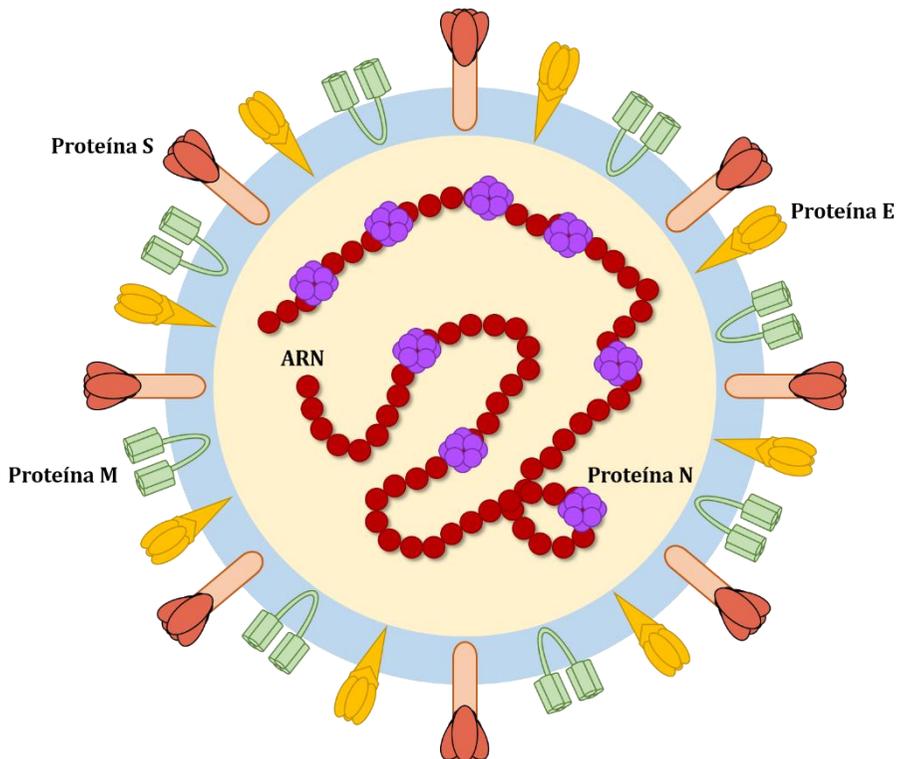
Los coronavirus fueron descritos por primera vez en 1966 por Tyrell y Bynoe, los cuales cultivaron virus de pacientes con resfriados comunes <sup>4</sup>. El

término coronavirus hace referencia a su morfología como viriones esféricos con proyecciones en su superficie que se asemeja a una corona. Existen cuatro subfamilias: alfa-, beta-, gamma- y deltacoronavirus. Mientras que la familias alfa- y beta- son originadas aparentemente en mamíferos, en particular en murciélagos, la gamma- y delta- son originadas en cerdos y aves. El SARS-CoV-2 pertenece al género *Betacoronavirus*, de la subfamilia *Coronavirinae* y está estrechamente relacionado con el SARS (OMS, 2004) y el Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS, *Middle East Respiratory Syndrome*) (OMS, 2013), originados en 2003 y 2012, con quienes comparte un 79% y un 50% de su genoma, respectivamente <sup>5,6</sup>, siendo un 96% idéntico al genoma del coronavirus del murciélago <sup>7</sup>. Como consecuencia de ello sugieren a los murciélagos como el principal reservorio natural de este virus <sup>8</sup>.

Hasta la fecha se han identificado siete coronavirus que afectan a humanos (HCoV), los cuales pertenecen al género *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus* y cuatros de ellos (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 y HCoV-hku1) se encuentran circulando libremente a nivel global contribuyendo a un tercio de las infecciones por resfriado común en humanos aproximadamente <sup>9</sup>.

## 4.2. Estructura y genoma de SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un virus de ácido ribonucleico (ARN) de cadena larga monocatenario que infecta a humanos, pero también a un amplio rango de animales <sup>10</sup>. Se trata de un virus esférico, envuelto con un diámetro aproximado de 60 a 140 nm <sup>11</sup>. El SARS-CoV-2 tiene cuatro proteínas estructurales entre las que se encuentran la proteína de superficie (S), la proteína pequeña de la envoltura (E), la proteína de matriz (M) y la proteína de la nucleocápside (N) <sup>12</sup>. Mientras que las proteínas E y M están asociadas a la envoltura del virus, la proteína N se encuentra asociada al material genético del mismo <sup>13</sup>. En cambio, la proteína S es una glicoproteína de fusión que como hemos dicho anteriormente se encuentra sobre la superficie del virus y es la encargada de la unión a los receptores en la célula huésped, presentando una gran importancia frente al desarrollo de fármacos y vacunas para el SARS-CoV-2 <sup>14</sup>.



**Figura 4. 1. Representación de SARS-CoV-2 y sus proteínas.**

La proteína S es una glicoproteína de aproximadamente 140 kDa, la cual se ensambla en homotrímeros<sup>15</sup>. Contiene un dominio extracelular N- terminal, un dominio transmembrana (TN) anclado a la membrana del virus y dominio pequeño intracelular C- terminal<sup>16</sup>. La longitud de la proteína S es de 1273 aminoácidos, compuesta por un péptido señal (aminoácidos 1- 13) localizado en el dominio N- terminal, la subunidad S1 (aminoácidos 14 - 685) y la subunidad S2 (aminoácidos 686 - 1273)<sup>17</sup>. Representando la proteína S una de los *targets* más importantes para el desarrollo de vacunas y la investigación terapéutica frente al SARS-CoV-2. Se estima que cada virión contiene aproximadamente 40 trímeros<sup>18</sup>, es decir, 120 por virión.

La proteína N cuenta con una longitud de 419 aminoácidos<sup>19</sup> y un peso molecular aproximado de 40 kDa<sup>15</sup>. Contiene un dominio de unión al ARN, que es el dominio N- terminal y un dominio C- terminal, ambos se encuentran

unidos por un enlace que contiene un dominio rico en serina/ arginina<sup>20,21</sup>. Se estima que cada virión presenta aproximadamente 1000 copias de proteína N (medida para SARS-CoV-1)<sup>22</sup>.

### 4.3. Ciclo de replicación de SARS-CoV-2

Una vez que el virus interactúa con la célula hospedadora, se produce un reordenamiento estructural de la proteína S, permitiendo la fusión del virus con la membrana de la célula del huésped<sup>23</sup>. Las subunidades S1 y S2 son responsables de la unión al receptor y fusión a la membrana, respectivamente. En la subunidad S1 se encuentra el dominio de unión al receptor (RBD, *Receptor-Binding Domain*) que es el encargado de unirse al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2, *Angiotensin-Converting Enzyme 2*) de la célula hospedadora. En cambio, la subunidad S2 es la responsable de la fusión viral y entrada del virus en la célula huésped<sup>24</sup>. Las proteínas S de SARS-CoV y SARS-CoV-2 comparten un 76.5% de identidad en su secuencia de aminoácidos, teniendo un alto grado de homología<sup>25,26</sup>, en cambio, a diferencia de SARS-CoV, la glicoproteína S de SARS-CoV-2 tiene uno de sus tres RBD dotados hacia arriba en una conformación accesible al receptor ACE2, haciendo más accesible la unión del virus a la célula huésped. Además, a través de un análisis estructural 3D se observó que la proteína S de SARS-CoV-2 presenta una unión al menos 10 veces más intensa al receptor ACE2 que la proteína S de SARS-CoV<sup>27</sup>.

Tras la infección, la proteína N que es una proteína estructural, se une al ARN del virus entrando en el interior de la célula hospedadora para facilitar la replicación del mismo<sup>28</sup> aumentando los niveles de la proteína N en la etapa inicial de la infección<sup>29,30</sup>. El análisis de la secuencia de la proteína N muestra que tiene un 90.52% de identidad con la proteína N de SARS-CoV<sup>19</sup>.

El receptor ACE2 se encuentra comúnmente en el epitelio de las vías respiratorias y neumocitos alveolares tipo 2, razón por la cual se explica las principales manifestaciones clínicas a nivel pulmonar de este virus<sup>31</sup>. Aunque su expresión principal es pulmonar, el receptor ACE2 también se encuentra en tejidos extrapulmonares tales como corazón, hígado, endotelio<sup>32,33</sup> y

altamente expresado en la superficie luminal de las células epiteliales del intestino <sup>34</sup>, causa por la que podría haberse iniciado el primer contagio en humanos al comer comida contaminada en el mercado de Wuhan <sup>35</sup>. Desafortunadamente, ningún mamífero vivo recolectado en el mercado ha sido examinado para detectar virus relacionados con el SARS-CoV-2 <sup>36</sup> no estando claro si la iniciación de los casos Covid-19 hospitalizados asociados con este mercado fue realmente un reflejo del brote inicial <sup>37</sup>.

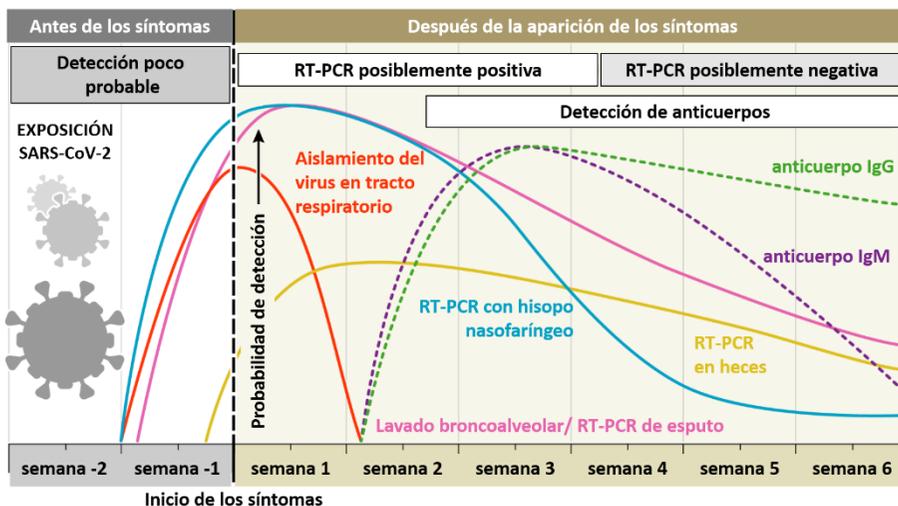
#### 4.4. Limitaciones de las técnicas actuales para el diagnóstico de SARS-CoV-2 y la necesidad del desarrollo de nuevas tecnologías

Las técnicas empleadas en la actualidad para la detección del virus, son las conocidas como pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAAT, *Nucleic Acid Amplification Tests*) como es la RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) que se encargan de detectar el ARN del virus en las muestras de los pacientes <sup>38,39</sup>. Estas pruebas son hoy en día las más sensibles para el diagnóstico de infecciones virales y la medida de la carga viral, con una excelente sensibilidad técnica, pero con una sensibilidad clínica algo menor <sup>39</sup>, presentando dificultades para cumplir con los requisitos de pruebas rápidas y accesibles para la detección de un gran volumen de muestras, como ocurre en una pandemia.

