

ICFO-INSTITUT DE CIÈNCIES FOTÒNIQUES
&
UPC-UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Desarrollo y Validación de una Plataforma
Optofluídica Ultrasensible para la
Detección Específica y Selectiva de
Marcadores Tumoraes relevantes en
Oncología.

María A. Ortega. M

Supervisor: Prof. Romain Quidant

Co-Supervisor: Dra. Vanesa Sanz

PhD Thesis-2015

Con amor para...

Kenny, Joaquín y Matías

AGRADECIMIENTOS

Ahora ha llegado el momento de la escritura que tanto he esperado y ansiado, el dar gracias; y trataré de hacerlo con la mayor humildad y respeto posible, incluyendo a todas esas personas que me han acompañado y que han hecho posible que este gran reto termine justo aquí.

En primer lugar debo dar gracias a Dios porque sin Él y la fuerza, aguante, paciencia e iluminación que me ha dado esto no hubiese sido posible. Durante este tiempo te conocí, y te sentí más que nunca en mi corazón. Empezamos muy distantes, yo con mi mente y mi corazón alejados y enfocados en cosas que me alejaban cada vez mas de Ti, y con cada reto y cada circunstancia que pusiste en mi camino, me fuiste acercando a Ti y demostrándome lo mucho que me amas y lo maravillosa que es la vida que me regalas día a día. Gracias Señor por acompañarme siempre y por regalarme cada amanecer, cada sonrisa, los tropiezos, las alegrías, en fin; toda la felicidad que me acompaña en estos momentos. Este milagro es éxito exclusivo tuyo...

En segundo lugar debo agradecer a mi Esposo que durante todo este tiempo ha vivido conmigo y en primera línea todo lo que ha significado esto para mí. Todo empezó mi amor hace 5 años, cuando en un gesto de amor puro, dejaste todos tus proyectos y me seguiste en esto que yo llamaba mi "sueño". Me viste sufrir, reír, equivocarme, caer, levantarme, rectificar, llorar (y mucho), desistir, perdonar... y siempre estuviste ahí apoyándome y dándome fuerzas para seguir adelante, muchas veces sacrificándote tú mismo, entregándote a mi enteramente, demostrándome el verdadero significado de amor. Hemos crecido juntos durante todo este tiempo y creo que esta experiencia ha fortalecido aún más nuestro compromiso a estar siempre juntos, para lo bueno y para lo malo. Sin tu apoyo y paciencia esto no hubiese podido salir adelante. Mil gracias por tu amor y tu entrega incondicional. Te amo inmensamente...

En tercer lugar debo agradecer a las personas que con su ternura, sus miradas y sonrisas me daban día a día el empuje para continuar. A mis chicos, mis ángeles, mis niños Joaquim y Matías. Primero llegó mi Joaquim, fue difícil entender en ese momento porque Dios te había enviado en esa etapa de mi vida, y la espera fue difícil llena de miedos, estrés, preocupaciones, confusión... Pero en el momento que te vi por primera vez y te tuve en mi pecho sentí lo más grande jamás sentido; el amor materializado... Empecé a entender, a darle el verdadero sentido a mi vida, a entender que estaba en el camino equivocado, que mi "sueño" empezaba justo ahí al tenerte en mis brazos y lo que yo tenía como meta era superfluo y vacío en comparación con eso. Me enseñastes el verdadero camino hijito, me distes las fuerzas necesarias para seguir adelante. Contigo empezó todo... Perdona todos los momentos que mami te hizo pasar, tu también viviste de lleno esta investigación (y muy literalmente). Luego ya al final mi felicidad se duplicó, cuando llegó mi Matías. El impulso que necesitaba para finalizar esta etapa. Contigo fue todo más fácil (y a la vez más difícil ajaja), porque mi mente y mi corazón estaban en la dirección y en el lugar correcto, pero cada abrazo, cada mirada tuya, convertían la escritura una experiencia más fácil de llevar. Esta tesis fue escrita entre, bronquitis, varicelas, gripes, fiebres, jajaj pero a pesar de lo cansada y todas las dificultades que se presentaron, siempre me recibían con un Mamá!!!! y una sonrisa que me traspasaba el pecho y me daba las fuerzas para continuar un día más... Gracias mis niños, con su inocencia y amor me llenaron y me brindaron de todo lo necesario para acabar con éxito esta etapa, fueron el motor que impulso todo. Mami los ama inmensamente....

Luego debo agradecer a una persona vital en este proceso, sin ella no hubiese sido esto posible. Mi madre. Gracias Mamá, por el esfuerzo que pusiste en cuidar a mis niños con el mismo amor y dedicación que nos distes. Gracias a ti, y a la tranquilidad que me daba el que mis niños estuviesen a tu lado y bajo tu cuidado, fue posible que pudiese desconectar y enfocarme en el aspecto profesional. Gracias por el amor que me das, a tu manera, pero sé que nos amas inmensamente, y lo sigues demostrando al día de hoy. Gracias por el amor que le das a mis hijos día a día, eso no tiene precio, y espero Dios me dé mucha salud para compensar y regresarte todo lo que día a día haces por mí, tú los llamas sacrificios, yo prefiero llamarlo amor... Te amo mami y gracias, esto es también un éxito tuyo... También debo agradecer a los demás miembros de mi familia... a mi Papá que dentro de sus posibilidades, me ayudó con su apoyo y su compañía; a mi hermano porque cuando te necesité estuviste ahí... Gracias a ambos por acoplarse siempre a mí, por entender mi situación y por formar parte de mi gran tesoro, mi Familia... Los amo.

Debo agradecer igualmente a mis supervisores. Primeramente gracias al Dr. Romain Quidant por permitirme desarrollar mi doctorado en el ICFO, por darme la confianza y aceptarme para formar parte de su grupo de investigación. Así mismo debo agradecerle su dedicación y esfuerzo para que sus estudiantes (incluyéndome) contemos con los recursos necesarios para llevar a cabo las investigaciones.

Debo agradecer a la Dra. Vanesa Sanz, por toda la dedicación que me ha brindado para que este trabajo saliera adelante, por todos los conocimientos adquiridos y por demostrarme lo que "hacer ciencia" significa. Gracias por tu guía, por tu paciencia al enseñar, por tu bondad y tu nobleza, por entender mi situación y nunca juzgarme... ha sido para mí un verdadero placer aprender a tu lado tantas cosas, no solo a nivel profesional sino personal también, eres una súper bella persona que me alentó y me apoyo siempre que lo necesité. Por eso y más mil gracias....

Quiero dar las gracias a las personas que a nivel profesional forman parte de este éxito. Gracias al Dr. Srdjan Acimovic porque fue una pieza fundamental en toda esta historia, lamentablemente la vida nos puso bajo el mismo objetivo y como todo, el más apto y fuerte triunfa. Gracias a nivel profesional, por cada muestra de sensores y por cada chip de microfluídica que fabricaste, por el empeño y dedicación que mostraste día tras día para que el proyecto saliera adelante. Debo decir que bajo mi punto de vista, representábamos un buen equipo... Particularmente disfrute mucho el tiempo vivido y las enseñanzas aprendidas (especialmente sobre física), y más aún el conocer a esa persona detrás del investigador. Gracias por abrirme las puertas de tu familia y por todos esos momentos que juntos disfrutamos, así como todas las veces que me apoyaste y me animaste para seguir en la lucha. Mil gracias también al Dr. Mark Kreuzer por todos los momentos que día a día vivimos en esta lucha. Debo darte gracias Mark, por todas aquellas veces que me recibiste en tu oficina con mis frustraciones, con mis problemas y me diste una palmada en la espalda, alentándome a seguir... Principalmente debo agradecer lo mucho que me apoyaste cuando Joaquim nació y por el cariño que tanto tu como Vero le dieron y le siguen dando al día de hoy. Yo me quedo con todos esos bonitos recuerdos que durante cuatro años nos acompañaran siempre, esos viajes, esas fiestas, esos cafés en la plaza, esas charlas que disfrutábamos durante horas y esa manera tan particular de hacerme reír. Eres una bella persona y me alegra que finalmente hayas encontrado lo que verdaderamente te brinda felicidad en la vida... Os quiero mucho y muchas gracias...

Gracias al Dr. Mathieu Juan, Dr. Jan Renger y al Dr. Johann Berthelot por la elaboración de los montajes ópticos y del software necesario para el tratamiento y el análisis de los resultados, lo cual fue una herramienta fundamental para llevar a cabo esta investigación. Gracias

igualmente al Dr. José García Cordero por la realización de los chips de microfluídica y por la dedicación en lo referente a diseño y fabricación de los chips se refiere.

Debo agradecer a todas esas bellas personas que con su cariño y su amistad han sido pieza fundamental en todo este tiempo. Los miembros de mi familia que me han animado y han estado conmigo en los momentos más duros... Los amo inmensamente.

A mis amigos de toda la vida, que con su amistad incondicional y sin fronteras me han acompañado y me han alentado para seguir adelante... Gracias por su amistad invaluable...

A todos esos amigos que durante este tiempo he adquirido y con los cuales he vivido y compartido momentos especialmente únicos en mi vida.

A todos esos miembros de PNO que formaron parte de esta historia. Gracias Valeria por cada día en el laboratorio, sin duda tu compañía y tu amistad fue clave en todo este proceso... juntas nos apoyábamos y espero que lo sigamos haciendo por muchos años más... Esteban, Michael, Ignacio, Jose, Vanesa, Guillaume, Jon, Jan, Bea, Ignacio, Sebastian, Chris, Marco, Giorgio, Srdjan, Sukanya, Mark, para mí representan el mejor momento de PNO y estoy súper orgullosa de haber sido parte de este grupo...

En especial quiero agradecer a Gonzalo, Fede, Nadia y Phillippe, ustedes representan mi familia adoptiva... No tengo como agradecerles todo el amor que me han demostrado, no solo a mí sino a mis hijos. Es tan grande el vínculo que nos une, a la final terminamos siendo todos compadres, tios, padrinos, ahijados ejjeje... De verdad yo los aprecio muchísimo y valoro cada gesto hacia conmigo y mi familia, que bello es poder establecer vínculos tan grandes y firmes en especial cuando estás tan lejos de tu tierra y de tu gente... Ustedes han sabido llenar bien ese vacío... gracias por todas las navidades, cumpleaños, fiestas, celebraciones, en fin por todooooo... como siempre les digo ustedes ya pasaron a formar parte de mi familia....

Quiero igualmente dedicar unas palabras de agradecimiento a los que yo considero como las piezas de oro del ICFO, los más humanos y los que siempre, pero siempre me brindaron una sonrisa y un apoyo único... En primer lugar las chicas de HR, Cristi, Anne, Manu, Mery, Laia gracias por cada sonrisa, por lo mucho que hacen por cada uno de nosotros (estudiantes y no estudiantes), por la disposición que tienen a la hora de ayudarnos, en fin por el excelente trabajo que realizan día a día, es todo un lujo haber contado con su ayuda y con su apoyo durante todo este tiempo... mil y una gracias.... En segundo lugar a toda esa gente del ICFO que siempre tuvo palabras bonitas para mí y mis nenes: Xavi por la excelente persona y el gran corazón que tienes y por los consejos que me distes en su momento, que me han llevado a estar aquí en la recta final... A Adri y Jonas por el buen rollo y por las sonrisas que me lograron sacar aún en los momentos más difíciles... A las chicas del frontdesk por todo esa alegría que transmiten tanto al salir como al entrar, en especial a mi consuegra jajaja... mi Moni por todas esas charlas y por los momentos vividos fuera del ICFO, gracias por todo tu apoyo mi guapi... A mi gente bella de compras, Magda, Elena y Santi por esa alegría que transmiten y por lo atentos que fueron y son siempre conmigo y los míos... A Luis y Javi por las sonrisas y por el cariño que siempre mostraron. A mi primo Cesar por tantos momentos lindos y alegres vividos en el Biolab... A mi gente bellísima de comunicaciones, Ester, Tomas (mi paisano), Alina, con ustedes la diversión y la alegría están garantizada, por cada uno de los momentitos de risas que teníamos porque me ayudaron muchas veces a levantar el ánimo y a reírme de las cosas de la vida...muchísimas gracias... A Nuria uff a ti debo agradecerte muchísimo todo tu apoyo en los momentos que considero fueron los más duros, tu compañía, tus palabras de aliento, tus consejos y tu fortaleza me ayudaron muchísimo a salir adelante y a luchar con todo, no tengo como agradecerte tanto cariño... Debo agradecer especialmente al Dr. David Artigas y al Dr. Rob Sewell, por interceder ante ICFO por mí para conseguir esta nueva oportunidad y poder culminar con éxito la escritura del manuscrito y poder así finalizar esta etapa, gracias

por la comprensión y la guía para poder sacar adelante todo este trabajo...En fin debo agradecer a toda esa gente del ICFO que de alguna u otra manera con su entusiasmo ha contribuido en mi motivación para alcanzar esta meta... Son en mi opinión el lado humano que sostiene este gran instituto... Gracias Totales...

Debo agradecer a mis amigos, Raúl, Carmen, Lucia y Andrés y a los niños, porque han sido pilares fundamentales en que sea posible que hoy haya acabado esta etapa en nuestras vidas. Por su apoyo, sus palabras de apoyo, su amistad y especialmente por todas esas oraciones que estoy confiada tuvieron hacia conmigo y nuestra familia... Fue el motor más grande que hizo posible mover nos hasta donde estamos hoy... Quiero agradecer especialmente a Ms Xavier por guiarme desde hace mas de dos años, porque fue usted una pieza clave en toda esta historia, por enseñarme a perdonar y aceptar con alegría todos los momentos difíciles y por alentarme a continuar y a ver la mejor cara de todo y de todos lo que me rodean...

Ya para acabar quiero agradecer a todas esas personas que nunca confiaron en que iba a ser posible que yo pudiera acabar esto bajo las condiciones en las que me encontraba... Esto también es para ustedes... Esta tesis fue realizada con mucha ilusión, mucha humildad, sin ansias de protagonismo y con la mejor disposición de hacer las cosas bien para el bien de todos, por la ilusión de contribuir aunque sea un poco en la búsqueda de una mejora para la sociedad... En muchas ocasiones me faltó carácter, en especial cuando estuvo en riesgo mi propia vida, pero no me arrepiento... aprendí muchísimas cosas, de ciencia, negocios... pero me quedo simplemente con lo humano, lo que me hizo verdaderamente crecer... No pretendí que fuera fácil, pero muchas veces el viento estuvo en mi contra y el camino se hizo más duro de lo normal....Gracias a la vida por esta experiencia, mi mayor motivación: el poder demostrarles a mis hijos que la vida tiene sus altibajos pero con perseverancia, Fé, humildad y buen corazón se puede salir de ellos... Enormemente agradecida y satisfecha de lo alcanzado...

INDICE

INTRODUCCION

CAPITULO 1

DEFINICIONES GENERALES

1.1 ASPECTOS GENERALES EN BIOSENSADO

1.1.1. DEFINICIÓN DE CONCEPTOS BÁSICOS EN EL BIORECONOCIMIENTO

MOLECULAR	1
1.1.1.1 El Sistema Inmune.....	1
1.1.1.2 Antígeno.....	2
1.1.1.3 Anticuerpos.....	3
1.1.1.3.1 Anticuerpos Policlonales.....	5
1.1.1.3.2 Anticuerpos Monoclonales.....	6
1.1.1.4 Marcadores tumorales.....	8
1.1.1.4.1. Antígeno prostático específico (PSA).....	11
1.1.1.4.2 Alfafetoproteína (AFP).....	13
1.1.1.4.3 Antígeno Carcinoembrionario (CEA).....	14
1.1.1.4.4 Proteínas de choque térmico.....	15

1.1.2 DEFINICION DE BIOSENSOR.....	17
------------------------------------	----

1.1.3 CLASIFICACIÓN DE BIOSENSORES

1.1.3.1 Clasificación de Biosensores en Función del Sistema de Transducción... ..	20
1.1.3.1.1. Transductores electroquímicos.....	21
1.1.3.1.2 Transductores mecánicos.....	22
1.1.3.1.3 Transductores ópticos.....	23
1.1.3.2. Tipos de Biosensores Según el Tipo de Elemento Biológico que participa en el Reconocimiento Molecular.....	26

1.1.4	FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES SÓLIDAS EN BIOSENSORES	
1.1.4.1	Materiales empleados para la inmovilización de los receptores biológicos en un biosensor.....	28
1.1.4.2	Modificación Química de Superficies Sólidas.....	31
1.1.4.2.1	El concepto de auto-ensamblado.....	32
1.1.5	INMOVILIZACIÓN DE RECEPTORES BIOLÓGICOS EN SUPERFICIES SÓLIDAS FUNCIONALIZADAS.	
1.1.5.1	Inmovilización No Covalente del Receptor Biológico.....	39
1.1.5.1.1	Unión biotina/avidina.....	40
1.1.5.2	Inmovilización Covalente del Receptor Biológico.....	43
1.1.5.2.1	Aspectos generales de la reacción EDC/NHS.....	44
1.1.5.3	Agentes Bloqueantes.....	45
1.1.6	ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA “ELISA”	
1.1.6.1	Aspectos generales del ensayo ELISA.....	48
1.1.6.1.1	Inmovilización y detección del Antígeno.....	50
1.1.6.1.2	Detección empleando una reacción enzimática.....	52
1.1.6.2	Factores que afectan la preparación de inmunoensayos empleando ELISA.....	54
1.1.6.3	Aplicaciones de ELISA en la detección de analitos.....	56
1.2	SENSORES BASADOS EN NANOESTRUCTURAS PLASMÓNICAS	
1.2.1	ASPECTOS GENERALES SOBRE PLASMONES.....	58
1.2.2	RESONANCIA DE PLASMONES SUPERFICIALES LOCALIZADOS (LSPR).....	59
1.2.3	PLASMONES EN SENSADO: LSPR VS SPR.....	63
1.3	MICROFLUÍDICA Y “LAB-ON-A-CHIP”	
1.3.1	ASPECTOS FÍSICOS RELEVANTES EN MICROFLUÍDICA.....	69
1.3.2	TECNOLOGÍAS DE FABRICACIÓN PARA MICROFLUÍDICA.....	73

1.3.3 APLICACIONES DE LA MICROFLUÍDICA.....	74
1.2.3.1 “LAB ON-A-CHIP”	76
1.2.3.1.1 Aplicaciones Recientes y Futuras de los LOC’s.....	78

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DESARROLLO DE LA PLATAFORMA OPTOFLUÍDICA PARA LA DETECCIÓN DE MARCADORES TUMORALES

2.1.1 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE NANOESTRUCTURAS.....	82
2.1.1.1 Litografía de haz de electrones (EBL).....	83
2.1.1.2 Litografía de haz de electrones (EBL) empleando un fotopolímero negativo y combinado con grabado de iones reactivos (RIE).....	85
2.1.1.2.1 Protocolo de Fabricación de los Nanocilindros de oro empleados como elementos sensores en la detección de analitos con la plataforma optofluídica	87
2.1.2 FABRICACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DE LOS LAB-ON-A-CHIPS’s	
2.1.2.1 Protocolo de Fabricación de los chips de microfluídica.....	89
2.1.2.1.1 Fabricación de los moldes para la elaboración de los chips de microfluídica.....	90
2.1.2.1.2 Preparación del PDMS para la elaboración de los chips.....	91
2.1.2.1.3 Creación de la salida y entrada de los canales en el chip.....	92
2.1.2.1.4 Unión del chip de microfluídica al sustrato.....	93
2.1.2.2. Funcionamiento del Lab-On-A-Chip final.....	94
2.1.3 PLATAFORMA OPTO-FLUÍDICA EMPLEADA PARA LA CARACTERIZACIÓN Y MONITOREO DE LA DETECCIÓN DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	98
2.2 MATERIALES Y REACTIVOS EMPLEADOS EN LOS ENSAYOS DE BIORECONOCIMIENTO MOLECULAR.....	101

2.3. METODOLOGÍA EMPLEADA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LAS NANOESTRUCTURAS CON BRI.....	103
2.4 PROTOCOLOS QUIMICOS INVOLUCRADOS EN LOS ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR REALIZADOS CON NANOCILINDROS DE ORO Y APLICACIONES EN LA DETECCION DE MARCADORES TUMORALES.....	105
2.4.1 PROTOCOLO DE FUNCIONALIZACIÓN DE NANOCILINDROS DE ORO EMPLEANDO HS-(CH ₂) ₁₁ -(PEG) ₃ -BIOTINA	105
2.4.1.1 Biotinización de los Anticuerpos monoclonales empleados en la detección de analitos.....	106
2.4.1.2 Cuantificación del número de biotinas por proteínas utilizando el método HABA/avidina.....	110
2.4.2 PROTOCOLO DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE NANOCILINDROS DE ORO EMPLEANDO ÁCIDO MERCAPTOUNDECANOICO (MUA).....	113
2.4.2.1 Protocolo para la reacción entre grupos carboxilos del MUA y grupos aminos primarios de anticuerpos monoclonales empleando la reacción EDC/NHS.....	113
2.4.3 METODOLOGÍA APLICADA PARA LA DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN A PARTIR DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LOS SISTEMAS ANTICUERPO-ANALITO BAJO ESTUDIO.....	115
2.4.4 PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN EMPLEANDO ELISA DE LOS DIFERENTES SISTEMAS DE MARCADORES TUMORALES Y PROTEÍNAS EMPLEADAS EN ESTA INVESTIGACIÓN.....	117
2.4.4.1 Materiales y Reactivos.....	117
2.4.4.2 Elaboración de curvas de calibración empleando ELISA.....	118

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LOS NANOSENSORES EMPLEANDO BRI Y SELECCIÓN DEL MEJOR SISTEMA DE NANOESTRUCTURAS PARA SER EMPLEADOS COMO ELEMENTO SENSOR EN LA PLATAFORMA OPTOFLUIDICA DESARROLLADA.....	119
3.2 ENSAYOS PRELIMINARES Y PUESTA EN MARCHA DE LA PLATAFORMA OPTOFLUÍDICA DESARROLLADA EN ESTA TESIS DOCTORAL PARA LA DETECCIÓN DE ANALITOS EN DISTINTAS MATRICES.....	124
3.2.1 METODOLOGÍA DE DETECCIÓN BASADA EN LA INTERACCIÓN BIOTINA-STV	
3.2.1.1 Optimización de la capa de STV sobre el sensor funcionalizado con HS-(CH ₂) ₁₁ -(PEG) ₃ -Biotina.....	125
3.2.1.2 Detección de Anti-Inmunoglobulina de Conejo (Gt-a-Rb IgG) empleando como receptor el conjugado Inmunoglobulina-Biotina (Rb-IgG-Biotina).....	132
3.2.1.2.1 Estudio empleando la técnica ELISA de la interacción en el sistema de anticuerpos IgG/Anti-IgG.....	144
3.2.1.3 Estudio de la detección del marcador tumoral HSP70 en Tampón y Suero Humano.....	150
3.2.2 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS Y MARCADORES TUMORALES EMPLEANDO EL PROTOCOLO DE ACTIVACION CON EDC/NHS PARA EL ANCLAJE DEL RECEPTOR.	
3.2.2.1 Optimización General de diversos parámetros involucrados en la reacción de activación EDC/NHS para la Inmovilización de los receptores.....	159
3.2.2.2 Empleo del sistema modelo de anticuerpos IgG/anti-IgG para la evaluación del protocolo de activación con EDC/NHS.....	161

3.2.2.3 Detección de alfa feto proteina (AFP) en Tampón y en Suero	
Humano empleando la plataforma de sensado LSPR.....	165
3.2.2.3.1 Empleo de ELISA como método para evaluar el reconocimiento de los anticuerpos anti-AFP empleados y como método de validación de los resultados obtenidos en la detección de la proteína empleando la plataforma optofluídica de sensado LSPR.....	178
3.2.2.3.2 Determinación cuantitativa de la cantidad de AFP endógena en el suero humano de trabajo, empleando el método de adición estándar.....	182
3.2.2.4 Detección del marcador tumoral Antígeno Específico de Próstata (PSA) en tampón y suero humano empleando la plataforma de sensado LSPR.....	186
3.2.2.4.1 Estudio de la interacción anticuerpo-analito empleados en la detección de PSA y validación de los resultados obtenidos en los ensayos de detección, empleando el método ELISA.....	191
3.2.2.4.2 Determinación cuantitativa de la cantidad de PSA endógeno en el suero humano empleado, utilizando el método de adición estándar.....	193
3.2.2.5 Ensayos preliminares en la detección de otros sistemas de marcadores tumorales relevantes empleando la plataforma de sensado LSPR	
3.2.2.5.1 Detección de antígeno carcinoembrionario (CEA) en tampón.....	195
3.2.2.5.2 Detección en tampón de la proteína S100A4 empleando como receptor el anticuerpo monoclonal 5C3 empleando la plataforma de sensado LSPR.....	196

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC), organismo de la Organización Mundial de la Salud¹ especializado en la lucha contra dicha enfermedad, ha publicado en el año 2014 un informe detallado basado en las últimas estadísticas sobre la incidencia del cáncer y sus tasas de mortalidad en todo el mundo. Este reporte pone de manifiesto que esta enfermedad está creciendo a un ritmo alarmante. En el 2012 la carga mundial de cáncer alcanzó los 14 millones de casos nuevos al año, una cifra que se prevé que aumente hasta las 22 millones anuales en las próximas décadas. Se subraya especialmente la necesidad de adoptar urgentemente estrategias eficaces de prevención para poner freno a la enfermedad.

En esta “guerra” contra el cáncer la estrategia más alentadora, está basada en la detección temprana de la enfermedad, donde se espera que los tratamientos hasta ahora encontrados puedan ser más eficaces. La alta sensibilidad que se requiere para esta detección precoz, hoy en día no se encuentra disponible muy a pesar de la alta tecnología desarrollada hasta el momento. De hecho, los diagnósticos actuales aún dependen principalmente de señales macroscópicas, que corresponden al tumor formado, compuesto de millones de células cancerígenas. Alternativamente se piensa que rastrear el cáncer a nivel molecular, monitoreando la presencia de marcadores que indican la presencia del cáncer en el cuerpo del paciente, permitirían conocer mejor el desarrollo de la enfermedad anticipando la no proliferación y el desarrollo del tumor en sí.

En este sentido, los últimos avances en nanotecnologías han llevado al desarrollo de nuevos esquemas de biosensores ultrasensibles, capaces de detectar una baja concentración de estas moléculas asociadas con la enfermedad. Estos tipos de sensores, consisten principalmente en dispositivos analíticos, que poseen integración entre el elemento de bioreconocimiento y el mecanismo de transducción, generando una gran sensibilidad de detección. Dentro de los posibles mecanismos de transducción, existe la resonancia plasmónica soportado en interfaces metal/dieléctrico, que muestra una alta sensibilidad a perturbaciones externas ocasionadas por cambios en el índice de refracción del medio. El elemento de bioreconocimiento está ubicado justo en la superficie del metal, proporcionando la selectividad y especificidad a la biomolécula/analito de interés.

El desarrollo de nanopartículas metálicas plasmónicas y su aplicación en biosensado ha alcanzado un gran potencial en este sentido, llegando al punto de enfocar las investigaciones más recientes y emplear gran cantidad de recursos en desarrollar los llamados sensores LSPR (del inglés Localized Surface Plasmon Resonance). Muchos sistemas de nanopartículas metálicas basadas en este fenómeno han sido desarrollados y estudiados en los últimos años, sin embargo muchos de ellos han sido propuestos como idea conceptual, algunos han mostrado algún potencial biosensorial significativo y otros pocos aplicados directamente como biosensores. Los esfuerzos científicos a nivel mundial van dirigidos en esta línea, el alcanzar un sistema altamente sensible que combinado con otros aspectos relevantes como

¹www.who.int

miniaturización, detección libre de marcaje, paralelización, fácil operación y manejo analítico, reusabilidad, bajo coste de fabricación, baja relación señal-ruido, reproducibilidad, entre otros, permitan obtener plataformas basadas en biosensores LSPR altamente aplicables en la detección de moléculas de interés no sólo relevantes en el área de la oncología sino en diversas áreas e industrias que requieren estas condiciones para mejorar sustancialmente sus productos y/o procesos.

Hoy en día son muy pocas las investigaciones en esta línea que han terminado finalmente en un dispositivo de biosensado LSPR útil para aplicaciones reales (por ejemplo, Lambdagen Corporation, USA). Además, características como bajo consumo de muestra, paralelización de los procesos e integración con otras tecnologías como la microfluídica, no son por ahora alcanzadas por estas plataformas. En este particular, todas las ventajas que la integración con la tecnología microfluídica ofrece, representan una mejora notable en aplicaciones más específicas (centros de investigaciones biotecnológicas, compañías farmacéuticas, laboratorios analíticos, instituciones médicas, etc.) y un gran avance en la búsqueda de dispositivos de análisis de diagnóstico inmediato (conocidos como Point-of-Care POC). Aunque todavía no desplazan los laboratorios bioquímicos comunes, se espera que estos dispositivos puedan reducir los costos de los ensayos sustancialmente, ampliando enormemente las posibilidades de diagnóstico precoz y con ello de un tratamiento más eficaz de las enfermedades, especialmente en el área de la oncología.

Una combinación entre el alto potencial y sensibilidad mostrada por los sistemas de biosensores LSPR, un sistema óptico sensible robusto e integrado, una plataforma microfluídica que garantice un bajo consumo de muestra, que sea biológicamente compatible con posibilidades de automatización y control de los procesos, una posibilidad de paralelización, y finalmente, una química de funcionalización altamente específica, selectiva y reproducible, constituyen los pilares fundamentales de un proyecto de desarrollo tecnológico ambicioso e innovador que representaría una herramienta fundamental en el diagnóstico precoz de enfermedades, especialmente a cáncer, siendo igualmente aplicable en diversas áreas que impliquen detección ultrasensible.

En este contexto, nació el proyecto europeo SPEDOC (Surface Plasmon Early Detection of Circulating Heat Shock Proteins & Tumor Cells), una iniciativa multidisciplinaria que combina a expertos en fotónica y oncología, con el objetivo fundamental de desarrollar una plataforma de sensado ultrasensible e innovadora para la detección precoz de proteínas asociadas directamente con el cáncer como las Proteínas de choque térmico (HSP), así como también de la monitorización precisa de ciertos tratamientos para erradicar finalmente la enfermedad.

Esta tesis doctoral, se inscribe dentro del marco de este proyecto, donde se presenta la validación del dispositivo optofluídico final desarrollado. Este dispositivo está conformado por biosensores LSPR, altamente sensibles y reproducibles, integrados en una plataforma microfluídica que posee una tecnología y diseño de microválvulas que permiten controlar y direccionar los reactivos a dichos sensores permitiendo asimismo operar con muy pocos volúmenes de muestra (en el orden de pL) así como realizar ensayos paralelos de un mismo analito con posibilidad de multidetección. Todo esto, bajo un sistema óptico integrado,

operado en transmisión, que permite monitorizar y procesar rápidamente señales de detección en tiempo real y con una alta confiabilidad. La descripción del manejo de la plataforma, protocolos de elaboración y funcionamiento son descritos en detalle.

Por otro lado, el proceso de biofuncionalización de la superficie sensora representa un paso clave en el desarrollo del inmunosensor, ya que la calidad de la superficie de inmunoreconocimiento es decisiva en la especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad del mismo. Uno de los mayores retos en la fabricación final de nuestro dispositivo, consiste en conseguir llevar a cabo una eficiente inmovilización del anticuerpo, de manera que una vez unido a la superficie sensora, éste conserve su configuración funcional, y permita obtener un inmunosensor de alto rendimiento. Es precisamente en esta línea de trabajo en la que se ha basado esta tesis doctoral, cuyo objetivo fundamental es el estudio de las más óptimas estrategias en la funcionalización de los biosensores LSPR para la detección selectiva y específica de analitos en diversas matrices clínicas y, muy especialmente, en la puesta en marcha del dispositivo y su aplicabilidad en la detección de marcadores tumorales relevantes en oncología.

Se realizaron pruebas con diversas estrategias químicas para el anclaje del receptor, así como también determinaciones de la sensibilidad de los biosensores LSPR, primeramente con sistemas basados en la interacción (IgG/anti-IgG) para aplicarse finalmente a sistemas de marcadores tumorales tanto en matrices simples (tampón), como en matrices más complejas como el suero humano. Las curvas de calibrado fueron realizadas y el valor de la mínima concentración eficaz detectada (EC10) por el dispositivo fue calculado en cada caso y comparado con los reportados para cada sistema. Los resultados obtenidos con la plataforma fueron validados con ensayos tipo ELISA, así como también se empleó dicha técnica para realizar ensayos de interacción con los reactivos empleados en la plataforma de sensado LSPR.

El presente manuscrito está dividido en tres grandes capítulos:

El Capítulo 1 abarca los conceptos teóricos generales que se contemplan en la investigación. A su vez, está separado en tres bloques: uno dedicado a la bioquímica relacionada con biosensado, donde las definiciones de los protagonistas más importantes son presentadas y aspectos generales de inmunología son tratados, así como también todo lo relacionado con el escenario químico de los protocolos de funcionalización empleados. El segundo bloque engloba los aspectos teóricos generales relacionados con el área de la plasmónica y los fenómenos físicos involucrados, así como también el uso de nanoestructuras y su aplicación como sensores LSPR. Por último, tenemos el apartado donde se describe de manera general todo lo relacionado a los conceptos teóricos físicos que describen los microfluidos, así como también los dispositivos microfluídicos Lab-on-a-Chip y sus aplicaciones en diversas áreas de interés, destacando principalmente las ventajas que ofrecen cuando son empleados en biosensado.

Posteriormente, el Capítulo 2, describe la metodología empleada en la investigación. Se describe detalladamente los métodos de fabricación y el protocolo empleado para la obtención de los sensores nanoestructurados. Se describen las pruebas de determinación de

sensibilidad del sensor empleando medidas de índice de refracción y se evalúan diversos sistemas de nanoestructuras para la escogencia del biosensor final para ser integrado en la plataforma. Por otro lado, se describen los protocolos empleados en la elaboración de los chips de microfluídica y se muestran el diseño final del chip junto con una breve descripción de operación del mismo. Por último, se describe detalladamente los protocolos químicos empleados para la inmovilización del receptor basados principalmente en la interacción Biotina-STV y en la unión covalente del receptor mediante la reacción de activación EDC/NHS, así como también reacciones de conjugación que han sido empleadas de forma lateral en estos procesos. Los protocolos para los ensayos tipo ELISA realizados son descritos en detalle y se encontrará así mismo un apartado donde están detallados los materiales y reactivos empleados en toda la investigación.

El Capítulo 3 contempla, finalmente, todos los resultados obtenidos en los ensayos realizados durante esta tesis doctoral junto con las discusiones respectivas y conclusiones de los mismos. En un primer apartado presentamos la inmovilización del anticuerpo receptor empleando el protocolo basado en la interacción biotina-STV. El protocolo fue inicialmente testado empleando un sistema bien conocido y estable como lo es el sistema IgG/anti-IgG tanto en tampón como en suero humano y, posteriormente, realizamos ensayos preliminares en la detección de un sistema de marcador oncológico como lo es la proteína HSP70 (estos resultados están dentro del marco de un proyecto europeo llamado SPEDOC, que abarcó la primera etapa de investigación de esta tesis doctoral). En un segundo apartado presentamos todos los resultados relacionados con el segundo protocolo de funcionalización basado en la activación de grupos $-COOH$ depositados sobre el sensor empleando la reacción de activación EDC/NHS y su posterior reacción covalente con los grupos aminos terminales que poseen los receptores. Este anclaje fue evaluado primeramente en el sistema de IgG/anti-IgG y posteriormente fue estudiado y aplicado en profundidad para sistemas de marcadores tumorales, específicamente para la alfafetoproteína (AFP) y el antígeno específico de próstata (PSA) en matrices sencillas como tampón y más complejas como el suero humano. Para estos sistemas se evaluó el límite de detección con nuestra plataforma y se comparó con los valores normales de estas proteínas en sangre. Para ambos protocolos se muestran los resultados de validación empleando ELISA y diversos ensayos realizados para los diversos sistemas estudiados. Finalmente, en este capítulo se recogen resultados preliminares de otros sistemas reales estudiados bajo esta modalidad.

Finalmente, este trabajo doctoral concluye con la exposición de las conclusiones generales y las aportaciones más significativas y relevantes de esta investigación en el área de biosensado, así como las líneas de continuación, futuros ensayos y optimizaciones que han de ser realizadas para aumentar la madurez de la técnica.

Capítulo 1

Definiciones Generales

Capítulo 1

Definiciones Generales

CAPITULO 1

DEFINICIONES GENERALES

1.1 ASPECTOS GENERALES EN BIOSENSADO

1.1.1. DEFINICIÓN DE CONCEPTOS BÁSICOS EN EL BIORECONOCIMIENTO MOLECULAR

Los principales protagonistas de esta tesis doctoral son sin duda el biosensor, y más aún los inmunoensayos que se realizan en su superficie, que permitirán la detección específica y selectiva de especies moleculares en muy baja concentración. Es aquí donde se fundamenta la aplicabilidad de esta investigación, en el diagnóstico específico de marcadores tumorales relevantes en el área de oncología, asociados a diversos tipos de cáncer. Por esta razón, antes de definir en detalle algunos conceptos relacionados con el campo de los biosensores es importante definir algunas nociones y definiciones relacionadas con el área de la inmunología. A continuación, describiremos brevemente algunos de estos conceptos.

1.1.1.1 El Sistema Inmune

El sistema inmune o inmunológico como se le suele denominar, es aquel conjunto de estructuras y procesos biológicos en el interior de un organismo que lo protege contra agentes externos y/o enfermedades, identificando y matando células patógenas y cancerosas. Detecta una gran cantidad de agentes, desde virus hasta parásitos intestinales y necesita distinguirlos de las propias células y tejidos sanos del organismo para funcionar correctamente [Matzinger, 2002]. En el sistema inmune participan principalmente los leucocitos.

Los leucocitos (comúnmente llamados glóbulos blancos) son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son ejecutoras de la respuesta inmunitaria, interviniendo así en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos (antígenos). Se originan en la médula ósea y en el tejido linfático. Están conformados en su totalidad por linfocitos, células T, citoquinas, macrófagos y neutrófilos entre otros componentes que ayudan básicamente al correcto funcionamiento del sistema inmune.

Como se mencionó anteriormente, la función principal del sistema inmune es proteger frente a los organismos infecciosos y sus productos tóxicos. Este hecho supone el desarrollo de un poderoso sistema de mecanismos para localizar a los organismos extraños, virus o macromoléculas, para neutralizar a estos invasores y para eliminarlos del cuerpo. Además de las barreras físicas (piel, secreciones de las mucosas, pH ácido del estómago, enzimas proteolíticas, etc.), de gran importancia en la lucha frente a los antígenos, este control es llevado a cabo por proteínas y células que circulan por el organismo y está constituido por

diferentes mecanismos, que se pueden dividir en dos categorías principales: inmunidad natural e inmunidad adquirida.

La inmunidad natural o innata es la primera barrera inmunológica no específica frente a las infecciones a las que no se está inmunizado previamente [Ros y col, 2005]. Esta respuesta, se desencadena a los pocos minutos u horas de sufrir la agresión y está mediada fundamentalmente por células fagocíticas (macrófagos), células de citotoxicidad natural y los interferones. Cuando esta primera barrera falla, se produce la infección y comienza a desarrollarse la inmunidad adquirida. Los mecanismos inmunitarios relacionados con la inmunidad natural están ligados a mecanismos no específicos, es decir, no están producidos por la presencia de un antígeno determinado y no se mejora con exposiciones repetidas a los agentes extraños.

La inmunidad adquirida o adaptativa es el resultado de la respuesta inmune frente a una molécula o agente extraño (antígeno) y está mediada por células denominadas linfocitos, que sintetizan receptores de superficie celular y segregan proteínas denominadas anticuerpos [Pancer y Cooper, 2006]. Tras el proceso de captación y reconocimiento de los antígenos se ponen en marcha los mecanismos de presentación y activación de los linfocitos para la producción de anticuerpos. Es posible usar moléculas denominadas inmunógenos para inducir una respuesta adquirida. Los términos antígeno e inmunógeno se usan para describir diferentes propiedades de una molécula. La inmunogeneidad no es una propiedad intrínseca de una molécula, pero únicamente se define por su habilidad de inducir una respuesta adaptativa. La antigenicidad, tampoco es una propiedad intrínseca de una molécula, pero es definida por su habilidad de ser captada por un anticuerpo.

1.1.1.2 Antígeno

Un antígeno es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria. En líneas generales se podría definir como toda aquella sustancia que puede ser reconocida por el sistema inmunitario adquirido [Parham, 2009]. Normalmente, un antígeno suele ser una molécula ajena o tóxica para el organismo (por ejemplo, una proteína derivada de una bacteria) que, una vez dentro del cuerpo, atrae y se une con alta afinidad a un anticuerpo específico.

Para que un antígeno pueda ser reconocido por un anticuerpo es necesaria una complementariedad espacial. La zona donde el anticuerpo se une al antígeno recibe el nombre de epítopo o determinante antigénico, mientras que el área correspondiente de la molécula del anticuerpo es el parátopo (una analogía habitual para describir estas interacciones es el acoplamiento de una cerradura [epítopo] con su llave [parátopo])

Sin embargo, no toda sustancia extraña es capaz de estimular una respuesta inmunitaria. Para desencadenar la respuesta inmune es fundamental superar dos limitaciones fundamentales: Primero, las restricciones fisicoquímicas acerca del tipo de molécula participante y segundo, la

naturaleza de la sustancia exógena, que debe de ser tal que el organismo pueda reconocerla como sustancia extraña.

Los antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos. Esto incluye partes de bacterias (cápsula, pared celular, flagelos, fimbrias y toxinas), de virus y otros microorganismos. Los lípidos y ácidos nucleicos son antigénicos únicamente cuando se combinan con proteínas y/o polisacáridos, los antígenos no-microbianos exógenos (ajenos al individuo) pueden incluir polen, clara de huevo y proteínas de tejidos y órganos transplantados. Las vacunas son un ejemplo de antígenos en una forma inmunogénica; estos antígenos son intencionalmente administrados para inducir el fenómeno de memoria del sistema inmune adquirido hacia lo antígenos que invaden al receptor. En general las macromoléculas de estructura compleja (proteínas), son considerablemente mejores como antígenos que otros polímeros con subunidades idénticas que se repiten. Por esta razón, los lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, así como péptidos compuestos por un único aminoácido, son relativamente pobres como antígenos.

1.1.1.3 Anticuerpos

A finales del siglo XIX, Von Behring observó que los sueros de animales que habían padecido difteria contenían sustancias que neutralizaban el efecto de la toxina diftérica. A estas sustancias, que se caracterizaban por ser termolábiles y no dializables, se les denominó anticuerpos, debido a su capacidad de reconocer a las toxinas bacterianas. Los anticuerpos son glicoproteínas, cuyo peso molecular aproximado es de 150 KDa, producidas en respuesta a la presencia de una molécula extraña en el organismo. Son sintetizadas primariamente por las células plasmáticas (células de la estirpe de los linfocitos B), y circulan por la sangre y por la linfa donde se unen a los antígenos extraños. Tienen la capacidad de unirse de manera específica con el antígeno, y contribuyen a su destrucción o eliminación por medio de fagocitosis de los macrófagos.

Muchas de las características estructurales principales de los anticuerpos se pueden describir con mayor facilidad considerando como modelo los anticuerpos Inmunoglobulinas (Ig), los cuales contienen únicamente una unidad estructural en forma de “Y”, y además son las más abundantes en el suero. En 1937 Tiselius descubre la electroforesis y aplica este nuevo método al fraccionamiento de proteínas plasmáticas, identificando así los anticuerpos como las proteínas del suero que se desplazan más lentamente. Esta fracción recibió el nombre de g-globulina (gamma-globulinas), quedando así asociados temporalmente, los conceptos de anticuerpo y de g-globulina, como equivalentes. Posteriormente, se comprueba que no todos los anticuerpos migran electroforéticamente con las g-globulinas, sino que muchos de ellos lo hacen con las a y b globulinas [Galaktionov, 2004]. Se concluye entonces, que no todos los anticuerpos son gammaglobulinas, por lo que Hebermans propone el término de inmunoglobulinas para designar a todas las sustancias con capacidad de anticuerpo. Hoy se conocen cinco tipos de inmunoglobulinas: IgM, IgA, IgG, IgD e IgE, cada una de ellas con ciertas características distintas. Dado que las moléculas de anticuerpos son globulinas, se les suele llamar inmunoglobulinas (Ig), reuniéndose bajo esta denominación todas las proteínas que presentan actividad como anticuerpos, así como las que tienen estructura molecular

característica de estos últimos, pero a las que no se conoce actividad como anticuerpos. Ya que las inmunoglobulinas son proteínas, son excelentes antígenos cuando se inyectan a especies distintas a la de origen. Como consecuencia, se pueden preparar antisueños que reaccionan con las moléculas de inmunoglobulinas. Usando estos antisueños, es posible demostrar que las inmunoglobulinas inmunes son heterogéneas, y pueden clasificarse en distintos isotipos o clases [Litman y col, 1993]. Para simplificar en muchos estudios, se estudia específicamente las inmunoglobulinas provenientes del ratón, ya que sus propiedades son muy similares a las de otras especies.

La estructura básica de los anticuerpos se muestra en la Figura 1 y consiste en cuatro cadenas polipéptidas: dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, iguales entre sí y unidas por puentes disulfuros (región bisagra). Como en toda proteína, en cada cadena se distingue un extremo amino terminal (N-terminal) y un extremo carboxilo (C-terminal). La fracción N-terminal se caracteriza por secuencias variables, es decir, esta estructura que puede variar entre diferentes anticuerpos, mientras que el resto de la molécula posee una estructura relativamente constante.

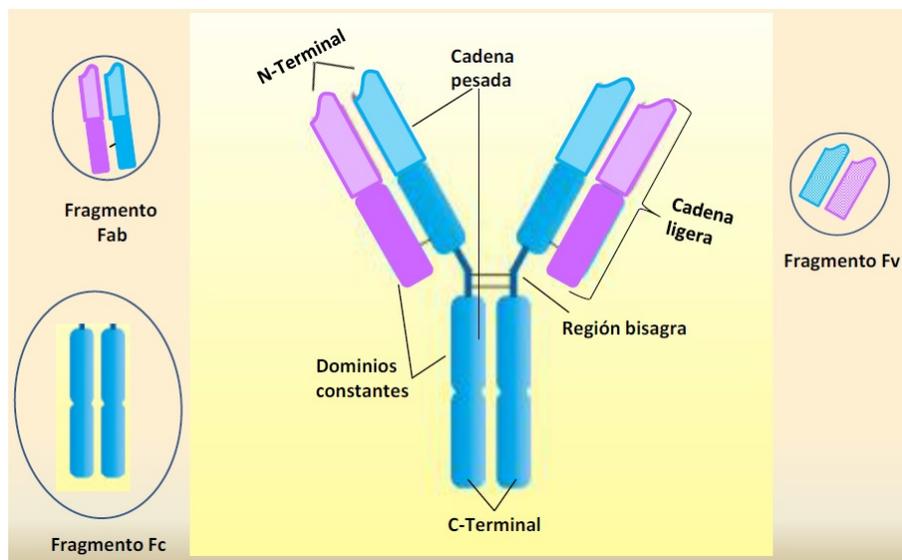


Figura 1. Esquema de la estructura de un anticuerpo, en el que se muestran los diferentes partes que lo constituyen.

La acción de enzimas proteolíticas, que descomponen las proteínas en fragmentos más pequeños, sobre los anticuerpos permite obtener distintos fragmentos:

- **Fc:** Corresponde al extremo C-terminal y está constituido por la región constante de las dos cadenas pesadas. El fragmento Fc es característico para cada clase de inmunoglobulina. De esta región, dependen ciertas funciones tales como la interacción con los receptores celulares de monocitos y macrófagos (responsables de la respuesta

inmunitaria celular) y la unión con ciertas proteínas tales como la proteína A de la bacteria *Staphylococcus aureus* y la proteína G de la bacteria *Streptococcus*.

- **Fab:** Corresponde al extremo N-terminal de una cadena pesada y de una ligera, unidas entre sí por puentes disulfuro. Tiene reconocimiento monovalente con respecto al antígeno.
- **Fv:** Corresponde al extremo N-terminal y está constituido por la región variable tanto de las cadenas pesadas como de las cadenas ligeras. Contienen a su vez la zona de enlace de un anticuerpo, denominada parátipo, la cual consta de residuos aminoácidos que interaccionan con la zona complementaria del antígeno (epítipo). La capacidad de reconocimiento de un anticuerpo por un antígeno radica en las diferentes conformaciones que puede asumir la región Fab, producidas como consecuencia de la variabilidad en las secuencias de sus cadenas proteicas.

Los epítipos de las moléculas de proteínas suelen contener de cuatro a seis aminoácidos, y se localizan en zonas expuestas o prominentes en la superficie de la molécula. En general, el número de epítipos de una molécula está en relación directa con su tamaño. Existe alrededor de un epítipo por cada 5.000 daltons. Los anticuerpos se fabrican sólo contra los epítipos, siendo por lo tanto la mayor parte de la proteína no antigénica.

Diferentes especies responden contra diferentes epítipos de la misma molécula. Los epítipos se seleccionan también por la manera en que el antígeno se presenta a las células sensibles a los mismos. Los epítipos difieren en el tipo de respuesta inmunitaria que estimulan. Algunos epítipos estimulan la formación de anticuerpos, otros las respuestas inmunitarias de tipo celular, y algunos provocan tolerancia estimulando a las células que suprimen la respuesta inmunitaria. En consecuencia, esta respuesta que estimula una molécula de gran tamaño es una mezcla compleja de respuestas. El resultado final depende de la naturaleza de todos los epítipos de la superficie de la molécula.

Por otro lado, La unión antígeno-anticuerpo se produce entre el epítipo y el fragmento Fv de las regiones variables de los anticuerpos. En general, los anticuerpos son altamente específicos, siendo capaces de discernir entre pequeñas variaciones del antígeno. La elevada afinidad entre el antígeno y el anticuerpo es debida a fuerzas de naturaleza no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals. La suma de estas fuerzas de atracción y repulsión se conoce como afinidad del anticuerpo por un antígeno [P.J. Conroy y col. 2009]. Con fines analíticos, cada antígeno requiere de la producción de un anticuerpo particular pudiéndose utilizar tanto anticuerpos policlonales como monoclonales

1.1.3.1.1 Anticuerpos Policlonales

La producción de anticuerpos es la culminación de una serie de interacciones entre los macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, los cuales reaccionan frente a la presencia de un

antígeno extraño. El producto final de esta respuesta es la producción de gran cantidad de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno, retirándolo inmediatamente de la circulación del organismo. Los anticuerpos policlonales son una mezcla de inmunoglobulinas producidos contra un antígeno específico cada una reconociendo diferentes epítomos. Normalmente, se obtienen de un antisuero que es el suero producido de manera convencional por un animal inmunizado, usualmente conejo, oveja o cabra. Se denominaron así porque contienen una mezcla compleja de anticuerpos dirigidos frente a una gama de determinantes antigénicos localizados sobre un determinado antígeno. La mayor ventaja del suero policlonal radica en su capacidad de formar gran cantidad de inmunocomplejos insolubles con el antígeno. Sin embargo, dado su escasa especificidad, el antisuero resulta pobre cuando se estudian determinantes antigénicos específicos y tiene ciertas limitaciones para su aplicación en inmunoensayos [Lipman y col, 2005].

Un antisuero es el producto de muchos clones de células y, en consecuencia, es heterogéneo a muchos niveles: en la clase y subclase (isotipos) del anticuerpo producido, su especificidad y afinidad. En un suero puede haber anticuerpos frente a unos cuantos antígenos (multiespecífico o poliespecífico), a algunos antígenos (oligospecífico) o a un antígeno simple (uniespecífico), pero incluso en el último caso el reactivo no es homogéneo. El significado de la heterogeneidad entre anticuerpos policlonales quiere decir en la práctica que cada producto es único en una composición de anticuerpos específica, y requieren ser analizados por separado para determinar su capacidad en cada inmunoensayo particular. Un suero normal sin purificar suele contener un 20-30% de inmunoglobulinas: esto reduce su eficiencia en muchos procesos. Por todo esto, los anticuerpos policlonales no pueden ser preparados o usados rutinariamente en ocasiones en las que se necesite especificidad para determinar estructuras y diferencias antigénicas entre moléculas a nivel de epítomos individuales.

El uso de antisueros policlonales para medir la IgG total está limitado por el hecho de que este antisuero puede no ser específico frente a las cuatro subclases, como resultado de la técnica usado para su preparación [Mazza y col, 1994b]. Esta teoría está apoyada por el hecho de que la cantidad total de IgG de cada suero, medida con un antisuero policlonal, es significativamente menor que el total obtenido por la suma de las subclases individuales medidas con anticuerpos específicos de cada subclase [Roitt, 1980].

1.1.3.1.2 Anticuerpos Monoclonales

Los problemas originados por el uso de los anticuerpos policlonales han sido superados desde que Kohler y Milstein, en 1975 [Kohler y Milstein, 1975], consiguieron la producción de anticuerpos monoespecíficos, conocidos como anticuerpos monoclonales. La producción de estos anticuerpos se basa en el hecho de que es posible fusionar linfocitos de bazo de ratones, adecuadamente inmunizados con un antígeno, con una línea celular de mieloma inmortal adaptada al cultivo celular. Este procedimiento genera diversos hibridomas, cada uno de los cuales tiene la capacidad de secretar anticuerpos frente a uno solo de los determinantes antigénicos. Así, la especificidad de las células B del bazo queda immortalizada tras la fusión

con las células de mieloma. Los hibridomas se seleccionan en busca de su unión con el antígeno mediante técnicas inmunológicas específicas y aquellos clones que resultan de interés son clonados para conseguir una línea celular estable capaz de crecer indefinidamente [Cambrosio y Keating, 1992].

El medio de cultivo celular en el que crecen estas células contiene grandes cantidades de anticuerpos monoclonales homogéneos (10 mg/ml). Sin embargo, existe la ventaja adicional de que las células del hibridoma pueden crecer como tumores ascíticos trasplantables en ratones histocompatibles, produciendo líquido ascítico con concentraciones muy altas del anticuerpo monoclonal (hasta 20 mg/ml). Es posible, por tanto, producir cantidades ilimitadas de anticuerpos específicos que reconozcan sólo a un determinante antigénico, incluso cuando el determinante antigénico presente en el inmunógeno sea débil o impuro.

El especial valor de los anticuerpos monoclonales radica en la capacidad de seleccionar una sola porción de un antígeno, que puede por tanto permitir la definición y separación de poblaciones celulares y el análisis de antígenos bacterianos. El uso de anticuerpos monoclonales simplifica muchos estudios de difícil solución con el uso de sueros policlonales, con lo que se puede incrementar la cantidad de moléculas disponibles para la investigación.

Con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales se ha abierto un amplio campo en la inmunología y la biología molecular en general, dadas sus características de:

- Unión específica al antígeno contra el cual han sido producidos.
- Homogeneidad.
- Habilidad para ser producidos en cantidades ilimitadas.

Desde su aparición, se han producido anticuerpos monoclonales frente a un amplio rango de epítomos. La producción de anticuerpos monoclonales permite el aislamiento de reactivos con una especificidad única y selectiva. Ya que todos los anticuerpos producidos por los descendientes de un hibridoma celular son idénticos, los anticuerpos monoclonales son reactivos poderosos para detectar la presencia de un epítomo determinado. Los hibridomas celulares proporcionan igualmente una fuente ilimitada de anticuerpos. Así mismo, se ha comprobado que los lotes de antisero pueden caducar. Los hibridomas superan este tipo de dificultades. Además, una ventaja única de la producción de hibridomas es que los antígenos impuros pueden usarse para producir anticuerpos específicos. Ya que los hibridomas son clonados antes de usarse, pueden producirse anticuerpos monoespecíficos después de inmunizar con mezclas complejas de antígenos. El uso más generalizado de los anticuerpos monoclonales se centra:

- 1.- En la caracterización y cuantificación de sustancias de interés biológico que se encuentran en cantidades muy pequeñas, tales como las hormonas, enzimas, interferones, etc.
- 2.- En la identificación de antígenos presentes en las membranas celulares. Esto ha permitido no solo la cuantificación de subpoblaciones celulares, sino también su fraccionamiento y aislamiento.
- 3.- Como agente terapéutico. Hasta 1994 sólo un anticuerpo monoclonal (anti-CD3(OKT3)) había sido autorizado para uso clínico. En los últimos años, la situación ha cambiado

drásticamente y ahora son los anticuerpos monoclonales el 25% de los productos sometidos a estudios clínicos [Glemmie & Johnson, 2000].

En años recientes, los anticuerpos monoclonales han sido la fuente preferida de anticuerpos para buena parte de la investigación inmunológica. Son absolutamente específicos para los epítomos individuales, y puede disponerse de ellos en grandes cantidades. Debido a su pureza, actúan como reactivos químicos estandarizados. Están siendo incorporados cada vez en mayor medida a las técnicas de diagnóstico clínico, en las cuales se necesitan grandes cantidades de anticuerpos de gran calidad.

Paulatinamente, los anticuerpos monoclonales van sustituyendo a los antiseros convencionales en base a las ventajas que su uso conlleva y en que pueden producirse industrialmente. En ésta panorámica general de la utilización de los anticuerpos monoclonales asistimos hoy a una impresionante dispersión hacia otros muchos campos. Esto permite vislumbrar horizontes esperanzadores de una técnica que, en principio, surgió simplemente de la pretensión de desvelar la organización y expresión génica de las inmunoglobulinas, y que acabó constituyendo un verdadero hito en la historia de la medicina y las ciencias biológicas.

1.1.1.4 Marcadores tumorales

Según la sociedad Americana de Cáncer (American Cancer Society) cáncer es un término que se utiliza como nombre general para un grupo de más de 100 enfermedades. Aunque existen muchos tipos de cáncer, todos tienen en común que son el resultado de la transformación genética y fenotípica de la célula normal. El cáncer se origina cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer sin control. El crecimiento de las células cancerosas es diferente al crecimiento de las células normales. En lugar de morir, las células cancerosas continúan creciendo y forman nuevas células anormales. Las células cancerosas pueden también invadir o propagarse a otros tejidos, algo que las células normales no pueden hacer. El hecho de que crezcan sin control e invadan otros tejidos es lo que hace que una célula sea cancerosa. En este sentido, cualquier molécula que puede ser identificada con el proceso de transformación maligna, proliferación y metástasis de las células cancerosas puede, en última instancia, considerarse como marcador tumoral.

Los marcadores tumorales son sustancias que pueden encontrarse en el cuerpo de una persona con cáncer. En principio, un marcador tumoral siempre será encontrado en la sangre en cantidades mayores a la normal, cuando existe cierto tipo de cáncer. Algunos marcadores tumorales se encuentran en la sangre, otros se encuentran en la orina o en otros fluidos corporales y otros se encuentran en tumores y en otros tejidos. La mayoría de los marcadores tumorales son proteínas, pero algunos más recientes consisten de genes.

La determinación de marcadores tumorales séricos es importante para realizar una evaluación integral de los pacientes con cáncer. No existe un marcador totalmente sensible y específico. Sin embargo, son muy útiles en la detección, diagnóstico, pronóstico, valoración del

tratamiento y vigilancia de los pacientes con diferentes tipos de cáncer, ya que los niveles séricos se modifican de acuerdo al curso clínico de la enfermedad [Hayes, 2011].

Normalmente cuando se tiene algún indicio médico de que un paciente puede padecer algún tipo de cáncer se procede a realizar lo que se conoce como pruebas de detección. Estas pruebas básicamente consisten en extraer sangre del paciente y monitorear los niveles de estos marcadores tumorales asociados con el tipo de cáncer que se sospecha. En algunos casos dependiendo el tipo de cáncer será necesaria la realización de una biopsia. Hoy en día, la detección es hecha cuando ya el cáncer ha alcanzado niveles difíciles de controlar en el organismo, de allí la lucha en encontrar técnicas de detección temprana que ayuden a combatir la enfermedad. Por lo tanto, detección temprana consiste en encontrar cáncer en sus etapas muy iniciales, cuando es menos probable que se haya propagado y, por lo tanto, es más fácil de tratar. Muy pocos marcadores han logrado dar resultados satisfactorios en la detección temprana, debido en muchos casos no solo al marcador en sí sino a que las técnicas hoy en día empleadas para la detección de los mismos presentan ciertas limitaciones (poca sensibilidad para lograr detectarlos a muy bajas concentraciones, requerimiento de grandes volúmenes de muestra para los ensayos, tiempo del ensayo, etc.).

El valor clínico de un marcador tumoral depende de su utilidad clínica y de su especificidad y sensibilidad, pudiendo utilizarse no sólo en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, sino también como factor pronóstico. Sin embargo, la medición de los niveles de los marcadores tumorales por sí sola no es suficiente para realizar el diagnóstico de cáncer por las siguientes razones [Bigbee y Herberman, 2003]:

- El nivel de un marcador tumoral puede elevarse en personas con condiciones benignas.
- El nivel de un marcador tumoral no se eleva en todas las personas con cáncer, especialmente en las etapas tempranas de la enfermedad.
- Muchos marcadores tumorales no son específicos a un tipo particular de cáncer; el nivel de un marcador tumoral puede aumentar como consecuencia de más de un tipo de cáncer.

De este modo, el marcador tumoral ideal sería aquel que:

1. Sea fácil de determinar.
2. Cuya detección conlleve un bajo coste.
3. Sea altamente sensible y específico.

Hasta el momento actual, no existe ningún marcador tumoral con dichas características, sin embargo hay diversos marcadores tumorales séricos con sensibilidad y especificidad lo suficientemente altas como para ser utilizados con relativa confianza en la práctica clínica diaria (Ver Tabla 1)

No todos los marcadores tumorales se encuentran presentes en fluidos como la sangre y/o orina, algunos de ellos requieren una biopsia para poder ser detectados. En particular es de nuestro interés aquellos presentes en los fluidos corporales ya que facilitan el uso y desarrollo de plataformas viables y prometedoras que ayudarían a su detección temprana del cáncer asociado. A continuación se analizarán algunos aspectos generales de aquellos marcadores tumorales empleados en esta tesis doctoral.

Tabla 1. Lista de marcadores tumorales más conocidos y su utilidad clínica.

Marcador	Aplicaciones
Antígeno carcinoembrionario (CEA)	Cáncer de colon-recto, medular de tiroides, mama, pulmón, carcinomas mucinosos de ovario
Alfafetoproteína (AFP)	Carcinoma primitivo de hígado, germinales
Fracción libre de la subunidad beta de la hormona gonadotrófica coriónica (HCGB)	Germinales
Subunidad beta de la hormona gonadotrófica coriónica (HGcb)	Germinales, colorrectales
CA 15.3	Mama, ovario no mucinoso
CA 125	Ovario no mucinoso, endometrio, cérvix, pulmón
CA 19.9	Exocrinos de páncreas, mucinosos de ovario, colorrectal
CA 195	Exocrinos de páncreas, mucinosos de ovario, colorrectal
B72.4	Estómago, ovario, colorrectal
CA242	Exocrinos de páncreas, mucinosos de ovario, colorrectal
HER2/erbB2	Mama, ovario
Enolasa específica neuronal (NSE)	Microcíticos
Cyfra 21.1	Escamosos de pulmón
Beta-2 microglobulina	Hematológicos
Antígeno asociado al carcinoma escamoso (SCC)	Escamosos de cérvix
Fosfatasa ácida prostática (PAP)	Próstata
Antígeno prostático específico (PSA)	Próstata
Índice PSAlibre/PSA total	Próstata
Índice PSA en complejos/PSA total	Próstata
Antígeno polipéptido hístico (TPA)	Mama, pulmón
Antígeno polipéptido hístico específico	Mama, pulmón, ovario
Propéptido aminoterminal del procolágeno III (PIIINP)	Ovario

1.1.1.4.1. Antígeno prostático específico (PSA)

Es actualmente el auxiliar más importante para el estudio y seguimiento de los pacientes con carcinoma prostático. El PSA es una glicoproteína de 240 aminoácidos, de 340 KDa, es una proteasa de serina parecida a la calicreína y se codifica en el cromosoma 19, producida por las células de la glándula prostática, la cual sólo se encuentra en los hombres. Llega a la sangre por lesión de la membrana basal epitelial y difunden a la luz vascular de capilares y linfático y su vida media en plasma es de 2.2 a 3.2 días. Su peso molecular es de 28,435 y el 90% se encuentra en sangre, así como en el coágulo seminal, producto de la eyaculación. [Steven y col, 2003; Lilja, 2003].

El PSA es un marcador tumoral para el cáncer de próstata bien conocido. Es el único marcador tumoral usado para la detección de uno de los tipos de cáncer comunes, pero no se recomienda que sea utilizado como prueba rutinaria de detección en todos los hombres. El nivel de PSA en la sangre puede elevarse con el cáncer de la próstata, pero los niveles de PSA pueden verse afectados por otros factores también. Entre las causas de aumento del PSA se encuentran todas aquellas que causan destrucción celular prostática: carcinoma prostático, adenoma prostático, prostatitis, isquemia prostática, status pos-cistoscopia o pos-biopsia, o después de cualquier tipo de manipulación prostática. Los hombres con hiperplasia prostática benigna (BPH, por sus siglas en inglés), un crecimiento no canceroso de la próstata, a menudo presentan niveles elevados [Carter, 2004]. El nivel de PSA también tiende a ser más elevado en hombres de edad avanzada y en los que tienen alguna infección o inflamación en la próstata. También puede permanecer elevado durante uno o dos días tras la eyaculación.

El PSA se mide en nanogramos por mililitro (ng/mL). El intervalo de referencia de 0-4,0 ng/mL (valor de corte 4 ng/mL) es ampliamente utilizado para los valores normales del PSA total, definido por la compañía Hybritech empleando el suero de hombres sanos menores de 40 años de edad [Svatek y col, 2008]. La mayoría de los médicos considera que un nivel de PSA en la sangre menor a 4 ng/mL indica que el cáncer no es probable. Los niveles mayores a 10 ng/mL implican que el cáncer es probable. El rango entre cuatro y diez constituye una zona incierta. Los hombres con niveles de PSA en este rango incierto tienen una probabilidad de uno en cuatro de tener cáncer de próstata. Puede que se deba realizar una biopsia de próstata (extracción de muestras de tejido de la próstata) para un hombre cuyo nivel de PSA es superior a 4 ng/mL [Myrtle, 1989; Thompson y col, 2004].

Una prueba útil cuando el valor de PSA está en el rango incierto (entre 4 y 10 ng/mL) consiste en medir el PSA libre (o porcentaje de PSA libre o fPSA). El PSA está en la sangre en dos formas: parte se encuentra en conjunto con una proteína, mientras que otra parte se encuentra libre. La prueba del porcentaje de PSA libre es la proporción de la cantidad de PSA que circula libre, en comparación con el total del nivel de PSA. Un nivel menor de PSA libre indica que la probabilidad de tener cáncer de próstata es mayor, y que es probable que corresponda hacerse una biopsia [Catalona, 1997]. El uso de estos valores límite permite detectar la mayoría de los cánceres, y ayuda a evitar biopsias de la próstata innecesarias. La prueba de PSA es muy valiosa en monitorear la respuesta al tratamiento y para el seguimiento en hombres con cáncer de próstata. Después de la cirugía o de la radioterapia, el nivel del PSA

puede ser monitorizado para determinar si el tratamiento ha resultado exitoso. Los valores del PSA normalmente disminuyen a niveles muy bajos si el tratamiento extirpa o destruye todas las células prostáticas. Una elevación posterior del PSA puede significar que las células del cáncer de próstata han sobrevivido y el cáncer ha reaparecido.

Así mismo, una de las grandes limitantes en la detección de este marcador tumoral está asociada a las técnicas que se utilizan para detectarlo. Es muy importante que las medidas de PSA se realicen siempre con la misma técnica y, a ser posible, bajo las mismas condiciones, de este modo se asegura que las variaciones encontradas son debidas al proceso evolutivo del tumor y no son alteraciones técnicas. Esta limitación ha sido motivación para la búsqueda de una técnica y/o método que permita una detección universal de este marcador. Es aquí donde el mundo del biosensado juega un papel importante.

En este sentido, múltiples biosensores basados en diversos mecanismos de transducción, han sido empleados en la detección de marcadores, logrando sensibilidades y especificidades realmente competitivas con las técnicas hoy en día empleadas.

Tabla 2. Características de los inmunoensayos realizados con dispositivos comerciales para la detección de PSA total

	Hybritech Tandem-R ¹	Abbott MXI ²	Corning ACS-180 ²
Matriz	Suero	Suero	Suero
Volumen de muestra (uL)	50	150	100
Límite de detección (ng/ML)	0.1	0.1	0.2
Rango del ensayo (ng/mL)	0.1-100	0.1-100	0.2-200
Tiempo total del ensayo (horas)	3	3	3

Leyenda: ¹ Anticuerpos monoclonales en la captura y en la detección del PSA, ² Anticuerpos monoclonales en la captura y anticuerpo policlonal en la detección del PSA.

En los últimos años han estado disponibles en el mercado al menos 30 inmunoensayos diferentes para la detección de PSA. Los sistemas de determinación del PSA total pertenecientes a las empresas norteamericanas Hybritech, Abbott, Tosoh y Ciba-Corning han sido aprobados por la Agencia Reguladora de Drogas y Alimentos en EE.UU (FDA, siglas en inglés) para el seguimiento de pacientes con cáncer de próstata [Kawachi y col, 2007; Carroll y col, 2001; Murphy, 1995]. Así mismo, existen ensayos comerciales que se basan en un ELISA de doble anticuerpo no competitivo con un anticuerpo monoclonal en contacto con la fase sólida y anticuerpos policlonales como trazadores. Ejemplos de estos ensayos son el “Abbott IMx.RTM PSA Assay” (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) y el “ACSTM PSA Assay” (Ciba-Corning Diagnostics Corporation, East Walpole, Massachusetts, EE.UU.) [Wan y col, 2003]. Las

características de algunos de los inmunoensayos de PSA total disponibles comercialmente [Carroll y col 2001] se recogen en la Tabla 2.

1.1.1.4.2 Alfetoproteína (AFP)

La alfafetoproteína (AFP, siglas en inglés) puede ser útil para diagnosticar y guiar el tratamiento contra el cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular). Es una glicoproteína con un peso molecular de 65 kDa, sintetizada por las células del saco vitelino y por el hígado e intestino fetales; su función en el feto es similar a la de la albúmina del adulto, participando en la presión oncótica del suero y como transportador proteico. Su vida media plasmática es de 5.5 días [Mizejewski, 2001].

Los niveles normales de AFP generalmente son menores a 10 ng/mL [Ball y col, 1992]. El nivel más alto se encuentra en el plasma fetal (3 mg/mL) el cual se alcanza durante las semanas 12 a 14 de la gestación; a partir de la semana 16 el nivel sérico empieza a descender hasta llegar a valores de 8 ng/mL en los primeros años de vida [Bader y col, 2004].

Los niveles de AFP se incrementan significativamente en la mayoría de los pacientes con cáncer de hígado. Igualmente es elevada en hepatitis aguda y crónica, pero rara vez es superior a 100 ng/mL en estas enfermedades. Cifras de AFP entre 100 y 350 ng/mL sugieren carcinoma hepático y valores > 400 ng/mL generalmente confirman la neoplasia (cáncer). Los valores superiores a 600 ng/mL es un factor de mal pronóstico. Sin embargo, una persona con hepatitis crónica a menudo presenta niveles elevados de AFP. Para estas personas, un nivel de AFP por encima de 4,000 ng/mL indica una señal de cáncer de hígado. La AFP también es útil para dar seguimiento de la respuesta al tratamiento contra el cáncer de hígado. Si el cáncer es extirpado completamente mediante cirugía, el nivel de AFP deberá bajar a niveles normales. Si el nivel vuelve a subir, a menudo indica que el cáncer ha regresado.

El nivel de AFP también es más elevado en ciertos tumores de células germinales. Las células germinales son las que dan origen a los espermatozoides y a los óvulos. La mayoría se encuentra en los ovarios o los testículos, aunque las células germinales a menudo permanecen en otras partes del cuerpo. Los tumores de células germinales con altos niveles de AFP incluyen a algunos cánceres testiculares (aquellos que contienen células embrionarias y de seno endodérmico), ciertos tipos poco comunes de cáncer ovárico (tumor de saco vitelino o cáncer mixto de células germinales), al igual que algunos tumores de células germinales que se originan en el medio del pecho (tumores de las células germinales mediastinales) [Ruolahti y Seppälä, 1971]. Así mismo, la AFP se usa para monitorear la respuesta al tratamiento, pues los niveles elevados deberán bajar ante un tratamiento eficaz. Si el cáncer se ha eliminado debido al tratamiento, el nivel deberá normalizarse de nuevo. Posteriormente, cualquier aumento del nivel puede ser una señal de regreso del cáncer.

Al igual que el PSA, existen diversas técnicas para la determinación específica de esta proteína en suero humano, la mayoría de ellas están basadas en inmunoensayos tipo ELISA. Podríamos destacar una técnica en particular denominada UMELISA®AFP. Este ensayo se basa en un

análisis inmunoenzimático heterogéneo tipo sándwich, que utiliza como fase sólida tiras de ultramicro-ELISA (10 µL por pocillo) revestidas previamente con anticuerpos contra la AFP (anti-AFP), lo cual garantiza la especificidad del ensayo [Horn y col, 1981].

1.1.1.4.3 Antígeno Carcinoembrionario (CEA)

El CEA fue descrito por primera vez por Gold y Freedman en 1965 [Gold y Freedman, 1965a-b], como un antígeno asociado a los tumores del sistema intestinal. Fue caracterizado como una glicoproteína con un peso molecular de 200 kDa, de origen fetal, perteneciente a la super familia de las inmunoglobulinas. El CEA es un complejo proteína-polisacárido hallado en carcinomas de colon, tracto intestinal, páncreas, y en el hígado de fetos normales; también podemos encontrar este marcador con valores positivos en fumadores intensos, en la cirrosis y en otras enfermedades malignas como cáncer de mama, vejiga, ovarios y cérvix [Krupey y col, 1967; Lo Gerfo y col, 1971]. Se relaciona principalmente con cáncer de colon donde sus valores se encuentran entre 5 a 10 ng/mL. En la población sana, la concentración normal es menor a 5 ng/mL en un 99% de los individuos [Dykes y King, 1972]. Su determinación en el laboratorio está indicada en los siguientes casos:

- Detección de carcinomas del tracto digestivo.
- Detección de cáncer colorrectal. La sensibilidad varía dependiendo del estado y diferenciación del cáncer
- Detección de procesos malignos en páncreas, estómago, e intestino.
- Prueba pre-operatoria. Nos sirve de referencia en el seguimiento y pronóstico de la enfermedad.
- Prueba post-operatoria, después de 6 semanas de la cirugía, ya que una completa eliminación del mal produce valores normales del CEA.
- Seguimiento post-operatorio cada tres meses, ya que un aumento de más del 50% del valor de CEA indica recurrencia o metástasis.
- Puede ayudar en el diagnóstico de cáncer de mama asociado con el marcador CA 15-3.
- Se puede usar en la detección de adenocarcinomas de pulmón.