Desde que comenzó la pandemia han sido muchas las especulaciones acerca de la sensibilidad de los test basados en RT-PCR, sugiriendo que podría ser de un 59% <sup>40</sup>. En el SARS-CoV-2, al igual que ocurre en otras enfermedades virales infecciosas como es el VIH o la hepatitis C, existe un periodo denominado “periodo ventana” <sup>41,42</sup> que hace referencia al tiempo transcurrido entre la adquisición de la infección y la detección del virus por RT-PCR. Durante este tiempo, las RT-PCR presentan un valor bajo de diagnóstico en los días inmediatamente después de la exposición al virus; por lo que un resultado negativo de una RT-PCR no descartaría la infección por SARS-CoV-2. En la figura 4.2 se muestra una gráfica para la detección de SARS-CoV-2

Aplicación de un nanosensor optoplasmónico para la detección ultrasensible de proteínas de SARS-CoV-2

mediante pruebas de diagnóstico en función del tiempo transcurrido tras la exposición al virus.



**Figura 4.2. Variación estimada a lo largo del tiempo en las pruebas de diagnóstico para la detección de la infección por SARS-CoV-2 en relación con el inicio de los síntomas.** Los intervalos de tiempo estimados y las tasas de detección viral se basan en datos de varios informes publicados. Debido a la variabilidad en los valores entre los estudios, los intervalos de tiempo estimados deben considerarse aproximaciones y la probabilidad de detección de la infección por SARS-CoV-2 es presentada cualitativamente. Modificado de Nandini *et al.*, 2020<sup>43</sup>.

El desarrollo de RT-PCR depende de un gran número de factores, como puede ser el tipo de muestra, el tiempo empleado en recolectar la muestra, la calidad y cantidad de ARN viral presente en la muestra y las sondas y *primers* diseñados entre otros factores. En general, la eficacia analítica de RT-PCR y la sensibilidad de diferentes tipos de sondas utilizadas en cuatro ensayos de diagnóstico comunes de SARS-CoV-2 muestran una gran similitud<sup>44,45</sup>, indicando que los resultados de diferentes ensayos son comparables. Los ensayos de diagnóstico molecular presentan una sensibilidad del 100% en la detección de SARS-CoV-2 a 100 copias de ARN viral/ $\mu$ L (500 copias por reacción), sin embargo, esta sensibilidad se ve reducida al 50 – 33% cuando el número de copias oscila entre 1 – 10 copias de ARN viral/ $\mu$ L (5 – 50 copias por reacción)<sup>44,46</sup>. Así mismo, una RT-PCR conlleva un porcentaje de falsos positivos mínimo, pero un riesgo mayor en la detección de resultados falsos negativos. Todo esto se suma a la variabilidad de la carga viral presente en las

personas; pudiendo presentar desde cargas virales muy altas considerándose especialmente propagadores de la infección, hasta aquellos individuos cuyas cargas virales están cerca o por debajo del límite de detección de muchos de los ensayos de detección usados en la actualidad <sup>38,47</sup>.

Los métodos de detección de antígenos pueden ser útiles para detectar virus activos en las primeras etapas de la infección por SARS-CoV-2. La detección de proteínas virales por inmunoensayos permite un flujo de trabajo más simple y accesible que la RT-PCR pudiendo tener los resultados en pocas horas tras la recepción de la muestra en el laboratorio. Por ejemplo, se pueden emplear inmunoensayos enzimáticos (EIA) como los ELISA o el inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA). Sin embargo, la mayoría de métodos de detección para SARS-CoV-2 han sido desarrollados como “pruebas rápidas” realizadas en el punto de atención al paciente <sup>48</sup> como los ensayos de flujo lateral (LFA). Estas pruebas han surgido como necesidad en un intento por el control de la pandemia al ofrecer resultados rápidos entre 15 y 30 minutos, mediante un proceso fácil y de bajo coste para la rápida identificación y aislamiento de aquellas personas positivas.

Han sido muchas las empresas que han desarrollado pruebas rápidas de antígenos para la detección de SARS-CoV-2, sin embargo, la sensibilidad que ofrecen las diferentes pruebas de antígenos disponibles varía del 30.2% al 96% <sup>18,45,48</sup>. Por lo general, las pruebas rápidas de antígenos ofrecen una sensibilidad analítica más baja (10.000 veces menor) que las pruebas basadas en NAAT. Las pruebas rápidas para la detección de SARS-CoV-2 pueden ser útiles para personas sintomáticas en los primeros días de la infección como alternativa a la RT-PCR, pero debido a la baja sensibilidad que presentan estas pruebas, especialmente en personas asintomáticas y presintomáticas, estas pruebas no son útiles para el diagnóstico de la enfermedad Covid-19 para la detección masiva, ya que la identificación de personas que son o se volverán infecciosas son claves para el control de la pandemia. Por ejemplo, las pruebas de hisopos nasales son comúnmente usadas en el diagnóstico de virus respiratorios, aunque presentan una baja sensibilidad en la detección temprana de SARS-CoV-2 <sup>49-51</sup>. La sensibilidad a la hora de la toma de muestras nasofaríngeas es variable, debido a la deficiencia de la técnica y a la necesidad de un personal cualificado para su toma. Todo ello se suma al malestar

causado en los pacientes debido a los procedimientos invasivos que requieren este tipo de toma de muestras y el riesgo que presenta para los trabajadores, ya que suele ocasionar estornudos o tos, lo que conlleva la expulsión de partículas virales <sup>52,53</sup>, planteándose la necesidad del desarrollo de nuevas técnicas en la detección de SARS-CoV-2, como por ejemplo la toma de muestras de saliva <sup>54</sup> o análisis de sangre como alternativa a los hisopos nasales.

El hecho de que el virus se elimine del cuerpo a medida que la persona va recuperándose, hace que las NAAT sean únicamente útiles en el periodo de infección, ofreciendo como ruta alternativa la detección de las proteínas virales S y N. Ambas proteínas pueden servir como biomarcadores interesantes para la detección de pacientes con Covid-19. El desarrollo de NAAT capaces de detectar todos y cada uno de los virus y subtipos de virus existentes en la actualidad es hoy día un desafío. La detección de proteínas virales es más sensible y específica ya que no se encuentran afectadas por variables genómicas. Además, las proteínas son el producto final de la transcripción y replicación viral. Estudios previos aislaron virus de pacientes tras haber pasado 10 días desde el comienzo de los síntomas, dando lugar a cultivos negativos en los cuales el virus no se replicaba <sup>55</sup>, aunque en los pacientes que se encontraban en una fase de convalecencia y no eran infecciosos los hisopos nasofaríngeos continuaban siendo positivos <sup>56</sup>.

La detección de ARN de SARS-CoV-2 en sangre (ARNaemia viral) podría no revelar siempre una infección activa, sino un periodo de infección post-viral <sup>57</sup>. Aunque no hay evidencias de cuál es la carga viral en plasma o suero durante el periodo de incubación, se ha detectado ARN viral en muestras sanguíneas de pacientes con Covid-19 entre los 2-3 primeros días después del inicio de los síntomas <sup>58</sup>. Además, la carga viral en suero aumenta gradualmente desde la primera semana, seguido de un declive en la tercera semana de la enfermedad <sup>59</sup>. Según los estudios llevados a cabo para la detección de ARN viral en sangre de pacientes con Covid-19, únicamente entre un 10 – 15% de pacientes en estado crítico presentan ARN en sangre o suero <sup>60-62</sup>, aunque también se han dado casos de una detección nula de ARN viral en muestras sanguíneas <sup>55,63</sup>. Debido a que son pocos los estudios que indican la presencia de ARN viral en muestras sanguíneas, se necesitan más investigaciones para determinar el

periodo de tiempo que el ARN está presente en la sangre, ya que el virus podría estar activo en pacientes con un análisis de sangre positivo, pero siendo el resultado del hisopo nasal negativo.

Por todo ello, el desarrollo de nuevas tecnologías con una elevada sensibilidad y especificidad siguen siendo en la actualidad una medida urgente para contener la propagación de SARS-CoV-2 y otras futuras pandemias. En los últimos dos años, han sido varias las tecnologías desarrolladas basadas en nanomateriales con una mejora en la sensibilidad para la creación de dispositivos de diagnóstico sensible para la detección de SARS-CoV-2. A continuación, se enumera una serie de estos estudios. Un ensayo colorimétrico basado en oligonucleótidos antisentido modificados con tiol y conjugados con nanopartículas de oro para la detección del gen N de SARS-CoV-2 cuyo límite de detección es de 0,18  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de partículas de ARN <sup>64</sup>. Un biosensor basado en grafeno para la detección de la proteína S de SARS-CoV-2 alcanza un límite de detección de 1 fg/mL <sup>65</sup>. Otro ejemplo es un dispositivo electroquímico usado para la inmovilización de anticuerpos contra la proteína S de SARS-CoV-2 en electrodos de carbono que llegó a detectar 90 fM de antígeno de 10 a 30 segundos <sup>66</sup>. Los metasensores plasmónicos toroidales han llegado a detectar concentraciones de hasta 4,2 fM de la proteína S <sup>67</sup>. En otro estudio se desarrolló un sensor de resonancia nanoplasmónica sobre el que se unen las proteínas S de SARS-CoV-2, el cual mide los cambios en la resonancia o la intensidad del plasmón, alcanzando un límite inferior de detección de 370 pv/mL en 15 minutos <sup>68</sup>. En otro estudio se desarrolló un biosensor que usa nanopartículas de oro junto con una plataforma de electrodo ITO para la detección de la proteína del RBD de SARS-CoV-2, alcanza un límite de detección de 0,577 fg/mL <sup>69</sup>.