Por lo anterior, el CEA es un marcador de gran interés clínico en el seguimiento de muchos tipos de cáncer, muy utilizado en asociación con otros marcadores, principalmente en el seguimiento y pronóstico del cáncer colorectal.

Desde comienzo de los 70's (luego del conocimiento y aislamiento de la proteína y su asociación con el cáncer colorectal) se viene trabajando en la búsqueda de técnicas para el diagnóstico y detección de esta proteína en fluidos corporales [Martin y Martin, 1972; Gold y col, 1972; Egan y col, 1972]. En 1969 Thomson y colaboradores han desarrollado un radioinmunoensayo (RIA) para determinar los bajos niveles de CEA en la sangre, fluidos biológicos, tejidos sanos y en tejidos enfermos [Thomson y col, 1969]. El RIA permitió detectar niveles elevados de este marcador pero fue una prueba con poca especificidad, ya que se consideró originalmente que el CEA era específico de neoplasias del tracto digestivo, pero

también se encuentra aumentado en otros tumores malignos, y en algunas afecciones no malignas.

1.1.1.4.4 Proteínas de choque térmico

En biomedicina, ha habido mucha atención sobre el uso de la familia de proteínas de choque térmico (HSPs) como biomarcadores, para ayudar en el diagnóstico y tratamiento de varias enfermedades. Específicamente, se han asociado niveles elevados de HSPs con más de 200 tipos diferentes de cáncer, incluyendo cáncer de mama, endometrial, de ovario, oral, gástrico, de hígado, de páncreas, de pulmón y muchos más [Daniel y col, 2005]. Entre los biomarcadores disponibles actualmente, la HSP70 tiene una relativa importancia en esta tesis doctoral. La proteína de choque térmico 70 (HSP70) es un biomarcador importante relacionado con el estrés celular que está siendo de gran impacto en las aplicaciones de monitorización y/o diagnóstico en humanos. En general, HSP70 es una proteína que es producida a nivel celular en altos niveles, en respuesta a una estimulación de estrés externa. Garrido y colaboradores han demostrado recientemente que la formación de un tumor, el potencial metastático y la resistencia a las drogas quimioterapéuticas están relacionadas con la cantidad de HSP70 expresadas por las células de cáncer [Rerole y col, 2011]. Así mismo, estudios clínicos han demostrado recientemente que el HSP70 está expuesto en la región intratumoral y/o en el suero de pacientes con cáncer [Ireland y col, 2007].

Esto demuestra el potencial de las HSPs para ser usadas como marcadores universales en un diagnóstico temprano de la enfermedad. De hecho, ya ha sido aplicado en una variedad de cánceres, como el diagnóstico de cáncer de próstata usando niveles de suero de HSP70 [Abe y col, 2004]. La sobre-expresión de HSP70 también ha sido implicada en la metástasis y la resistencia a la quimioterapia en el cerebro [Brondani y col, 2004] y cáncer de mama [Vargas-Roig y col, 1998]. Esto significa que la cantidad de HSP70 puede ser usada para predecir los resultados en un tratamiento y así poder realizar a tiempo los ajustes necesarios, maximizando la efectividad del mismo. Añadiendo, el HSP70 ha estado altamente implicado como un indicador de la salud cardíaca, encontrando elevados niveles en corazones de pacientes con anginas inestables (un factor de riesgo conocido por el infarto miocárdial (ataque al corazón) [Valen y col, 2000; Thompson y col, 1998], y cardiomiopatía dilatada, la cual está conectada al fallo congestivo del corazón [Knowlton y col, 1998].

Por otro lado, el flujo sanguíneo sirve de medio de transporte de lo que se conoce como células tumorales circulantes o CTCs (Circulating Tumor Cells), las cuales se originan desde el tumor principal y se establecen en órganos secundarios a través de la metástasis (por ejemplo, el hígado, hueso y pulmones) [Braun y Naume, 2005]. La HSP70 se puede clasificar también como un marcador en la detección de las CTCs, y es importante por al menos dos razones: en primer lugar, la sobre-expresión de la HSP70 en el suero está asociada con muchos cánceres, y en segundo lugar, debido a que la expresión del HSP70 se genera en la membrana externa de las células cancerígenas y no en las normales, puede ser posible detectar las células circulantes del tumor en la sangre. Sin embargo, la cantidad de CTC en la sangre es muy baja y requiere un

método altamente sensitivo para poder analizar este marcador. Como consecuencia, los niveles de marcadores en esta fase generalmente están por debajo de los niveles del umbral de las técnicas estándar. Todo lo mencionado anteriormente, hace a la HSP70 un objetivo interesante para ser rastreado en un paciente, diagnosticando el cáncer y monitoreando su progreso. En este sentido, el grupo de Garrido ha seleccionado pequeños péptidos denominados aptámeros por su habilidad de interactuar e inhibir las propiedades protectoras del HSP70.

Tabla 3. Resumen de las especificaciones de los actuales biosensores empleados en la detección de HSP70.

Especificaciones	Valor
Límite de Detección	1ng/ml [Jason y Hamilton, 2007; Clark y Peck, 2009]
Resolución	1ng/ml [Jason y Hamilton, 2007; Clark y Peck, 2009]
Precisión	90% [Yager y col, 2008]
Rango dinámico	1 ng/mL – 50 ng/mL [Jason y Hamilton, 2007; Clark y Peck, 2009]
Reproducibilidad	+/- 10% [Jason y Hamilton, 2007; Clark y Peck, 2009]
Selectividad	Muy alta (para la detección directa en el suero) [Jason y Hamilton, 2007; Clark y Peck, 2009]
Volumen de muestra	<100µl [Tudos y col, 2001]
Tiempo de detección	30-60 minutos [Yager y col, 2008]
Coste	<\$10,000/instrumento (estimado), <\$5/prueba [Yager y col, 2008]
Tamaño	Portátil (tamaño laptop) [Yager y col, 2008]
Facilidad de uso	Entrenamiento técnico no necesario
Condiciones ambientales	de 4 a 25+°C [Chin y col, 2006]
Multiplexado	No empleado [Jason y Hamilton, 2007; Clark y Peck, 2009]
Tiempo de vida del dispositivo	1 año [Yager y col, 2008]

Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla con tamaños entre 70 y 100 nucleótidos capaces de reconocer de forma específica y con alta afinidad a varios tipos de moléculas diana mediante un plegamiento tridimensional de su cadena. Generalmente, son obtenidos mediante su selección desde genotecas de oligonucleótidos combinatoriales, mediante el método SELEX (de sus siglas en inglés: *Systematic Evolution of Ligands by*

Exponential Enrichment), que permitirá seleccionar aquel oligonucleótido que se une con más afinidad a la molécula diana. Ellos ofrecen beneficios únicos comparados con otros receptores naturales, como por ejemplo que se enlazan al receptor con gran afinidad y selectividad, son fáciles de usar empleando técnicas *in vitro*, y son estables y consistentes (con poca o ninguna variación de lote a lote). Estas características los hacen extremadamente atractivos como alternativas para los anticuerpos y péptidos en el uso de inmunoensayos, o bien como agentes de diagnóstico. Estos sistemas no son inmunogénicos o tóxicos por lo que su uso como agentes terapéuticos y de escaneo tiene también un gran potencial. Debido a su pequeño tamaño, estos péptidos son muy atractivos para la funcionalización de superficies, en particular en el caso de biosensores plasmónicos, ya que ayudan a preservar el área sensorial de la estructura (sensor).

Hoy en día existen sistemas que han podido detectar HSP70 bajo diferentes condiciones. En la Tabla 3 se resumen las características de los actuales sensores aplicados en la detección de HSP70. Los valores mostrados corresponden a diferentes investigaciones de la proteína para diferentes sistemas biológicos, así como también de datos recogidos en dispositivos de diagnóstico y POC (Point of care).

Aunque el HSP70 ha ganado mucha atención como un nuevo e importante biomarcador, los métodos usados para cuantificar y detectar esta proteína no están al nivel de las aplicaciones de diagnósticos requeridas. Los métodos mayormente utilizados para cuantificar la HSP70, incluye el análisis de ensayos ELISA y Western Blot, los cuales disponen de equipos especializados, reactivos y operadores para poder implementarlos. Debido a esto, uno de los objetivos de esta investigación está asociado a la implementación de una plataforma basada en resonancia plasmónica de superficie localizada (LSPR) de sensibilidad mejorada con la finalidad de la detección de HSP70 (junto con otros sistemas de proteínas) empleando como receptores aptámeros designados específicamente para el HSP70.

1.1.2 DEFINICION DE BIOSENSOR

Un biosensor se puede definir como un dispositivo compuesto por dos elementos fundamentales: un receptor biológico, seleccionado para interactuar específicamente con un analito aprovechando la especificidad de las interacciones biomoleculares, y un transductor o sensor, capaz de interpretar la reacción de reconocimiento biológico que produce el receptor y transformarla en una señal cuantificable [A. Sadana, 2002; Coulet, 1991] (Ver Figura 2). Por lo tanto, el material biológico es el que otorga la selectividad del biosensor, mientras que el transductor es el que da la sensibilidad. De ahí la importancia de seleccionar un transductor adecuado.

En general, un biosensor completo consta de 4 elementos: (1) el analito que se va a detectar, (2) la interface: que contiene los receptores/ligandos seleccionados para presentar una alta afinidad y especificidad por el analito, (3) el transductor: la parte física del dispositivo que convierte la interacción de unión en una señal cuantificable; y, finalmente, (4) el entorno que lo rodea.

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el analito y el receptor biológico. Como resultado de esta unión se produce la variación de una o varias propiedades físico-químicas (propiedades eléctricas, mecánicas, ópticas, térmicas, etc.) que detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del receptor biológico en una señal electrónica indicativa de la presencia del analito sometido a estudio que es proporcional a su concentración en la muestra. Por lo tanto, las etapas de funcionamiento de un biosensor son las siguientes:

- Interacción específica del analito de interés con el receptor inmovilizado sobre el transductor.
- Detección, por parte del transductor, de la variación de alguna propiedad física o química del sistema, provocada por la reacción de reconocimiento selectivo.
- Procesamiento de la señal y obtención de resultados.

En este sentido, un biosensor ideal necesita cumplir varios requisitos, incluyendo, alta reproducibilidad, sensibilidad y especificidad, que no requiera marcaje, que sea rápido (con monitorización en tiempo real de la señal analítica generada) que sea de bajo coste, que emplee pequeños volúmenes de reactivos y muestras, que permita realizar los ensayos en ambientes acuosos compatibles con sistemas biológicos, que sea versátil y, por último, que ofrezca la posibilidad de realizar ensayos paralelos con posibilidad de miniaturización del dispositivo. Por supuesto, todos estos requisitos no siempre son factibles, dependiendo en gran medida del tipo de biosensor y el analito que se desea detectar.

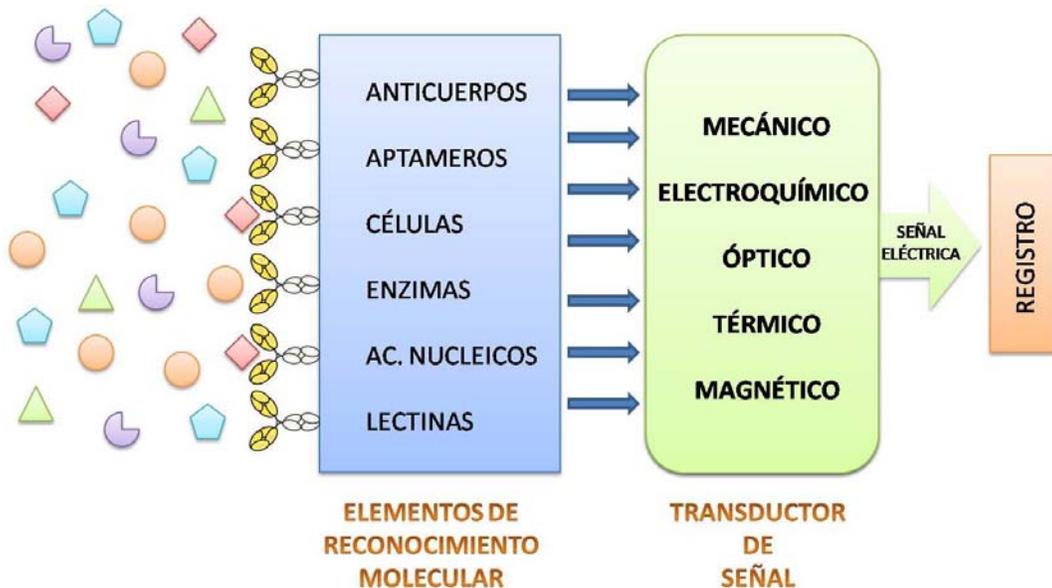


Figura 2. Componentes de un Biosensor.

Desde que en el año 1962 surgiera el primer concepto de biosensor, el analizador de glucosa desarrollado por Clark y Lyon [Clark y Lyon, 1962], el campo de investigación sobre biosensores

ha ido creciendo de una forma exponencial hasta convertirse en un área fundamental de trabajo. La selección de los materiales y técnicas de fabricación son determinantes para el adecuado funcionamiento de un biosensor. Por lo tanto, en la fabricación y desarrollo de biosensores se han de considerar diferentes aspectos que incluyen no solo los referidos a la elección del transductor y el bioreceptor, sino también al diseño de sistemas de fluidica, la química de inmovilización de biomoléculas en la superficie del sensor, el diseño y condiciones de los ensayos, y el análisis de los datos.

Por ello, es que el desarrollo de estos dispositivos va aparejado inevitablemente al avance tecnológico, a la investigación en nuevas moléculas de reconocimiento, a las modernas técnicas de inmovilización y a los progresos en los sistemas de transducción. Miniaturización y nanotecnología van ligados a todos estos avances así como a la investigación con los materiales de última generación. Este avance tecnológico del que hablamos ha hecho posible que el campo de los biosensores se extienda a un elevado número de sectores, como el medioambiental, agroalimentario, farmacéutico o incluso militar, aunque sin duda, el más beneficiado es el sector de la medicina. La rapidez en el análisis, los reducidos volúmenes de muestra, el alto grado de automatización y su carácter portátil y desechable, ha hecho de muchos biosensores indispensables en distintos lugares de atención médica, permitiendo disponer de pruebas de atención al paciente en el mismo momento del diagnóstico (POCT: point-of-care testing)[D’Orazio, 2003].

Teniendo en cuenta todas estas premisas, en este trabajo doctoral, se presenta el desarrollo de un biosensor libre de marcaje basado en nanoestructuras de oro funcionalizadas, el efecto de resonancia plasmónica localizada como mecanismo de transducción y una plataforma optofluídica que cumple con todos los requisitos anteriormente enumerados, y que ha permitido emplearlo en la detección altamente selectiva, sensible y específica de marcadores tumorales.

1.1.3 CLASIFICACIÓN DE BIOSENSORES

Son muchos los dispositivos biosensores que se han desarrollado y muy variados los mecanismos físico-químicos que se han empleado para transformar la interacción biológica en una señal cuantificable. Como elementos biológicos receptores se pueden emplear enzimas, anticuerpos, receptores proteicos, secuencias de oligonucleótidos, fragmentos subcelulares como mitocondrias, secciones de tejidos animales y vegetales y células completas, entre otros; y como transductor, dispositivos ópticos, electroquímicos y mecánicos principalmente[T.Vo-Dinh y B. Cullum, 2000]. La combinación de las diversas capas receptoras con los diferentes transductores puede dar lugar a una gran variedad de biosensores. Esto nos lleva a clasificar los biosensores bajo dos categorías: en función de los elementos biológicos de reconocimiento molecular y en función del sistema de transducción.

1.1.3.1 Clasificación de Biosensores en función del sistema de transducción

El transductor, en cuyas proximidades se encuentra inmovilizado el receptor biológico, debe permitir la conversión de la interacción del analito con el receptor en una señal cuantificable que estará relacionada con la concentración de ese analito.

Los mecanismos de transducción se suelen clasificar en dos categorías: transductores libre de marcajes y transductores marcados. Aquellos transductores que requiere un marcaje, se basan en la presencia de una molécula marcada o partícula, (por ejemplo, fluorescente, enzimática o radioactiva) y, por lo tanto, se clasifican como un método indirecto [Jokerst y col, 2009]. Este proceso de marcaje puede, en algunos casos, alterar la integridad de la molécula (especialmente crítico en el caso de biomoléculas), y, además, el proceso como tal en algunos casos es complejo de realizar, así como las mediciones *in situ* de las propiedades que ofrecen (como fluorescencia, luminiscencia, etc.) en determinadas condiciones como, por ejemplo, condiciones fluídicas. Por otro lado, la detección basada en biosensores libre de marcaje, se produce por la variación de una propiedad que puede ser de origen mecánico (por ejemplo, cambio en la masa), térmico, electroquímico u óptico (por ejemplo, la variación en el índice de refracción o frecuencia de resonancia).

Los sensores libres de marcaje ofrecen una serie de ventajas respecto a los que requieren marcaje, como son la baja relación señal/ruido que generan, el tiempo de respuesta más rápido, la simplicidad del diseño y la posibilidad de miniaturización, lo que ofrece un gran potencial para servir como plataforma para biosensores. Sin embargo, la selección del tipo de transductor empleado ha de ser importante ya que estas características pueden verse afectadas por otro tipo de parámetros como temperatura, pH, viscosidad, matriz de la muestra, etc. [Cheng y col, 2006]. A pesar de ello, muchos de los estudios que se han realizado recientemente en el campo de los biosensores se han enfocado principalmente en el desarrollo de sensores libres de marcaje.

Como se ha indicado anteriormente, existen varios tipos de transductores que pueden emplearse en la fabricación de biosensores, como transductores electroquímicos, ópticos, mecánicos (estáticos y dinámicos), térmicos y magnéticos. La utilización de un transductor u otro dependerá del propio receptor biológico empleado, de la naturaleza de la interacción entre éste y el analito y del mecanismo de señalización producido por el marcador utilizado si lo hubiere. En este trabajo se describirán ampliamente los transductores de tipo óptico, ya que fueron los empleados en esta tesis doctoral. No obstante, se realizará a continuación una breve descripción de los tipos de transductores más empleados hoy en día, enumerando algunos ejemplos concretos donde han sido aplicados como biosensores.

1.1.3.1.1. Transductores electroquímicos

Hoy en día existe una gran variedad de sistemas de biosensado basados en este tipo de transducción electroquímica [Grieshaber y col, 2008; Koncki, 2007]. El primer experimento que sirvió de origen a estos biosensores fue el biosensor para la determinación de glucosa, empleando electrodos de platino. La reducción de agua oxigenada en agua con la ayuda de un electrodo de platino polarizado a 0.6V ocasiona la aparición de una corriente medible que depende de la cantidad de glucosa presente [Wang, 2001]. La utilización de dispositivos electroquímicos como transductores para el desarrollo de biosensores es, probablemente, la más extendida de todas debido a una serie de importantes ventajas prácticas: a) las medidas electroquímicas pueden llevarse a cabo en volúmenes pequeños de muestra con relativa facilidad, esto hace que estos dispositivos sean especialmente adecuados para la monitorización "in vivo"; b) la señal obtenida es eléctrica y, por tanto, es factible la transducción directa de la velocidad de reacción en la señal de lectura; c) los límites de detección que se obtienen son suficientes y adecuados (en la mayoría de los casos lineales) para la detección de diversos analitos de interés; d) la relativa simplicidad, robustez, sus cortos tiempos de respuesta, bajo coste de la instrumentación electroquímica y la posibilidad de miniaturización permite una fácil disponibilidad de estos dispositivos [Pohanka y Skládal, 2008]. La metodología de trabajo más usual para la construcción de un biosensor electroquímico implica la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico (enzimas, tejidos, microorganismos, anticuerpos) sobre la superficie del transductor, que en este caso es un electrodo. La interacción receptor-analito ocasiona la variación de las propiedades eléctricas en la interfase entre la disolución y la superficie del electrodo (donde está depositado el analito). Basados en este principio podemos encontrar diferentes tipos de transductores electroquímicos: conductimétricos, potenciométricos y amperométricos.

Los biosensores amperométricos son los que han mostrado un mayor avance debido a su extensa aplicación dentro del campo del análisis médico. Los recientes avances en nanofabricación han permitido el uso de inmunosensores electroquímicos para la detección de marcadores tumorales en muestras clínicas reales, alcanzando límites de detección del orden de pg mL^{-1} altamente comparables con las técnicas comúnmente empleadas para la determinación de estas sustancias en sangre [Xiu y col, 2006]. El empleo de transductores electroquímicos es generalmente empleado por la sensibilidad que alcanza, sin embargo, esta sensibilidad debido a los avances tecnológicos que encontramos hoy en día puede ser mejorada empleando otros tipos de transductores. Una de las grandes desventajas de este tipo de transducción se basa en la limitación que existe con el uso de los electrodos. El empleo de electrodos muchas veces hace compleja la inmovilización de los receptores y limita en gran medida el poder realizar varias medidas con un único electrodo. Así mismo, el uso de sales que son necesarias para llevar a cabo las reacciones electroquímicas es un gran limitante. En el caso de muestras clínicas es bastante crítico este aspecto, donde un cambio en el pH así como el uso de tampones cuya concentración de sales no sea la idónea, puede afectar en gran medida el reconocimiento del analito a detectar.

1.1.3.1.2 Transductores mecánicos

Bajo esta denominación se incluyen los sistemas que detectan alteraciones de la respuesta mecánica de la superficie del transductor. Dichas alteraciones suelen corresponderse con mayor frecuencia con pequeños cambios de masa producidos sobre la superficie del sensor, aunque actualmente los transductores mecánicos también son capaces de detectar otras propiedades como la densidad y viscosidad de fluidos.

Los biosensores mecánicos son adecuados para detecciones muy sensibles, en el que la transducción se basa en cambios en la masa y/o deflexión. El medio principal del análisis de cambios en la masa, es mediante materiales piezoeléctricos que pueden hacerse vibrar a una frecuencia específica por medio de señal eléctrica. Cuando la superficie del material piezoeléctrico se recubre con un anticuerpo y se coloca en una solución que contiene patógenos, su unión da como resultado un aumento en la masa del sistema lo que provoca un desplazamiento de la frecuencia de resonancia. Este tipo de detección es fácil de usar, rentable, ofrece una detección libre de marcaje y proporciona un análisis con una mayor sensibilidad y especificidad en comparación con otros métodos. La detección de la respuesta mecánica puede hacerse de modo dinámico o de modo estático, permitiendo clasificar este tipo de transductores en dos tipos: mecánicos estáticos y mecánicos resonantes.

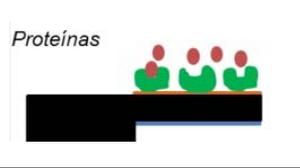
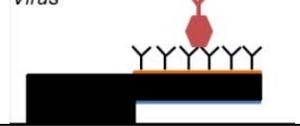
Uno de los transductores mecánicos más utilizados es el cantiléver, una estructura en voladizo anclada en uno de sus extremos. Los cantilevers pueden ser de diferente material, tamaño y configuración geométrica con el fin de que respondan a las necesidades concretas del uso al que estén destinados. En cuanto a los materiales usados, lo más común es utilizar silicio y algunos derivados como dióxido de silicio, nitruro de silicio como base y, en algunos casos, se colocan películas ultradelgadas de oro del orden de los nanómetros en la parte del cantilever donde se realizara la detección, con la finalidad de hacer activa la superficie y adherir el bioreceptor (proteínas, anticuerpos etc).

Los sensores basados en cantilevers han tenido un desarrollo y aplicación importantes en los últimos años. La gran relación de área superficial con respecto al volumen hace que estos sensores sean extremadamente sensibles a la superficie de detección [Dufour y col, 2010]. Los cantilevers se pueden utilizar como sensores mili, micro y nanomecánicos para la detección de moléculas, a través de interacciones electrostáticas o intermoleculares. Entre la superficie activa del cantilever y el medio donde se realiza la detección se puede registrar tensión, calor y masa, debido a interacciones fisicoquímicas. En general, uno de los elementos de unión se coloca sobre un cantilever mientras que el resto de elementos están presentes en el medio ambiente [Lang y col., 2005].

En la Tabla 4 se describen algunas aplicaciones de diversos cantilevers en el área de biosensado. Algunos biosensores han logrado registrar una detección del orden de los zeptogramos y se emplean ampliamente en el área médica y alimentaria. La caracterización de las fuerzas y la dinámica de las interacciones moleculares en este tipo de sensores ofrece una oportunidad para el desarrollo de plataformas de sensado con una alta sensibilidad,

miniaturizados y libres de marcaje [Fariña y col, 2011; Kim y col., 2009; Hwang y col, 2009; Calleja y col, 2005].

Tabla 4. Ejemplos de las aplicaciones de cantilevers en biosensado

Bioreceptores	Aplicación y Sensibilidad	Referencias
 <p>Microorganismos</p>	<p>Cantilevers rectangulares a partir de silicio con longitud de hasta 500µm. Se han empleado para la detección de <i>A. niger</i>, <i>S. cerevisiae</i>, <i>E. coli</i> funcionalizando la superficie del cantiléver con películas nutritivas o anticuerpos logrando una sensibilidad de hasta 50-140 pg/Hz</p>	<p>Campbell y col, 2007 Gfeller y col, 2005 Nugaeva y col, 2005</p>
 <p>Proteínas</p>	<p>Cantilevers triangulares (en forma de V) y rectangulares con longitud de hasta 300µm se han empleado para la detección de antígeno prostático específico con una sensibilidad de 10pg/mL; la detección de albumina sérica bovina se ha realizado con una sensibilidad de 10⁻⁷ g/µm²</p>	<p>Hwang y col, 2004 Burg y Manalis, 2003</p>
 <p>ADN</p>	<p>Cantilevers de silicio rectangulares con longitud de 30-50 µm se han utilizado para la detección de hepatitis B por medio de 243 pares de bases empleando tiol para la funcionalización de la superficie con ADN; la sensibilidad fue del orden de fM.</p>	<p>Cha y col, 2009 Zheng y col, 2011</p>
 <p>Virus</p>	<p>Cantilevers de silicio y metal con dimensiones mayores a 700 µm se han utilizado para detectar el virus del síndrome de las "manchas blancas" con una sensibilidad de 100viriones/mL.</p>	<p>Capobianco y col, 2010</p>

La funcionalización de la estructura en este tipo de biosensores juega un papel importante. El no control de las interacciones inespecíficas puede provocar una falsa señal de detección. En todos los casos descritos anteriormente la parte posterior del cantiléver fue bloqueada para evitar interacciones inespecíficas. Sin embargo, este proceso puede llegar a ser complicado y en muchos casos puede interferir con la química de superficie empleada para el anclaje del receptor biológico, perdiendo así la selectividad del dispositivo.

1.1.3.1.3 Transductores ópticos

Se utilizan transductores ópticos donde se mide las variaciones que se producen en las propiedades de la luz cuando tiene lugar una reacción de reconocimiento molecular sobre la superficie del transductor [Ligler, 2008]. El sistema básico de medida consiste en una fuente de luz, un transductor y el detector, y pueden utilizarse tanto bioreceptores catalíticos como de afinidad (los cuales describiremos más adelante). Este tipo de biosensores presenta grandes ventajas con respecto a los electroquímicos como, por ejemplo, un mayor nivel de sensibilidad, el no ser necesarios electrodos de referencia, la inmunidad ante interferencias eléctricas, su

menor tamaño y mayor versatilidad. Por estas razones, su uso se ha extendido en los últimos años, siendo en la actualidad los dispositivos biosensores más utilizados en la determinación de interacciones inmunológicas o de hibridación de secuencias de oligonucleótidos, por citar algunos ejemplos.

Los biosensores ópticos pueden dividirse en dos grandes grupos:

1.- *Bio-optopros*: En este grupo de biosensores se utiliza una guía de ondas (generalmente una fibra óptica) para conducir la luz al área sensora y esta es posteriormente recogida a su salida, tras interactuar con el complejo analito-bioreceptor [Wolfbeis, 1991]. Este último se localiza en la salida de la fibra, con lo que su unión al analito produce un cambio cuantificable en las propiedades ópticas del transductor (absorción, fluorescencia, índice de refracción, bioluminiscencia o dispersión). En este tipo de dispositivos, es necesaria la utilización de marcadores ópticamente activos como colorantes sensibles al pH o a la concentración de oxígeno, moléculas fluorescentes, moléculas bio- o químio-luminescentes. Este tipo de sensores se aplican preferiblemente en sistemas donde se requieren tiempos de respuesta cortos y una alta flexibilidad para su instalación.

2.- *Basados en campo evanescente*: estos biosensores hacen uso de la forma particular en que las ondas electromagnéticas se pueden confinar en determinados medios, dieléctricos o metálicos. En este tipo de biosensores la propiedad óptica más utilizada para detectar interacciones moleculares es el índice de refracción. En este grupo se incluyen los biosensores más numerosos, los cuales comparten dos características: la utilización de algún tipo de modo electromagnético guiado y el principio de detección de campo evanescente. Existen dos modos de guiar y confinar las ondas electromagnéticas: 1) mediante guías de onda convencionales, como es el caso de los interferómetros Mach-Zehnder [Lechuga y col, 2003] ó 2) en la interfase de un dieléctrico y un metal, como es el caso de los biosensores de resonancia de plasmón superficial (SPR siglas en inglés para Surface Plasmón Resonance) [Homola, 2008].

En ambos casos la luz se transmite por múltiples reflexiones internas a lo largo de la guía, que consiste en una capa de alto índice de refracción situada entre dos capas de materiales de menor índice de refracción. Aunque esta transmisión tiene lugar en condiciones de reflexión interna total, parte del campo electromagnético confinado en la guía se propaga en el medio que envuelve a la misma dando lugar a lo que se denomina onda evanescente. La longitud de penetración de la onda evanescente está comprendida entre 50-500 nm y ofrece una oportunidad única e ideal para medir cualquier reacción bioquímica que tenga lugar en su interior. Si se inmoviliza un receptor biológico sobre la guía de ondas y se expone esta superficie a una solución con el analito, la interacción biológica que tenga lugar modificará las propiedades ópticas de la luz (absorción, dispersión, índice de refracción, etc.), que serán detectadas por la onda evanescente. (Figura 3). La intensidad de la onda evanescente es máxima en la interfase, entre el núcleo de la guía y el medio adyacente, y decae exponencialmente con la distancia a la misma, por lo que la sensibilidad del sensor es máxima donde se inmoviliza el bioreceptor. Esta propiedad hace posible que solo pueda detectar cambios que se produzcan en la superficie de la guía, por lo que la interferencia de otras sustancias de la disolución es mínima. Esto hace que este tipo de dispositivos sean ideales para la detección de analitos mediante afinidad, ya que en ellos se minimiza la interferencia de

otras sustancias presentes en la muestra, sin que además sea necesaria la utilización de ningún tipo de marcador molecular [Homola, 2008].

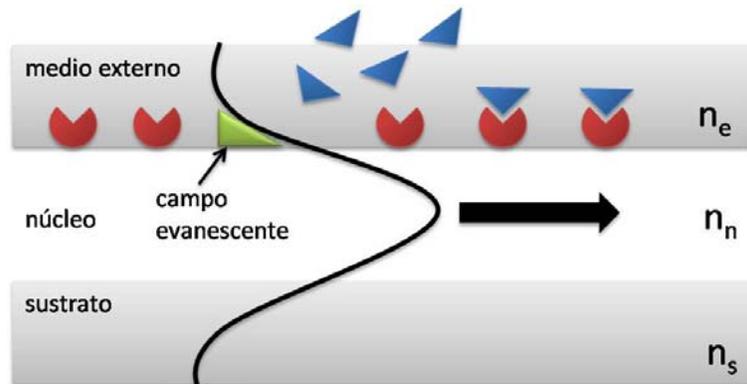


Figura 3. Representación del mecanismo de detección del biosensor óptico de onda evanescente.

Por ello, en las últimas dos décadas, los biosensores ópticos de campo evanescente se han convertido en herramientas indispensables para el análisis e identificación (en tiempo real y con un alto grado de sensibilidad y selectividad) de especies químicas o biológicas. Dentro del grupo de inmunosensores ópticos los basados en el fenómeno de SPR destacan por su simplicidad, sensibilidad y selectividad. La gran ventaja que presentan estos inmunosensores es que permiten una lectura directa (en la mayoría de los casos sin purificación previa) y en tiempo real de la interacción analito-anticuerpo, sin la intervención de ninguna otra molécula y por tanto de otra fuente de variabilidad, lo que simplifica las medidas en paralelo reduciendo el tiempo de análisis y aumentando la fiabilidad del mismo en comparación con la mayoría de técnicas inmunológicas que requieren del uso de moléculas marcadoras. A pesar del potencial que presentan estos dispositivos para su aplicación en el diagnóstico clínico, no existen muchas aplicaciones que midan analitos de interés clínico en muestras reales a niveles de concentración adecuados y de forma rápida, con los mínimos pasos de pretratamiento o sin amplificación de señal.

Como alternativa, se están desarrollando actualmente biosensores basados en el fenómeno de resonancia de plasmón en nanopartículas. En el caso de éstas, y debido a su pequeño tamaño, la oscilación de los electrones está muy localizada en ciertas zonas de las nanopartículas por lo que el fenómeno se denomina resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR). En este caso, la adsorción de bio-moléculas sobre las nanopartículas provoca cambios de color, que se pueden emplear para la detección. A pesar de que los límites de detección podrían ser similares que los obtenidos con los biosensores SPR, el sistema experimental es mucho más sencillo en LSPR, ya que se mide transmisión en lugar de reflexión y además se puede facilitar la miniaturización. En ambos casos, los dispositivos permiten portabilidad y requieren una cantidad de muestra relativamente baja (de micro a nanolitros) para hacer el análisis y ya se ha demostrado su utilidad en la detección de proteínas en el nivel nanomolar en muestras de

pacientes (orina, suero) sin necesidad de pretratarlas y sin necesidad de marcadores fluorescentes [Hill, 2015].

Debido a la importancia de estos biosensores en este trabajo de investigación hemos destinado un apartado para tratar los aspectos más significativos de ambos sistemas. Compararemos varios aspectos tanto teóricos como prácticos de ambos sistemas de transducción, así como también las ventajas y desventajas de cada uno en su aplicación como biosensores para la detección de biomoléculas, particularmente de marcadores tumorales. Así mismo, se desarrollará en detalle los conceptos físicos en los que se basa el fenómeno de SPR y LSPR, también las características y el funcionamiento de dispositivos conocidos (algunos ya comerciales) que utilizan esta metodología en pruebas de detección de analitos biológicos, particularmente en el área de la biomedicina.

1.1.3.2. Tipos de Biosensores según el tipo de elemento biológico que participa en el reconocimiento molecular.

Existe una clasificación de los biosensores basados en el tipo de especie biológica que interviene en el reconocimiento molecular. Esta clasificación se divide en dos clases: Biosensores Biocatalíticos y Biosensores de Afinidad. Los sensores biocatalíticos se basan en la utilización de receptores biológicos que actúan como catalizadores, es decir, mediando en una reacción química aumentando su velocidad. En dicha reacción intervienen uno o varios reactivos conocidos como sustratos donde actúan los biocatalizadores para generar uno o varios productos. Finalizado el proceso, el biocatalizador se regenera y puede ser nuevamente reutilizado. Estos biocatalizadores pueden ser enzimas inmovilizadas, orgánulos celulares y células completas. Pueden emplearse para detectar la desaparición de los sustratos que participan en la reacción o bien la generación de algún producto conocido y cuantificable.

Por otro lado, los sensores de bioafinidad se basan en la interacción del analito de interés con un receptor biológico, sin que haya transformación catalítica [Mello y Kubota, 2002]. Dado que en la interacción no se consumen reactivos ni se generan productos, como ocurre con los sensores catalíticos, en la mayor parte de este tipo de biosensores se recurre a la marcación del analito implicado en la interacción con el receptor o bien al de un elemento que compita con el analito por la unión al receptor. Como marcadores se utilizan elementos fluorescentes, nanopartículas o enzimas; con los que se asocia el mecanismo de detección. Uno de los inconvenientes de usar marcadores es que habitualmente se requieren pasos adicionales de purificación de las moléculas marcadas. Además, necesita de la adición de sustratos específicos de las enzimas que se utilizan como marcadores. Por ello, han surgido otros sistemas de transducción directa, sin necesidad de marcadores, basados en transductores mecánicos como los que se comentó anteriormente y, en particular, en los transductores ópticos en los que este trabajo de investigación se ha basado y desarrollado.

El parámetro que permite dar una expresión cuantitativa sobre el grado de afinidad entre el receptor biológico y el analito es la constante de afinidad, expresada en M^{-1} , es decir, litro/mol.

La afinidad es la medida de la fuerza de unión entre el receptor biológico y el analito, la cual depende de la naturaleza de las interacciones que tienen lugar entre dichas moléculas, como son las interacciones por puente de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e interacciones de carácter hidrofóbico, las cuales mencionamos anteriormente. Para cuantificar la interacción entre el receptor biológico y el analito de interés puede recurrirse a métodos directos o indirectos, competitivos y tipo sándwich. A este tipo de ensayos se les conoce como inmunoensayos, los cuales pueden verse en la Figura 4.

Los tipos de inmunoensayos se pueden clasificar como sigue:

- Inmunoensayo directo: medida directa de la interacción antígeno/anticuerpo sin necesidad de marcador.
- Inmunoensayo indirecto: requieren el uso de material marcado para medir la concentración de antígeno o anticuerpo presente.
- Inmunoensayo competitivo: en los formatos competitivos, el analito sin marcar (generalmente el antígeno) en la muestra se mide por su capacidad para competir con un antígeno marcado. El antígeno sin marcar bloquea la capacidad del antígeno marcado de unirse puesto que ese punto de unión en el anticuerpo ya se encuentra ocupado. Tanto el antígeno marcado como el antígeno que se encuentra sin marcar (analito de interés) compiten por una cantidad proporcional a la concentración de la señal.
- Inmunoensayo no competitivo o “sándwich”: Se trata de un ensayo muy empleado, en el que el antígeno queda retenido (como un sándwich) entre dos anticuerpos con especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

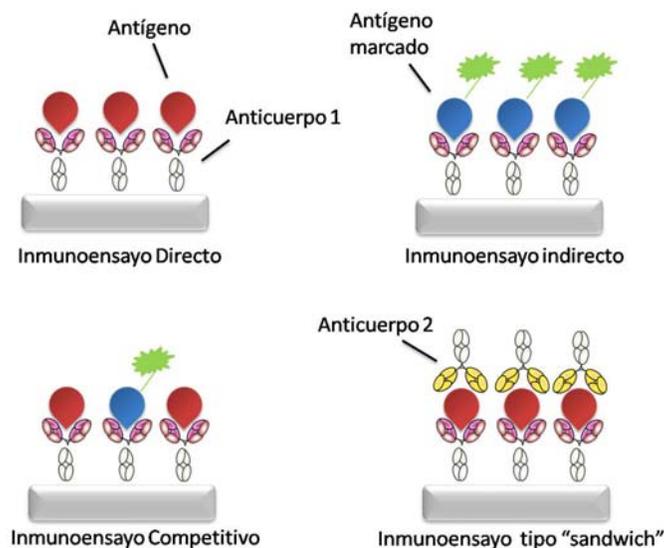


Figura 4. Diferentes tipos de inmunoensayos.

En la actualidad se emplean distintos tipos de reactivos de bioafinidad, como anticuerpos, receptores, canales iónicos, lectinas, ácidos nucleicos, aptámeros, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), y polímeros de impresión molecular (MIPs). Los anticuerpos, han sido quizás los componentes de los sensores de bioafinidad más utilizados en la tecnología de los biosensores, constituyendo de hecho un amplio grupo de diferentes dispositivos, conocidos como inmunosensores [D`Souza, 2001].

La regeneración del inmunosensor representa la etapa más limitante del empleo de los mismos, ya que condiciona su reutilización [Quinn y col, 1999]. Habitualmente, para conseguir selectividades y límites de detección adecuados, se requiere la formación de complejos antígeno-anticuerpo de elevada afinidad, cuya disociación suele ser complicada, lo que limita su utilización a un único uso. También es de suma importancia minimizar las interacciones no específicas que conducen a falsos positivos a través de procesos como la pasivación empleando agentes bloqueantes. Estos agentes ayudan a que las selectividades sean más controladas aumentando de esta manera los límites de detección de la biomolécula por parte del receptor biológico.

1.1.4 FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES SÓLIDAS EN BIOSENSORES

1.1.4.1 Materiales empleados para la inmovilización de los receptores biológicos en un biosensor.

Se ha observado que la naturaleza del soporte y, particularmente, la de su enlace con las biomoléculas son aspectos esenciales para determinar el rendimiento y la eficacia del biosensor. Por ello, existen numerosas líneas de investigación centradas en la obtención de materiales cuya modificación superficial sea reproducible, estable y biológicamente selectiva.

Generalmente, cada aplicación para una biomolécula concreta requiere una selección del soporte adecuado que ofrezca los mejores resultados para el ensayo. Para la elección del soporte utilizado en los procesos de inmovilización y estabilización de éstas es fundamental el análisis de sus propiedades. El desarrollo de nuevos materiales está basado en el hecho de que la superficie de los nuevos materiales posea ciertas propiedades [Wilson y Jourdain, 2007]: capacidad de la superficie para su funcionalización, selectividad hacia ciertas especies químicas, estabilidad química de dichas superficies a entornos químicos externos, incremento en la sensibilidad y estabilidad de la señal y biocompatibilidad del dispositivo final.

Uno de los materiales usados para este fin es el silicio. La razón de la creciente demanda que ha tenido el silicio hasta nuestros días no sólo es debida a sus propiedades electrónicas, sino también a sus excelentes propiedades mecánicas, químicas, térmicas y magnéticas. Debido a estas propiedades, hay un gran interés en su modificación superficial. En este sentido, ciertas moléculas orgánicas pueden enlazarse directamente sobre el silicio hidrogenado (Si-H), el cual evita la inminente oxidación que sufre el material. Otros grupos funcionales pueden reaccionar

con la superficie Si-H, tales como alquenos, alquinos, aldehídos, tioles y alcoholes [Hacker y col, 2007; Thissen y col, 2012].

Además de las propiedades semiconductoras del silicio, la razón principal que ha llevado al silicio a ser el material más utilizado para la fabricación de circuitos integrados es la habilidad de formar sobre él una capa de óxido estable, de buena calidad y con magníficas propiedades aislantes. El óxido de silicio es termodinámicamente un material muy estable, en comparación con otros como el nitruro de silicio. Las excepcionales propiedades eléctricas de la interfase Si/SiO₂ [Lamb, 1970] han hecho que muchos estudios se hayan centrado en la funcionalización de la capa de óxido de silicio nativa. Por otro lado, para aumentar el número de grupos –OH en la superficie, es habitual llevar a cabo una limpieza de la misma con reactivos químicos. Se han llevado a cabo numerosos estudios para obtener superficies de óxido de silicio funcionalizadas de forma estable y reproducible mediante el uso de la química de los silanos y fosfonatos [Pesek y Matyska, 1997; Midwood y col, 2004]. A pesar de la popularidad del proceso de funcionalización con silanos, la formación de la monocapa de silanos sobre este material, es muy sensible a varios factores como concentración de agua, temperatura y densidad de grupos –OH en la superficie. En el caso de los fosfonatos, su activación resulta más compleja [Vega y col, 2012], la formación de monocapas orgánicas sobre superficies es importante en áreas como la de los sistemas micro-eléctro-mecánicos (MEMS) [Maboudinan, 1998]. La superficie de óxido de silicio se ha utilizado como soporte para la inmovilización de enzimas [Subramanian y col, 1999], anticuerpos y proteínas [Zhan-Hui y Gang, 2004].

Otro material que se utiliza ampliamente en la inmovilización de biomoléculas son los polímeros. Los polímeros se producen por la unión de miles de moléculas pequeñas denominadas monómeros que forman enormes cadenas de las formas más diversas, de las cuales se derivan los plásticos, fibras, adhesivos y recubrimientos, entre otros. Tienen alta resistencia a la corrosión, alta flexibilidad en las estructuras y gran estabilidad. Estas propiedades hacen que puedan ser utilizados como soportes para la construcción de biosensores [Saftics y col, 2012]. La principal desventaja se debe a la pérdida de las características mecánicas y geométricas con la temperatura. El desarrollo científico y tecnológico que se ha generado en los últimos años ha dado lugar al desarrollo de polímeros con características especiales denominados polímeros conductores. A este tipo de polímeros se les conoce como materiales sintéticos y son capaces de producir corriente eléctrica. Deben su conductividad a propiedades intrínsecas del material o a modificaciones mediante el dopado de los mismos. Debido a su flexibilidad, resistencia, elasticidad y facilidad de producción se han convertido en un área de investigación de la microtecnología, así como en el campo de los biosensores [Emre y col, 2011].

En el campo del biosensado, los metales (en particular el oro) han sido los materiales por excelencia empleados como soporte para la inmovilización de biomoléculas debido a las ventajas que ofrece con respecto a los demás materiales. El oro, cuyo nombre en latín es aurum (brillante amanecer), es un metal muy denso, blando y de color amarillo intenso. Es un buen conductor del calor y de la electricidad. Posee una alta resistencia eléctrica y a la oxidación y es uno de los metales menos reactivos químicamente, inalterable por el aire, el calor, la humedad y la mayoría de los agentes químicos.

La superficie del oro limpia muestra una gran tendencia a la adsorción directa de las proteínas [Lavrik y col, 2004]. La fisorción de un receptor biológico (por ejemplo un anticuerpo) sobre superficies metálicas como el oro se emplea comúnmente como método de inmovilización, debido a su rapidez y simplicidad, ya que no requiere que la superficie sea modificada previamente y la unión sucede de forma directa a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Pero debido a la inespecificidad de la unión, ésta resulta débil, y por tanto, poco estable ante variaciones de pH, temperatura, fuerza iónica o ante la naturaleza química del microambiente, por lo que la pérdida de anticuerpo inmovilizado se produce con facilidad, disminuyendo considerablemente la reproducibilidad del inmunosensor. Por otro lado, el escaso control sobre el proceso de inmovilización que caracteriza a esta estrategia conduce a una orientación al azar del anticuerpo y a una probable formación de multicapas, lo que reduce no solo la reproducibilidad, sino también la sensibilidad final. Los problemas de la inmovilización mediante fisorción sobre estas superficies, se han visto superados con el desarrollo de la técnica basada en el autoensamblaje de moléculas alquílicas con un grupo tiol (-SH) en un extremo sobre la superficie de oro, el cual ha permitido inmovilizar anticuerpos de forma covalente. La formación espontánea de monocapas de moléculas tioladas, conocidas como SAM's (self assembled monolayers), está dirigida principalmente por la coordinación entre los tioles o disulfuros y el oro, acompañada de interacciones de Van der Waals entre las cadenas alquílicas [Ferreti y col, 2000; Ostuni y col, 1999]. Las SAMs de alcanotioles sobre oro presentan una fácil preparación, un ordenamiento muy definido y una relativa inactividad por parte del sustrato, lo que se traduce en una limpieza comparativamente fácil.

Un punto importante, es la facilidad para preparar películas de oro evaporadas y su bajo costo de fabricación. Éstas con un simple recocido (*flame annealing*) logran sustratos consistentes en cristales de oro de tamaño micrométrico preferentemente orientados en la dirección (111). La superficie en el plano (111) posee la energía superficial más baja y, por tal motivo, se ha convertido en la preferida para el crecimiento de películas delgadas de oro. De lo anterior, podemos entender el gran uso y popularidad en el campo de investigación de las SAMs.

Por otro lado, los efectos colectivos, superficiales y de confinamiento responsables de las propiedades y fenómenos únicos en los sistemas de baja dimensionalidad para este tipo de materiales metálicos (como se discutirá más adelante) han permitido el desarrollo y diseño de nuevos dispositivos y tecnologías, así como el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas y de diagnóstico [Daniel y Astruc, 2004]. Las nanopartículas metálicas son utilizadas hoy en día con fines de marcaje, diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer [Mateo y col, 2013]. Sin embargo, hace falta realizar más investigaciones sobre el campo de la nanotoxicología que involucre aspectos de citotoxicidad e impacto ambiental. En años recientes se han logrado algunos avances en este campo.

Investigadores han realizado estudios sobre la biocompatibilidad de nanopartículas de oro, plata y platino aplicadas a eritrocitos y células humanas [Asharani y col, 2010; Asharani y col, 2009]. En estos trabajos se concluye que los materiales que presentan una mayor biocompatibilidad son las nanopartículas de oro, mientras que las más citotóxicas fueron las nanopartículas de plata, causando lisis, hemaglutinación, daño de la membrana celular, distorsión del citoesqueleto y por ende afectación de la forma. La plata en su estado metálico

es inerte pero ésta reacciona con el agua provocando su ionización de manera inmediata, siendo su forma iónica altamente reactiva [Rai y col, 2008].

Por ende, la baja reactividad del oro lo convierte en el metal más inocuo para la salud humana siendo el material más utilizado en el área biomédica hoy en día. Así mismo, estos nanomateriales pueden recubrirse de un sinfín de moléculas y son una herramienta muy útil en la investigación de enfermedades muy específicas [Kean y Kean, 2008].

1.1.4.2. Modificación Química de superficies sólidas

Una forma de generar grupos reactivos sobre las superficies sólidas, es mediante la unión de moléculas orgánicas a la superficie. Dichas moléculas orgánicas, también conocidas como agentes de acoplamiento, pueden ser tioles y silanos entre otros, siendo estos los más utilizados en el campo de los biosensores. Blodgett fué el primero en emplear moléculas orgánicas sobre sustratos sólidos donde depositó ácidos carboxílicos de cadenas largas sobre sustratos metálicos [Blodgett, 1935; Blodgett, 1937]. El interés de estos estudios se centró principalmente en estudiar las propiedades macroscópicas tales como la tensión superficial y las propiedades de mojabilidad. Con el paso del tiempo y el desarrollo de nuevas herramientas, el panorama ha cambiado en relación a lo que interesa estudiar. Por ejemplo, las propiedades interesantes que exhiben desde el punto de vista de las aplicaciones en el campo de la Ciencia de los Materiales. Las propiedades de estas películas orgánicas se pueden alterar de manera selectiva al modificar sus grupos funcionales específicos. Por ejemplo, el cambio del grupo terminal CH_3 por un grupo OH cambia una superficie hidrofóbica en hidrofílica. Las moléculas auto-ensambladas (SAMs "Self Assembled Monolayers") crecidas desde solución o desde la fase gas, representan una clase de películas orgánicas delgadas. La característica que define este grupo es la quimisorción (o, generalmente, un tipo de interacción fuerte) debido a una afinidad específica con el sustrato.

Así mismo, dichas moléculas pueden: 1) terminar en el grupo de interés, ó 2) una vez depositadas, reaccionar con otro compuesto químico para dar lugar al grupo reactivo buscado. Estos reactivos actúan también como brazos espaciadores, evitando, por ejemplo, los cambios conformacionales que pueden sufrir las biomoléculas al ser inmovilizadas directamente a la superficie. Además, esta metodología permite la creación de una mayor diversidad de grupos funcionales sobre la superficie. En esta sección introduciremos algunos conceptos y propiedades fundamentales de las SAMs. Un énfasis especial será dado a las moléculas auto-ensambladas sobre un sustrato de oro específicamente a la química de los tioles sobre este metal.

1.1.4.2.1 El concepto de auto-ensamblado

Desde que la formación de las SAMs fue descrita por primera vez por Nuzzo y Allara en 1983, las monocapas de tioles sobre oro, especialmente alcanotioles, son el sistema autoorganizado más extensamente estudiado [Nuzzo y Allara, 1983]. Las SAMs corresponden a ensambles orgánicos formados por la adsorción de moléculas desde una solución (o una fase gas) sobre superficies sólidas; las moléculas adsorbidas se organizan espontáneamente dentro de sus estructuras cristalinas (o semicristalinas). Las SAMs tienen cierta funcionalidad química gracias a la cabeza de la cadena orgánica de las moléculas (en inglés *headgroup*, HG)[Delamarche y col, 1994]. En algunos casos, la HG posee una afinidad específica tan alta por la superficie, que es capaz de desplazar material orgánico adsorbido previamente sobre ésta. Hay un gran número de HG que se unen a metales específicos como el oro, óxidos metálicos [Love y col, 2005] y a semiconductores como el óxido de Silicio [Sagiv, 1980].

Algunas de las razones de por qué son tan estudiadas y atractivas hoy en día, tanto en el ambiente científico como tecnológico son:

1. El espesor de una SAM es típicamente de 1 a 3 *nm*; por lo tanto son la forma más elemental para una película orgánica de escala nanométrica sobre un material.
2. Los componentes moleculares de la SAM determinan la composición atómica de la SAM perpendicular a la superficie; esta característica hace posible que sean utilizadas en síntesis orgánica para ajustar estructuras organometálicas en la superficie con una aproximación controlada de posicionamiento de 0,1 *nm*.
3. Las SAMs pueden ser fabricadas dentro de patrones con dimensiones de 10-100 *nm*, en el plano de una superficie por medio de técnicas tales como de impresión de microcontacto (μ CP) [Xia y Whitesides, 1998; Michel y col, 2001], sondas de barrido [Liu y col, 2000; Kraemer y col, 2003; Ginger y col, 2004], haces de fotones [Shadnan y col, 2004; Klauser y col, 2003; Sung y col, 2002; Behm y col, 1996], electrones [Geyer y col, 2001] o átomos [Berggren y col, 1995; Chabynie y col, 2003].
4. Las aplicaciones posibles que pueden ser realizadas debido a estas características son innumerables, en especial en las áreas de nanociencia y nanotecnología, ya que (1) las monocapas son fáciles de preparar, por ejemplo por simple inmersión, (2) las monocapas se forman sobre objetos de todos los tamaños y son componentes críticos en algunos casos, para estabilizar e incorporar nuevas funciones logrando formar objetos con tamaños nanométricos, (por ejemplo películas delgadas, nanoalambres, coloides, entre otras nanoestructuras), (3) las monocapas pueden unir el medio externo a las propiedades electrónicas, electroquímicas (respuestas corriente voltaje) y ópticas (índice de refracción local, frecuencia de plasmones superficiales) de las estructuras metálicas y (4), las monocapas vinculan las estructuras de un nivel molecular a fenómenos interfaciales macroscópicos, tales como la humedad, adhesión y la fricción.

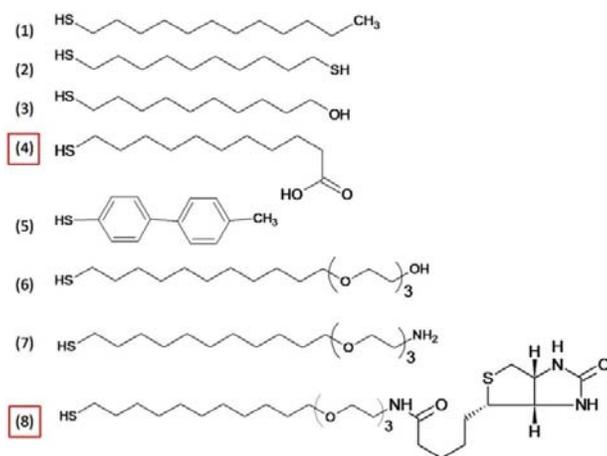


Figura 5. Tioles frecuentemente utilizados en la formación de SAMs sobre metales. [1]DDT (1-dodecanotiol), [2] DT(decanoditio),[3] 11-mercapto 1-undecanol, [4]MUA (Ácido 11-mercaptopundecanoico), [5] MMB(4-mercaptobifenil),[6] 2-[2-[2-(1-mercaptopundec-11-yloxy)-etoxy]-etoxy]-etanol, [7] hidrocloreuro de 2-[2-[2-(1-mercaptopundec-11-yloxy)-etoxy]-etoxy]-etilenammina, [8] N-(2-[2-[2-(2-[2-(1-mercaptopundec-11-yloxy)-etoxy]-etoxy)-etoxy]-etoxy]-etil) biotinamida. Las moléculas [4] y [8] fueron las empleadas para la preparación de SAM en la funcionalización de nanopartículas de oro en este trabajo de investigación.

Los tioles se emplean principalmente (como ya se mencionó) en la formación de capas auto-ensambladas sobre metales como el oro, pero también sobre Ag, Cu, Pt, Fe y Ni. Su fácil preparación y el bajo costo para depositar vía disolución, son las razones más importantes para la popularidad adquirida de las SAMs. Los sistemas más populares son los alcanotioles sobre Au(111) y el de las monocapas formadas por moléculas de organo-silanos sobre superficies hidroxiladas, que por cierto, no exhiben típicamente el mismo grado de ordenamiento de largo alcance que aquellas observadas en los alcanotioles. El sistema alcanotiol/Au(111) será utilizado como sistema modelo de las características de las SAMs sobre metales. Un ejemplo de algunos alcanotioles más usados en la formación de SAMs se muestra en la Figura 5.

En el caso de los alcanotioles, la estructura básica de estas moléculas es la siguiente:

Grupo “cabeza”: es la parte de la molécula que se enlaza químicamente al sustrato. En los alcanotioles este grupo es un tiol. La especificidad química de este grupo determina los sustratos sobre los cuales estos reactivos pueden depositarse (círculos naranjas de la Figura 6).

La cadena: en el caso de los alcanotioles, la cadena está formada por un alcano $(CH_2)_n$ y en algunos casos por grupos especiales que tienen una determinada función dependiendo de la aplicación que tenga la capa a formar (reducción de interacciones no específicas entre los elementos que conforman el medio, aumento de las interacciones entre la cadena, etc). En el caso de inmovilizar posteriormente una biomolécula, cuanto mayor es la longitud de esta cadena, menor será el cambio conformacional que sufra la biomolécula tras la inmovilización.

Grupo terminal: corresponde al grupo funcional en la superficie. Es el grupo que se encuentra al final de la cadena y define la interacción con el medio circundante (líquido, aire) o bien con la molécula receptora a inmovilizar (círculos púrpuras de la Figura 6).

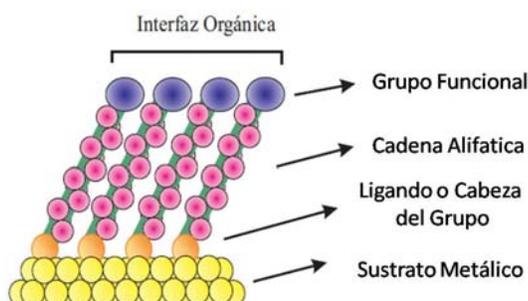


Figura 6. Componentes que integran un SAM. Los círculos naranjas corresponden al grupo cabeza que se enlaza con el sustrato y los círculos púrpuras corresponden al grupo funcional que interactuará con el medio circundante.

La energía relacionada con cada parte de la molécula posee un orden de magnitud distinto; 50 Kcal/mol para la interacción entre la cabeza de S y el sustrato (un enlace tiolato); 1 - 2 Kcal/mol por grupo metileno para las interacciones del tipo Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas; finalmente la energía relacionada con el grupo terminal es de unas pocas kT (Kelvin/s)[Ulman, 1996]. Sin embargo, los tres componentes de la molécula contribuyen a la estructura y a las propiedades físicas y químicas de las SAMs. Existe una gran controversia sobre la forma en la que los tioles se unen a las superficies metálicas. En general, se acepta que los tioles se adsorben sobre el oro como especies tiolato, según la siguiente reacción:



Hay evidencias por espectroscopía IR, Raman y XPS, entre otras [Ulman, 1996], de la ruptura de la unión S-H, aunque en realidad no se ha podido detectar la presencia de H_2 tras la unión del tiol a la superficie. No se conocen muchos detalles acerca del mecanismo involucrado en la reacción dada por la ecuación anterior. A pesar de que en general se acepta que las especies tiolatos son las que se adsorben, existen algunos estudios experimentales que sugieren que en realidad los tiolatos se adsorben a temperatura ambiente sobre la superficie del Au(111) como dímeros (disulfuros), en el caso de recubrimientos altos [Fenter y col, 1994; Yeganeh y col, 1995]. Sin embargo, no se ha podido encontrar más evidencias experimentales contundentes que respalden esta hipótesis.

El auto-ensamble del alcanotiolato sobre el oro es fácil de realizar y puede ser realizado tanto en fase gas como en disolución (empleando distintos solventes). En general, para la adsorción

del alcanotiol sobre oro se utilizan soluciones de tior con una concentración entre 10 - 1000 μM en diferentes solventes dependiendo de la naturaleza del tior. Los tiempos de adsorción pueden variar de 2 - 12 hs para tioles con cadena larga a mayores de 24 h para tioles con una cadena corta [Finklea, 2000]. Hay varios factores que afectan la calidad de la SAM. En el caso de SAM formadas en solución afecta la cristalinidad y rugosidad del sustrato oro (como también su limpieza previa), la naturaleza de la molécula adsorbida (el largo de la cadena hidrocarbonada, la funcionalidad del grupo terminal, etc.), la temperatura a la cual el tior es adsorbido, el disolvente utilizado (etanol, metanol, tolueno, hexano, agua, etc.), el tiempo de inmersión y la concentración del adsorbato, entre otros [Love y col, 2005; Finklea, 1996; Finklea, 2000]. Debido a los factores mencionados anteriormente, la idea de concebir una monocapa auto-ensamblada perfecta es complicada, debido a la existencia y poco control de estos factores. En la figura 6 se muestra un esquema general donde se visualizan las diferentes etapas que intervienen en la formación de un SAM sobre un sustrato de oro en fase líquida.

Tomando en cuenta lo complejo del proceso las investigaciones llevadas a cabo en este tema han permitido que la formación de SAMs sea ampliamente usada en funcionalización de superficies [Gooding y Hibbert, 1999]. Las SAMs se han utilizado ampliamente en el campo de los sensores, en la prevención de la corrosión, en la nanofabricación (especialmente en la tecnología de la información), para la construcción de nanodispositivos, para implantes médicos, y en farmacología, entre otros [Vericat y col, 2005]. En muchas de estas aplicaciones, las SAMs pueden ser consideradas como la interface entre materiales con propiedades fisicoquímicas totalmente diferentes: metales, semiconductores, u otros materiales inorgánicos, por un lado; y materiales orgánicos y biológicos (polímeros, biomoléculas, moléculas orgánicas simples, etc.), por otro lado.

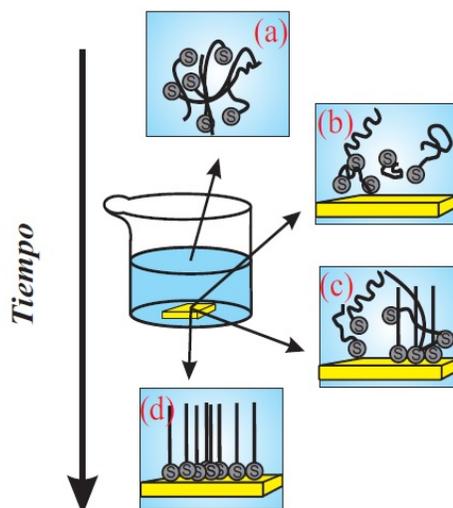


Figura 6. Esquema que muestra el auto-ensamblado de las moléculas de alcanotiol sobre un sustrato metálico de oro desde una solución líquida. (a) El alcanotiol en solución, (b) sustrato antes de la adsorción, (c) la primera etapa de adsorción. (d) formación de la SAM.

El amplio rango de aplicación de las SAMs, incluyendo a la biotecnología, se debe a la variedad de grupos terminales que se pueden anclar al sustrato. Esto hace que las SAMs permitan modificar las propiedades superficiales, formando la superficie inicial para construir estructuras más complejas. Una de ventajas de la utilización de SAMs es la posibilidad de generar una superficie con funcionalidad biológicamente relevante. La SAM puede exponer un grupo funcional específico, por ejemplo, se puede añadir un receptor, para unir específicamente una biomolécula de interés (Figura 7). Las capas auto-ensambladas de tioles se comportan como un microambiente celular permitiendo inmovilizar sobre ellas biomoléculas como anticuerpos, ácidos nucleicos, enzimas, etc. [Briand y col, 2006].

Algunas de las razones por las cuales las SAM's resultan útiles para biosensado son [Scheiber, 2004]:

(1) el concepto relativamente simple de unión específica con la SAM, sirviendo como ancla y generando rutas alternativas para añadir biomoléculas a superficies.

(2) la creación de superficies biológicamente "inertes" usando SAMs terminadas en OEG (oligoetilenglicol) o PEG (polietilenglicol), para así limitar la adsorción indeseada [Frederix y col, 2004; Silin y col, 1997]. Este aspecto es una gran ventaja ya que estos grupos debido a fuerzas electrostáticas reducen notablemente esta adsorción no específica que tanto afecta en las medidas de sensado, limitando aspectos importantes como la sensibilidad, reproducibilidad y especificidad del dispositivo sensor.

(3) posibilitar la adhesión de células a través de proteínas unidas a las SAM's, permitiendo así la manipulación de la estructura de las células.

(4) la biocompatibilidad de los sustratos de Au con las células de mamífero favorece su adherencia y funcionamiento sin evidencia de toxicidad (otros sustratos metálicos pueden generar especies tóxicas) [Love y col, 2005].

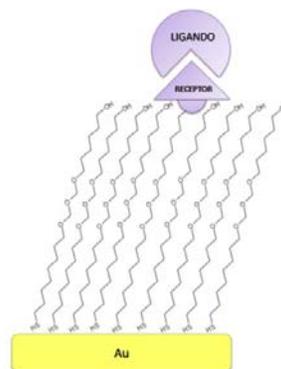


Figura 7. Ejemplo de biointerfase basada en SAMs, involucrando moléculas para adsorción específica de proteínas y adsorbatos para evitar la adsorción no específica (polietilenglicoles).

Una de las principales desventajas de la inmovilización de estas moléculas sobre superficies, radica en el hecho de que estas películas de tioles presentan una estabilidad limitada una vez formadas, así mismo, la buena formación de dichas capas está igualmente limitada con el tiempo que están en contacto con la superficie. Por ejemplo, un tiempo prolongado de contacto puede generar multicapas que afectan el posterior enlace con la biomolécula receptora.

1.1.5 INMOVILIZACION DE RECEPTORES BIOLÓGICOS EN SUPERFICIES SÓLIDAS FUNCIONALIZADAS.

Una etapa clave en la construcción de un biosensor es la inmovilización del receptor biológico sobre una superficie sólida, que puede ser directamente la superficie del transductor o bien una superficie o molécula enlazada a éste. Este material de base puede actuar únicamente como soporte de las biomoléculas o participar además en la generación de la señal analítica. Debido a la importancia que tiene este proceso, existen numerosas metodologías para la inmovilización de receptores biológicos que dependen fundamentalmente de los componentes del sistema empleado (soporte, sistema de transducción empleado, tipo de biomolécula que se quiere detectar, etc.) [Guisan, 2006; Hermanson, 1996; Cao, 2006]

El proceso de inmovilización puede definirse como la unión de moléculas a una superficie, resultando en una reducción o pérdida de movilidad de las mismas y, en algunas ocasiones, un cambio en su conformación. La inmovilización de especies biológicas tuvo comienzo en 1916 con el trabajo hecho por Nelson y Griffin [Nelson y Griffin, 1916], cuando inmovilizaron invertasa en carbón vegetal y alúmina. A partir de entonces, la inmovilización de especies biológicas ha tenido lugar en una gran variedad de soportes sólidos y se ha convertido en una tecnología ampliamente usada. Clark y Lyons en 1962 llevaron a cabo la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre la superficie de un electrodo con el objetivo de determinar la concentración de glucosa en lo que hoy en día se conoce como el primer biosensor [Clark y Lyons, 1962]. Posteriormente, también se ha llevado a cabo la inmovilización de biomoléculas para la determinación de muchas otras sustancias en el área de la bioquímica, como colesterol [Arya y col, 2008] y ácido láctico [Mo y Smart, 2004], en el análisis medioambiental [Rogers, 2006] y en el control de la calidad de alimentos [Mello y Kubota. 2002], entre otros.

El objetivo más importante de la técnica de inmovilización es mantener la actividad biológica y favorecer (o al menos no alterar) la cinética de la reacción biológica, ya que factores como la precisión y reproducibilidad de las medidas, así como el tiempo de vida del biosensor, van a estar en gran medida influenciadas por la estabilidad de las biomoléculas inmovilizadas. Otro factor a tener en cuenta es que no se produzca la desorción de las biomoléculas inmovilizadas durante el uso del biosensor.

En algunos casos, el proceso de inmovilización puede producir la pérdida parcial o completa de la actividad de las biomoléculas, debido a una orientación no correcta o bien a una alteración de la conformación de las mismas. Por ello, es muy importante la elección del método de

inmovilización, el cual debe ser seleccionado en función de las propiedades fisicoquímicas tanto del material sobre el que se va a llevar a cabo la inmovilización como de las biomoléculas. El soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del biosensor y ser biocompatible con las biomoléculas que se vayan a utilizar. Por lo que concierne a la biomolécula, hay que tener en cuenta sus propiedades físico-químicas: dimensiones, composición, dominios hidrofílicos e hidrofóbicos, así como también la composición química. También hay que considerar que, en determinadas circunstancias, el procedimiento de inmovilización más adecuado puede estar constituido por la combinación de varias estrategias de inmovilización. A pesar de que se han desarrollado metodologías para la detección de biomoléculas en fase homogénea, es decir, que no necesitan estar inmovilizadas para poder ser detectadas, gran parte de las técnicas biológicas comúnmente empleadas como ELISA o PCR, implican la inmovilización de las biomoléculas [Sassolas y col, 2012; Rusmini y col, 2007].

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas de inmovilización, las cuales están basadas principalmente en dos tipos: a) inmovilización covalente, que implica la formación de un enlace covalente estable entre la molécula a inmovilizar y el soporte y b) inmovilización no covalente que incluye la inmovilización por entrapamiento, por adsorción y por afinidad (ver Figura 8). Cada uno de estos métodos de inmovilización presenta una serie de ventajas e inconvenientes como se describirá posteriormente. La estrategia a seguir y la elección del método va a depender de las propiedades tanto de la superficie del transductor como de las biomoléculas a inmovilizar.

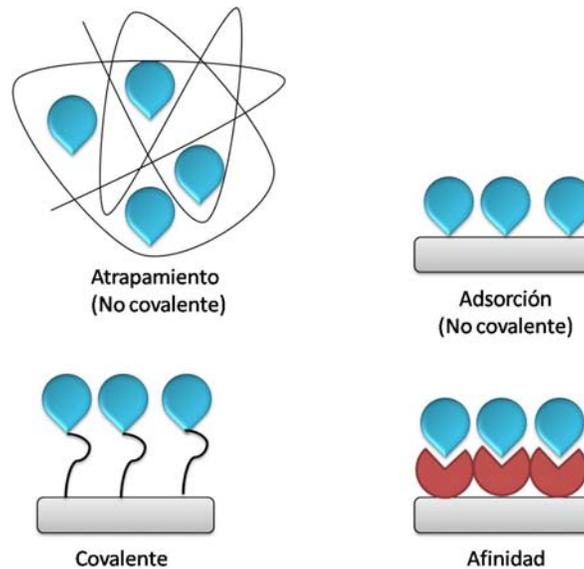


Figura 8. Esquema de los diferentes métodos de inmovilización de biomoléculas

1.1.5.1 Inmovilización no covalente del receptor biológico

Incluyen los métodos más simples, aunque es el tipo de inmovilización que no genera los mejores resultados, por ser poco selectivo. Consiste en la unión de las biomoléculas al soporte por mecanismos físicos y poco específicos. Las principales limitaciones de la inmovilización empleando mecanismos no covalentes radican en el reducido control de la cantidad inmovilizada y la orientación de la biomolécula sobre el soporte, conduciendo a una eficacia y reproducibilidad variables. Existen diversos tipos de inmovilizaciones no covalentes del receptor: por adsorción, por entrapamiento y por bioafinidad.

La inmovilización no covalente por adsorción implica la unión del elemento de reconocimiento mediante diferentes interacciones, tales como electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Representa el método más sencillo para la inmovilización de proteínas y otras biomoléculas, por lo que suele resultar la alternativa más simple de inmovilización. La ventaja de esta técnica reside en el hecho de que no requiere el empleo de ningún reactivo adicional por lo que se reduce el peligro de contaminación de la muestra y el coste global de la metodología. No obstante, presenta el inconveniente de su reversibilidad y variabilidad, que puede representar un problema cuando las condiciones de trabajo fluctúan (pH, temperatura, disolventes empleados, fuerza iónica, velocidad de flujo, etc.). A esto hay que añadir que tanto la orientación espacial de las moléculas inmovilizadas como la accesibilidad de los analitos a los lugares de unión de las mismas, se encuentran sometidas al azar.

Por otro lado, el método de inmovilización por atrapamiento se basa en la inmovilización de la molécula biológica en el interior de una membrana o matriz de polímero con el fin de impedir la pérdida de la proteína, permitiendo la entrada de los analitos y la salida de productos. Puesto que la biomolécula no se une a la membrana o matriz, el método se puede aplicar a cualquier tipo de biomolécula, sin pérdida apreciable de sus propiedades y escasa destrucción de su actividad biológica. Presenta la ventaja de preservar la configuración y actividad de las moléculas inmovilizadas, aunque introduce barreras de difusión que normalmente afectan a los tiempos de respuesta de los sensores. Entre los polímeros más empleados para el entrapamiento de compuestos biológicos destacan la poli(acrilamida), poli(alcohol vinílico) (PVA), cloruro de polivinilo (PVC), poliuretano (PU), colágeno, agar-agar, entre otros.

Para el caso de la inmovilización por bioafinidad, llamado también a veces captura biológica, consiste en la inmovilización del receptor biológico a la superficie como consecuencia de una interacción de reconocimiento específico entre dicho receptor y un agente de captura. Un caso particular sería la interacción antígeno/anticuerpo. Este método de inmovilización requiere la unión previa del agente de captura a la superficie, normalmente mediante un método covalente. El enlace entre el agente de captura y el receptor biológico posee una elevada fuerza de unión, siendo un enlace muy estable. Presenta las mayores ventajas en cuanto a la especificidad de la fijación, la reproducibilidad y uniformidad de la orientación de las biomoléculas sobre el soporte y la integridad estructural de aquellas. Además, se consigue una elevada densidad de receptores sobre la superficie. Uno de los más generales sistemas empleados en biosensado basados en la bioafinidad entre las especies es el sistema

biotina/avidina. Este sistema ofrece grandes ventajas debido a la gran afinidad de los elementos que lo integran. Debido a que en este estudio hemos utilizado este sistema como medio de interacción y anclaje entre el analito y receptor hemos dedicado el siguiente apartado para explicar los aspectos generales en lo que se basa esta unión.

Debido a la importancia que tiene la inmovilización no covalente por bioafinidad en nuestra investigación, a continuación describiremos brevemente la bioafinidad existente entre el sistema biotina-avidina que fundamenta uno de los protocolos de funcionalización desarrollados y aplicados sobre el biosensor para la detección de marcadores tumorales relevantes en oncología.