Todos estos estudios se basan en el desarrollo de dispositivos capaces de llegar a límites de detección cruciales para la detección tanto de las proteínas como el material genético del virus, ya que para el control de la pandemia es necesario el poder diagnosticar a todos los pacientes infectados y susceptibles de infectarse. Por ello, un punto crítico es minimizar el tiempo necesario en confirmar un caso positivo entre la infección y la aparición de los síntomas. Los biosensores basados en nanomateriales hacen posible el desarrollo de pruebas de diagnóstico sensibles y específicas para el control de SARS-CoV-2.

En este capítulo se ha desarrollado un inmunoensayo optoplasmónico de tipo sándwich para la detección de las proteínas S1 y N de SARS-CoV-2 haciendo uso de placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> y nanopartículas de oro de 100 nm de diámetro.

## 4.5. Materiales y métodos

### 4.5.1. Anticuerpos y proteínas usados en el inmunoensayo

Para este capítulo se utilizaron las siguientes parejas de anticuerpos según la detección de las proteínas S1 y N de SARS-CoV-2. En la siguiente tabla se especifican las proteínas y anticuerpos usados en este capítulo:

<b>Proteínas</b>	<b>Anticuerpos de captura</b>	<b>Anticuerpos de detección</b>
Proteína S1 (MyBioSource, MBS569935)	Anticuerpo monoclonal S1 (MyBioSource, MBS355889)	Anticuerpo monoclonal S1 (MyBioSource, MBS355890)
Proteína N (MyBioSource, MBS355894)	Anti-Covid-19 monoclonal nucleocápsida (BN18) (MyBioSource, MBS8574744)	Anti-Covid-19 policlonal nucleocápsida (MyBioSource, MBS669375)

**Tabla 4.1. Proteínas, anticuerpos de captura y de detección usados en la detección de las proteínas de SARS-CoV-2.**

Las proteínas S1 y N fueron diluidas en una secreción nasal simulada. Los componentes de la secreción nasal usada en este capítulo son los descritos en Kelly J. Henrickson *et al.*<sup>70</sup> (ver tabla 4.2).

Compuesto	Concentración	Casa comercial
Na <sup>+</sup>	180 mM	NaCl (S3014, Sigma-Aldrich)
K <sup>+</sup>	10 mM	KCl (P9333, Sigma-Aldrich)
Ca <sup>++</sup>	4 mM	CaCl <sub>2</sub> (C1016, Sigma-Aldrich)
Albúmina	0.5 mg/mL	Albúmina humana (A7030, Sigma-Aldrich)
IgG	0.05 mg/mL	Human IgG (P7899, Sigma-Aldrich)

**Tabla 4.2. Componentes de la secreción nasal simulada utilizada para la dilución de las proteínas S1 y N.**

## 4.5.2. Inmunoensayo

Se desarrollaron dos inmunoensayos; uno para la detección de la proteína S1 y otro para la detección de la proteína N. Para ello, tras la funcionalización de las placas de silicio (ver “capítulo 2: materiales y métodos”), estas fueron incubadas en 1 mL de solución que contenía las proteínas S1 o N durante 1 hora a 37°C bajo agitación. El rango estudiado de concentraciones de las proteínas S1 y N va desde 1 µg/mL hasta 1 ag/mL. Para los experimentos controles, las placas de silicio funcionalizadas fueron incubadas en 1 mL de solución nasal simulada sin la presencia de las proteínas S1 y N. A continuación, las placas de silicio fueron lavadas con PBS + 0.1% Tween® 20 durante 15 minutos seguidamente de otro lavado de otros 15 minutos con PBS + 0.05% Tween® 20 y lavadas con agua Milli Q. Para el inmunoensayo, las placas de silicio fueron sumergidas en 1 mL de una solución 10 µg/mL de nanopartículas de oro funcionalizadas previamente con el respectivo anticuerpo de detección (ver tabla 4.1) y preparada en MES 10 mM (pH 5.5) al 0.1% de Tween® 20. Las placas de silicio fueron incubadas a 37°C durante 1 hora para la detección de la proteína S1 y durante 30 minutos para la detección de la proteína N. Por último, las placas fueron lavadas durante 4 horas con 4 mL de MES 10 mM (pH 5.5) al 0.5% Tween® 20, siendo lavadas abundantemente con agua Milli Q y secadas bajo un flujo de nitrógeno seco.

En la figura 4.3 se muestra una representación esquemática de los diferentes pasos seguidos en el inmunoensayo para la detección de las proteínas virales S1 y N del virus que provoca la enfermedad Covid-19.



El inmunoensayo para la detección de las proteínas S1 y N y el inmunoensayo control negativo fueron llevados a cabo paralelamente, de forma que la solución de nanopartículas de oro con el anticuerpo de detección fue la misma para ambos inmunoensayos.

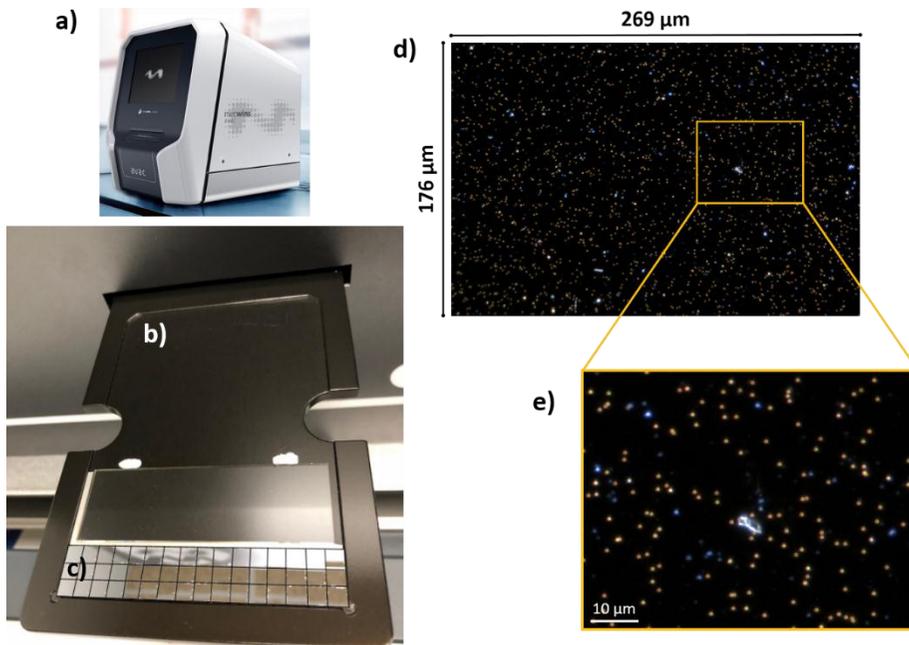
### 4.5.3. Sistema de la medida optoplasmónica de las superficies de silicio mediante AVAC

Tras llevar a cabo el inmunoensayo, las placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> se midieron con la utilización de un sistema AVAC desarrollado por la empresa Mecwins, S.L. AVAC permite de manera simultánea la medida y el análisis de las nanopartículas de oro con alto rendimiento <sup>71,72</sup>. La medida y el análisis completo de una placa de 96 muestras se lleva a cabo en menos de 8 horas <sup>73</sup>. Este sistema consta de un objetivo de 50X y una pletina automatizada por unos motores sobre la cual se colocan las muestras.

## 4.6. Resultados y discusión

### 4.6.1. Mecanismo optoplasmónico en placas de silicio con AVAC

Finalizado el inmunoensayo, las placas de silicio se colocaron en la pletina automatizada de AVAC y las nanopartículas de oro fueron identificadas ópticamente en el modo campo oscuro mediante el objetivo 50X analizando la dispersión de cada una para caracterizar, clasificar y contar las nanopartículas de oro presentes en la superficie del sensor con una elevada especificidad mediante un software desarrollado en Wolfram Mathematica®, lo que disminuye considerablemente el número de resultados falsos positivos. La dimensión de cada imagen tomada por el sistema es de 269 x 176 μm<sup>2</sup> y para cada muestra (placa de silicio) AVAC toma un total de 532 imágenes.



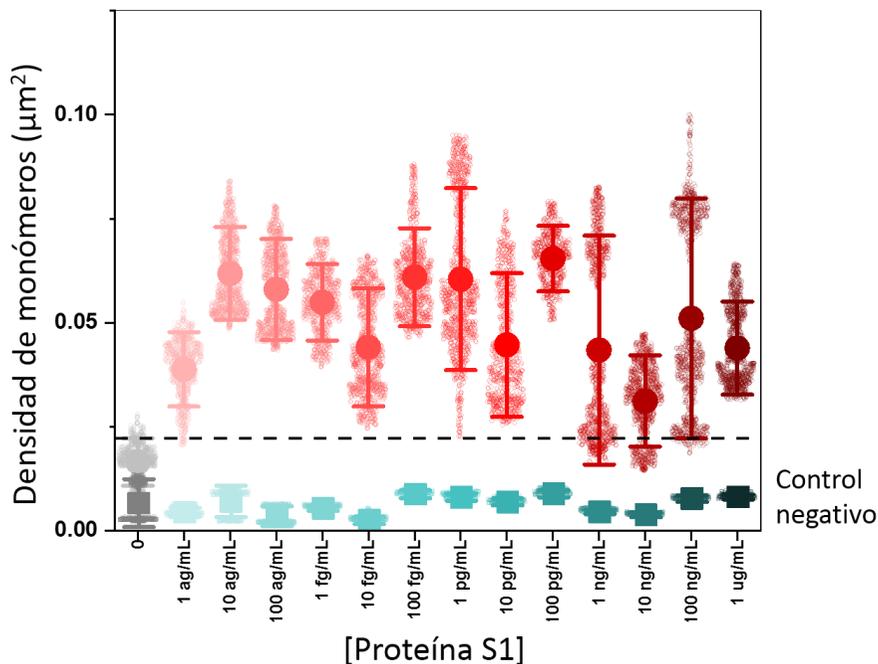
**Figura 4.4. Sistema AVAC e imágenes ópticas de campo oscuro. a)** sistema AVAC. **b)** platina automatizada. **c)** placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup>. **d)** imagen óptica de campo oscuro de la superficie de una placa de silicio tomada por AVAC. **e)** imagen óptica de alta resolución de d).