1.1.5.1.1. Unión biotina/avidina

En los últimos años, se ha mostrado un interés creciente en la interacción que se produce entre la avidina y la biotina y sus aplicaciones en el campo de sensado. Este complejo, debido a las características especiales que posee, constituye un medio analítico con grandes posibilidades de uso en la biología molecular, siendo ampliamente explotado en métodos de purificación y detección de proteínas y ácidos nucleicos. La alta afinidad que presenta, que lo hace un complejo muy estable, le confiere una alta sensibilidad y especificidad a los procedimientos en donde se usen, especialmente en las aplicaciones de biosensado y reconocimiento molecular. Es posible derivatizar la biotina con diferentes grupos funcionales como amino, carboxilo, tiol y fenol. Además, unida a una macromolécula puede mantener su afinidad por la avidina, proceso que se conoce como biotinilación. De este modo, hormonas biotinizadas, fagos, lectinas, anticuerpos y otras proteínas, pueden derivatizarse con esta metodología. Si la avidina es inmovilizada, o unida covalentemente a una sonda (por ejemplo, un isótopo radiactivo o una enzima) el complejo avidina-biotina puede ser usado para la localización y aislamiento de los componentes antes mencionados y/o de sus receptores.

El amplio uso del complejo avidina-biotina en estudios de bioafinidad, se debe a diversas razones [Fernández, 1985]:

1. Debido a que la biotina es significativamente pequeña (244.3 Daltons), puede unirse eficientemente tanto a ligandos pequeños como a macromoléculas en condiciones muy diferentes.
2. En la mayoría de los casos, las características y la actividad biológica de las proteínas biotinizadas, prácticamente no se afectan.
3. El complejo avidina-biotina es de una afinidad y estabilidad muy alta.
4. El uso de este sistema permite la realización de estudios cinéticos.
5. Tanto la avidina como la biotina son comercialmente rentables en grandes cantidades.
6. El complejo avidina-biotina es la interacción no-covalente más fuerte conocida hasta ahora entre un ligando y una proteína, con constantes de afinidad del orden de $K_d=10^{-15}$ M. (como referencia la afinidad entre antígeno-anticuerpo suele ser alrededor de $K_d=10^{-12}$ M).

7. La formación del enlace entre ambas especies es muy rápida y una vez formado no es fácilmente afectado por variaciones en pH, temperatura, solventes orgánicos y agentes desnaturizantes.

Aunque el sistema avidina-biotina es fácil de configurar y usar, tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, dado que la biotina es una molécula biológica, la biotina endógena puede provocar problemas de fondo y especificidad cuando se realizan ensayos con ciertos tejidos y extractos ricos en biotina (como por ejemplo, de cerebro, de hígado, leche, huevos, maíz). Esto también se aplica a las muestras que contienen proteínas ligadas a biotina endógenas tales como los huevos (fuente de avidina) o bacterias como *Streptomyces avidinii* (fuente de estreptavidina). El ácido valérico que contiene en su estructura (ver figura 9), se emplea comúnmente para incorporar la biotina como etiqueta en numerosas biomoléculas.

En técnicas de purificación, la fuerza de la interacción de unión entre biotina y avidina es un factor que limita su utilidad, debido a que se requieren condiciones extremas (como cambios severos de temperatura, uso de disolventes orgánicos y condiciones de pH extremos) para romper los enlaces avidina-biotina y, por lo tanto, poder disociar y eluir, pudiendo estas condiciones desnaturizar las proteínas purificadas. Para evitar esta desnaturización, se dispone comercialmente de resinas de avidina modificadas y reactivos conjugados a biotina que hacen que la interacción sea fácilmente reversible [Holmberg y col, 2005].

En el contexto de la inmunohistoquímica, la biotina es la molécula más usada para la conjugación de anticuerpos primarios y secundarios. El anticuerpo conjugado puede interactuar con una especie afín a la biotina (como la estreptavidina), que puede estar anclada a una superficie o bien a otra molécula de interés, lo que los hace una alternativa muy viable en la creación de ensayos biológicos altamente sensibles. Anticuerpos marcados con biotina y otras moléculas se encuentran fácilmente disponibles hoy en día de manera comercial, con la limitación que en algunos casos el costo es elevado. Sin embargo, hoy en día hay un desarrollo notable en la química de biotilación lo que permite unir de manera efectiva la biotina a diferentes moléculas y materiales de superficie y así lograr ensayos de tipo personalizado y de menor coste.

La avidina por el contrario es una proteína que se cree que sirve como antibiótico en huevos de aves, reptiles y anfibios. La avidina procedente de pollo, tiene una masa de 67.000-68.000 Daltons y es formada por cuatro sub-unidades de 128 aminoácidos, siendo estas unidades las que interactúan con la biotina. La avidina, formada por un 10% de carbohidratos y un punto isoelectrico en torno a 10-10.5, es altamente soluble en agua y en soluciones salinas acuosas. Debido a que la avidina se puede purificar fácilmente a partir de yemas de huevo de pollo, su producción es muy económica y fácil de llevar a cabo.

Como ya se mencionó anteriormente, la avidina tiene una alta afinidad por la biotina, pudiendo unirse a cuatro moléculas de biotina en unas condiciones de pH y temperatura bastante accesibles. La especificidad de esta interacción hace de esta unión una herramienta fundamental en la detección de sistemas biológicos con una excelente sensibilidad. Por otro lado, es importante resaltar que debido a la gran cantidad de carbohidratos y al punto

isoeléctrico que posee, presenta una adsorción no específica bastante elevada, por lo que requiere en la mayoría de los casos el uso de agentes bloqueantes así como procedimientos de lavado cuando se emplea en ensayos biológicos.

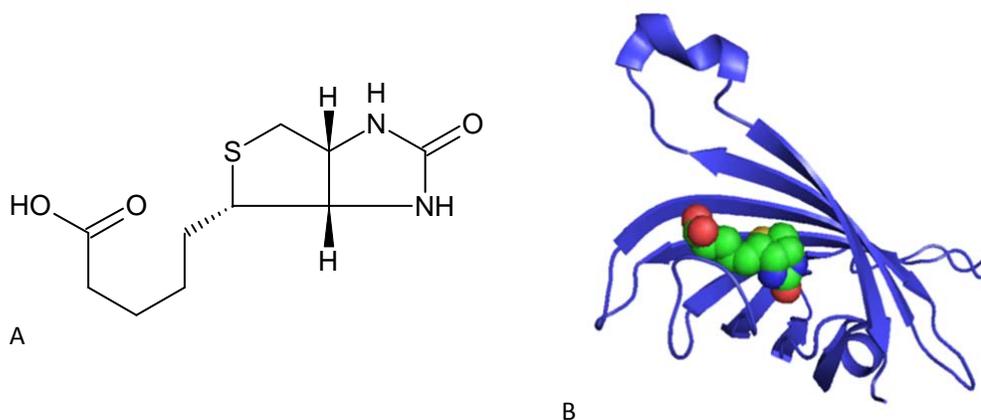


Figura 9. Estructuras químicas de A) Biotina y B) Estreptavidina monomérica enlazada a una unidad de biotina.

Por otro lado, existe una variación de la avidina, la estreptavidina. La estreptavidina es una proteína tetramérica altamente afín a la biotina, que es aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii* y tiene una masa de 60,000 Daltons. Su estructura es muy similar a la de la avidina (ver Figura 9), sin embargo no posee carbohidratos y su punto isoeléctrico es ácido ($pI = 5$), lo que hace que sea una molécula menos soluble que la avidina. Sin embargo, presenta altas constantes de afinidad para la biotina ($K_d = 10^{-14}$ a $10^{-15} M$). Estas propiedades hacen que sea altamente empleada en inmunoensayos, especialmente en la detección de sistemas biológicos, ya que posee un enlace no específico inferior a su equivalente avidina. En comparación con la avidina, su fabricación es más compleja y más costosa de producir. En la tabla 5, se muestran las propiedades de las proteínas comúnmente empleadas en la interacción con la biotina.

Tabla 5. Propiedades de proteínas con alta afinidad por la biotina.

	Avidina (Pollo)	Estreptavidina	Neutravidina (obtenida de avidina)
Peso molecular (kDa)	67	53	60
Sitios de enlace con biotina	4	4	4
Punto Isoeléctrico (pI)	10	6.8 - 7.5	6.3
Especificidad	baja	alta	Muy alta
Afinidad por Biotina (K_d)	$\sim 10^{-15} M$	$\sim 10^{-14}$ a $10^{-15} M$	$\sim 10^{-15} M$
Enlace no específico	alto	bajo	Muy bajo

La interacción estreptavidina-biotina es frecuentemente empleada en numerosos ensayos y métodos de laboratorio, siendo el más común la detección de proteínas. En general, ha sido un

ensayo que se ha empleado en varios sistemas de sensado en los últimos años, por los altos niveles de estabilidad y de sensibilidad que ha presentado, así como también en las condiciones relativamente sencillas de trabajo y lo compatible de los reactivos a las diversas plataformas de sensado hoy en día desarrolladas [Feuz y col, 2010; Jung y col, 2008]. En particular, se ha empleado esta metodología en este trabajo para la detección de proteínas, empleando anticuerpos que han sido modificados previamente con biotina.

1.1.5.2 Inmovilización Covalente del receptor biológico

El enlace covalente de basa en una reacción entre grupos reactivos de la biomolécula a inmovilizar (no importantes para la actividad biológica) y grupos reactivos de la superficie sólida. Por lo tanto, la inmovilización mediante enlace covalente requiere la presencia de grupos funcionales adecuados, tanto en el soporte como en la biomolécula [Williams y Blanch, 2011].

Las ventajas de la inmovilización covalente son: 1) La baja pérdida de material biológico, 2) la elevada estabilidad de la molécula y 3) la respuesta del biosensor suele ser más reproducible debido al mayor control que ofrece. Como desventajas se puede decir que es una técnica que usualmente requiere una activación previa del soporte sólido mediante procesos y/o reacciones a menudo complicadas y laboriosas; además en la mayoría de los casos no garantiza una correcta orientación de las moléculas biológicas.

En el caso de las biomoléculas receptoras, es necesario que posean grupos funcionales activos para las reacciones covalentes que se han de producir sobre la superficie funcionalizada. En la mayoría de las reacciones químicas que hoy en día se utilizan, generalmente intervienen los grupos nucleófilos de las biomoléculas receptoras, como grupos amino (-NH₂), grupos carboxílicos (-COOH), grupos tiol (-SH) y también grupos hidroxilo (-OH). De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las proteínas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina, la serina, el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran mayoritariamente expuestos hacia el exterior de la superficie proteica y no pueden intervenir en la unión covalente.

Por otro lado, se precisa la generación de grupos funcionales en las superficies capaces de interaccionar con los aminoácidos de las proteínas, dicha generación se puede realizar de diferentes formas, bien mediante la creación directa de grupos funcionales sobre la superficie (a través de la formación de SAMs como lo vimos en el apartado anterior) o mediante reacciones químicas con moléculas orgánicas que poseen el grupo funcional de interés. La reacción química que hemos utilizado en este trabajo para enlazar covalentemente al receptor sobre la superficie del sensor, se basa principalmente en la interacción de los grupos aminos de las biomoléculas y los ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) que se forman en la superficie del sensor tras la activación con una mezcla de EDC y NHS de los grupos carboxilo de la monocapa de MUA. A continuación describiremos brevemente la química detrás de dicha

reacción. El protocolo empleado y más detalles al respecto son descritos en profundidad en el capítulo de materiales y métodos.

1.1.5.2.1 Aspectos generales de la reacción EDC/NHS

La inmovilización de anticuerpos sobre superficies metálicas, donde grupos -COOH se encuentran expuestos, se puede realizar empleando la reacción EDC/NHS. Los grupos carboxílicos terminales (que pueden formar parte de una SAM), reaccionan muy débilmente con los grupos aminos primarios que poseen las proteínas, por lo que se requiere de una reacción adicional que incorpore un mejor grupo saliente y de esa manera catalice la reacción. En este sentido, el hidrócloro de *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) es usado como catalizador para activar los grupos carboxilos, formando un intermediario inestable antes de reaccionar con las aminas primarias de la biomolécula (ver estructura química en la Figura 10). La eficiencia de la reacción alcanza valores alrededor de 5 %, debido a la competencia que existe entre la formación del enlace con la amida y la hidrólisis reversible del intermediario para revertir al grupo carboxílico inicial [Haes y Van Duyne, 2002]. Este proceso está limitado por una serie de parámetros como pH, fuerza iónica, concentración y tiempo de reacción, por lo que forma parte de una etapa muy delicada que requiere un control minucioso de estos parámetros para que se lleve a cabo satisfactoriamente. El proceso total es detallado en la Figura 10.

El hecho que las proteínas estén normalmente disueltas en tampones acuosos, favorece la reacción reversible del intermediario formado en la reacción. Es por ello que la *N*-hidroxisuccinimida (NHS) juega un papel importante en la reacción. El NHS previene la exposición a los solventes acuosos por parte del intermediario, mediante la transformación de éste a un compuesto más estable susceptible a la reacción con las aminas. NHS reacciona con el intermedio producido tras la reacción de los grupos carboxilos con la EDC formando un éster de NHS semi-estable altamente reactivo con las aminas. Dicho éster tiene un tiempo de vida medio de 4-5 horas a pH 7 disminuyendo su estabilidad al aumentar el pH.

La reacción es normalmente llevada a cabo en un solo paso, donde ambos compuestos son disueltos en el tampón MES (ácido 2-(*N*-morfolino) etanesulfónico) en un rango de pH entre 4.5-6.0. La hidrólisis de los grupos activados por NHS es bastante rápida (en el orden de minutos) y teniendo en cuenta las condiciones en las que se trabaja, es importante controlar las condiciones de la reacción, especialmente los tiempos de reacción, para evitar que se vea afectada la eficiencia de la reacción. La reacción es bastante reproducible siempre y cuando se conserven los parámetros de trabajo y las condiciones del protocolo. Aunque la reacción ha sido ampliamente empleada en la funcionalización de nanosensores y el mundo de sensado en general, se requiere sin embargo que las condiciones de trabajo sean optimizadas para cada sistema en particular [Chen y col, 2009].

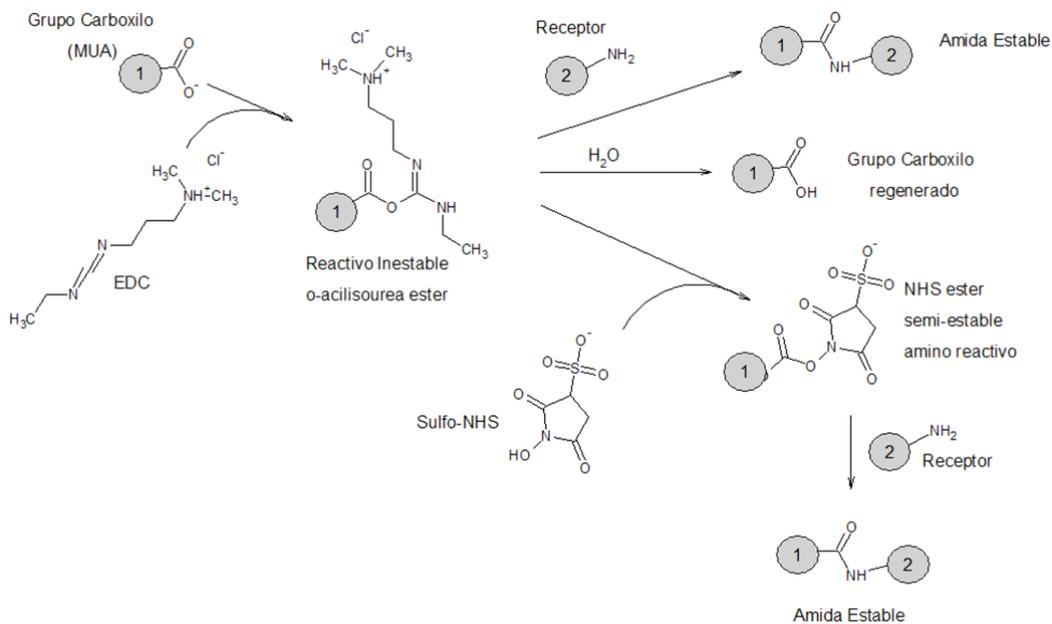


Figura 10. Esquema químico de la reacción EDC/NHS. Se puede observar todos los productos e intermediarios que están involucradas en reacción entre una amina primaria del receptor y el grupo carboxilo activado con EDC/NHS.

1.1.5.3. Agentes Bloqueantes

Agentes bloqueantes es un término que incluye varias sustancias que se usan para cubrir los sitios no ocupados por los receptores biológicos, sin afectar a la actividad de los mismos. La elección del agente bloqueante más adecuado debe hacerse de forma empírica, ya que no existe un único método para todas las aplicaciones. Dicha elección debe hacerse en base a:

- el tipo de superficie sobre la que se va a realizar la inmovilización
- el tipo de receptor biológico a inmovilizar
- el tipo de sistema de detección.

Un agente bloqueante ideal debe bloquear aquellos espacios libres que quedan sobre la superficie, no debe interactuar con otras biomoléculas utilizadas en el ensayo, y su comportamiento debe ser reproducible. Algunos de los mayores problemas asociados con los agentes bloqueantes consisten en que pueden interferir en la interacción entre el receptor biológico y el analito, así como interactuar con la biomolécula de interés.

Los problemas relacionados con un bloqueo no suficiente están directamente relacionados con la absorción no específica de proteínas, factor que debe ser altamente considerado en el desarrollo de un biosensor. Diseñar un recubrimiento resistente a la absorción no específica de especies biológicas representa un problema importante en áreas como la medicina,

especialmente relacionado con implantes, donde una fuerte absorción de un material biológico no deseado sobre el material puede representar el fracaso, en cuanto a su utilidad se refiere.

El funcionamiento estable y óptimo de cualquier biosensor (especialmente aquel libre de marcaje) depende en gran medida de los procedimientos de pasivación que se utilicen. En líneas generales, podemos diferenciar tres niveles de pasivación:

- 1) El bloqueo de la superficie activa del sensor
- 2) La pasivación de superficies inactivas adyacente a las activas.
- 3) Pasivación de superficies restantes (paredes de los microcanales, tubos de inyección de muestra, etc)

El primer nivel de pasivación se relaciona con la inicial modificación de la superficie del sensor. Los reactivos de bloqueo se utilizan una vez que los receptores se inmovilizan para llenar los vacíos en la superficie, que no son llenados por éste elemento, pero que siguen activos. En biosensores es muy usado para bloquear estos espacios, pequeñas entidades con grupos aminos (como la etanolamina $\text{OH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$, Peso molecular 97.54 gr/mL), con grupos terminales que no interfieren posteriormente en los ensayos de bio-reconocimiento molecular a ser efectuados por el receptor anclado [Frederix et al. 2004]. Estos agentes junto con anticuerpos inmovilizados garantizan la especificidad y la selectividad del sensor.

Por otro lado, se conoce que la mayoría de las proteínas tienden a absorberse a los sustratos de vidrio y otros materiales (por ejemplo al PDMS), debido a las fuertes interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas que se llevan a cabo en la superficie de estos [Li y col, 2009; Sapsford y Ligler, 2004]. Los mecanismos de absorción, la velocidad y la cantidad de proteína absorbida dependen principalmente del tipo de proteína, de la carga de la superficie, la hidrofobicidad de ambas especies, la topografía de la superficie, pH, concentración de la proteína, tiempo de incubación, etc. [Norde, 1996].

Uno de los agentes bloqueantes más utilizados en los inmunoensayos es particularmente el suero de albúmina bovino (también conocido como BSA –siglas en inglés de BovineSerumAlbumin-). El uso del BSA en este tipo de ensayos está bien documentado, siendo un buen agente bloqueante de la interacción no específica de las biomoléculas con superficies como el oro, poliestireno, resinas, vidrio entre otros (Reimhult y col, 2008; Xiao y Isaacs, 2012; Brorson, 1997). Sin embargo, el enlace no específico de BSA a la superficie del sensor, puede contaminar la superficie metálica del sensor durante los protocolos de modificación superficial que se lleva a cabo sobre el sensor. Una alternativa viable y que ha sido de gran ayuda en los procesos de funcionalización, es el incorporar el analito a detectar junto con el BSA (durante la etapa de detección), que sirve como agente pasivante de las superficies adyacentes (PDMS, vidrio), mientras que el analito es direccionado al receptor para su reconocimiento. Un punto a favor en esta manera de pasivar, es que el BSA no interacciona con el receptor inmovilizado sobre la superficie, sin embargo influirá en la señal de detección recogida por el sensor. Para ello se recomienda el empleo de un control que contenga la misma matriz de BSA que se usa

en el ensayo, para así poder conocer cuál es el efecto del BSA sobre el área de sensado y de esta manera poder restarlo a las señales que originan la detección.

En el caso de ensayos donde se trabaja con muestras reales de suero, el uso del BSA no será necesario, debido a que será remplazado por la albúmina que originalmente contiene la muestra, la cual debido a la alta proporción en la que se encuentra (3.4-5.4 g/dL), sirve como agente pasivante, que ayuda al analito a ser detectado por el receptor inmovilizado en la superficie del sensor.

Una alternativa más compleja en protocolos de pasivación, conlleva el uso de reactivos recombinantes que interactúan con sustratos negativamente cargados, mediante interacciones electrostáticas. Uno de los reactivos que ha demostrado tener grandes ventajas como agente pasivante es la poli-L-lisina (PLL) modificada con cadenas de polietilenglicol (PEG). El compuesto en sí, consta de unidades de PLL que contienen aminos cargadas en su estructura ($-\text{NH}_2^+$), junto con cadenas poliméricas de PEG injertadas en la cadena de PLL, que tienen propiedades de repulsión contra proteínas. La eficiencia del PLL-g-PEG ha sido demostrada en amplios trabajos aplicados en biosensado [Feuz y col, 2010; 2012a]. En este sentido otras moléculas basadas en el mismo principio han sido igualmente empleadas en la pasivación de sustratos como PDMS y vidrio. El polisacárido n-dodecil- β -D-maltosa (DDM), ha sido empleado como un fuerte agente pasivante en materiales como el PDMS, debido a la fuerte interacción con las superficies hidrofóbicas que posee [Huang y col, 2005].

En el caso específico de los biosensores empleando transductores ópticos (específicamente RPSP) el enlace no específico se evita generalmente mediante la funcionalización de la superficie del biosensor usando SAM's que contienen unidades de PEG, o bien como ya lo mencionamos anteriormente mediante el uso de reactivos de bloqueo, justo después de la inmovilización del bioreceptor. Sin embargo, incluso cuando estas uniones no específicas son tratadas empleando estos agentes, existe una interacción específica adicional sobre el sensor, que corresponde a las interacciones de las proteínas con el sustrato de vidrio circundante al sensor. Sabemos que el campo electromagnético sobre la superficie de las nanopartículas se extiende en un rango de 20-30 nm, por lo que el volumen de detección LSPR como tal abarca una porción del sustrato/interfaz del medio que lo rodea. Cualquier fisiabsorción (anticuerpos, antígenos) que se genere en las áreas circundantes al sensor, en partículas sobre el sustrato de vidrio, contribuirá al desplazamiento total del pico del plasmón asociado al enlace molecular.

Este efecto ha de ser tomado en cuenta por múltiples razones. En primer lugar, el área más sensible de los sistemas nanoestructurados se encuentra en la región vidrio/medio/interfaz debido al entorno no homogéneo dieléctrico que experimenta la nanoestructura. En segundo lugar, la limitación en el proceso de fabricación, produce nanoestructuras con características morfológicas (paredes laterales), que incrementa los campos evanescentes locales en las proximidades de vidrio [Haes y col. 2003]. Finalmente, la detección de analitos en una matriz real como suero sanguíneo implica la interferencia de muchas proteínas, presentes en concentraciones mucho más altas que el analito objetivo. Si la pasivación no se efectúa eficientemente, trae como consecuencia la aparición de falsos positivos o bien la disminución del límite de detección. Por supuesto, los experimentos se deben llevar a cabo de manera que

la superficie del sensor se ha modificado adecuadamente para evitar la adsorción no específica directa.

En general, el proceso de pasivación constituye una etapa crítica y determinante a la hora de desarrollar un biosensor y de aplicarlo en la detección de moléculas biológicas, ya que determina en gran medida las interacciones no específicas que pueden generar falsos positivos e interferencias durante la etapa de detección. Una buena elección del método junto con la elección de un agente bloqueante óptimo, garantizará el éxito del dispositivo, logrando disminuir significativamente los niveles de detección del analito así como también la generación de señales que pueden ser claramente medibles con el menor error posible.

1.1.6 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA “ELISA”

1.1.6.1. Aspectos generales del ensayo ELISA

El “Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima” o ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es una técnica poderosa para detectar y cuantificar una proteína específica que se encuentra inmersa en una mezcla compleja. La técnica fue descrita originalmente por Engvall y Perlmann en 1971 [Engvall y Perlman, 1971], y básicamente contempla el análisis de muestras de proteínas inmovilizadas en pequeños pocillos de microplacas usando como elemento de reconocimiento anticuerpos específicos a estas proteínas.

Esta técnica debido a las múltiples ventajas que ofrece ha revolucionado áreas como la inmunología y es comúnmente usada en laboratorios de investigación médica. ELISA posee así mismo importantes aplicaciones comerciales, como por ejemplo en el diagnóstico de marcadores asociados a enfermedades y alérgenos, así como también en la industria de alimentos.

El método de ELISA se ha podido desarrollar gracias al avance científico que se ha producido en otros campos y áreas relacionadas con la técnica. El avance en la tecnología ha permitido la producción de anticuerpos monoclonales específicos a antígenos [Kohler y Milstein, 1975], permitiendo su uso como base para la detección de moléculas individuales en mezclas de proteínas complejas o muestras de tejidos. Inicialmente el proceso de detección fue llevado a cabo empleando radioinmunoensayos usando anticuerpos etiquetados previamente con radioisótopos, pero debido a los altos riesgos a la salud que conllevan estos ensayos, otros métodos alternativos fueron desarrollados. Avramais [Avramais y Uriel 1966; Avramais 1969] y Pierce [Nakane y Pierce, 1967] desarrollaron un método para enlazar químicamente enzimas biológicas a anticuerpos, las cuales producían una señal medible al reaccionar con un sustrato apropiado. Así mismo, con el descubrimiento de la fluorescencia, el uso de anticuerpos etiquetados con fluoróforos ha constituido una alternativa muy viable en este tipo de ensayos, especialmente en ensayos múltiples.

Se han ensayado numerosas fases sólidas para el anclaje de estos anticuerpos en un sustrato que permita la lectura de la señal obtenida, desde los tubos de cristal de los orígenes hasta las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico tratado, para aumentar su capacidad de adsorción de moléculas (en la superficie), y con superficies de pocillos ópticamente claros que permitan realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos, específicamente en espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de “lectores ELISA”. Actualmente se están desarrollando dispositivos de mayor capacidad —por ejemplo, con 384 y 1536 pocillos—, adecuados para los sistemas de monitoreo masivo de los sistemas robotizados (HTS, *High-throughput system*).

Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional (con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua) los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que solo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda; las que corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados.

A pesar de las múltiples variantes de ELISA que han sido desarrolladas y empleadas en diferentes situaciones, todas éstas dependen de los mismos elementos básicos:

- Recubrimiento del elemento de Captura: Inmovilización directa o indirecta del antígeno sobre la superficie de los pocillos de las microplaca.
- Bloqueo de las placas: adición de proteínas pasivantes y/o otras moléculas para cubrir los sitios no saturados por el antígeno en los pocillos de la microplaca.
- Detección: incubación con los anticuerpos específicos, que debido a la alta afinidad interaccionarán con el antígeno anteriormente anclado.
- Medida de la señal: detección de la señal generada, por vía directa o mediante el uso de un segundo anticuerpo (comúnmente etiquetado) que interacciona con el anticuerpo específico.

En general las fases que contempla un ensayo ELISA son respectivamente:

- A. Conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina...): El anticuerpo conjugado a la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sandwich, etc. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno. Dicha unión anticuerpo-enzima o antígeno-enzima ha de producirse durante un determinado período de tiempo con el propósito de producir una solución coloreada y que pueda ser valorada visualmente o cuantificada por medio de un espectrofotómetro. Si no transcurre el tiempo adecuado para que se dé la reacción, no se evidenciará ningún color, interpretándose este resultado como un falso negativo y disminuyendo la sensibilidad de la técnica. Hoy en día podemos encontrar de manera comercial los anticuerpos conjugados con diversas enzimas y/o reactivos que facilitan este proceso.

- B. Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos: La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas. Así, el procedimiento de recubrimiento de los pocillos debe realizarse cuidadosamente. Si se usa mucho antígeno, se pueden obtener falsos positivos. Por el contrario, si se usa poco antígeno, el exceso dará lugar a una reacción falsa negativa. Este procedimiento viene acompañado de etapas de bloqueo empleando proteínas que no interfieren con el ensayo, pero que interactúan fuertemente con la superficie del pocillo, normalmente mediante interacciones electrostáticas. Esto es un paso importante ya que disminuye las interacciones no específicas que pueden dar lugar a falsos positivos.

- C. Formación de una o más capas de inmunocomplejos: Esta etapa depende en gran medida del tipo de ensayo ELISA a realizar (ELISA directo, indirecto o tipo "sándwich").

- D. Revelado de la reacción enzimática: Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica mediante espectrofotometría. La señal observada es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra. Esta etapa viene acompañada de varios lavados para garantizar que la señal recogida es específica a la interacción y no a excesos o remanentes del reactivo.

1.1.6.1.1 Inmovilización y detección del Antígeno.

La inmovilización del antígeno varía entre dos técnicas principales. En un ELISA tradicional (directo), los antígenos son directamente enlazados a la placa por adsorción pasiva, usando generalmente un tampón carbonato/bicarbonato a pH > 9. La mayoría de las proteínas enlazan fuertemente a las superficies de poliestireno de las microplacas en condiciones alcalinas, debido a las interacciones electrostáticas que se generan.

La detección directa del antígeno envuelve un marcaje del anticuerpo que se emplea para la detección, ya sea con una enzima para generar una reacción enzimática o cualquier otra etiqueta que exprese su existencia en el ensayo (como una molécula fluorescente). La detección indirecta implica pasos adicionales usando otro anticuerpo o una especie que posea un par altamente afín y detectable como es el par Estreptavidina-biotina. En este paso normalmente toman lugar los llamados anticuerpos secundarios, que tienen como único propósito poder cuantificar la señal que origina el reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo primario. La detección directa es generalmente más rápida que la indirecta y evita los posibles problemas de reactividad cruzada que puedan existir entre el anticuerpo secundario y el anticuerpo que se emplea para la detección. Sin embargo, una de las ventajas de emplear un segundo anticuerpo es que es capaz de amplificar la señal de detección, lo cual

favorece mucho a aquellos sistemas donde el límite de detección es bastante bajo. Por otro lado, la detección directa es menos sensible y requiere que el marcaje en el anticuerpo de detección sea óptimo y que posea suficientes moléculas en su estructura (etiquetas) que produzcan una señal fácilmente medible.

Sin embargo, si el antígeno está presente a muy bajas concentraciones o no se adhiere bien al pocillo, entonces la modalidad “sándwich” ELISA ha de ser empleada. EL ELISA “sándwich” es la modalidad más frecuentemente usada cuando se usan muestras complejas, ya que solo el antígeno es inmovilizado por el anticuerpo anclado sobre la superficie. A mayor cantidad de antígeno inmovilizado, mayor es la sensibilidad del ensayo. Este método requiere dos tipos de anticuerpos diferentes que interactúan específicamente con el antígeno (cada reactivo empleando un epítipo diferente). El primer anticuerpo (anclado a la placa) es llamado anticuerpo de captura o anticuerpo de recubrimiento. Mientras que el segundo anticuerpo detecta el antígeno inmovilizado y es llamado anticuerpo de detección. Tales anticuerpos se conocen como “pares”, estos se emplean en combinación, siempre y cuando no compitan en el reconocimiento con el antígeno. Normalmente se emplea una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales, empleando los primeros como los anticuerpos que cubren la superficie y los policlonales como los anticuerpos de detección. El ELISA tipo “sándwich” en comparación con el tradicional requiere una mayor optimización en su proceso, pero la relación señal-ruido alcanzada con éste es mucho mayor.

Por otro lado se emplea el ELISA indirecto en donde se emplean dos anticuerpos como sistema de detección: uno primario contra el antígeno inmovilizado y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. En la figura 11 podemos observar un esquema donde se representan los diferentes formatos aplicables en los ensayos ELISA.

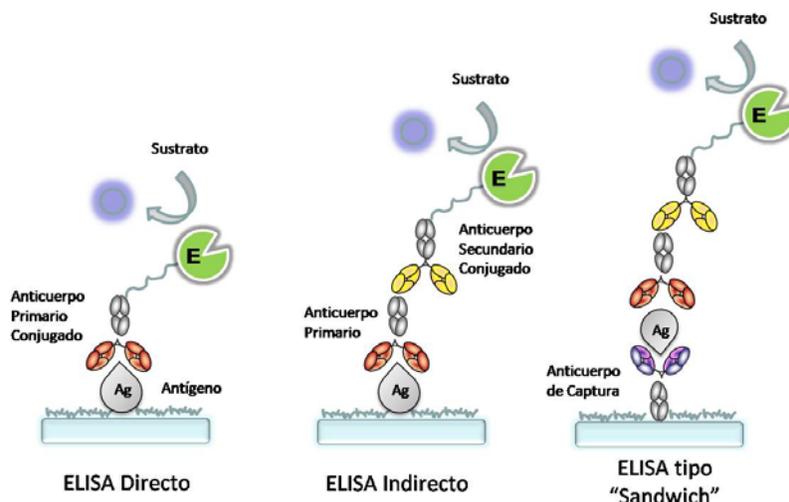


Figura 11. Diagrama de los diferentes formatos a emplear en los ensayos ELISA

1.1.6.1.2. Detección empleando una reacción enzimática.

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles. Una enzima hace que una reacción química que es energéticamente posible, pero que transcurre a una velocidad muy baja, sea cinéticamente favorable, es decir, transcurra a mayor velocidad que sin la presencia de la enzima [Grishman y Reginald, 1999]. En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos. Casi todos los procesos en las células necesitan enzimas para que ocurran a unas tasas significativas. A las reacciones mediadas por enzimas se las denomina reacciones enzimáticas.

Cada enzima es altamente específica para la reacción que cataliza. Esta especificidad está determinada por el centro activo de la enzima (en donde se hallan los grupos químicos responsables de la catálisis). Normalmente son proteínas de alto peso molecular (macromoléculas de entre 10^4 y 10^6 g/mol y que contienen un número de entre 10^2 y 10^4 aminoácidos). Las enzimas son catalizadores específicos; cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos.

En una reacción catalizada por una enzima, la sustancia sobre la que actúa (sustrato), se une a una región concreta de la enzima (centro activo), bien sea un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato o bien a través de un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de reacción. Una vez que los productos han sido formados la enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción, de allí su importancia como elemento vital para la medición de una reacción dada. Sin embargo, al contrario que las reacciones químicas, las enzimas se saturan. Esto significa que a mayor cantidad de sustrato, mayor número de centros catalíticos estarán ocupados, lo que incrementará la eficiencia de la reacción, hasta el momento en que todos los sitios posibles estén ocupados. En ese momento se habrá alcanzado el punto de saturación de la enzima y, aunque se añada más sustrato, no aumentará más la eficiencia. En la Figura 12 podemos observar la actuación del ciclo enzimático.

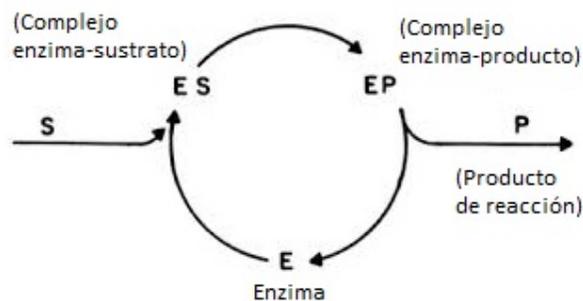


Figura 12. Ciclo enzimático.

Dos enzimas son comúnmente empleadas en los ensayos ELISA: la fosfatasa alcalina (del inglés Alkaline Phosphatase AP) y la peroxidasa del rábano (del inglés Horseradish Peroxidase HRP).

La fosfatasa alcalina es ampliamente usada en ELISA. Debido su gran tamaño (140 kDa) en algunos casos dificulta la conjugación con el anticuerpo, sin embargo, la reacción enzimática es rápida y efectiva. Un inconveniente a tener en cuenta es que los conjugados son a veces inestables en el tiempo, lo que requieren un almacenaje adecuado y un correcto uso de los mismos. Sin embargo, la HRP al ser más pequeña en tamaño (40kDa), permite que sea fácilmente conjugada a anticuerpos y a otras especies como la avidina, lo que ayuda a incrementar significativamente la señal de detección. Es muy usada en los ensayos ELISA y puede ser usada con una gran variedad de sustratos, lo que la hace más sensible que las equivalentes fosfatasas.

Como ya mencionamos, los reactivos de las reacciones catalizadas por enzimas se denominan sustratos. Un sustrato es capaz de unirse al sitio activo de la enzima que lo reconozca y transformarse en un producto a lo largo de una serie de pasos denominados mecanismo enzimático. La generación de una señal mediante una reacción enzimática, requiere la catálisis de un sustrato para producir un compuesto coloreado, fluorescente o quimioluminiscente (luz visible). La señal es medida normalmente empleado un espectrofotómetro (lector de placas) o bien, un fluorímetro con los filtros apropiados para colectar la señal de interés.