#### 4.6.2. Detección de las proteínas S1 y N

La señal optoplasmónica de las proteínas S1 y N es observada en las figuras 4.5 y 4.7, respectivamente. Los resultados presentados comprenden un total de 336 placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> funcionalizadas (englobando los inmunoensayos para la detección de ambas proteínas y los inmunoensayos controles negativos). Los experimentos se realizaron usando placas de 48 pocillos y cada una de las concentraciones estudiada se repitió por triplicado en dos experimentos independientes. Los resultados se calcularon en base a la densidad de monómeros de cada imagen.

En los resultados obtenidos para la proteína S1 (figura 4.5), se puede observar la detección de la proteína a partir de una concentración de 1 ag/mL, donde existe una clara evidencia en el aumento de la señal con respecto a la

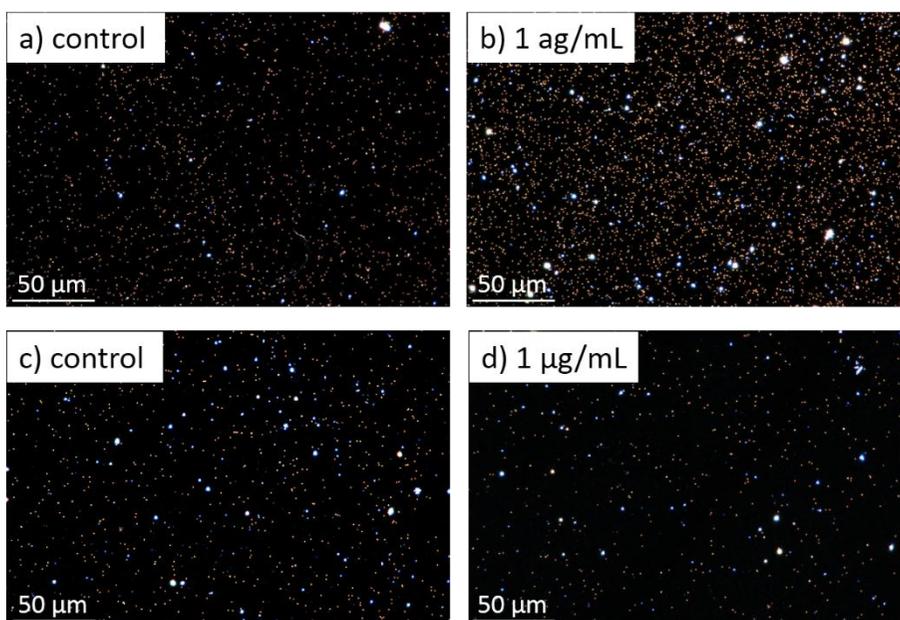
señal obtenida de los experimentos controles (placas incubas en 1 mL de solución nasal simulada sin presencia de la proteína S1).



**Figura 4.5. Gráfica de la detección de la proteína S1.** Detección optoplasmónica de la proteína S1 en una simulación nasal simulada (en rojo) y respuesta del sensor en el control negativo con un anticuerpo de captura que no reconoce la proteína S1 de SARS-CoV-2 (en verde). En gris se representan los controles de ambos experimentos en ausencia de proteína S1.

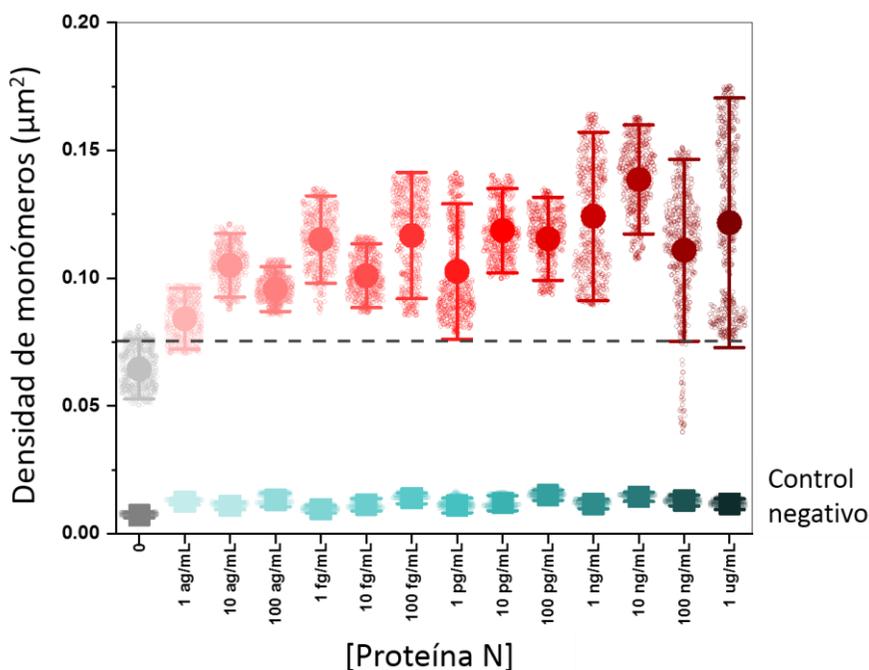
En la figura 4.6 podemos observar la densidad de nanopartículas de oro en función de la concentración de proteína S1 (figura 4.6a y 4.6b) y en ausencia del anticuerpo de captura que reconoce la proteína S1 (figura 4.6c y 4.6d). Se observa como la densidad de nanopartículas de oro aumenta en la detección de 1 ag/mL para la proteína S1 (figura 4.6b) en comparación con el control (figura 4.6a). Sin embargo, cuando se hace uso de un anticuerpo de captura que no reconoce a la proteína S1, la densidad de nanopartículas no varía entre ensayos con una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  (figura 4.6d) y ausencia de proteína S1 (figura 4.6c).

Cuando comparamos ambos ensayos controles, observamos que la densidad de nanopartículas de oro para los ensayos de detección (figura 4.6a) parece ser mayor que para los ensayos controles negativos (figura 4.6c). Esto podría deberse a la presencia de interacciones inespecíficas entre los anticuerpos específicos para la proteína S1 en los ensayos controles de detección (figura 4.6a). Se observa una mayor densidad de nanopartículas de oro en el experimento de detección de la proteína S1 a una concentración de 1 ag/mL (figura 4.6b) con respecto al experimento control negativo usando una alta concentración de proteína (figura 4.6d). En este caso la diferencia de densidad de nanopartículas muestra el reconocimiento de la proteína S1 por parte de los anticuerpos específicos usados en el inmunoensayo.



**Figura 4.6. Imágenes de campo oscuro tomadas por el sistema AVAC en la detección de la proteína S1 de SARS-CoV-2.** En a) y en b) se observa una imagen tomada de una placa de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> de un inmunoensayo haciendo uso de los anticuerpos específicos para la proteína S1 para un experimento control (a) y un experimento de detección con una concentración de proteína S1 de 1 ag/mL (b). En cambio, las imágenes c) y d) hacen referencia a un inmunoensayo en el que el anticuerpo de captura fue sustituido por un anticuerpo que no reconoce la proteína S1 (inmunoensayo control negativo), con ausencia de la proteína S1 en la imagen c) y una concentración de proteína S1 de 1 µg/mL para la imagen d).

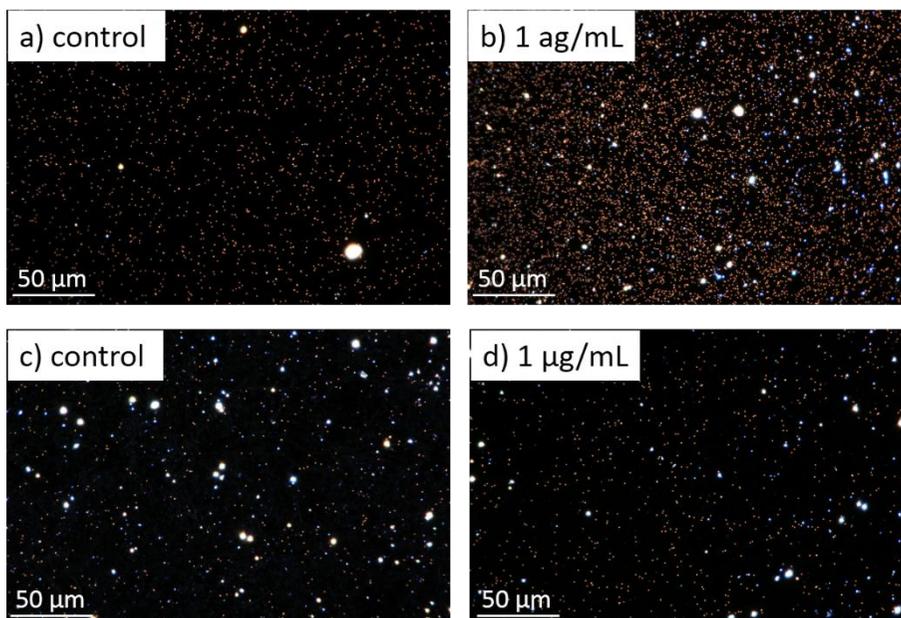
En la gráfica 4.7 para la detección de la proteína N mediante la detección optoplasmónica, el límite de detección alcanzado es de 10 ag/mL frente al límite de aproximadamente 2 pg/mL alcanzado en los test de ELISA <sup>74</sup>.



**Figura 4.7. Gráfica de la detección de la proteína N.** Detección optoplasmónica de la proteína N de SARS-CoV-2 en una simulación nasal simulada (en rojo) y respuesta obtenida en los experimentos controles negativos con un anticuerpo no específico a la proteína N de SARS-CoV-2 (en verde). En gris se representan los controles de ambos experimentos en ausencia de proteína N.

En la figura 4.8, se observan cuatro imágenes tomadas con AVAC de las placas de silicio de  $5 \times 5 \text{ mm}^2$  en un ensayo de detección (figuras 4.8a y 4.8b) y un ensayo control negativo (figuras 4.8c y 4.8d) para la proteína N. Del mismo modo que ocurre en el caso de la proteína S1, se observa que la densidad de nanopartículas de oro en el inmunoensayo de detección a una concentración de proteína N de 1 ag/mL en la solución nasal simulada (figura 4.8b) es superior a la densidad encontrada en el inmunoensayo control (figura 4.8a). En cambio, cuando comparamos los inmunoensayos de control negativo donde el anticuerpo de captura específico para la proteína N fue sustituido

por un anticuerpo que no reconoce a esta proteína, podemos observar que la densidad de nanopartículas de oro es constante en todas las concentraciones estudiadas (1 ag/mL – 1 µg/mL) de proteína N (figura 4.8d) con respecto al control negativo (figura 4.8c). Pudiendo determinar que existe reconocimiento por parte del anticuerpo de captura específico para la proteína N, ya que, en ausencia de este anticuerpo, no se captura a la proteína N y por lo tanto la densidad de nanopartículas de oro que observamos en la imagen es menor que en el inmunoensayo de detección.



**Figura 4.8. Imágenes de campo oscuro tomadas por el sistema AVAC en la detección de la proteína N de SARS-CoV-2.** En a) y en b) se observa una imagen tomada de una placa de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> de un inmunoensayo haciendo uso de los anticuerpos específicos frente a la proteína N para un experimento control (a) y un experimento de detección con una concentración de 1 ag/mL de proteína N (b). En cambio, las imágenes c) y d) hacen referencia a un inmunoensayo en el que el anticuerpo de captura fue sustituido por un anticuerpo que no reconoce la proteína N (inmunoensayo control negativo), con ausencia de la proteína N en la solución nasal simulada en la imagen c) y una concentración de 1 µg/mL de proteína N para la imagen d).

Como anteriormente se ha mencionado, se llevó a cabo experimentos controles negativos donde el anticuerpo de captura fue sustituido por un anticuerpo que no reconoce la proteína S1 ni la proteína N. En estos

experimentos se observa que para ambas proteínas la señal obtenida es constante a lo largo del rango de concentraciones estudiadas (desde 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 1  $\text{ag}/\text{mL}$ ) indicando que las interacciones inespecíficas que existen son mínimas, ya que se observan nanopartículas en los controles negativos. Esta señal podría deberse a interacciones no específicas que ocurren entre el anticuerpo de captura y las biomoléculas presentes en la solución nasal simulada. No obstante, la señal obtenida de los experimentos controles con los anticuerpos de captura específicos para las proteínas S1 y N es mayor a la señal obtenida que en los ensayos de controles negativos, indicando que existe un ruido de fondo que podría deberse a la interacción entre los anticuerpos de captura y los anticuerpos de detección. Una característica de los datos obtenidos en este método para ambas proteínas es que para concentraciones superiores a 1  $\text{fg}/\text{mL}$  el número de nanopartículas de oro satura rápidamente, mostrando una variabilidad a altas concentraciones en la detección de ambas proteínas. Este comportamiento también es observado en la detección de otros biomarcadores (CEA y PSA) usando el método optoplasmónico <sup>75</sup>.

La proteína S1 es considerada una diana atractiva en el desarrollo de inmunoensayos para la detección del virus que provoca la Covid-19, siendo una proteína más específica en la detección de SARS-CoV-2 que otras proteínas estructurales de membrana <sup>76</sup>. El hecho de que la mayoría de vacunas para combatir la infección por SARS-CoV-2 estén diseñadas frente a la proteína S se debe a que la proteína S está involucrada en los primeros estadios de la infección. Haciendo uso del ensayo ultrasensible de Simoa (Quanterix Corporation) se detectó (en el rango de  $\text{pg}/\text{mL}$ ) niveles de proteína S1 en el día posterior a la vacunación, obteniéndose el pico más elevado al quinto día después de la administración de la primera dosis ( $68 \text{ pg}/\text{mL} \pm 21 \text{ pg}/\text{mL}$ ) y llegando a ser indetectable por dicho ensayo al día 14 <sup>77</sup>. El desarrollo de nuevas tecnologías ultrasensibles basadas en la detección de una única proteína, podrían ser de gran ayuda para analizar los mecanismos de funcionamiento de las vacunas, siendo útiles en la fabricación y diseño de futuras vacunas.

Al igual que la proteína S, la proteína N es frecuentemente usada en el desarrollo de vacunas y ensayos serológicos <sup>78</sup>. El análisis serológico de

pacientes con SARS demostró que los anticuerpos frente a la proteína N presentan una mayor sensibilidad y una persistencia más prolongada que los anticuerpos referidos a otras proteínas estructurales de SARS-CoV <sup>79,80</sup>, detectándose anticuerpos frente a la proteína N con una elevada especificidad en las etapas iniciales de la infección <sup>81</sup>. Por lo que el análisis de esta proteína, puede llevar a la comunidad científica a un mejor entendimiento de la enfermedad causada por el SARS-CoV-2, ayudando a diseñar terapias innovadoras para el tratamiento y el diagnóstico de la enfermedad. La proteína N que se expresa de manera abundante durante la infección, muestra una naturaleza conservada y estable en el proceso evolutivo de replicación de SARS-CoV-2, por lo que esta proteína presenta un uso llamativo como marcador de diagnóstico ya que presentará menos mutaciones a lo largo del tiempo <sup>82-84</sup>. Llevar a cabo la detección de la proteína N de SARS-CoV-2 evitará fallos en la detección del mismo y aumentará considerablemente el rendimiento del sensor plasmónico. Debido a que una célula infectada con SARS-CoV-2 puede contener varios viriones antes de que comience la gemación de nuevos virus <sup>85</sup>, cabría la posibilidad de detectar cargas virales a bajas concentraciones en muestras de pacientes usando la tecnología aquí presentada. Además, la detección de la proteína N también ha sido realizada en suero de pacientes infectados por SARS-CoV-2 <sup>74,86</sup> donde se encontró que la especificidad en la detección de la proteína N en suero fue del 96.84% y la sensibilidad del 92% antes de la aparición de anticuerpos. Pacientes asintomáticos presentaron unos niveles medios de proteína N de 72 pg/mL, mientras que en los pacientes pre-sintomáticos y sintomáticos los niveles de proteína N fueron de 3.896 pg/mL y 1.931 pg/mL, respectivamente <sup>86</sup>. Este estudio sugiere que la detección de esta proteína podría tener un alto valor diagnóstico en personas infectadas antes de la aparición de anticuerpos, acortando el periodo para la realización de pruebas serológicas.

La tasa mutacional de SARS-CoV-2 es mucho más lenta a comparación de otros virus; siendo la mitad del virus de la influenza y una cuarta parte del VIH. La mayoría de mutaciones se han encontrado en proteínas no estructurales y en la proteína S <sup>87-89</sup> por lo que la mutación en la proteína S podría afectar al desarrollo de inmunoensayos basados en la detección de dicha proteína. Sin embargo, la presencia de mutaciones en la proteína N son raramente

conocidas, por lo que el desarrollo de inmunoensayos basados en la detección de ambas proteínas (S1 y N) mejorarían la precisión y la sensibilidad en la detección.

Aunque la tecnología actual más demandada en la detección de SARS-CoV-2 es la RT-PCR, la sensibilidad de esta varía según el momento de la prueba en relación con la exposición al virus. Según un estudio <sup>39</sup>, la probabilidad de que una persona infectada diese negativo en una RT-PCR en los 4 días anteriores a la aparición de los síntomas disminuyó del 100% en el primer día hasta el 68% en el cuarto día. Lo que estaría provocando posiblemente la rápida expansión del virus, debido al desconocimiento de las personas infectadas por resultados falsos negativos y, por ende, el retraso por parte de estas personas a la hora de aislarse. En cambio, al quinto día (día de inicio de los síntomas comúnmente), la tasa de falsos negativos fue del 38% disminuyendo hasta el 20% en el octavo día, indicando que 38 de cada 100 personas (en el quinto día) y 20 de cada 100 personas (al octavo día) obtendrían resultados falsos negativos por RT-PCR. Teniendo en cuenta la elevada capacidad de propagación del virus, esta tasa de falsos negativos sigue siendo alta para la contención de la transmisión de SARS-CoV-2. Además de esto, la necesidad de asegurar la viabilidad del material genético del virus en la muestra obtenida, hace que la recolección, almacenamiento y el transporte de las muestras sean más costosos y desafiantes. En cambio, los test de antígenos no requieren asegurar una viabilidad del material genético del virus. Haciendo uso de un modelo analítico <sup>90</sup>, se estimó que más del 59% de las transmisiones surgen de personas asintomáticos, seguidos del 35% por personas en una etapa pre-sintomática y del 24% de personas que nunca desarrollan síntomas.

El límite de detección de los métodos de diagnóstico aprobados para la detección de SARS-CoV-2 varían considerablemente de 500 – 80.000 copias virales/mL <sup>91</sup>, mientras que el mejor límite alcanzado en protocolos basados en la extracción de ARN parece ser de 1.000 copias/mL aproximadamente <sup>92</sup>. En la actualidad, los test comerciales más sensibles para la detección de las proteínas de SARS-CoV-2 presentan un límite de detección en el rango de los pg/mL. Todo ello contribuye a la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías con una elevada sensibilidad analítica para detectar a personas que probablemente recibirían un resultado falso negativo con las técnicas que

existen en la actualidad para la detección de SARS-CoV-2, siendo la mejor estrategia para bloquear la expansión del virus la detección temprana de personas infectadas previamente a la aparición de los síntomas.