Los sustratos colorimétricos forman un producto, soluble y coloreado, que se acumula con el tiempo en el pocillo, dependiendo de la cantidad de enzima que se ha empleado. Cuando la intensidad de color es adecuada para la medida (suficientemente intensa para ser medida), la absorbancia del producto es, o bien medida directamente; o se emplea en algunos casos una solución que detiene la reacción que provee un punto final por igual en las medidas. Existen varios tipos de sustratos para la correspondiente enzima a emplear. En el caso de la HRP, podemos encontrar sustratos como el TMB (3,3',5,5' tetrametil-bencidina), OPD (o-fenilendiamina) y ABTS (2,2'-azino-bis[3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfónico]).

La fosfatasa alcalina (AP) cuenta con un único sustrato conocido, el PNPP (fosfato de para-nitrofenol). El PNPP es un sustrato soluble de peso molecular 371.14 g/mol, que se emplea en ensayos ELISA normalmente con elementos conjugados previamente con la enzima AP. Puede ser usado para la determinación de la actividad de la fosfatasa (ácida o alcalina) en fluidos fisiológicos y/o otras soluciones acuosas. Este sustrato produce un producto final soluble de color amarillo (4-nitrofenol, Ver Figura 13), que presenta una absorbancia característica a 405 nm. La reacción puede ser detenida empleando una solución de NaOH 3 M para su posterior medida.

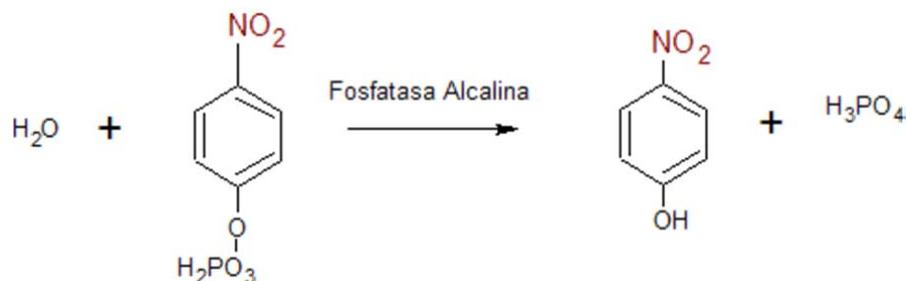


Figura 13. Reacción enzimática de la PNPP con la AP.

1.1.6.2. Factores que afectan la preparación de inmunoensayos empleando ELISA.

Si bien ELISA es una aplicación potente y bien caracterizada, desarrollar y optimizar un ensayo específico puede ser complejo. El método requiere el empleo de inmunocomplejos, así como múltiples componentes, muchos de ellos sensibles a diversos factores, por lo que algún problema con la señal generada proveniente de la captura del antígeno puede ser causado por cualquiera de estos factores. Para evitar estos problemas de señal se requiere una optimización del método.

Tabla 6. Factores que afectan la generación de una buena señal en un ELISA

Factores	Variables a tomar en cuenta
Placa de ensayo	Material del que está hecho, forma de los pocillos, pre-activación
Tampón de acoplamiento	Composición, pH
Anticuerpo de captura	Especificidad, afinidad, tiempo de incubación y temperatura
Tampón de Bloqueo	Composición, concentración, reactividad cruzada
Antígeno a detectar	Conformación, estabilidad, epítopos disponibles para la detección, efectos de la matriz
Anticuerpo de Detección	Especificidad, afinidad, tiempo de incubación, temperatura y reactividad cruzada.
Enzima conjugada	Tipo de enzima, tipo de conjugado, actividad, concentración, reactividad cruzada.
Lavados	Composición del tampón, volumen empleado, duración y frecuencia del lavado
Sustrato	Sensibilidad, fabricante, envejecimiento del reactivo
Detección de la señal.	Filtros, instrumento de la detección y medida de la imagen, tiempo de exposición.

Una lista de estos factores y variables se describen en la Tabla 6. Al configurar un ELISA es aconsejable realizar y optimizar una curva estándar para el analito de interés antes de realizar múltiples análisis de muestras de composición desconocida. Si la curva estándar muestra una

sensibilidad y linealidad adecuada, el investigador puede confiar en el método y proceder a procesar las muestras de interés.

El éxito del ensayo ELISA así como una correcta inmovilización del material biológico que se emplea en el método depende principalmente de los siguientes factores [Harlow, 1998; Esser, 1988; Tijssen, 1993; Susuki y col, 1997]:

- Las características del soporte sólido. Composición química y forma.
- Propiedades de las biomoléculas. La velocidad de difusión disminuye proporcionalmente al aumento del volumen hidrodinámico, por consiguiente, la velocidad y por tanto la adsorción de las grandes moléculas es menor que las pequeñas. Según sea su hidrofobicidad y el tipo de soporte sólido, se favorecerá o no la adsorción.
- Concentración de las biomoléculas. A mayor concentración se incrementa la adsorción. Concentraciones entre 1-10 µg/mL son generalmente suficientes, aunque deben ser optimizadas para cada sistema. Las elevadas concentraciones pueden provocar una disminución de la sensibilidad y detectabilidad del ensayo, debido a la formación de sobrecapas de biomoléculas débilmente adsorbidas, que se liberan fácilmente en los pasos subsiguientes inhibiendo los inmunoreactantes en la fase líquida.
- Tiempo y temperatura: son directamente proporcionales a la adsorción. Cuando se prolonga demasiado tiempo el ensayo o se aumenta excesivamente la temperatura durante el mismo, puede disminuir la adsorción por desnaturalización de las biomoléculas. Existe una relación inversa entre tiempo y temperatura que debe ser controlada estrechamente, incubaciones de 2-4 horas a 37 °C son equivalentes a 16-20 horas a 2-8 °C. generalmente esta última combinación es satisfactoria debido a la estabilidad que adquieren la mayoría de las biomoléculas, sin embargo el tiempo y la temperatura óptimos son particulares para cada biomolécula.
- Soluciones Tampones. La adsorción es más fuerte cerca del punto isoeléctrico de la biomolécula, sin embargo la elección del tampón se determina experimentalmente. El más común y el que ha producido mejores resultados sigue siendo el tampón carbonato/bicarbonato 0.05M, pH 9.6. Entre otros tampones tenemos: tris 0.01 M/NaCl 0.1 M, pH 8.5; tris 0.05 M, pH 8.0; fosfato de sodio 0.01 M/NaCl 0.1 M, pH 7.2; citrato 0.1 M, pH 6.0; el clásico tampón fosfato salino (PBS-phosphate buffer saline) 0.15 M, pH 7.2 entre otros. No deben emplearse tampones con elevada fuerza iónica junto con otras moléculas que puedan competir con los sitios activos de unión a la fase sólida o aumentar la viscosidad de la solución.
- Agitación: facilita el encuentro entre la biomolécula y la superficie. Mediante este procedimiento son menos críticos otros parámetros como la viscosidad de la solución y la temperatura.

La concentración óptima de recubrimiento a una temperatura, tiempo y solución tampón definidos, habitualmente se determina cuando con el suero positivo empleado para este fin, se alcance en el ensayo la mayor señal, generalmente mantenida a concentraciones superiores (saturación). En la práctica, se recomienda recubrir con un ligero exceso de material biológico, siempre y cuando se cumplan las condiciones anteriores.

Los posibles espacios libres se bloquean con moléculas que no interfieran con el inmunoensayo enzimático empleando agentes bloqueantes. La albúmina sérica bovina, gelatina, leche, caseína, suero de diferentes especies animales y el detergente Tween 20 son ejemplos de agentes bloqueadores normalmente empleados en este tipo de ensayos.

1.1.6.3. Aplicaciones de ELISA en la detección de analitos.

Los métodos de ELISA desde su desarrollo inicial han sido empleados como la mayor técnica de detección de analitos en distintos medios. Es el método más usado en el análisis clínico de muestras biológicas. Se usa en muchos laboratorios para determinar si un analito particular está presente en la muestra de sangre de un paciente. Aunque el procedimiento es rutinario y sencillo, como ya mencionamos, involucra a un gran número de variables, que si no se ajustan correctamente, puede afectar los pasos sucesivos y el resultado de la prueba. La interacción antígeno-anticuerpo en el laboratorio puede ser utilizada para determinar si un paciente tiene una infección o una enfermedad autoinmune.

Debemos tener en cuenta que cuando se trata de diagnosticar una enfermedad que posee un valor predictivo positivo bajo en una determinada población —es decir, en donde la concentración del analito es baja—, es necesario volver a confirmar el resultado positivo mediante otro método de diagnóstico independiente. En este sentido, es importante describir algunos aspectos relacionados con el empleo de la técnica como medio de validación.

La validación corresponde al proceso establecido para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos. En general se consideran tres tipos de validación: 1) Validación prospectiva: la que se realiza a técnicas nuevas; 2) Validación retrospectiva: para técnicas no validadas anteriormente y de las que se tiene documentación suficiente para probar la calidad del método; 3) Revalidación: cuando hay cambios significativos en las condiciones originales del método o cuando éste lleva largo tiempo utilizándose. En ensayos de validación, importantes parámetros han de ser tomados en cuenta: linealidad, límite de detección, selectividad, sensibilidad, especificidad, robustez, entre otros; que determinarán en gran medida el futuro de la técnica en las aplicaciones para lo cual fue diseñada.

Como prueba diagnóstica, el ELISA posee ciertas limitaciones. En los casos de diagnóstico de enfermedad, es recomendable la eliminación (mediante centrifugación) de células de la sangre que puedan interferir con el ensayo y puedan ocasionar un resultado falso positivo, careciendo aquel de especificidad.

Debido a que el ELISA se puede realizar ya sea para evaluar la presencia de antígeno o la presencia de anticuerpos en una muestra, es una herramienta útil para determinar las concentraciones de anticuerpos en suero [Lequin, 2005]. También se ha encontrado aplicaciones en la industria alimentaria en la detección de posibles alérgenos de alimentos [Puchades y Maqueira, 2013], como la leche, cacahuates [Montserrat y col, 2015], nueces,

almendras y huevos. ELISA también se puede utilizar en la toxicología como medio rápido de prueba, para ciertas clases de medicamentos.

ELISA fue la primera prueba de detección ampliamente utilizado para el VIH debido a su alta sensibilidad [Hellins y col, 1987]. Así mismo investigadores han desarrollado ensayos empleando esta metodología en la detección de diversos tipos de enfermedades, como la malaria [Roy y col, 1994], enfermedad de Chagas [Santos Coelho y col, 1997] y la enfermedad de Johnne [Frank y col, 2005] entre otras. Pruebas de ELISA también se utilizan en la diagnosis in vitro en laboratorios médicos.

Otras aplicaciones de ELISA son:

- detección de anticuerpos en *Mycobacterium tuberculosis*
- detección de rotavirus en las heces
- detección de marcadores de hepatitis B en el suero
- detección de la enterotoxina de *E. coli* en las heces
- detección de anticuerpos del VIH en muestras de sangre [Rikhtegaran y col, 2015]
- detección de distintos marcadores tumorales en fluidos corporales [Acevedo y col, 2005; Wang y col, 2008; May y col, 2013]

Como se puede evidenciar la técnica ELISA ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc. Es por ello que en el desarrollo de una plataforma de biosensado constituye un importante y fiable método de validación de los resultados obtenidos con la nueva metodología.

1.2 SENSORES BASADOS EN NANOESTRUCTURAS PLASMÓNICAS

Gracias a su simplicidad, sensibilidad y bajo coste, los biosensores ópticos basados en el principio de campo evanescente, y en especial los biosensores de resonancia de plasmón superficial, se han convertido en herramientas esenciales para el análisis y detección de sustancias químicas y biológicas. A continuación describiremos los aspectos físicos y teóricos mas relevantes del campo de la plasmónica y de los conceptos que se encuentran detrás de este tipo de sensores.

1.2.1 ASPECTOS GENERALES SOBRE PLASMONES.

En los metales existe una gran cantidad de electrones (del orden del número de Avogadro, $\approx 10^{23}$) que no se encuentran ligados a un determinado núcleo atómico (electrones libres), de modo que se pueden mover libremente dentro del material formando un plasma. Con la aplicación de campos eléctricos, estos electrones fluyen a través del material dando lugar al fenómeno de la conducción eléctrica. Cuando se hace incidir radiación electromagnética (por ejemplo, campos electromagnéticos oscilantes) sobre los metales, se pueden inducir excitaciones colectivas de los electrones libres, denominadas plasmones. Estas oscilaciones electrónicas se pueden propagar en la interfase de un metal y un material dieléctrico dando lugar a un plasmón superficial.

El fenómeno de plasmón superficial fue observado inicialmente por Wood en 1902 [Wood, 1902] al analizar la luz policromática reflejada por un espejo que poseía una red de difracción en su superficie. Dicha luz reflejada presentaba un patrón de franjas que Wood no era capaz de interpretar. La interpretación física del fenómeno fue iniciada por Rayleigh [Rayleigh, 1907] y posteriormente refinada, en 1941, por Fano [Fano, 1941]. Fue este último el que introdujo el concepto de polaritón, una quasipartícula resultante de la oscilación colectiva de los electrones como resultado de la interacción de la luz, es decir fotones, con la materia. Sin embargo, la primera descripción teórica de la resonancia de plasmón superficial la proporcionó Ritchie en 1957 [Ritchie, 1957]. Aún hubo que esperar 11 años más (1968) hasta que el propio Ritchie [Ritchie y col, 1968] relacionara el plasmón superficial con las ondas superficiales de Sommerfield y el fenómeno observado por Wood 66 años antes. Ese mismo año, Otto [Otto, 1968] y Kretschmann-Raether [Kretschmann, 1968] presentaron dos sencillos métodos de excitación de plasmones en capas de metales nobles, estableciéndose así las bases de lo que hoy se conoce como Plasmónica.

Como se dijo anteriormente, las ondas de plasmón superficial son oscilaciones colectivas de electrones libres en la interface entre dos medios cuyas constantes dieléctricas poseen partes reales de signos opuestos (generalmente un metal y un dieléctrico, aunque también puede generarse en semiconductores dopados). El término deriva del concepto de plasma y se debe a que ambos, plasma y plasmón superficial, están constituidos por partículas cargadas que pueden responder de forma colectiva. Los plasmones superficiales pueden excitarse mediante

electrones [Wang y col, 2001; Bharadwaj y col, 2011], fonones [Diaconescu y col, 2007] o fotones [Raether, 1968]. En este último caso, los electrones libres responden colectivamente oscilando en resonancia a la misma frecuencia que la luz incidente. De ahí que a la creación o excitación de plasmones superficiales mediante luz, se la denomine usualmente Resonancia de Plasmón Superficial (SPR, del inglés Surface Plasmon Resonance), aunque estrictamente hablando se trata de un plasmón-polaritón superficial. Por esta razón, en clara referencia a su carácter híbrido, también se le denota como SPP (del inglés Surface Plasmon Polariton).

Existen dos tipos distintos de plasmones superficiales con extraordinarias propiedades, los propagantes y los localizados. Los de tipo propagante, denotados como SPP se producen en la frontera plana entre un metal (los más usados son el oro y la plata) y un dieléctrico, como consecuencia de la oscilación colectiva de los electrones libres del metal, próximos a su superficie [Maier, 2007]. Esta oscilación colectiva genera una onda electromagnética que se propaga a lo largo de la interface entre ambos medios, generando un campo electromagnético muy intenso, cuyo máximo de intensidad se localiza en la interface metal/dieléctrico y decae exponencialmente de ambos lados de esta (ver Figura 14a). El otro tipo de plasmones superficiales, los localizados, se generan en nanoestructuras metálicas aisladas (por ejemplo, nanopartículas de oro). Este tipo suele denotarse como LSPR, del inglés Localized Surface Plasmon Resonance, quedando reservado el término Plasmón Superficial (o SPR) para los de tipo propagante. Como su propio nombre indica, en este caso el LSPR no se propaga si no que se localiza en la región de la nanoestructura [Novotny y Hecht, 2006, Sepúlveda y col, 2009]. (Ver Figura 14b).

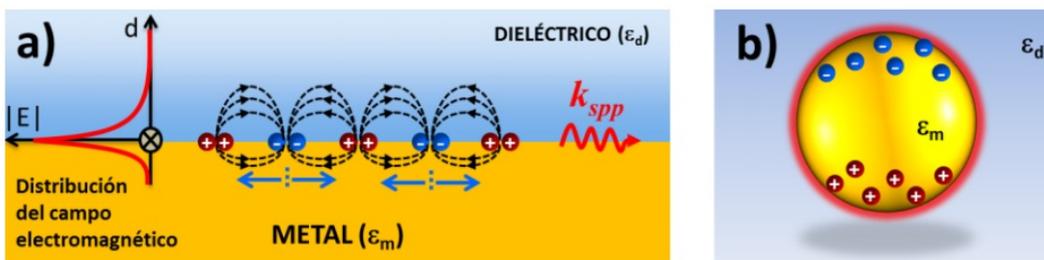


Figura 14. Tipos de plasmones superficiales. a) propagantes (SPR) y b) Localizados (LSPR)

1.2.2 RESONANCIA DE PLASMONES SUPERFICIALES LOCALIZADOS (LSPR)

En una nanopartícula metálica de dimensiones muy reducidas en relación a la longitud de onda de la radiación incidente ($D \ll \lambda$ donde D es el diámetro de la partícula), se tiene que los plasmones están localizados dando lugar a una frecuencia LSPR. La frecuencia de resonancia del plasmón está determinada por la función dieléctrica que depende de la frecuencia del metal y del material del medio que la rodea, además es fuertemente dependiente del tamaño

y forma de la nano-estructura. Así, al incidir luz sobre la superficie en condiciones de resonancia con la frecuencia de los LSP, éstos son excitados, dando lugar al fenómeno conocido como Resonancia de Plasmón Superficial Localizado (LSPR), lo que conduce a una polarización de la nanopartícula como se muestra en la Figura 15.

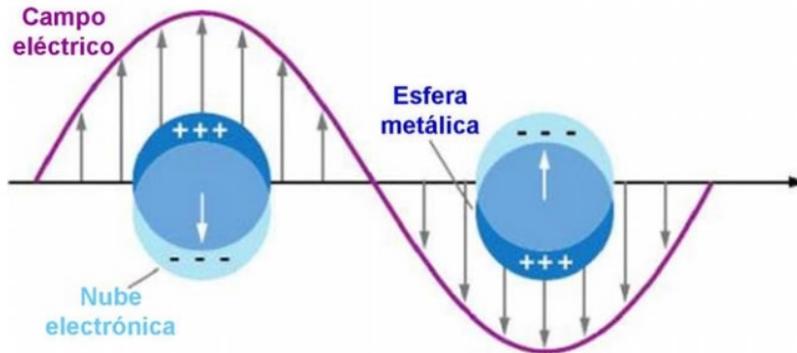


Figura 15. Plasmones de superficie localizados en una nanopartícula

Las NPs de metales nobles, como oro, plata y cobre, poseen plasmones de superficie localizados con resonancias en la región del visible [Creighton y col, 1979; Billaud y col, 2007]. Esto hace que dichas partículas tengan color. Diversas investigaciones se han realizado sobre las propiedades ópticas de partículas metálicas y su relación directa con la forma y diversos tamaños de las mismas [Kelly y col, 2003, Mulvaney, 1996; El-Sayed, 2004]. En estos trabajos se analiza el efecto del disolvente y de la adsorción de otras moléculas o iones sobre dichas propiedades. Por otra parte, las resonancias de plasmón pueden ser medidas mediante los espectros de extinción. Es decir, midiendo la cantidad de radiación que no es transmitida por el medio debido a dos efectos principales, absorción y difusión de la luz por las nanopartículas, efectos considerablemente aumentados en condiciones de LSPR. En líneas generales, el espectro de extinción de nanopartículas esféricas presenta un máximo intenso debido a la oscilación dipolar de los LSP que aparece a una longitud de onda que depende del tamaño de las mismas. Cuanto menor sea el tamaño de partícula, la excitación de los LSP se producirá a longitudes de onda más bajas. A modo de ejemplo ilustrativo, en la Figura 16 se muestran suspensiones coloidales de nanopartículas de oro y plata que presentan diferentes geometrías y tamaños y, en consecuencia, diferentes propiedades de absorción de luz, lo que le confiere diferentes colores.



Figura 16. Nanopartículas obtenidas por vía húmeda (Síntesis química) Foto cortesía del Dr. Ignacio De Miguel (Grupo PNO-ICFO). Se observa la diferente coloración que presentan y por tanto, sus diferentes propiedades ópticas en el espectro visible debido a la diferencia en tamaños y formas que presentan, lo que afecta al plasmón ligado a cada estructura.

El acoplamiento de los plasmones con los fotones de una radiación incidente que conduce a condiciones de LSPR, produce un fuerte incremento del campo electromagnético cercano a la superficie de la nanoestructura. La intensidad del campo decae muy rápidamente desde la interfase metal/dieléctrico, desapareciendo a muy corta distancia al adentrarse en el dieléctrico (el disolvente, en el caso de nanopartículas coloidales). Dicha amplificación de la intensidad de la luz en la proximidad de la superficie es un aspecto muy importante de la LSPR, puesto que da lugar a un aumento de la sección eficaz para las técnicas espectroscópicas ópticas (absorción infrarroja, Raman y fluorescencia) de aquellas moléculas situadas muy próximas a la superficie del metal. El efecto es similar al de una mayor cantidad de fotones incidiendo sobre estas moléculas, lo cual favorece la probabilidad de que se produzcan los fenómenos de absorción y difusión de luz, aumentando consecuentemente la sección eficaz. Así pues, este efecto se aprovecha en las Espectroscopías Intensificadas por Superficie (Surface Enhanced Spectroscopies) que están siendo ampliamente estudiadas y aplicadas hoy en día.

Sin embargo, el incremento del campo electromagnético no es homogéneo sobre todos los puntos de la superficie, sino que se concentra y localiza en determinados puntos conocidos como “hot spots” (HS) o puntos de máxima intensificación. En el caso de nanopartículas con morfología esférica, los HS están localizados en los espacios entre partículas situadas a pocas unidades de nanómetro unas de otras [Le Ru y col, 2006; Halas y col, 2011; Nordlander y col, 2004; Le Ru y Etchegoin, 2009]. En simetrías no esféricas, los HS se localizan en las zonas de máxima curvatura, como son los vértices de un prisma o las crestas y valles de superficies nanorrugosas [Kelly y col, 2003; Sherry y col, 2006]. Así pues, resulta de especial interés controlar la cantidad de HS, y trabajar con superficies plasmónicas con un elevado número de ellos.

Este hecho hace que las nanopartículas de oro sean muy útiles en el desarrollo de sensores, debido a lo sensibles que pueden llegar a ser en la detección de moléculas [Acimovic y col, 2009]. De este modo, se puede explotar, por ejemplo, la sensibilidad del espectro LSPR a los cambios en el índice de refracción local para la detección de moléculas suspendidas en un medio líquido y que tiendan a adherirse a la superficie de las partículas de oro. Estas

nanopartículas son además fáciles de funcionalizar mediante la adsorción y conjugación de diferentes moléculas incluidas biomoléculas, como ya se ha mencionado en apartados anteriores, lo que incrementa las posibilidades de su aplicación en el desarrollo de sensores.

En los últimos 10 años, las técnicas basadas en el fenómeno de LSPR han ganado mucho interés y, lo que inicialmente se consideró una técnica sensible para la detección del índice de refracción (con respecto al patrón Biacore), ha resultado ser una metodología clave en lo que respecta a la medida de enlaces y el estudio de reconocimiento en sistemas biológicos. Así mismo, los recientes avances en técnicas de nanofabricación (nanolitografía y nanoimpresión) han permitido el desarrollo de estructuras capaces de mejorar sustancialmente la integración, la sensibilidad, la complejidad y especificidad de los sistemas empleados en la detección de biomoléculas [Barbillon y col, 2007].

El fenómeno de LSPR fue utilizado en sensado por primera vez por Englebienne in 1998 [Englebienne y col, 1998]. A partir de aquí, el desarrollo de biosensores basados en RPSL ha tenido un gran potencial en diversas áreas. Una de las aplicaciones más relevantes, se encuentra en el desarrollo de dispositivos sensibles de diagnóstico clínico. Hoy en día, el mayor reto es el desarrollo de biosensores basados en nanoplasmones, los cuales debido a las propiedades que poseen pudiesen ser empleados para complementar los diagnósticos arrojados por laboratorios clínicos, pudiéndolos incluso usar como dispositivos de diagnóstico inmediato (más conocidos como dispositivos Point-of-Care), que ayuden a mejorar notablemente el tiempo de respuesta del análisis y analizar varias pruebas simultáneamente.

Los biosensores que no requieren marcaje para ser empleados como elemento de transducción como SPR y LSPR son poderosas herramientas para estudiar interacciones moleculares. Esto es debido a varias razones. Por un lado, el proceso de marcaje de moléculas normalmente presenta ciertos problemas como pueden ser los cambios inducidos en la molécula marcada por el marcador en sí mismo, lo cual puede afectar la posterior interacción con la molécula que se quiere detectar. Por otro lado, el proceso de marcaje puede llegar a ser en algunos casos una labor costosa y compleja. Los biosensores LSPR libres de marcaje son capaces de estudiar cinéticas de interacción mediante la monitorización de la interacción en tiempo real, indicando directamente la fuerza del enlace entre las moléculas. Estas aplicaciones en el estudio de interacciones moleculares han permitido el uso de este tipo de biosensores [Newman y col, 1998; Mozsolits y col, 2003] en la industria farmacéutica como sistemas de screening para el descubrimiento de nuevos fármacos para diversas enfermedades. La desventaja más importante de este tipo de sensores es que el enlace no específico de las moléculas induce cambios en la señal, algunas veces imposibles de separar de la señal específica que se genera al detectar el analito. Esto limita el uso de este tipo de biosensores en aplicaciones relacionadas especialmente con diagnóstico clínico, donde los biomarcadores y analitos se encuentran frecuentemente en bajas concentraciones y en matrices complejas con una gran cantidad de moléculas circundantes.

La Figura 17 muestra los principales actores que intervienen en la detección de una plataforma basada en un transductor LSPR. En líneas generales, un sensor basado en LSPR consiste en una nanoestructura (A), por lo general hecha de oro o plata, fabricada sobre un sustrato (normalmente de vidrio) y que es recubierto con un receptor biológico para

proporcionar un reconocimiento específico (C) [Silin y col, 1997]. El reconocimiento selectivo y específico de las moléculas de interés, provoca un cambio en la constante dieléctrica alrededor de las estructuras que produce un cambio en la longitud de onda medida, lo que puede usarse como parámetro analítico para la detección [Endo y col, 2005]. En otras palabras, la posición de la banda de absorción asociada al LSPR (que definimos como $\lambda_{\text{máx}}$), es sensible a la naturaleza y a los cambios en la interface entre el metal nanoestructurado y su entorno. De esta manera, controlando y monitorizando los cambios de esta banda de absorción LSPR es posible detectar la presencia de moléculas/marcadores en varios entornos.

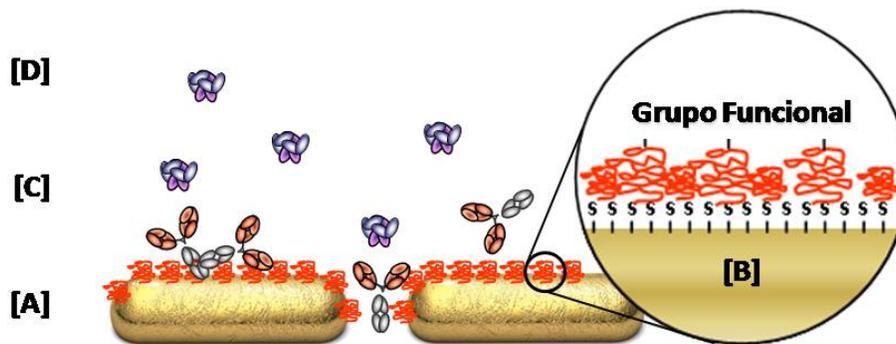


Figura 17. Esquema donde se representan los principales elementos de un biosensor basado en LSPR. A) nanoestructuras de oro que poseen una energía de campo localizado sensible a cambios en el entorno. B) Funcionalización de la estructura que permite el enlace del receptor biológico a la superficie C) Enlace del receptor biológico, el cual posee una alta especificidad y selectividad del elemento a detectar. D) Finalmente, la detección del elemento biológico de interés.

1.2.3 PLASMONES EN SENSADO: LSPR VS SPR

A día de hoy, una de las aplicaciones de mayor éxito de la plasmónica es en el campo de los biosensores. Durante las últimas 2 décadas, la SPR ha sido considerada como una referencia en el desarrollo de biosensores libres de marcaje [Mukhopadhyay, 2005]. El uso del fenómeno SPR con fines analíticos se debe a la posibilidad de inmovilizar un elemento de reconocimiento adecuado sobre una superficie metálica, ya que la interacción del bioreceptor inmovilizado y un determinado analito da lugar a un cambio en el índice de refracción del medio que produce un desplazamiento de la posición angular a la que tiene lugar el fenómeno de resonancia (cambio del ángulo de resonancia), o lo que es lo mismo, un desplazamiento de la curva de resonancia.

La configuración de Kretschmann que se emplea en SPR permite utilizar dos modos de medida: siguiendo la variación del ángulo de acoplamiento al que tiene lugar la resonancia, o la variación de la intensidad reflejada a un ángulo fijo (Figura 18). Para medir en el primer modo

es necesario que la muestra y el detector se encuentren fijos en una plataforma rotatoria y la condición de resonancia se observa como un mínimo agudo en la reflectancia de la luz cuando el ángulo de incidencia varía. Durante una interacción biomolecular se produce un cambio en la curva de resonancia que se puede relacionar cuantitativamente con el analito que se ha detectado. En este método es necesario registrar las curvas de resonancia completas por lo que la información sobre el evento bioquímico se obtiene una vez que este ya ha tenido lugar. A diferencia de este método de medida, el segundo modo de medida permite detectar las interacciones moleculares en el mismo instante que se están produciendo. Esto es posible porque se registra de forma continua la luz reflejada a ángulo fijo. El ángulo de trabajo se selecciona a media distancia del mínimo de reflectancia, que es la zona de mayor pendiente de la curva de resonancia, y por tanto la que proporciona una mayor sensibilidad. Cuando la molécula de analito se une al elemento de reconocimiento inmovilizado en la superficie sensora se produce un cambio en el índice de refracción, que se detecta en tiempo real por medio de la variación de la reflectancia.

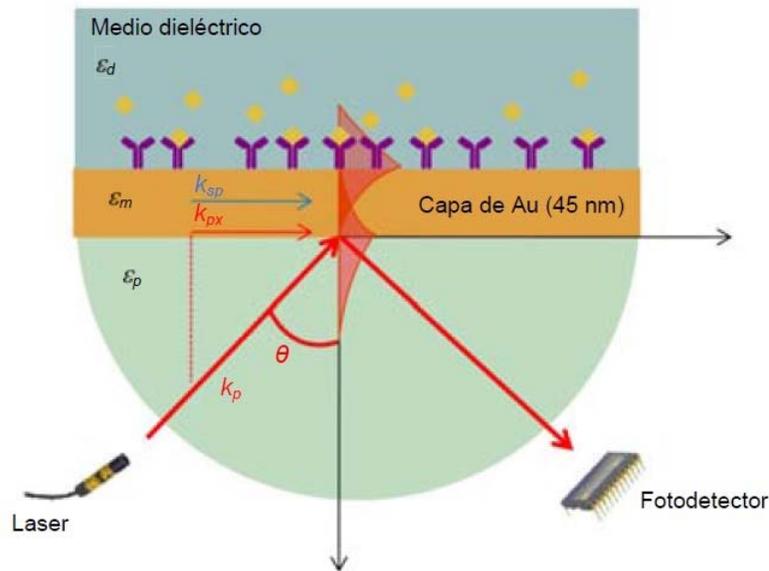


Figura 18. Modo de operación de un inmunosensor SPR basado en la configuración de Krestschmann.

En cuanto a los mecanismos de traducción, SPR y LSPR presentan diferencias significativas. Como ya se mencionó anteriormente, las resonancias plasmónicas presentan una fuerte dependencia de los cambios en el índice de refracción que se puedan generar en el área de sensado, que estará definida por el rango de extensión de los campos evanescentes. Así pues, la presencia en esta región de cualquier material con un índice de refracción diferente al del ambiente que lo rodea, producirá un cambio en la resonancia de menor o mayor energía, que dependerá de la magnitud del índice de refracción asociado. En este sentido, se pueden definir dos tipos de perturbaciones: una de ellas es un cambio de índice de refracción del conjunto (BRI), donde el volumen completo del área de sensado es uniformemente perturbado, y el otro tipo corresponde a las perturbaciones locales provocadas por adsorciones de moléculas o

deposición de capas delgadas que ocupan en este caso sólo una pequeña porción del área de sensado. En este sentido, un biosensor ideal basado en LSPR debe ser muy sensible a estas perturbaciones locales. Como las biomoléculas en general presentan un índice de refracción mayor que la matriz que las contiene (agua, suero, tampones), el contacto de estas con el área de sensado producirá un cambio de las longitudes de onda hacia el rojo en el espectro, para el caso de SPR en la profundidad de las señales de reflectividad, y en el caso de LSPR para el pico del plasmón asociado al sensor (Ver Figura 19). La magnitud de este cambio está directamente asociada con los cambios en el índice de refracción del conjunto (SPR) y/o con el número de moléculas absorbidas sobre la superficie del sensor (LSPR). Es en este sentido, cuando la funcionalización del sensor juega un papel importante en la absorción de estas moléculas para el caso particular de sensores basados en LSPR.

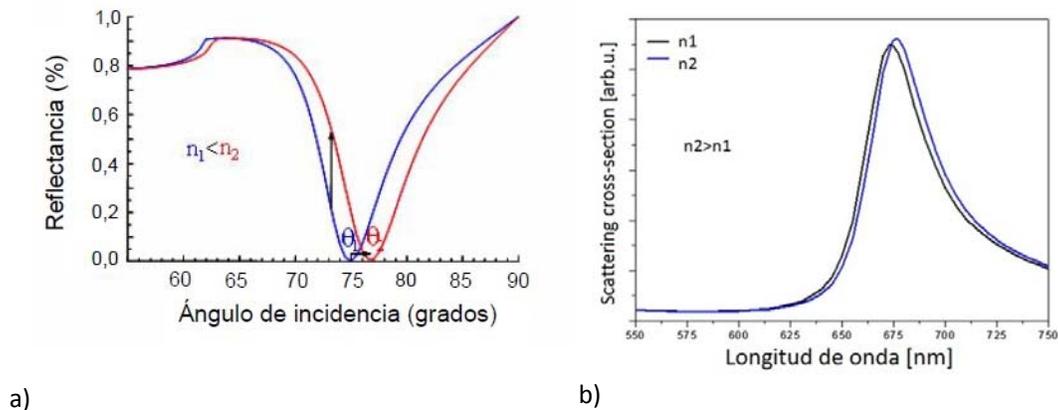


Figura 19. Ejemplo de señales características para SPR y LSPR. a) Para SPR se observa un cambio en el ángulo de incidencia con un aumento en el índice de refracción, originando un desplazamiento en las señales de reflectividad. b) para LSPR un cambio en el índice de refracción en las proximidades del sensor produce un desplazamiento del plasmón asociado a la nanoestructura metálica [De Juan Franco, 2013; Acimovic, 2013].

Los sistemas SPR están clasificados básicamente en dos categorías: espectroscopia SPR e imagen SPR. En la espectroscopía SPR el área de colección de la información está definida por el tamaño del haz láser. El principio de detección en esta categoría está basado en la monitorización de los cambios en el ángulo de incidencia, la monitorización de la longitud de onda reflejada o bien en la monitorización de los cambios de fase, polarización e intensidad de detección [Homola, 2008]. La resolución en índice de refracción de los sensores SPR con acoplamiento por prisma está entre 10^{-5} y 10^{-6} RIU (unidades de índice de refracción, del inglés refractive index units) [Homola y col, 1999]. Esto significa que el límite de detección actual de estos dispositivos está en 1 pg/mm^2 de material analizado.

En el caso de imagen SPR, un haz extendido ilumina uniformemente una gran área del sensor. La reflectividad en este caso es monitorizada en tiempo real generalmente por una cámara CCD bidimensional, donde cada pixel o grupos de pixels de la imagen son analizados. Es así como cambios en índices de refracción locales producirán cambios de la intensidad de luz

asociados a cada pixel de la cámara CCD. En este sentido, esta configuración ofrece una solución para la monitorización en paralelo de varias reacciones, lo cual es ampliamente necesario en diversas áreas como la industria farmacéutica o el área de la genómica. Sin embargo, una de las grandes complicaciones de esta técnica está asociada con la contaminación entre diferentes áreas durante la funcionalización, así como también la complejidad de la óptica y la alta resolución de las cámaras requeridas para tal fin. Existen hoy en día gran variedad de plataformas propuestas bajo este tipo de configuraciones que han sido aplicadas en áreas como la industria de los alimentos, industria farmacéutica, ámbito medioambiental, diagnóstico clínico o la industria militar. La mejor sensibilidad descrita hasta la fecha para estas plataformas está por encima de los 10^{-8} RIU (unidades de índice de Refracción) para cambios en índice del conjunto (BRI), y alcanzando los 10^{-5} - 10^{-6} RIU para sistemas de medidas estándares. Normalmente, estos valores, incluyendo la sensibilidad y resolución de estos sistemas, son inversamente proporcionales al grado de miniaturización, paralelización, simplicidad y coste del ensayo [Homola, 2006].