## 4.7. Conclusiones

En este capítulo se muestra una tecnología poderosa para la detección de las proteínas S1 y N del SARS-CoV-2 en una solución nasal simulada haciendo uso de un inmunoensayo el cual engloba únicamente dos pasos. El límite de detección alcanzado en este inmunoensayo es de 1 ag/mL para la proteína S1 y 10 ag/mL para la proteína N, siendo de dos órdenes de magnitud mejor que los test que existen en la actualidad. El sistema de medida AVAC capaz de medir hasta 96 muestras en tan solo 8 horas, aporta una solución a todas esas situaciones en las que la detección rápida, fiables y ultrasensible es de gran necesidad. Esta nueva tecnología permitiría identificar proteínas virales de SARS-CoV-2, pudiéndose implementar fácilmente en entornos clínicos de los grandes centros de investigación y hospitales, pero también en pequeñas ciudades o países en desarrollo que presenten equipos automatizados básicos para el desarrollo de inmunoensayos, debido a su bajo coste y simplicidad, minimizando así el error humano y desempeñando un papel fundamental en el control de la pandemia.

## Bibliografía

1. Velavan, T. P. & Meyer, C. G. The COVID-19 epidemic. *Trop. Med. Int. Heal.* **25**, 278–280 (2020).
2. Gomes, M. M. G. *et al.* Individual variation in susceptibility or exposure to SARS-CoV-2 lowers the herd immunity threshold. *medRxiv* 1–9 (2021). doi:10.1101/2020.04.27.20081893
3. Burki, T. K. Lifting of COVID-19 restrictions in the UK and the Delta variant. *Lancet. Respir. Med.* **9**, e85 (2021).
4. Tyrrell, D. A. & Bynoe, M. L. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet* **1**, 76–77 (1966).
5. Gorbalenya, A. E. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* **5**, 536–544 (2020).
6. Lu, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* **395**, 565–574 (2020).
7. Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020).
8. Acter, T. *et al.* Evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A global health emergency. *Science of the Total Environment* **730**, 1–19 (2020).
9. Lim, Y., Ng, Y., Tam, J. & Liu, D. Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions. *Diseases* **4**, 26 (2016).
10. Saltigerall, P. & León, X. Virus SARS-CoV-2 ¿ Qué se sabe al momento? *Acta Pediatr. Mex.* **41**, 3–7 (2020).
11. Prasad, S., Potdar, V., Cherian, S., Abraham, P. & Basu, A. Transmission electron microscopy imaging of SARS-CoV-2. *Indian J. Med. Res.* 241–243 (2020). doi:10.4103/ijmr.IJMR
12. Phan, T. Novel coronavirus: From discovery to clinical diagnostics. *Infect. Genet. Evol.* **79**, 1–2 (2020).
13. Cui, J., Li, F. & Shi, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 181–192 (2019).
14. Huang, Y., Yang, C., Xu, X. feng, Xu, W. & Liu, S. wen. Structural and

- functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol. Sin.* **41**, 1141–1149 (2020).
15. Li, D. & Li, J. Immunologic testing for SARS-CoV-2 infection from the antigen perspective. *J. Clin. Microbiol.* **59**, 1–12 (2021).
  16. Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A. M. & Rottier, P. J. M. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J. Virol.* **77**, 8801–8811 (2003).
  17. Xia, S. *et al.* Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 765–767 (2020).
  18. Safiabadi Tali, S. H. *et al.* Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection. *Clin. Microbiol. Rev.* **34**, 1–63 (2021).
  19. Zeng, W. *et al.* Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **527**, 618–623 (2020).
  20. Hurst, K. R., Koetzner, C. A. & Masters, P. S. Identification of In Vivo-Interacting Domains of the Murine Coronavirus Nucleocapsid Protein. *J. Virol.* **83**, 7221–7234 (2009).
  21. Huang, Q. *et al.* Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. *Biochemistry* **43**, 6059–6063 (2004).
  22. Bar-On, Y. M., Flamholz, A., Phillips, R. & Milo, R. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife Sci.* **9**, 1–15 (2020).
  23. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S. & Crispin, M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science (80-. )*. **369**, 330–333 (2020).
  24. Huang, Y., Yang, C., Xu, X. feng, Xu, W. & Liu, S. wen. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol. Sin.* **41**, 1141–1149 (2020).
  25. Xu, X. *et al.* Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci.* **63**, 457–460 (2020).
  26. Li, F., Li, W., Farzan, M. & Harrison, S. C. Structure of SARS coronavirus

- spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science (80-. ).* **309**, 1864–1868 (2005).
27. Wrapp, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (80-. ).* **367**, 1260–1263 (2020).
  28. Narayanan, K., Chen, C.-J., Maeda, J. & Makino, S. Nucleocapsid-Independent Specific Viral RNA Packaging via Viral Envelope Protein and Viral RNA Signal. *J. Virol.* **77**, 2922–2927 (2003).
  29. Liu, S. J. *et al.* Immunological characterizations of the nucleocapsid protein based SARS vaccine candidates. *Vaccine* **24**, 3100–3108 (2006).
  30. Thomas, J. A. & Gorelick, R. J. Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus Res.* **134**, 39–63 (2008).
  31. Zhang, H., Penninger, J. M., Li, Y., Zhong, N. & Slutsky, A. S. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.* **46**, 586–590 (2020).
  32. Ding, Y. *et al.* Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: Implications for pathogenesis virus transmission pathways. *J. Pathol.* **203**, 622–630 (2004).
  33. Hamming, I. *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* **203**, 631–637 (2004).
  34. Hashimoto, T. *et al.* ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature* **487**, 477–481 (2012).
  35. Zhang, H., Penninger, J. M., Li, Y., Zhong, N. & Slutsky, A. S. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.* **46**, 586–590 (2020).
  36. OMS. WHO-convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part. *Jt. WHO-China Study* 120 (2021).
  37. Worobey, M. Dissecting the early COVID-19 cases in Wuhan. *Science (80-. ).* **374**, 1202–1204 (2021).
  38. Arnaout, R. *et al.* SARS-CoV2 Testing: The Limit of Detection Matters. *bioRxiv* (2020). doi:10.1101/2020.06.02.131144
  39. Kucirka, L. M., Lauer, S. A., Laeyendecker, O., Boon, D. & Lessler, J.

- Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Ann. Intern. Med.* **173**, 262–267 (2020).
40. Ai, T. *et al.* Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology* **296**, E32–E40 (2020).
  41. Konrad, B. P., Taylor, D., Conway, J. M., Ogilvie, G. S. & Coombs, D. On the duration of the period between exposure to HIV and detectable infection. *Epidemics* **20**, 73–83 (2017).
  42. Glynn, S. A. *et al.* Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. *Transfusion* **45**, 994–1002 (2005).
  43. Sethuraman, N., Jeremiah, S. S. & Ryo, A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **323**, 2249–2251 (2020).
  44. Vogels, C. B. F. *et al.* Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat. Microbiol.* **5**, 1299–1305 (2020).
  45. Matsumura, Y. *et al.* Comparison of 12 Molecular Detection Assays for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J. Mol. Diagnostics* **23**, 164–170 (2021).
  46. Kevadiya, B. D. *et al.* Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat. Mater.* **20**, 593–605 (2021).
  47. DeFilippo Mack, C. *et al.* Optimizing sars-cov-2 surveillance in the united states: Insights from the national football league occupational health program. *Ann. Intern. Med.* **174**, 1–9 (2021).
  48. Dinnes, J. *et al.* Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1–129 (2020). doi:10.1002/14651858.CD013705
  49. Zou, L. *et al.* SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1175–1177 (2020).
  50. Xie, X. *et al.* Chest CT for Typical Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. *Radiology* **296**, E41–E45 (2020).
  51. Wenling Wang *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **323**, (2020).
  52. To, K. K. W. *et al.* Temporal profiles of viral load in posterior

oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 565–574 (2020).

53. Azzi, L. *et al.* Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J. Infect.* **81**, e45–e50 (2020).
54. Wyllie, A. L. *et al.* Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. *medRxiv* (2020). doi:10.1101/2020.04.16.20067835
55. Wölfel, R. *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* **581**, 465–469 (2020).
56. Sumio Iwasaki, Shinichi Fujisawa, Sho Nakakubo, Keisuke Kamada, Yu Yamashita, Tatsuya Fukumoto, Kaori Sato, Satoshi Oguri, Keisuke Taki, Hajime Senjo, Junichi Sugita, Kasumi Hayasaka, Satoshi Konno, Mutsumi Nishida, T. T. Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab and saliva. *J. Infect.* 145–147 (2020).
57. Azghandi, M. & Kerachian, M. A. Detection of novel coronavirus (SARS-CoV-2) RNA in peripheral blood specimens. *J. Transl. Med.* **18**, 4–7 (2020).
58. Kujawski, S. A. *et al.* Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. *Nat. Med.* **26**, 861–868 (2020).
59. Zheng, S. *et al.* Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January–March 2020: Retrospective cohort study. *BMJ* **369**, 1–8 (2020).
60. Chang, L., Yan, Y. & Wang, L. Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety. *Transfus. Med. Rev.* **34**, 75–80 (2020).
61. Dodd, R. Y. & Stramer, S. L. COVID-19 and Blood Safety Help with a Dilemma. (2020).
62. Chen, W. *et al.* Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 469–473 (2020).
63. Ling, Y. *et al.* Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients. *Chin. Med. J. (Engl.)*. **133**, 1039–1043 (2020).
64. Moitra, P., Alafeef, M., Dighe, K., Frieman, M. B. & Pan, D. Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV-2 Mediated by N Gene Targeted

- Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles. *ACS Nano* **14**, 7617–7627 (2020).
65. Seo, G. *et al.* Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. *ACS Nano* **14**, 5135–5142 (2020).
  66. Mahari, S., Roberts, A., Shahdeo, D. & Gandhi, S. Ultrasensitive novel in-house built printed circuit board based electrochemical device for rapid detection of nCovid-19 antigen, a spike protein domain 1 of SARS-CoV-2. *bioRxiv* (2020). doi:10.1101/2020.04.24.059204
  67. Ahmadivand, A. *et al.* Functionalized terahertz plasmonic metasensors: Femtomolar-level detection of SARS-CoV-2 spike proteins. *Biosens. Bioelectron.* **177**, 1–8 (2021).
  68. Huang, L. *et al.* One-step rapid quantification of SARS-CoV-2 virus particles via low-cost nanoplasmonic sensors in generic microplate reader and point-of-care device. *Biosens. Bioelectron.* **171**, 1–8 (2021).
  69. Aydın, E. B., Aydın, M. & Sezgintürk, M. K. Highly selective and sensitive sandwich immunosensor platform modified with MUA-capped GNPs for detection of spike Receptor Binding Domain protein : A precious marker of COVID 19 infection. *Sensors Actuators B. Chem.* **345**, 1–10 (2021).
  70. Bose, M. E. *et al.* Simulated respiratory secretion for use in the development of influenza diagnostic assays. *PLoS One* **11**, 1–18 (2016).
  71. Pini, V. *et al.* Spatially multiplexed dark-field microspectrophotometry for nanoplasmonics. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).
  72. Pini, V. *et al.* Spatially multiplexed micro-spectrophotometry in bright field mode for thin film characterization. *Sensors* **16**, (2016).
  73. Pini, V. *et al.* Ultra-sensitive and multiplexed detection of protein biomarkers using Mecwins technology. *NanoBio&Med - Abstr. Conf.* 1–2 (2019).
  74. Li, T. *et al.* Serum SARS-COV-2 Nucleocapsid Protein: A Sensitivity and Specificity Early Diagnostic Marker for SARS-COV-2 Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 1–8 (2020).
  75. Kosaka, P. M. *et al.* Detection of cancer biomarkers in serum using a hybrid mechanical and optoplasmonic nanosensor. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 1047–1053 (2014).
  76. Mariano, G., Farthing, R. J., Lale-Farjat, S. L. M. & Bergeron, J. R. C.

Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be. *Front. Mol. Biosci.* **7**, 1–28 (2020).

77. Ogata, A. F. *et al.* Circulating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Vaccine Antigen Detected in the Plasma of mRNA-1273 Vaccine Recipients. *Clin. Infect. Dis.* **2**, 14 (2021).
78. Ahmed, S. F., Quadeer, A. A. & McKay, M. R. Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. *Viruses* **12**, 1–15 (2020).
79. Tan, Y. J. *et al.* Profiles of Antibody Responses against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Recombinant Proteins and Their Potential Use as Diagnostic Markers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 362–371 (2004).
80. Shi, Y. *et al.* Diagnosis of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) by Detection of SARS Coronavirus Nucleocapsid Antibodies in An Antigen-Capturing Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5781–5782 (2003).
81. Leung, D. T. M. *et al.* Antibody response of patients with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid. *J. Infect. Dis.* **190**, 379–386 (2004).
82. Bai, Z., Cao, Y., Liu, W. & Li, J. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. *Viruses* **13**, 1–13 (2021).
83. Renuse, S. *et al.* A mass spectrometry-based targeted assay for detection of SARS-CoV-2 antigen from clinical specimens. *EBioMedicine* **69**, 1–12 (2021).
84. Gorshkov, K. *et al.* A SARS-CoV-2 nucleocapsid protein TR-FRET assay amenable to high-throughput screening. *bioRxiv* (2021).
85. Che, X. Y. *et al.* Nucleocapsid protein as early diagnostic marker for SARS. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1947–1949 (2004).
86. Shan, D. *et al.* N-protein presents early in blood, dried blood and saliva during asymptomatic and symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* **12**, 1–8 (2021).
87. Korber, B. *et al.* Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* **182**, 812–827 (2020).
88. Callaway, E. The coronavirus is mutating - does it matter? *Nature* **585**,

174–177 (2020).

89. Akkiz, H. Implications of the Novel Mutations in the SARS-CoV-2 Genome for Transmission, Disease Severity, and the Vaccine Development. *Front. Med.* **8**, 1–10 (2021).
90. Johansson, M. A. *et al.* SARS-CoV-2 Transmission from People without COVID-19 Symptoms. *JAMA Netw. Open* **4**, 1–8 (2021).
91. FDA. In Vitro Diagnostics Emergency Use Authorizations. *Food Drug Adm.* (2021).
92. Hockemeyer, D., Urnov, F., Green, R. & Doudna, J. Blueprint for a Pop-up SARS-CoV-2 Testing Lab. *medRxiv* (2020). doi:10.1101/2020.04.11.20061424

**APÉNDICE A: Detección de  
Interleucina 11 como biomarcador  
en enfermedades**

Debido a la enfermedad de la Covid-19 causada por la infección por SARS-CoV-2 se genera una respuesta hiperinflamatoria inducida por el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SRAS), siendo una de las principales causas de gravedad y muerte de la enfermedad <sup>1</sup>. Desde que comenzó la pandemia, han sido muchos los estudios que se han centrado en el descubrimiento de biomarcadores predictivos de la inflamación patógena, sin embargo, no son muchos los encontrados hasta el momento <sup>2</sup>.

La respuesta inmunitaria generada en un pequeño porcentaje de pacientes afectados por la Covid-19 hace que esta pueda ser potencialmente mortal causando el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA) (un tipo de insuficiencia respiratoria caracterizada por la aparición de la inflamación generalizada de los pulmones) y/o un fallo multiorgánico <sup>3</sup>. El daño multiorgánico puede aparecer en casos graves de Covid-19. Este síndrome se desencadena por una respuesta inmune disfuncional del huésped frente al virus, lo que se conoce como “tormenta de citocinas” <sup>4-6</sup>. En estos pacientes se informó de un aumento de los niveles plasmáticos de diferentes interleucinas y quimiocinas, aunque no se ha conseguido establecer una relación entre la expresión de estas y un mal pronóstico asociado al paciente <sup>7</sup>.

En este apéndice, hacemos uso de la interleucina 11 (IL-11). Un miembro de la familia de citoquinas IL-6 cuya función biológica más conocida es su actividad hematopoyética, ya que promueve la megacariocitopoyesis, eritropoyesis y la trombopoyesis. Aunque IL-11 puede desempeñar un papel fundamental en el desarrollo fetal del pulmón <sup>8,9</sup>, los niveles de IL-11 en suero son frecuentemente indetectables en pacientes sanos, sin embargo, se ha observado sobreexpresión de IL-11 en varios cánceres <sup>10,11</sup> aunque por el momento no existen ningún estudio que relacione dicha interleucina con la respuesta inmune generada frente a la infección por SARS-CoV-2.

Se piensa que IL-11 estimula la proliferación y supervivencia de las células de cáncer de pulmón, debido a su implicación en el aumento de la migración celular, invasión y metástasis del cáncer de pulmón, lo que conlleva a la formación del tumor. Además, se cree que IL-11 también está implicada en la progresión del carcinoma de células no pequeñas (NSCLC) y en la capacidad

que tienen las células cancerosas extrapulmonares para hacer metástasis en los pulmones <sup>12</sup>. En un estudio de 2016, se compararon tejidos de adenocarcinoma (ADC), carcinoma de células escamosas (SCC) y carcinoma de células pequeñas (SCLC) con tejidos de pulmón no tumorales del mismo paciente, observándose que los niveles del receptor de IL-11 (IL-11R $\alpha$ ) se encontraban elevados en los tejidos tumorales <sup>13</sup>.

## A.2. Materiales y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo de igual modo que para las proteínas S1 y N de SARS-CoV-2 en placas de 48 pocillos haciendo uso de placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup>.

### A.2.1. Anticuerpos e IL-11

Para la detección de la interleucina 11 los anticuerpos usados fueron anticuerpo IL-11 (Lifespan Biosciences, LS-C104366) como anticuerpo de captura y anticuerpo IL-11 (Lifespan Biosciences, LS-C104441) como anticuerpo de detección. La interleucina 11 fue obtenida del Servicio de Oncología del Hospital Universitario 12 de Octubre, por el Dr. Luis Paz-Ares Rodríguez.

### A.2.2. Inmunoensayo

La interleucina 11 fue diluida en FBS y el rango de concentraciones estudiadas fue de 1  $\mu$ g/mL hasta 1 ag/mL. Una vez finalizada la funcionalización de las placas de silicio (ver “capítulo 2: materiales y métodos”), estas fueron incubadas en 1 mL de solución que contenía IL-11 en el rango de concentraciones arriba mencionada, durante 1 hora a 37°C bajo agitación. Para los experimentos controles, las placas de silicio funcionalizadas fueron incubadas en 1 mL de FBS sin IL-11. A continuación, las placas de silicio fueron lavadas con PBS + 0.05% Tween<sup>®</sup> 20 durante 15 minutos (este paso se repitió una vez más) y seguidamente se lavaron con agua Milli Q. Para el inmunoensayo, las placas de silicio fueron sumergidas en 1 mL de una solución 10  $\mu$ g/mL de nanopartículas de oro funcionalizadas previamente con el

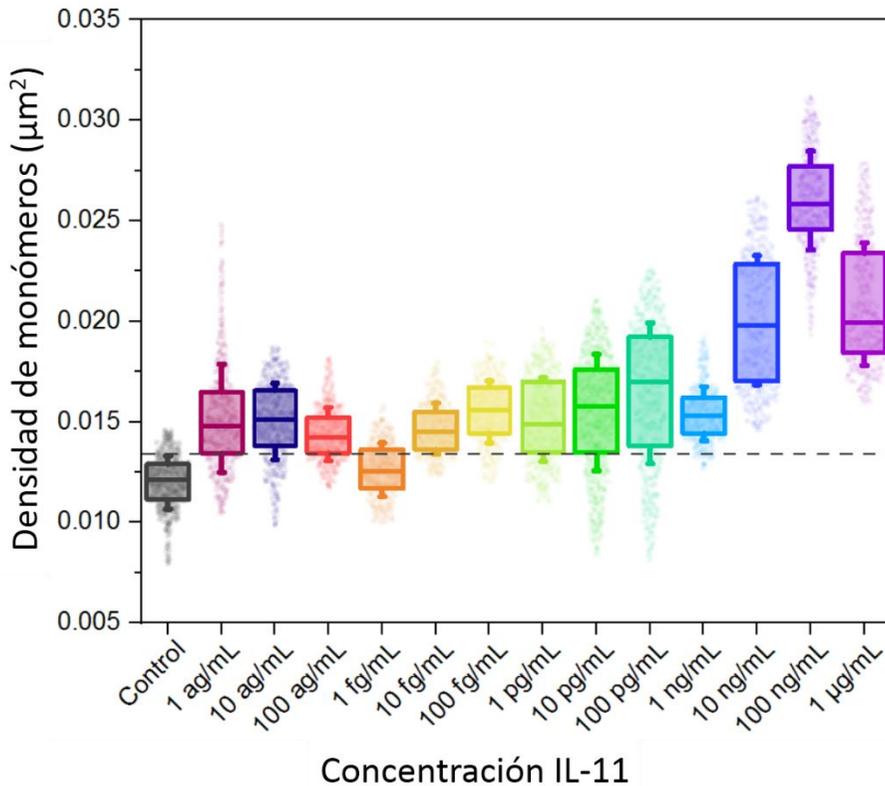
respectivo anticuerpo de detección y preparada en MES 10 mM (pH 5.5) al 0.05% de Tween® 20. Las placas de silicio fueron incubadas a 37°C durante 1 hora con la solución de nanopartículas de oro. Por último, las placas fueron lavadas durante 4 horas con 4 mL de MES 10 mM (pH 5.5) al 0.5% Tween® 20, siendo lavadas abundantemente con agua Milli Q y secadas bajo un flujo de nitrógeno seco.