El éxito de los biosensores SPR se ve reflejado en el aumento de estos sistemas disponibles comercialmente. Actualmente, son comercializados por más de doce compañías a nivel mundial [O'Malley, 2008]. Especial mención merece el biosensor SPR comercializado por Biacore (inicialmente Pharmacia Biosensor AB y recientemente adquirida por GE Healthcare-USA) bajo diferentes modelos, que domina este mercado desde que introdujo el primero de estos dispositivos en 1990. Hoy en día, GE Healthcare es considerada como la principal protagonista en el campo, aunque existen también muchas otras compañías activamente presentes en el mercado con productos y plataformas basadas en SPR. Es a partir de los últimos 25-30 años (después de haber sido desarrollada y explotada la tecnología basada en el fenómeno de SPR) donde los sistemas basados en LSPR toman un papel importante en el mundo del biosensado, convirtiéndose en un sector bastante popular y ampliamente utilizado en diversas áreas, donde destaca principalmente la biología y la medicina [Gerion y Day, 2010].

Desde que la técnica de SPR se aplicó por primera vez en el biosensado de la interacción antígeno-anticuerpo, la investigación y el desarrollo tecnológico de los inmunosensores ha experimentado un crecimiento exponencial. Además de permitir la medida de constantes de afinidad, los inmunosensores SPR pueden utilizarse para determinar la velocidad de las reacciones antígeno-anticuerpo, así como para determinar la presencia de un determinado compuesto en muestras de matriz compleja a niveles de concentración del orden nanomolar. Los inmunosensores SPR representan actualmente uno de los métodos de detección de la unión antígeno-anticuerpo más prometedores, y su uso en el diagnóstico de diferentes enfermedades y en la investigación biomédica continua en aumento [Kausaitė y col, 2007]. El interés en el desarrollo y aplicación de los inmunosensores SPR se debe a diferentes motivos entre los que se incluye la gran sensibilidad, selectividad, rapidez y fiabilidad de sus análisis, y en especial, a su potencial para la realización de análisis tanto in-situ como in-vivo gracias a la posibilidad de la miniaturización y portabilidad de los dispositivos [Green y col, 2000]. Son muchas las áreas de aplicabilidad de estos inmunosensores hoy día, incluyendo la ingeniería molecular, análisis de alimentos, diagnóstico clínico, proteómica, monitorización medioambiental, bacteriología, virología y detección de armas biológicas [Karlsson, 2004].

Lo que inicialmente llevó a pensar en el uso de LSPR como mecanismo de traducción en el campo de los biosensores fue la ventaja de su posibilidad de miniaturización, (debido a que cada partícula es potencialmente un sensor); el hecho de poder emplear directamente la luz (sin la necesidad de usar elementos ópticos) y la detección de niveles por debajo de partículas individuales que muestra [Dondapati, 2010]. Se han empleado recientemente sensores basados en partículas individuales encontrándose que presentan sensibilidades que permiten detectar concentraciones en el rango de attomolar [McFarland y Van Duyne, 2003], con la limitación de que se requieren equipos sofisticados en la detección y cuyos tiempos de adquisición de las señales son largos. Así mismo, empleando el mismo principio se ha utilizado recientemente el fenómeno de LSPR para la detección de pocas partículas en tiempo real [Bingham y col, 2009].

Las comparaciones directas de los sistemas de SPR y LSPR rara vez son encontradas en la literatura. Un ejemplo es el del trabajo del grupo de Van Duyne en 2004 [Yonzon y col, 2004]. El analito a detectar en este trabajo fue la proteína Concanavalina A (ConA), que fue reconocida específicamente por una monocapa auto-organizada exponiendo manosas en su superficie. En este trabajo, se comparó la detección de un sistema comercial SPR basado en un receptor anclado sobre una película continua de oro, con la detección obtenida anclando el receptor sobre nanoestructuras de plata dispuestas en un arreglo triangular, las cuales fueron fabricadas empleando la técnica de litografía con nanoesferas (NSL-Nanosphere Lithography). Las respuestas en tiempo real mostraron la misma dinámica de la asociación entre el receptor y el analito por ambas técnicas. Por el contrario, la fase de disociación (la liberación de las moléculas que no fueron ancladas específicamente al receptor) mostró un 60 % de caída de la señal para el sistema de SPR, comparado con un 14 % obtenido para el sistema de LSPR.

A partir de estos estudios de química de superficie realizados por estos autores tanto en películas delgadas como en sistemas de nanopartículas, la discrepancia en la señal se puede atribuir principalmente a la diferencia de la sensibilidad en medidas de BRI entre el SPR y LSPR. EL sistema SPR presenta una sensibilidad mayor para cambios correspondientes al índice de refracción del conjunto lo que hace que el efecto del tampón en la detección de la proteína sea más significativo que para el sistema de LSPR donde el efecto del índice de refracción del conjunto es menos significativo. Esto demuestra la ventaja del uso de LSPR para la detección de analitos en muestras cuya matriz es bastante compleja como en el caso de muestras clínicas (por ejemplo, sangre, suero).

Otro estudio más exhaustivo fue llevado a cabo por Svedendahl y colaboradores, donde se presenta la comparación de una manera más elaborada, intentando utilizar componentes y métodos similares siempre que sea posible para ambos métodos [Svedendahl y col, 2009]. El experimento fue realizado para el estudio de la interacción entre estreptavidina-biotina. Para ello, emplearon BSA funcionalizada con biotina depositada no covalentemente al oro. Los autores utilizaron la misma fuente de luz y condiciones de iluminación, mismo material, mismo algoritmo para el procesamiento de los datos y diseñaron condiciones en la plataforma de sensado que contenían resonancias similares. Para el caso de LSPR se emplearon estructuras de nanodiscos aleatorios y para el SPR se utilizó una película gruesa de 50 nm de grosor, ambos sistemas con resonancias ubicadas en los $\lambda = 700$ nm. Los autores comprobaron que el cambio en el BRI en el caso de SPR es unas 20 veces mayor que para el sistema de LSPR. Sin

embargo, en el cambio de resonancia correspondiente a la detección de la estreptavidina, ambos sistemas presentaron resultados similares, siendo más rápida la dinámica de unión para el caso de LSPR. Aunque estos experimentos comparan los sistemas de SPR y LSPR y demuestran que son muy similares, la pregunta sobre cuál es el mejor sistema para ser empleado en biosensado sigue abierta. Los sistemas SPR más sensibles utilizan escaneo del ángulo de reflexión lo que origina que los picos sean más nítidos, pero a su vez presentan una mayor dispersión. Por otro lado, alcanzar una alta sensibilidad en los sistemas de LSPR no es tan sencillo, depende en gran medida de la geometría, la distribución y las características de las nanoestructuras empleadas.

La diferencia más evidente entre SPR y LSPR está relacionada con la óptica empleada en los sistemas. En un sistema SPR se requiere una óptica especial que permite llevar a cabo el proceso (prisma, guía de ondas, rejillas), mientras que para LSPR no se necesita de tales elementos.

Una diferencia intrínseca entre los plasmones de superficie localizados y extendidos, es el confinamiento del campo que presentan, el cual define el volumen de sensado. Los plasmones de resonancia superficiales se extienden mucho más lejos dentro de la matriz del analito. Los plasmones localizados y los campos evanescentes asociados a estos son más confinados con una longitud del decaimiento del campo (un orden de magnitud por debajo de las encontradas para SPR). Como consecuencia, los sistemas SPR son más sensibles a cambios en el índice de refracción del conjunto (BRI). Los plasmones localizados presentan una mayor ventaja en cuanto a sensibilidad desde el punto de vista de la detección bio-molecular. Los volúmenes de sensado que los plasmones localizados presentan (de tamaño comparable al analito a detectar) incrementan la sensibilidad de detección debido al solapamiento volumen-analito, disminuyendo el efecto de la matriz del conjunto (muy importante a tener cuenta en medidas en tiempo real). Así mismo, los sistemas de detección empleando SPR requieren un control de temperatura extendido en la superficie que añade más complejidad al diseño experimental.

La química de superficie y los diversos protocolos y ensayos químicos han sido ampliamente testados empleando sistemas donde se emplea SPR. Sin embargo, la mayoría de estos protocolos pueden ser empleados y trasladados a los sistemas de LSPR debido a que se emplean los mismos materiales, con la única diferencia que estos sistemas requieren un mayor control en la pasivación de las superficies donde están presentes las estructuras (normalmente vidrio) para así mantener la alta sensibilidad característica de estos sistemas a nivel bio-molecular. Debido a lo pequeño de la superficie de sensado, los sistemas LSPR presentan cinéticas de reacción y de enlace más rápidos que en los SPR.

Los sustratos empleados en SPR son generalmente más económicos y fáciles de fabricar. Sin embargo, el acelerado avance en las técnicas de nanofabricación, como por ejemplo litografía coloidal o nanoimpresión, ha permitido que el coste de los sustratos en LSPR pueda ser reducido significativamente.

Por otro lado, ambos sistemas presentan ventajas comunes. Una de las más importantes es la alta compatibilidad con la microfluídica y con componentes fotónicos integrados [Wong y col, 2011], lo que les otorgan una ventaja significativa con los otros sistemas de traducción en

biosensado (multideteción simultánea en los ensayos, poco consumo de muestra, entre otros).

Debido al tiempo que llevan siendo utilizados, los sistemas de SPR muestran un gran desarrollo y demanda en el mercado comercial, sin embargo, ventajas y desarrollos en los niveles de sensibilidad no van en la misma línea. Los sistemas de detección basados en LSPR están cobrando más protagonismo debido a las ventajas que ofrecen a nivel de detección biomolecular. Por ejemplo, ha sido demostrado que reacciones enzimáticas empleadas en sistemas SPR mejoran sustancialmente la sensibilidad. Sin embargo, estas reacciones han sido recientemente testadas en sistemas LSPR obteniendo resultados prometedores en este sentido [Lee y col, 2011; Chen y col, 2011]. El parámetro crítico en esta última configuración es la necesidad de mantener al analito de interés lo más cerca posible de la superficie de la nanopartícula debido al rápido decaimiento de los campos electromagnéticos originado por el pequeño volumen de sensado que presentan.

No obstante, la comercialización tecnológica basada en sistemas de traducción empleando LSPR ha comenzado, presentando hoy en día una gran competencia para los sistemas SPR ya existentes. En este trabajo doctoral se presenta una plataforma basada en sistema LSPR que acoplada con la tecnología de lab-on-a-chip ha demostrado, como se verá en capítulos siguientes, una alta sensibilidad y propiedades particulares que la hacen potencialmente viable en este mercado de plataformas empleadas en biosensado.

1.3 MICROFLUIDICA Y “LAB-ON-A-CHIP”

La microfluídica es la tecnología que permite procesar o manipular pequeñas cantidades de líquidos (entre 10^{-9} y 10^{-18} litros) utilizando canales con dimensiones entre las decenas hasta las centenas de micras [Whitesides, 2006]. Implica estudios teóricos y experimentales del flujo de un líquido en el interior de canales del orden de las micras fabricados en un chip. Cuando estos canales disminuyen sus dimensiones por debajo del rango micrométrico, se utiliza el término de nanofluídica [Dittrich y Manz, 2006]. Estos estudios abarcan desde el proceso de fabricación hasta el manejo y aplicación de los chip fabricados.

En sus orígenes, la microfluídica se centró en el desarrollo de microcanales para análisis moleculares. A continuación apareció un interés en crear sistemas fiables de detección frente a posibles ataques biológicos que, junto con la posibilidad de realizar análisis a nivel molecular, aumentaron la motivación en la investigación microfluídica.

1.3.1. ASPECTOS FÍSICOS RELEVANTES EN MICROFLUÍDICA.

Para conseguir reducir el tamaño de un laboratorio convencional y poder integrar los análisis que allí se realizan es necesario conocer cómo se comportan los fluidos en la escala

micro/nanométrica. El flujo del líquido en el interior de un microcanal viene caracterizado por fenómenos que normalmente no se considerando se trabaja en la escala macro. Janasek y colaboradores, desarrollaron la relación existente entre diferentes parámetros al pasar de sistemas macrofluídicos a microfluídicos [Janasek y col, 2006].

La sección transversal del canal es uno de los factores que determina el comportamiento del líquido en su interior y se denomina diámetro hidráulico (D_H), depende del área y del perímetro del canal,

$$D_H = \frac{4S}{P_m} \quad (1)$$

Donde S es la sección mojada del canal y P_m el perímetro mojado. Esto significa que para una sección circular, D_H queda definido como,

$$D_H = d \quad (2)$$

Donde d es el diámetro del canal. Siempre que la sección del conducto no sea circular o bien se considera que el canal está lleno de líquido, estos datos coinciden con el área (A) y el perímetro (C) de la sección transversal y D_H quedará definido como:

$$D_H = \frac{2ab}{a+b} \quad (3)$$

En canales rectangulares, al existir dos lados con medidas diferentes, se suele hablar de diámetro equivalente. Si un lado del canal rectangular es mucho mayor que el otro ($b \gg a$), el diámetro hidráulico se puede simplificar ($D_H \approx 2a$), esto significa que la dimensión más pequeña del canal será la que determine el comportamiento del flujo [Pérez-Castillejos, 2003].

Así mismo, el fenómeno de transporte también debe ser considerado al trabajar con fluidos en la escala micro. El tiempo (t_{diff}) necesario para que las especies difundan en una distancia dada (L) depende de su coeficiente de difusión (D),

$$t_{diff} = \frac{L^2}{D} \quad (4)$$

Esto implica que a menor longitud del canal, menor es el tiempo que se necesita para que una especie difunda por él y, por lo tanto, menor será el tiempo de respuesta. Por otro lado, hay que tener en cuenta que con microcanales, la cantidad de fluido que circula por su interior se encuentra en la escala de los nanolitros. El movimiento de los fluidos a este nivel se describe con un conjunto de ecuaciones de derivadas parciales, no lineales conocidas como ecuaciones de Navier-Stokes. Como el objetivo principal de esta tesis ha sido el desarrollo de la tecnología y no el estudio del comportamiento de los fluidos en el interior del canal, no se entrará en la explicación en detalle de estas ecuaciones, sin embargo describiremos brevemente algunos conceptos importantes a tener en cuenta cuando se trabaja con nanofluidos.

Fijando las condiciones de contorno en dichas ecuaciones, se obtienen una serie de números adimensionales que representan la importancia de diversos fenómenos físicos de los fluidos en la escala nanométrica [Squires y Quake, 2005]:

- El número de Reynolds (Re): está definido por la ecuación 5, este valor representa la proporción entre las fuerzas de inercia (donde v es la velocidad característica del fluido y ρ la densidad del fluido) y las fuerzas viscosas (η/d , donde η es la viscosidad dinámica y d el diámetro del microcanal).

$$Re = \frac{v\rho d}{\eta} \quad (5)$$

Dependiendo del diámetro del microcanal, los Re obtenidos en microfluídica son normalmente bajos, lo que indica que se trabaja con flujos laminares porque las fuerzas que dominan son viscosas. Flujo laminar significa que el movimiento del fluido es perfectamente ordenado, es decir, el fluido se mueve en láminas paralelas sin entremezclarse.

- El número de Weber (We) es una medida de la importancia relativa de la inercia del fluido comparada con su tensión superficial y está definido por la ecuación 6.

$$We = \frac{\rho v^2 l}{\gamma} \quad (6)$$

Donde γ corresponde a la tensión superficial existente en el fluido. A mayor tensión superficial, menor We y mayor influencia de las fuerzas capilares sobre el movimiento del fluido. Como el movimiento de líquidos en microcanales viene determinado por bajos números de Reynolds ($Re < 1$) y Weber ($We < 1$), significa que las fuerzas que predominan son la viscosa y la capilar, al contrario de la macro-escala, donde las fuerzas que gobiernan el movimiento son las gravitatorias, la inercia y la presión hidrostática.

- Por último, tenemos al número Péclet (Pe) que relaciona el transporte de masa entre convección y difusión para flujos que contienen más de una especie, esto quiere decir que influye en el proceso de mezclado de dos soluciones. Dependiendo de la aplicación requerida se puede preferir una mezcla por difusión antes que por convección. Así el número Péclet está definido por la ecuación 7

$$Pe = \frac{vl}{D} \quad (7)$$

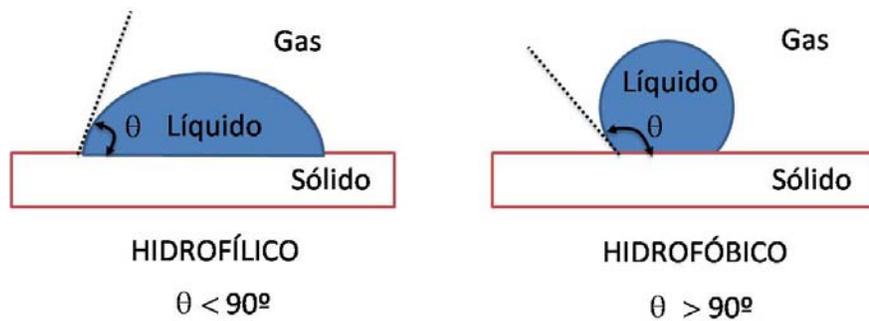
Donde l corresponde a la longitud del canal y D es el coeficiente de difusión de las dos especies. En el caso de querer realizar una reacción química entre dos especies se requieren tiempos de mezclado rápidos, es decir, una mezcla por convección.

Tomando en cuenta estas premisas, las fuerzas viscosas se pueden definir como la fricción entre un fluido y un sólido, es decir la fricción entre el líquido que se encuentra en el interior del canal con las paredes que lo definen. Estas hacen que el flujo dentro de un microcanal sea laminar. El comportamiento de la interfase líquido-sólido es difícil de predecir porque las moléculas del líquido existentes en la interfase están en continua interacción por un lado con otras moléculas del líquido y por otro con el sólido.

La tensión superficial mide las fuerzas internas que hay que vencer para poder expandir el área superficial de un líquido, en otras palabras, la energía necesaria para crear una nueva área

superficial, trasladando las moléculas de la masa líquida a la superficie de la misma. La tensión superficial tiene como principal efecto la tendencia a disminuir en lo posible la superficie de un líquido para un volumen dado, de aquí que un líquido rodeado de aire adopte forma esférica, ya que es la forma con menor relación área/volumen y menos energía. EL valor de la tensión superficial depende de la temperatura y de la naturaleza de las dos fases puestas en contacto. Para un líquido dado, disminuye con la temperatura, debido al aumento de la agitación térmica. Cuando una gota se encuentra sobre una superficie sólida, la tensión superficial también intenta minimizar la energía total. El ángulo definido por la curvatura de la gota sobre la superficie se conoce como ángulo de contacto (θ). Este ángulo se utiliza para medir la capacidad que tiene un líquido para mojar una superficie. La Figura 6 muestra dos ejemplos representativos del comportamiento de un líquido sobre una superficie sólida horizontal. Principalmente, depende de la relación que existe entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas existentes en el interior del líquido.

Cuando las fuerzas adhesivas (líquido-superficie) con la superficie del sólido son muy grandes en relación a las fuerzas cohesivas (dentro del líquido), el ángulo de contacto es menor de 90° , teniendo como resultado que el líquido moja la superficie y se expande sobre la misma. Cuando esto ocurre se habla de superficies hidrofílicas (Figura 20.a). Por el contrario, una superficie es hidrofóbica (Figura 20.b) cuando el ángulo de contacto es mayor de 90° . Las fuerzas cohesivas del líquido son mayores, esto significa que mantiene su forma de gota y no moja la superficie.



a)

b)

Figura 20. Comportamientos representativos de un líquido en contacto con una superficie sólida horizontal. a) Para una superficie hidrofílica el ángulo de contacto es menor de 90° , el líquido se extiende sobre la superficie. b) Por el contrario, cuando el ángulo formado entre el líquido y la superficie es mayor de 90° , el líquido se contrae y mantiene forma de gota sobre una superficie hidrofóbica.

Por último, destaca un término muy utilizado cuando se trabaja con microcanales: la capilaridad. Se conoce como capilaridad al fenómeno por el cual el líquido sube o baja al entrar en contacto con las paredes de un conducto de diámetro reducido. En el caso de un microcanal, éste puede succionar un líquido incluso en contra de la fuerza de gravedad. La capilaridad se produce cuando las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido son mayores que las fuerzas cohesivas dentro del líquido, esto significa que el líquido moja las paredes del microcanal [Colin, 2001].

1.3.2. TECNOLOGÍAS DE FABRICACIÓN PARA MICROFLUÍDICA

El uso de tecnologías de microfabricación en campos como la química, la biología o la medicina han permitido la disminución del volumen de muestra y del tiempo empleado en la realización de los análisis [Nguyen, 2002]. También ha incrementado la posibilidad de automatizar estos procesos y de efectuar un número elevado de análisis al mismo tiempo, es decir, la realización de análisis en paralelo. El desarrollo de nuevas tecnologías es de gran importancia para alcanzar estos objetivos.

Tabla 7. Visión general de las técnicas de fabricación para microfluídica más comunes [Mijatovic y col, 2005].

Técnica	Alcance de Fabricación	Dimensiones	Materiales	Ventajas	Desventajas
Top- down (Volumen)	Nanocanales Nanoestructuras	Por debajo de ~ 10nm	Si, SiO ₂ , Si ₃ N ₄	Buen control de áreas grandes, adecuado para producción en masas	Procesos litográficos caros
Top- Down (Superficie)	Nanocanales	Por debajo de 100nm	SiO ₂ , Si ₃ N ₄ , fotoresinas	Relativamente fácil de fabricar	Tiempos de reacción largos, limitación en la longitud del canal
Top- down (Molde)	Nanocanales Nanoestructuras	Por debajo de ~ 20nm	Moléculas orgánicas, polímeros (PMMA)	Barato y fácil de replicar las estructuras en los moldes	Fabricación costosa de los masters. Se necesita nuevo molde cuando se cambia de estructura
Bottom-up	Nanoestructuras	2-10 nm	Zeolitas, Nanotubos de carbono, Carbón poroso	Principalmente utilizado para estructuras naturalmente formadas bien definidas	Poco o ningún control de la posición de las nanoestructuras

Los métodos de fabricación se pueden dividir en dos grandes grupos: top-down y bottom-up [Mijatovic y col, 2005]. Los métodos top-down empiezan con diseños a gran escala y van reduciendo sus dimensiones laterales antes de formar nanoestructuras. Por otro lado, los métodos bottom-up utilizan átomos o moléculas para construir nanoestructuras. La tabla 7 intenta mostrar los materiales utilizados normalmente en estos métodos de fabricación, las dimensiones mínimas alcanzadas, así como las ventajas e inconvenientes que presentan.

La base para la fabricación de la mayoría de los dispositivos microfluídicos, es el proceso de fotolitografía. Inicialmente, la mayoría de los procesos se realizaban en materiales semiconductores, particularmente en silicio. A causa de la demanda de ciertas características como, por ejemplo, características ópticas especiales, compatibilidad bioquímica, procesos de

fabricación de bajo coste y desarrollo rápido de prototipos, se han desarrollado métodos de fabricación en otros materiales tales como vidrio, cerámica y polímeros, siendo estos últimos los más empleados hoy en día.

El polidimetilsiloxano (PDMS) es un polímero ampliamente usado para la realización de microsistemas fluídicos. Se trata de un polímero de baja densidad, $0,97 \text{ Kg/m}^3$, y bajo módulo de Young (360 – 870 KPa). Presenta interesantes propiedades para la realización de dispositivos microfluídicos como son su hidrofobicidad y biocompatibilidad. Puede ser tratado de varias formas, mediante grabado húmedo y mediante grabado por plasma, para obtener formas determinadas. También se usa para moldeado, mediante el cual se realiza un molde en silicio para posteriormente rellenarlo de PDMS y, finalmente, retirar el molde tras un tratamiento térmico obteniendo la estructura en PDMS, también conocido este método como litografía suave o “soft lithography”. [McDonald y col, 2002; Deng y col, 2000]. Los dispositivos microfluídicos construidos por soft-lithography se obtienen de manera fácil, rápida y a muy bajo coste. Empleando esta técnica se pueden elaborar dispositivos verdaderamente complejos con la integración de válvulas y dispositivos que ayuden a controlar los procesos para los cuales son aplicados [Love y col, 2001; Anderson y col, 2000].

Sin embargo, el inconveniente de la utilización de PDMS radica principalmente en los procesos de fabricación, puesto que tanto los grabados húmedos como mediante plasma se realizan con máquinas muy especializadas y de muy alto coste. En el caso de realización del molde de silicio se tiene el mismo problema, puesto que para realizar la estructura en silicio es necesaria la utilización de tales máquinas, aunque se están usando cada vez más las resinas epoxi como SU-8 como sustituto de silicio para estas tareas. Además, para la realización de estructuras fluídicas, como por ejemplo microcanales, el PDMS presenta el inconveniente adicional de su baja rigidez y por tanto, la posibilidad de deformación debido a la fuerza que ejerce el fluido sobre las paredes. Tal inconveniente se salva con el uso de SU-8, un polímero de mayor rigidez que el anterior. Aún a pesar de todos estos inconvenientes, el PDMS es un material muy empleado actualmente en la fabricación de microsistemas.

Otra de las ventajas que tiene el PDMS como material para la fabricación de microsistemas es las propiedades óptimas que posee para ser usado en aplicaciones biomédicas dado que es compatible con los estudios biológicos y no tóxico para las células. Al ser un material con un módulo de Young bajo, ajustable desde 360 a 870 KPa mediante el control de las proporciones de sus componentes, es extremadamente sensible a las tensiones externas y puede alcanzar grandes deformaciones. También es un material de bajo coste, impermeable al agua y permeable a los gases, y ópticamente transparente y, por tanto, propicio para el uso de métodos de detección óptica.

1.3.3 APLICACIONES DE LA MICROFLUÍDICA

La microfluídica se ha convertido en una tecnología clave de integración en el desarrollo de muchas compañías dedicadas a las ciencias de la vida [Gustin, 2007]. El principal mercado de la

microfluídica continua siendo el estudio y desarrollo de nuevos fármacos debido especialmente a las ventajas que ofrece el aumento del número de análisis realizados en paralelo y la disminución del tiempo y los costes de los mismos. Los dispositivos microfluídicos están siendo hoy en día comercializados tanto por pequeñas y medianas empresas como por grandes multinacionales. Esto significa que en un futuro inmediato formarán parte indispensable de las tecnologías necesarias para llevar a cabo cualquier tarea ya sea en investigación como en tratamientos y diagnósticos. El crecimiento más inmediato de esta tecnología se produce en el campo de los diagnósticos. La microfluídica ofrece una ventaja muy competitiva basada en la posibilidad de realizar análisis automatizados y descentralizados. El crecimiento de mercado de los componentes microfluídicos se muestra en la Figura 21. Podemos ver como para el año 2014 los componentes microfluídicos aplicados en diagnóstico clínico han alcanzado ganancias significativas de más de 3 B\$.

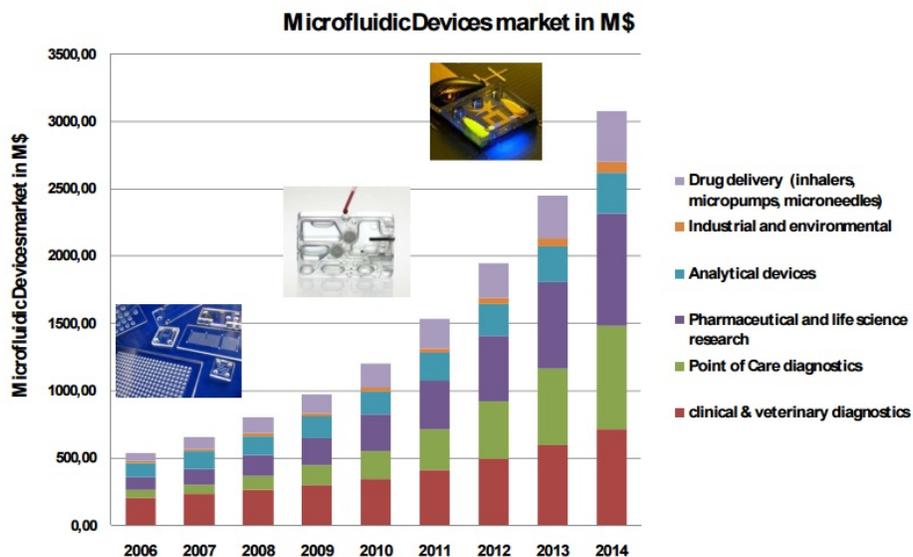


Figura 21. Mercado para los productos microfluídicos en el período correspondiente a los años 2006-2014 (M\$). [Gustin, 2007]

Industrias del campo de la diagnosis están incluyendo la microfluídica como una de sus estrategias para su crecimiento y desarrollo. De hecho, la microfluídica se ha identificado claramente como una tecnología que permite dar soporte al desarrollo en el mercado de la biología molecular.

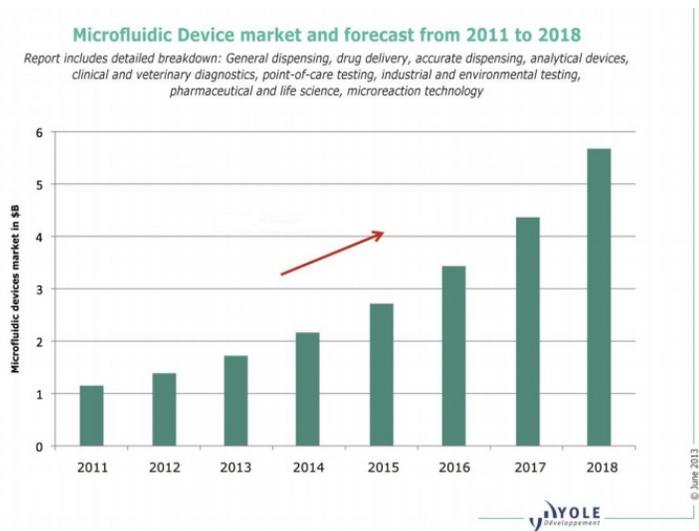


Figura 22. Proyección del mercado de los dispositivos microfluídicos aplicados en ciencias de la salud [Roussel, 2013].

Hoy en día podemos decir que la microfluídica tiene un protagonismo importante, hasta el punto que compañías de alta tecnología están empezándose a interesar por este campo, posicionadas en el concepto de industrialización de dispositivos con soluciones prometedoras como, por ejemplo, chips microfluídicos para el suministro de fármacos, para la diagnosis clínica y el estudio celular, que constituyen una evolución y mejora del mercado del diagnóstico clínico en general. De hecho, se estima que para el año 2018 la microfluídica domine el mercado de las ciencias de la salud alcanzando ganancias que alcanzan los 5.7 B\$. (Ver Figura 22).

1.3.3.1 "LAB ON-A-CHIP"

Entre los dispositivos microfluídicos es el "lab on a chip" (LOC) el que tiene la mayor aplicación en diversas áreas, especialmente de la salud. Consiste en un dispositivo que integra una o varias funciones propias de un laboratorio en un único chip cuyas dimensiones van desde solo unos milímetros hasta unos pocos centímetros cuadrados. Un lab-on-a-chip permite el manejo de volúmenes de fluidos extremadamente pequeños, incluso más bajo del orden de picolitros, siendo una herramienta fundamental para el avance de la microfluídica [Whitesides, 2006]. Los dispositivos lab-on-a-chip son un subconjunto de los dispositivos micro electro mecánicos conocidos como MEMS (Micro electro mechanical Systems) y, a veces también, son indicados como "sistemas de micro análisis total" (μ TAS). Sin embargo, se considera estrictamente "Lab-on-a-chip", el escalamiento de procesos únicos o variados bajo el formato de un chip.

Profundizando en el origen de los términos "lab-on-a-chip" y " μ TAS", el concepto " μ TAS" fue introducido y desarrollado a partir de la modificación del concepto de sistema de análisis total

(TAS) mediante la disminución del escalado e integración de sus múltiples etapas (inyección, reacción, separación, detección) en un único dispositivo, dando lugar a un sistema de prestaciones similares a un sensor con tiempo de respuesta rápido, bajo consumo de muestra, funcionamiento in situ, y alta estabilidad [Manz y col, 1990; Manz y Eijkel, 2001]. Posteriormente, se introdujo el término “lab-on-a-chip” para aunar el hecho de que en estos dispositivos no sólo se podían llevar a cabo tareas analíticas sino también otras tales como la síntesis de compuestos y el control de reacciones químicas [De Mello, 2006] Actualmente, cada uno de los términos mencionados anteriormente se utiliza de manera indistinta.

Los lab-on-a-chip son dispositivos complejos fabricados con técnicas de nanoingeniería. De acuerdo con los principales laboratorios que han desarrollado esta tecnología, los lab-on-a-chip contendrán millones de nanodispositivos que trabajarán de forma conjunta y coordinada para llevar a cabo su cometido. Los lab-on-a-chip son fabricados de manera tal que en áreas de pocos centímetros se tengan las funciones de un laboratorio en un solo chip con canales, cámaras de difusión bombas, válvulas y mucho más, con capacidad de manejar volúmenes de fluidos y muestras pequeños [Hong y col, 2003]. Es por ello que su desarrollo va en aumento.

Los primeros dispositivos de este tipo se consiguieron a principio de los noventa donde se transfirieron procesos de electrocinética a dispositivos fabricados con tecnología de microsistemas. El movimiento de los fluidos era producido por electroósmosis, es decir, se producía el movimiento de un líquido polar aplicando un campo eléctrico. Con este dispositivo se consiguió la separación de partículas fluorescentes en un chip [Manz, 1992; Jacobson y col, 1994a] y de aminoácidos marcados con partículas fluorescentes [Harrison y col, 1993; Jacobson y col, 1994b] por electroforesis capilar. En estos dispositivos no es posible trabajar con muestras puras de principio a fin, debido a que la presencia de partículas que puedan estar presentes en una muestra real podrían obturar el microcanal o quedarse adheridas a las paredes del mismo. La limitación que presentan los sistemas que utilizan electroósmosis para desplazar fluidos se encuentra en su uso ya que sólo pueden ser utilizados con fluidos polares. Por ello, en otros casos se aplica presión para inducir el movimiento en algunos dispositivos [Mcenery y col, 1999]. En los dispositivos LOC más actuales ya se emplean elementos que ayudan en gran medida al desplazamiento de los líquidos como lo son micro-bombas o micro-válvulas.

El objetivo del diseño de un lab-on-a-chip requiere la consideración de algunos aspectos importantes en su fabricación y funcionamiento por lo que pueden presentar desventajas cuando se intenta implementar para otros propósitos. Las técnicas de manipulación de partículas, el diseño de la geometría de los electrodos, las dimensiones de las sondas, el volumen del flujo, el tamaño de la muestra son algunos de estos elementos que se consideran característicos en cada lab-on-a-chip diseñado. Estas unidades están compuestas por sistemas microfluídicos, micromecánicos y nanosensores y son diseñados para manipular volúmenes del orden de los microlitros, nanolitros y hasta picolitros con el objetivo de aplicarlos en la industria médica, la biotecnología, la química y la bioingeniería. Con ellos se reduce significativamente los tiempos de análisis hasta segundos y permite explorar posibles fenómenos que no son posibles o evidentes con dispositivos tradicionales. Estos nuevos fenómenos como por ejemplo el desarrollo de nuevas reacciones químicas, junto con la

fabricación de nuevos micro instrumentos conducen a nuevas aplicaciones en química, medicina o bioingeniería.

1.3.3.1.1 Aplicaciones recientes y futuras de los LOC's

La posibilidad de miniaturización, junto con sus otras ventajas, hace de este tipo de sistemas, un dispositivo portátil que facilita el proceso y estudio in situ de análisis de muestras de fluidos corporales, evaluación y desarrollo de nuevos fármacos, estudios celulares etc., en general diversos aspectos importantes en las ciencias de la salud. De igual forma, estos dispositivos pueden ser usados para tratamiento de aguas, en la industria agro-alimentaria, el sector militar y espacial entre otros. Estos dispositivos hoy en día son diseñados con diferentes propósitos y con diferentes técnicas para el manejo de muestras.

Las diferentes aplicaciones de los lab-on-a-chip se han clasificado de acuerdo a los siguientes criterios:

➤ Lab-on-a-chip para manejo de fluidos

Los sistemas microfluídicos son dispositivos que manipulan fluidos a escalas del orden de los nanolitros con precisión controlada. Estos sistemas emergen en los años 80 y han sido utilizados en el desarrollo de cabezales de impresión, chips de ADN, micropropulsión, tecnologías microtérmicas y en la tecnología de los lab-on-a-chip [Stone y col, 2004]. Un sistema típico lab-on-a-chip microfluídico consiste básicamente de tres elementos: un dispositivo microfluídico para procesar la muestra, un microsensor detector y, finalmente, un sistema de control y salida.

En las ciencias de la salud ya se han diseñado lab-on-a-chip para el análisis de muestras de sangre [Tai y Zheng, 2004], análisis de la cinética de fluidos integrados con técnicas complejas como resonancia magnética nuclear [Wensenk y col, 2005] y análisis de fluidos biológicos usando espectrofotometría [Minas y col, 2005]. Son empleados hoy en día con grandes proyecciones en el desarrollo y el estudio de medicamentos [Dittrich y Manz, 2006; Weigl y col, 2003]. Se han fabricado dispositivos microfluídicos en la búsqueda y descubrimiento de nuevos fármacos así como para analizar los ya existentes.