La medida de la densidad de nanopartículas de oro sobre la superficie de las placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> se llevó a cabo usando el sistema AVAC, del mismo modo que para el capítulo 4 (ver apartado “4.5.3. Sistema de la medida optoplasmónica de las superficies de silicio mediante AVAC”).

### A. 3. Resultados

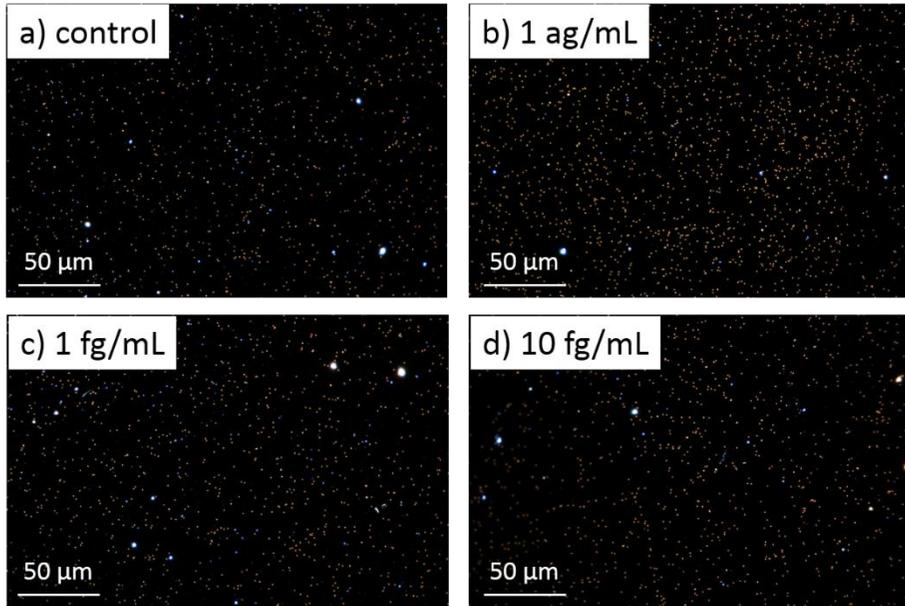
Los resultados comprenden el análisis de un total de 84 placas de silicio, en la que cada concentración se repitió por triplicado en cada uno de los dos inmunoensayos llevados a cabo.

En la figura A.1, se muestra la detección de IL-11 haciendo uso de las placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> y nanopartículas de oro con el método de detección plasmónico, llegando a un límite de detección de 10 fg/mL. A concentraciones más elevadas se puede observar como el sensor satura y la variabilidad entre muestras aumenta, siguiendo el mismo comportamiento que en la detección de las proteínas S1 y N de SARS-CoV-2. En la actualidad, la mayoría de test encargados de la detección de IL-11 se basan en inmunoensayos como los ELISA, los cuales presentan un límite de detección, en el mejor de los casos, en el rango de los pg/mL.



**Figura A.1. Gráfica de la detección de IL-11 en placas de silicio haciendo uso de nanopartículas de oro de 100 nm.** Los datos de cada concentración estudiada es la medida de tres muestras (placa de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup>) independientes de cada inmunoensayo.

En la figura A.2 podemos observar algunas imágenes en campo oscuro tomadas por el sistema AVAC. La imagen A.2a pertenece a un experimento control, donde la densidad de nanopartículas es baja a comparación con un experimento de detección de IL-11 (imágenes A.2b, A.2c y A.2d). Comparando una concentración de 1 fg/mL y un ensayo control, cabría esperar un aumento en la densidad de nanopartículas, aunque desafortunadamente no es así como se aprecia en la gráfica (figura A.1) y en las imágenes (figura A.2a y A.2c).



**Figura A.2. Imágenes de campo oscuro tomadas por el sistema AVAC en la detección de la interleucina 11. a)** imagen de un experimento control, en **b)** un experimento de detección con una concentración de IL-11 de 1 ag/mL y en **c)** y en **d)** imágenes de la detección de IL-11 a una concentración de 1 fg/mL y 10 fg/mL, respectivamente.

#### A.4. Conclusiones

Aquí se muestra la sensibilidad del método desarrollado en el capítulo 4 para la detección de la interleucina 11. El descubrimiento de biomarcadores que estén relacionados posiblemente con varias enfermedades a través de las nuevas tecnologías basadas en nanomateriales, traería consigo un beneficio de los pacientes, con el fin de mejorar los cursos de las enfermedades y reducir notablemente la mortalidad.

## Bibliografía

1. Riveiro-Barciela, M. *et al.* Simple predictive models identify patients with COVID-19 pneumonia and poor prognosis. *PLoS One* **15**, 1–14 (2020).
2. Del Valle, D. M. *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat. Med.* **26**, 1636–1643 (2020).
3. Chen, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* **395**, 507–513 (2020).
4. Vabret, N. *et al.* Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity* **52**, 910–941 (2020).
5. Zhang, C., Wu, Z., Li, J., Zhao, H. & Wang, G. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist. *Int. J. Antimicrob. Agents* **55**, 105954–105960 (2020).
6. Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 363–374 (2020).
7. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **395**, 497–506 (2020).
8. Winship, A. L. *et al.* Interleukin-11 alters placentation and causes preeclampsia features in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 15928–15933 (2015).
9. Nogueira-Silva, C. *et al.* The Role of Glycoprotein 130 Family of Cytokines in Fetal Rat Lung Development. *PLoS One* **8**, 1–15 (2013).
10. Ng, B. *et al.* IL-11 is a therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **11**, 1–14 (2019).
11. Putoczki, T. L. & Ernst, M. IL-11 signaling as a therapeutic target for cancer. *Immunotherapy* **7**, 441–453 (2015).
12. Zhao, M. *et al.* Upregulation of IL-11, an IL-6 Family Cytokine, Promotes Tumor Progression and Correlates with Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* **45**, 2213–2224 (2018).
13. Cardó-Vila, M. *et al.* Interleukin-11 Receptor Is a Candidate Target for Ligand-Directed Therapy in Lung Cancer: Analysis of Clinical Samples and BMTP-11 Preclinical Activity. *Am. J. Pathol.* **186**, 2162–2170 (2016).

## **CONCLUSIONES GENERALES**

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el desarrollo de biosensores para la detección de proteínas a bajas concentraciones. Para ello, se ha hecho uso de matrices de silicio de ocho micropalanca y de placas de silicio de  $5 \times 5 \text{ mm}^2$  utilizando dos métodos de transducción; uno nanomecánico basado en la vibración de las micropalanca a determinadas frecuencias de resonancia y el optoplasmónico haciendo uso de la dispersión de las nanopartículas de oro de 100 nm. Los dispositivos aquí desarrollados son más sensibles en comparación con las tecnologías que existen en la actualidad para la detección de proteínas, donde en el mejor de los casos llegan a límites de detección del rango de los pg/mL, como es el caso de los ELISA.

Se ha demostrado la detección mediante un biosensor nanomecánico y optoplasmónico de proteínas en diferentes lisados celulares con el empleo de matrices de ocho micropalanca. Concretamente, se ha detectado la p-AKT (Ser473) en la línea celular MCF-7 y la mutación G13D en la línea celular MDA-MB-231, a una densidad de  $10^5$  células/mL, siendo ambas líneas de cáncer de mama. Tras comparar ambos métodos de transducción se ha comprobado que el método de transducción optoplasmónico resulta el más adecuado y presenta una mayor sensibilidad para la detección de proteínas a bajas concentraciones. Por esta razón, haciendo uso de este método se ha demostrado por primera vez y como prueba de concepto, la detección de proteínas en muestra de suero de pacientes con cáncer de mama. Concretamente, se ha detectado la p-AKT (Ser473) y la mutación G13D.

Del mismo modo se ha desarrollado un sensor optoplasmónico para la detección de dos proteínas (S1 y N) del virus que provoca la Covid-19, el SARS-CoV-2. Se ha implementado un sistema experimental basado en la utilización de placas de silicio de  $5 \times 5 \text{ mm}^2$  como sustitución a las matrices de ocho micropalanca. Con la utilización de nanopartículas de oro de 100 nm se ha calculado la densidad de monómeros presentes en la superficie de las placas de silicio, consiguiendo un límite de detección de 1 ag/mL y de 10 ag/mL para las proteínas S1 y N, respectivamente, con este sencillo sistema experimental.

## Conclusiones generales

Además, utilizando el método optoplasmónico en placas de silicio de 5 x 5 mm<sup>2</sup> se ha desarrollado un sensor para la detección de la interleucina 11, donde el límite de detección alcanzado se encuentra en 10 fg/mL.

Finalmente, los biosensores y métodos de detección desarrollados a lo largo de esta tesis han demostrado ser una herramienta eficaz y válida para la detección de diferentes biomarcadores en medios biológicos distintos; lo que manifiesta la universalidad de la tecnología presentada y su poder de uso en diferentes aplicaciones.