La National Aeronautics and Space Administration (NASA) ha diseñado un dispositivo de detección de sustancias químicas y biológicas a bordo de una estación espacial, llamado Lab-on-a-chip Application Development Portable Test System (Locad-PTS), que ha sido probado en investigaciones simuladas en el manejo de fluidos en un ambiente de gravedad cero, en el monitoreo de la contaminación biológica, en el transporte de formas de vida microbacteriales encontradas en ambientes extremos manteniéndolas en condiciones óptimas para el estudio, y también en la detección de moléculas lípidas y proteínas. De igual forma, se han diseñado dispositivos con técnicas perfeccionadas en el manejo de fluidos para determinar la frecuencia de reacciones químicas [Ajdary y col, 2006].

➤ Lab-on-a-chip para manipulación de partículas

Otra aplicación del lab-on-a-chip ha sido la manipulación de partículas inorgánicas, tales como esferas de poliestireno, polímeros y proteínas. Básicamente, los experimentos han consistido en observar el comportamiento de las muestras cuando ha sido aplicado un campo electromagnético en algunos casos combinados con otros efectos como plasmones [Lenshof y Laurell, 2010]

➤ Lab-on-a-chip para separación y clasificación de partículas

Los lab-on-a-chip han sido también diseñados no sólo para observar el comportamiento de una población de partículas sino para lograr una clasificación de acuerdo a ciertas características. Se ha conseguido realizar separaciones binarias utilizando estos dispositivos, es decir, es posible separar una población en dos grupos o en fracción de varias poblaciones [Hughes, 2002]. Para proveer información cuantitativa en la retención de partículas se ha diseñado un dispositivo que ejecuta una separación sistemática de cuentas de poliestireno y eritrocitos (células de la sangre) [Auerswald y Knapp, 2003]. Se han realizado simulaciones de clasificadores de partículas en función de la geometría de los electrodos comparando diferentes configuraciones [Gray y col, 2004]. Otros trabajos han consistido en poder inmovilizar partículas en áreas definidas del lab-on-a-chip donde el número de partículas inmovilizadas se puede determinar por sus señales de fluorescencia [Wakizaka y col, 2004].

➤ Lab-on-a-chip para manipulación de células, bacterias y virus

Los micro sistemas lab-on-a-chip ofrecen nuevas opciones para el control y manejo de células pues son sistemas en los que pueden integrarse componentes fluidicos, ópticos, electrónicos y biológicos, dando lugar a la creación de nidos biológicos [El-Ali y col, 2006]. Por ello, estos dispositivos han encontrado su espacio en diversos campos de la ciencia, como puede evidenciarse en la cantidad de trabajos realizados en las áreas de las ciencias de la salud, farmacéutica y la química y en los diferentes desafíos para los equipos de investigación dedicados a este fenómeno [Craighead, 2006]. Se pueden encontrar numerosos ejemplos fabricados para procesar y detectar células, proteínas, ADN o pequeñas moléculas [Andersson y Berg, 2004; Graham, 2005; Mouradian, 2002].

Se han realizado investigaciones donde se ha diseñado un sistema microfluídico capaz de fraccionar una población de células vegetales en suspensión en subpoblaciones usando arreglos de microelectrodos que suministran un campo eléctrico no uniforme [Lapizco y col, 2004]. Otro dispositivo diseñado consiste en un arreglo de microelectrodos que atrapa miles de células sencillas de mamíferos [Lapizco y col, 2005]. El efecto de la geometría de los electrodos también ha sido estudiado para comprobar la efectividad en la separación de células [Sanchis y col, 2007] según el diseño del dispositivo. Los aisladores son otra propuesta en lugar de arreglos de microelectrodos, por lo que se han diseñado dispositivos basados en ellos para la separación de bacterias vivas y muertas y, de esta manera, concentrar microbios localizados en el agua [Prasad y col, 2004 a,b]. Otros trabajos se han dedicado a la caracterización de células humanas y bacteriales [Do y Ahn, 2008]. Dentro de las aplicaciones usando células vivas se destaca el estudio de células de manera individual, pudiendo combinar

e integrar sofisticadas técnicas con los dispositivos para realizar el estudio “in situ” e “in vivo” de unidades celulares y sus componentes [Irawan y col, 2006; Craighead, 2006].

La tecnología de los lab-on-a-chip, la miniaturización de los instrumentos convertidos en dispositivos nanométricos, junto con las técnicas empleadas para la manipulación de las muestras, promete un amplio espacio de aplicaciones [Kopf-Sill, 2002; Gardeniers y Van den Berg, 2004]. Diferentes compañías fabricantes de los lab-on-a-chip esperan incursionar en campos tan novedosos como la aeroespacial, la industria petroquímica, la agricultura, el descubrimiento de medicamentos y otras aplicaciones en síntesis químicas [Stone y col, 2004]. Igualmente, se desarrollan dispositivos lab-on-a-chip para el monitoreo de nutrientes en aguas para la agricultura y horticultura, el control de la calidad de los alimentos y el control de procesos en la industria química [Curtis, 2009]

La tecnología de los lab-on-a-chip emerge rápidamente en el campo de la salud. Las investigaciones recientes están orientadas al desarrollo de estos dispositivos para lograr la prevención de enfermedades y el diagnóstico en tiempo real. En la actualidad, especialmente en los países menos desarrollados, hay ciertas demandas insatisfechas en lo que a salud se refiere: como los diagnósticos tardíos que imposibilitan o retrasan las medidas preventivas, los altos costos en tratamientos y los efectos secundarios. Se espera entonces desarrollar esta tecnología con el propósito de prestar un servicio de salud más efectivo, a bajo costo y con resultados confiables.

En particular, el diagnóstico de cáncer, es en ocasiones imposible de dar antes de que este ya se encuentre ampliamente extendido, lo cual un diagnóstico precoz ha sido un desafío a la ciencia de la salud y es aquí donde se espera lograr un importante avance, empleando dispositivos lab-on-a-chip. Hoy en día, están en proceso de implementación dispositivos lab-on-a-chip para el diagnóstico de diversos tipos de cáncer, existiendo plataformas ya avanzadas para el cáncer oral [Mauk y col, 2007; Ziober y col, 2008]. Sin embargo, la investigación en este sentido no ha cesado, y el principal objetivo de un diagnóstico precoz de la enfermedad empleando una simple plataforma, aún no ha sido alcanzado.

Esto nos llevó, en el desarrollo de esta tesis doctoral a pensar en una nueva plataforma optofluídica basada en nanosensores plasmónicos, para lograr la detección de proteínas que circulan en diferentes entornos clínicos. Nuestro principal reto es el uso de esta plataforma en la detección de marcadores tumorales asociados a diferentes cánceres. En lugar de operar en aire, las mediciones se realizan en un medio líquido, que es más atractivo biológicamente hablando, y permite el confinamiento de las biomoléculas en una región de interés, facilitando así la detección de moléculas en volúmenes de muestras más pequeños. El volumen de fluido usado en los microcanales es pequeño (los nanolitros contenidos en una gota de fluido), como consecuencia las cantidades de reactivos utilizados para preparar el sensor y la muestra (sangre del paciente) que se utilizan se reduce, lo que significa una ventaja significativa para reactivos caros y/o para aquellas muestras biológicas difíciles de adquirir. Además, la miniaturización el dispositivo y el diseño que se propone ofrecen la posibilidad de detección in situ en los sistemas biológicos, así como el rendimiento de varios ensayos diferentes sobre el mismo chip (paralelización). Estas son algunas de las características que podríamos mencionar de nuestra plataforma, lo que permite situarla como una herramienta con un futuro

prometedor en el área de diagnóstico. En los siguientes apartados se detallará el desarrollo y la puesta en marcha de la plataforma y los resultados preliminares obtenidos.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

Capítulo 2

Materiales y Métodos

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DESARROLLO DE LA PLATAFORMA OPTOFLUÍDICA PARA LA DETECCIÓN DE MARCADORES TUMORALES

2.1.1 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE NANOESTRUCTURAS

En general, los métodos de fabricación de nanopartículas metálicas pueden ser clasificados en dos procesos: aproximación bottom-up, la cual está relacionada con métodos de química húmeda (como por ejemplo auto ensamblajes químicos, crecimiento cristalino a nanoescala, síntesis molecular y biológica y polimerización) y aproximación top-down, la cual contempla procesos de mayor ingeniería como litografía a nanoescala, nano-impresión y nano-manipulación (a nivel de átomos y moléculas). Las ventajas de los métodos basados en la síntesis vía húmeda son diversos; bajo coste del proceso, alta posibilidad de producción a gran escala, obtención de gran variedad de formas (esferas, cilindros, estrellas, cubos, prismas, etc.), así como un control del tamaño (cien veces por debajo de la escala de nm), su monocristalinidad y que tienen la propiedad que al ser utilizadas sin ser enlazadas a un sustrato pueden ser empleadas en aplicaciones in vivo como en administración de fármacos a nivel celular y terapia foto-térmica [Huang y col, 2008]. Las desventajas asociadas a estos procesos están relacionadas con la alta polidispersión de formas y tamaños que se generan después de la síntesis (debido al poco control que se tiene en los procesos de síntesis), así como también a la limitación y la dificultad de ubicarlos de manera ordenada y precisa sobre un determinado sustrato. Hoy en día, la inmovilización de coloides sobre sustratos empleando diferentes químicas de superficies es altamente utilizada [Sanz y col, 2012; Sanz y col, 2010, Kreuzer y col, 2008], aunque el arreglo obtenido sobre el sustrato es completamente aleatorio. Recientemente, se ha conseguido un control más preciso en la deposición de nanopartículas coloidales utilizando moldes para la organización de los coloides sobre el sustrato. No obstante, estas etapas añaden más complejidad al proceso global de fabricación [Malaquin y col 2007].

Los procesos basados en la litografía están generalmente limitados por la resolución de los equipos utilizados para ese fin. Por ejemplo, la litografía óptica estándar es un proceso limitado donde una fuente de luz ultravioleta (fuente que escribe) provee una resolución entre 0.5-1 μm que no es suficiente para la fabricación de nanopartículas. De todos los métodos que podemos encontrar en el mercado, las técnicas disponibles con la mayor resolución son las basadas en la litografía de haz de electrones (EBL) y la litografía de haz de iones enfocados (FIB- Focused -Ion Beam). Sin embargo, hoy en día también se dispone de otras técnicas de coste más reducido y que permiten una fabricación paralela y a gran escala de nanoestructuras sobre un sustrato determinado. Estos métodos están basados en el empleo de microesferas

que se auto-alinean sobre el sustrato creando patrones para la posterior evaporación del material obteniendo finalmente las nanoestructuras. Esta técnica se llama litografía de nanoesferas (NL). Esta litografía de nanoesferas, puede producir, entre otras, estructuras triangulares ordenadas y de manera controlada [Haynes y Van Duyne, 2001], así como nanohoyos [Jonsson y col, 2010], nanodiscos y nanoanillos [Aizpurua y col, 2003]. La desventaja de esta técnica radica en el hecho de la limitación proveniente del tamaño de las microesferas utilizadas así como la flexibilidad de las formas obtenidas y lo complejo del proceso para controlar el ordenamiento de las microesferas sobre el sustrato. Una de las técnicas desarrolladas más recientemente en este sentido es la litografía de nano-impresión, que consiste en la utilización de un sello, el cual es transferido bajo presión y calor sobre un sustrato cubierto por un polímero químico denominado “resist” sensible a estas condiciones donde queda plasmado el patrón y posteriormente bajo la remoción del exceso de este polímero se obtienen finalmente las nanoestructuras [Chou y col, 1996; Chou y col, 1997]. La desventaja de la técnica está justamente en la fabricación del sello ya que está limitado por la resolución de los equipos destinados para tal fin, así como también en los procesos de transferencia del patrón con el sello, donde pueden ocurrir deterioros del estampado.

La fabricación de estructuras plasmónicas manteniendo un control nanométrico del tamaño, forma, y arreglo espacial, se realiza normalmente empleando la litografía de haz de electrones (EBL), hoy en día considerada la técnica más flexible para este propósito siendo empleada tanto en investigación como a nivel de laboratorio. En este trabajo doctoral los sistemas de patrones de nanoestructuras empleados han sido realizados por el Dr. Srdjan Acimovic empleando la técnica de EBL, sin embargo, a continuación describiremos en detalle la técnica y el protocolo empleado para el mismo.

2.1.1.1 Litografía de haz de electrones (EBL)

La litografía por haz de electrones (Electron Beam Lithography, EBL) se ha consolidado como una de las técnicas más eficaces que permiten definir motivos en el rango nanométrico. Su implantación ha permitido la nanofabricación de estructuras y dispositivos para su uso en el campo de la nanotecnología y la nanociencia. Además, el uso de la EBL para el desarrollo de un gran número de nanoestructuras, nanodispositivos y nanosistemas ha sido, y continúa siendo, crucial para las aplicaciones de producción de máscaras, prototipaje o dispositivos discretos para la investigación fundamental. Su éxito radica en la alta resolución, flexibilidad y compatibilidad de la EBL con otros procesos de fabricación convencionales.

La técnica está basada en un barrido y una irradiación enfocada bastante precisa de un haz de electrones expuesto sobre un sustrato conformado por un polímero fotosensible llamado “resist”. Debido a la absorción de la energía (proveniente de los electrones) por parte del resist, este sufre cambios a nivel estructural [Cui, 2005]. Si el polímero localmente expuesto, puede ser eliminado fácilmente por un solvente (que se conoce como sustancia reveladora o revelador) entonces el resist es denominado positivo. Si, por el contrario, el polímero no expuesto es el disuelto por el revelador entonces es llamado resist negativo. La resolución de

la técnica alcanza los 10 nm, sin embargo, el proceso está limitado por el tamaño del haz, el voltaje empleado para la aceleración de los electrones y por la química empleada. Dejando a un lado el coste y el tiempo que consume la técnica en la nanofabricación, EBL ofrece unas ventajas y alta precisión especialmente en cuanto al control de distribución de nanoestructuras sobre un sustrato metálico.

En la óptica de plasmones, muchas de las aplicaciones basadas en EBL llevan a cabo procedimientos empleando polímeros positivos (tales como polimetilmetacrilato PMMA) y, además, van acompañados de técnicas de remoción basadas en el grabado con iones reactivos RIE (Reactive Ion etching). Esta técnica consiste en irradiar un plasma de iones químicamente reactivos para remover material contenido en un sustrato. Este plasma es generado bajo presiones muy bajas (condiciones de vacío) y empleando un campo electromagnético, lo que hace que la alta energía que contienen los iones interactúe con el sustrato reaccionando con él y removiéndolo.

Existen otros métodos de remoción del material en un sustrato por medios químicos empleando un disolvente químico donde el polímero es altamente soluble (este proceso es conocido como lift-off). Generalmente, en un proceso de lift-off el polímero se disuelve en un solvente (acetona, diclorometano, diclorobenceno, depende del polímero empleado) bajo condiciones especiales de temperatura, agitación, sonicación y tiempo del revelado. Sin embargo, en comparación con el RIE el proceso no es tan controlado y las estructuras generadas no siempre presentan la calidad final deseada. Sin embargo, a pesar de las mejoras y ventajas observadas en la técnica, ésta presenta algunas limitaciones. La primera limitación está relacionada con el proceso de lift-off en sí mismo, que como ya se mencionó anteriormente, limita la calidad final de la muestra. El poco control que se tiene del proceso de lift-off, restringe notablemente la reproducibilidad de las estructuras y es bastante deficiente en la definición y resolución de muestras con detalles como por ejemplo de nanodímetros con separación menores de 15 nm [Acimovic, 2013]. La otra desventaja viene dada por el proceso de evaporación del material. Las nanoestructuras obtenidas pueden verse distorsionadas (y por ende el resultado final), si hay ligeras variaciones de la orientación de la muestra dentro del evaporador. Evaporaciones donde la muestra no se encuentre vertical a la fuente de evaporación pueden producir una alteración de la forma de la estructura. Por ejemplo, la exposición de nanodiscos puede resultar en elipsoides variando el ángulo de incidencia en la muestra durante el proceso de evaporación [Zhao y col, 2011]. Este efecto se pronuncia mucho más para estructuras como nanodímetros ya que presentan áreas de acercamiento entre estructuras bastante reducidas. Para evitar este tipo de limitaciones relacionadas con el proceso de lift-off y evaporación se puede emplear la litografía de haz de electrones utilizando un polímero negativo [Acimovic, 2013].

En esta tesis doctoral, las estructuras que sirvieron de base para la fabricación del biosensor que forma parte de la plataforma LSPR desarrollada fueron realizadas empleando EBL sobre un polímero negativo combinado con un proceso final de RIE.

2.1.1.2 Litografía de haz de electrones (EBL) empleando un fotopolímero negativo y combinado con grabado de iones reactivos (RIE)

Las estructuras empleadas en este trabajo de investigación doctoral fueron realizadas como lo hemos mencionado anteriormente por el Dr Srdjan Acimovic, empleando un proceso nuevo de fabricación basado en la litografía de haz de electrones con un polímero negativo. Esta modalidad en litografía ha demostrado que presenta grandes mejoras en cuanto a reproducibilidad en las muestras así como también en la resolución que se puede alcanzar. El proceso general se muestra en la Figura 23. Inicialmente, el sustrato que contiene el fotopolímero es irradiado. Posteriormente, la parte no expuesta del “resist” se elimina mediante un proceso de lift-off (Figura 23B), quedando de esta manera una máscara que protege el oro por debajo de la misma (creando así los patrones de nanoestructuras). Después, un plasma de argón es irradiado sobre el sustrato empleando RIE para eliminar el oro adyacente a la máscara (Figura 23C). Finalmente, el proceso termina irradiando un plasma de oxígeno para eliminar la máscara del “resist” quedando finalmente el arreglo de nanoestructuras finales sobre el sustrato.

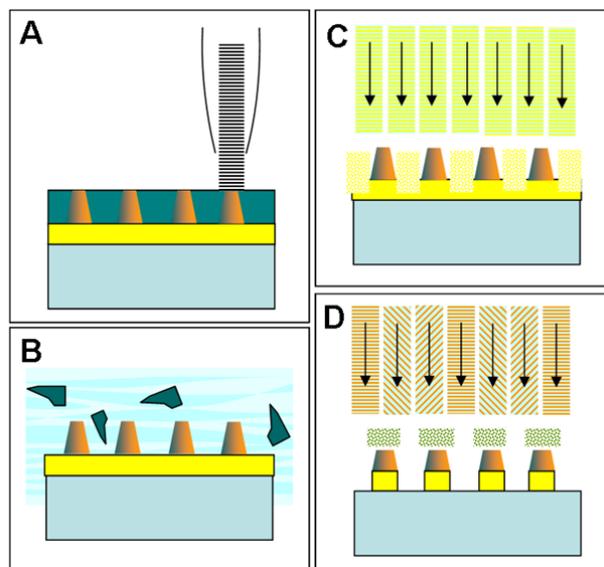


Figura 23. Litografía de haz de electrones con polímero negativo combinado con RIE. A) Grabado del patrón de nanoestructuras sobre el polímero negativo empleando EBL. B) Revelado del polímero (se remueve las áreas que no fueron irradiadas, C) Eliminación del oro que no está cubierto por la máscara de polímero, D) Eliminación de la máscara de polímero para obtener finalmente el patrón nanoestructurado.

Este método, descrito de manera general, presenta grandes ventajas ya que la resolución está sólo limitada por la resolución del EBL y su estabilidad. Por lo tanto, las estructuras obtenidas son en líneas generales más uniformes y con un control más detallado (se puede llegar a obtener detalles en el patrón nanoestructurado como, por ejemplo, un ajuste más fino y

controlado en la distancia entre estructuras). En la Figura 24 se muestra una fotografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de nanodímeros obtenidos mediante esta técnica y la comparación con nanodímeros obtenidos empleando otra modalidad de la técnica donde se emplea un polímero positivo. Se observa claramente que las estructuras presentan diferencias en la resolución y en la forma que adquieren con cada técnica empleada. El empleo de un polímero negativo les da una forma más suavizada y controlada a las estructuras. Se observa también que la separación entre partículas empleando un polímero negativo, se resuelve con mejor precisión.

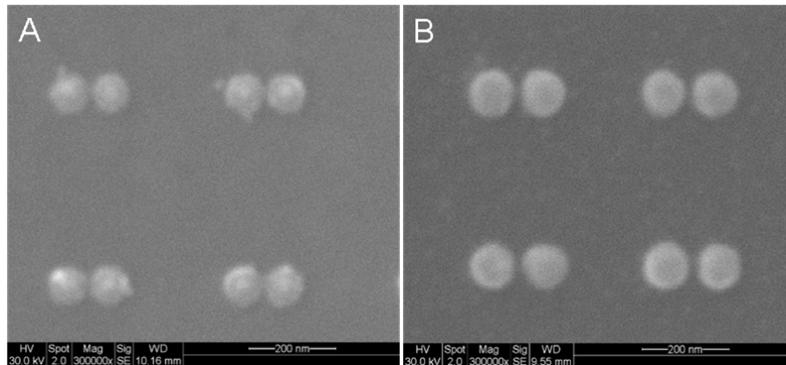


Figura 24. Imágenes SEM de nanodímeros obtenidos por A) polímero negativo (PMMA) combinado con un proceso de lift-off y B) empleando un polímero negativo y RIE en el proceso de fabricación.

Mediante esta técnica se realizaron igualmente Nanodiscos y Nanocilindros obteniendo gran precisión y reproducibilidad (Figura 25). Tras varias pruebas de sensibilidad y evaluando los resultados obtenidos con ambos sistemas nanoestructurados (como veremos más adelante), son los nanocilindros los que fueron finalmente seleccionados como sensores para formar parte del conjunto que integra la plataforma opto-fluídica presentada en este trabajo.

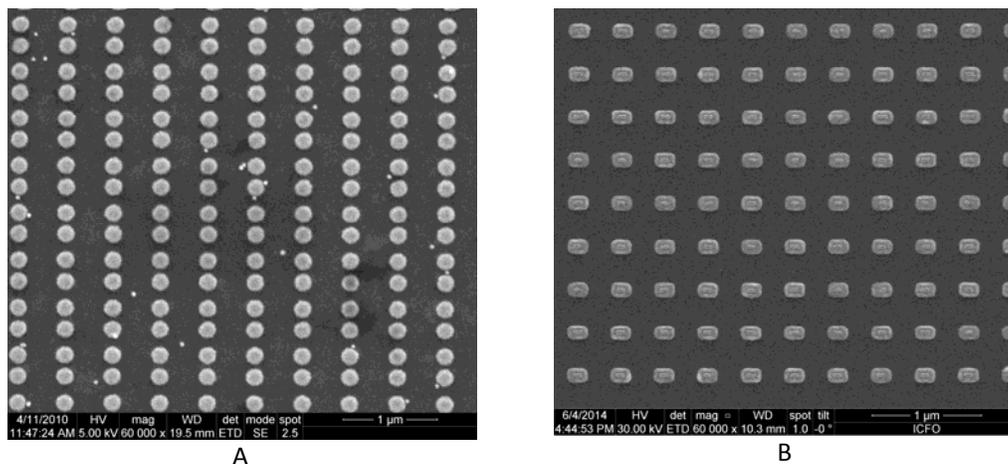


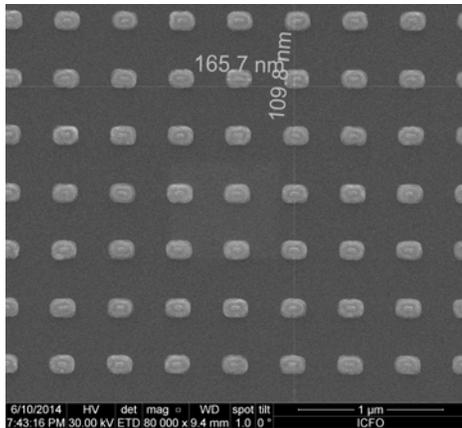
Figura 25. Nanoestructuras obtenidas mediante EBL empleando un polímero negativo en combinación con RIE. A) Nanodiscos de oro, B) Nanocilindros de oro.

2.1.1.2.1 Protocolo de Fabricación de los Nanocilindros de oro empleados como elementos sensores en la detección de analitos empleando la plataforma optofluídica.

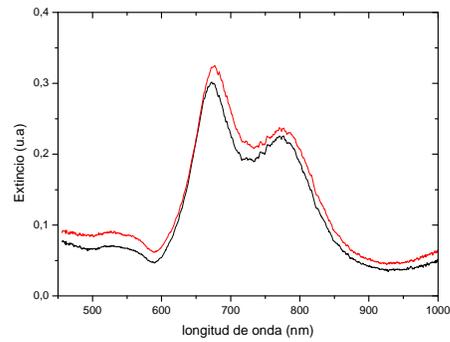
Una vez descrita en detalle la metodología empleada para la fabricación de las nanoestructuras, a continuación describiremos el protocolo empleado en esta tesis doctoral para la fabricación de los Nanocilindros de oro que conforman el elemento sensor de la plataforma optofluídica desarrollada y aplicada en la detección de marcadores tumorales. Este protocolo fue previamente desarrollado en el grupo de investigación del ICFO, PNO (plasmon Nano-optics group) por el Dr Srdjan Acimovic en el marco de su trabajo doctoral.

El sustrato utilizado para la fabricación de nanocilindros de oro es vidrio de tamaño 25x25 mm y grosor de 0.4 mm. Primero, los sustratos de vidrio son cuidadosamente tratados y limpiados mediante el empleo de ultrasonidos. El vidrio es sumergido en soluciones de detergente disuelto en agua desionizada (con pH neutro), agua desionizada, acetona y finalmente isopropanol en ciclos entre 5 y 10 minutos cada uno y secados empleando nitrógeno de alta pureza. Una vez el sustrato está limpio, se evaporan 2 nm de una capa delgada de titanio empleando un haz de electrones (electron beam evaporation) con la finalidad de ayudar a la fijación de la subsecuente capa de oro de las cuales estarán hechas las nanoestructuras. Posteriormente, se depositan 50 nm de oro sobre el anterior sustrato mediante evaporación térmica a alto vacío (estodetermina la altura de las nanoestructuras). Una vez las capas están depositadas sobre el sustrato, se procede a colocar la capa del polímero mediante una técnica de recubrimiento por rotación y esparcimiento del líquido, conocido como "spin coating". Se emplea un polímero negativo AR-N 7500.08 (Alresist Germany) sometido a 8000 rpm durante 60 segundos para obtener una capa de aproximadamente 80 nm sobre el sustrato de oro (optimizado por la compañía manufacturadora del producto). El sustrato se coloca después en una placa de convección a 85 °C durante 30 minutos para ayudar a fijar el polímero sobre el sustrato. Finalmente, la muestra es expuesta al haz de electrones para el grabado del patrón empleando un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 acoplado con un equipo de litografía Raith Elphy Plus, utilizando un voltaje continuo de 30 kV.

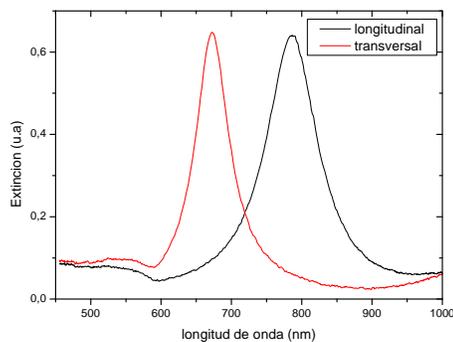
Una vez la exposición ha finalizado, la muestra ha de ser revelada. Para ello, se emplea una mezcla en agua desionizada (4:1) del revelador ARM 300.47, sumergiendo el sustrato en esta solución por varios minutos (proceso de lift-off). Posteriormente, la muestra se sumerge en agua para detener el proceso de revelado. La formación de la máscara puede ser observada empleando un microscopio óptico. Después, el sustrato se calienta en el horno a 120 °C durante 1 hora. Una vez es enfriado el sustrato, éste es sometido a un plasma de argón (bombardeo de iones de argón direccionados) durante 4 minutos empleando un PlasmaLab 100 (Oxford Instruments) para transferir el patrón a la capa de oro por debajo de la máscara, eliminando el oro que no ha sido protegido por ésta. Finalmente, un plasma suave isotrópico de oxígeno irradia el sustrato durante 1 hora, para la eliminación final de la máscara de polímero quedando así las nanoestructuras de oro finales sobre el vidrio.



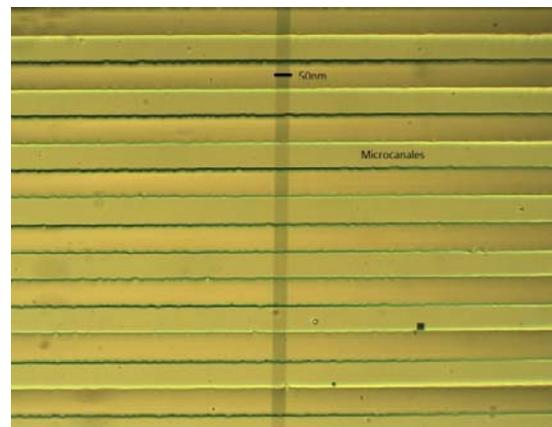
A



B



C



D

Figura 26. A) Imagen obtenida por SEM de un arreglo de nanocilindros de oro obtenidos mediante EBL, se observa en la imagen las dimensiones obtenidas para las nanoestructuras de oro. B) Espectro de extinción de los nanocilindros sin polarizar. C) Espectro de extinción polarizado linealmente para el modo transversal y longitudinal del plasmón característico de esta geometría con un máximo de absorción en 680 nm y 800 nm, respectivamente. D) Arreglo final de los sensores (nanoestructuras) ensamblado con la plataforma microfluídica.

EL resultado final del proceso es la obtención de arreglos periódicos de nanocilindros de oro que pasan a formar el elemento transductor de nuestro dispositivo opto-fluídico. En la figura 26A podemos observar una imagen obtenida por SEM ampliada con las dimensiones de las nanocilindros, así como también la caracterización óptica polarizada y no polarizada, donde se observan los modos del plasmón transversal y longitudinal correspondiente (Figura 26B y 26C, respectivamente). El tamaño individual de los nanocilindros está alrededor de 170x110 nm con una altura de 50 nm aproximadamente. El espectro de extinción de las estructuras en agua muestra un pico, correspondiente al modo longitudinal dipolar, entre 700-800 nm (dependiendo del tamaño) junto con el pico transversal característico para este tipo de sistemas ubicado en 680 nm. Para el propósito que se quiere (aplicar las nanoestructuras en biosensado) es importante seleccionar y mantener el pico longitudinal siempre en el mismo rango. Este pico es seleccionado por una correcta polarización de la luz incidente (paralela al

eje x) en la plataforma óptica empleada para la monitorización de los procesos. El área de colección es circular con un diámetro de 35 μm y el área total de los arreglos de nanoestructuras es un línea de tamaño 2 mm x 50 μm que atraviesa los canales de microfluídica donde las soluciones están en contacto con los sensores (más adelante se describirán más detalles al respecto). En la Figura 26D se muestra una imagen del arreglo final montado sobre la plataforma microfluídica.

2.1.2 FABRICACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DE LOS LAB-ON-A-CHIPS'S

2.1.2.1 Protocolo de Fabricación de los chips de microfluídica.

En esta tesis se utilizaron dos prototipos de chips de microfluídica. El primero de ellos, que se denominará chip de prueba, está conformado por canales rectos con un terminal en forma de "Y", y en donde el fluido viene controlado exclusivamente por los sistemas de bombeo convencionales (bombas peristálticas, bombas para jeringas o presión de aire), sin integración de ningún elemento que permita direccionar el fluido (válvulas). El segundo prototipo, presenta un diseño más complejo e involucra elementos como válvulas, que permiten controlar y direccionar el flujo del líquido dentro del mismo, así como también un complejo ensamblaje del sistema para que pueda operar correctamente. Ambos chips fueron elaborados en PDMS bajo la técnica de "soft-lithography". Un molde con el diseño es elaborado y los chips son obtenidos realizando réplicas sobre este molde.

Es importante mencionar que la fabricación y diseño de los dispositivos microfluídicos fueron inicialmente desarrollados por el grupo del Dr. Sebastian Maerkl (EPFL, Suiza), en particular por el Dr. Jose García Cordero, como cooperación en los trabajos realizados en el marco del proyecto europeo SPEDOC. Posteriormente la tecnología fue transferida y los dispositivos fueron elaborados por investigadores del grupo PNO en el ICFO.

En general, los chips de microfluídica empleados en este trabajo fueron elaborados siguiendo estos pasos generales:

1. Diseño y Fabricación de los moldes.
2. Elaboración de los chips en PDMS
3. Creación de las salidas y entradas de los microcanales
4. Unión de los chips sobre el sustrato

En la Figura 27 se muestra un esquema general de estos procesos. A continuación describiremos brevemente cada proceso y la metodología aplicada detrás de los mismos.

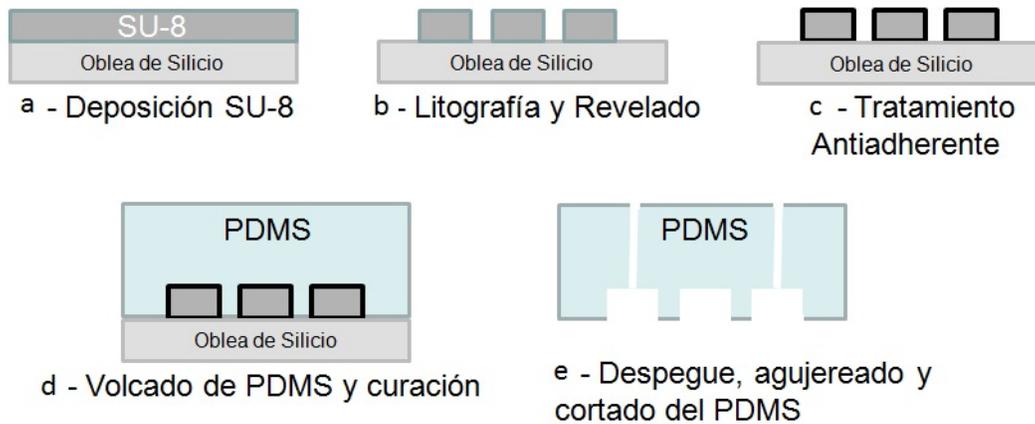


Figura 27. Pasos de elaboración de chip de microfluídica. a y b) Empleando el polímero SU-8 el molde es creado por irradiación UV, c) el molde recibe un tratamiento antiadherente y d) la mezcla de PDMS es vertida sobre el molde. e) Finalmente el chip es desprendido con la réplica del diseño.

2.1.2.1.1 Fabricación de los moldes para la elaboración de los chips de microfluídica

La litografía óptica convencional se ha empleado para la elaboración de las máscaras que servirán de base para la creación del molde final. Una vez el diseño es elaborado digitalmente (empleando algún programa de diseño avanzado, que permita un control fino y preciso de las medidas del mismo), se imprime una copia sobre una hoja de plástico transparente, mediante una impresión de gran calidad y resolución. Esta hoja es expuesta con luz ultravioleta sobre una oblea de silicio (previamente tratada con un polímero sensible a esta luz), donde finalmente el diseño es transferido a la oblea. Realizando un revelado el diseño final es finalmente obtenido sobre la oblea de silicio obteniendo así los moldes para la fabricación de los chips.

Específicamente, una capa delgada del fotopolímero SU8 ha sido empleada (SU8, Microchem, USA). Este fotopolímero se coloca sobre la oblea de silicio (limpio y seco) mediante spin-coating (Ver Figura 27a y 27b). El espesor de esta capa depende exclusivamente de las revoluciones empleadas en el proceso y, una vez expuestos a la luz, determinarán la altura del canal. Las demás dimensiones del diseño vienen dadas por la máscara elaborada en el plástico. La relación anchura-altura del canal en PDMS no deberá exceder 20:1, ya que se puede producir un colapso del canal [Xia y Whitesides, 1998]. Posterior a la irradiación, la oblea de silicio con el patrón se calienta para endurecer el diseño transferido y poder así realizar los chips de PDMS. El molde final podrá ser usado cuantas veces se requiera.

Esta técnica presenta importantes limitaciones relacionadas principalmente con la elaboración de las láminas que poseen el diseño. Las técnicas de impresión no poseen una resolución lo suficientemente óptima, lo que produce el pixelaje de la imagen, afectando en gran medida el diseño y en algunos casos el buen funcionamiento de los chips (sobre todo en aquellas áreas cuyas dimensiones requieren de una alta precisión). Por otro lado, las hojas de plástico utilizadas normalmente no son 100% transparentes, lo que conduce imperfecciones en el resultado final. Hemos empleado este método para la fabricación de los chips de prueba, cuyo diseño es muy sencillo (varios canales separados por cientos de μm) y no se requiere de una alta precisión de los mismos.

Sin embargo, estas limitaciones pueden ser solventadas empleando otras técnicas. Una alternativa es emplear directamente un láser que escriba el patrón o diseño sobre un polímero sensible a la irradiación. Esa técnica ofrece diseños con una alta resolución y un control preciso de las dimensiones del mismo. El único inconveniente está asociado a la disponibilidad de los equipos para realizar tal escritura láser. Los moldes que hemos empleado para el diseño complejo que integra nuestros chips de microfluídica fueron realizados por colaboradores externos (EPFL, Laussane, Suiza) empleando esta técnica.

2.1.2.1.2 Preparación del PDMS para la elaboración de los chips

Debido a la fuerte adhesión del PDMS con el sustrato de silicio, la superficie del molde es tratada con silanos antes de trabajar con el PDMS, de forma que se crea una capa antiadherente (ver Figura 27c). Para ello se deja evaporar unas gotas de Trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma Aldrich, Alemania) en la superficie de la oblea durante 15-45 minutos esperando a que se seque en una cámara desecadora. Este proceso ha de repetirse cada vez que se use el molde para la elaboración de nuevos chips.

Una vez que se ha creado la capa antiadherente sobre la superficie de la oblea se crea la mezcla del PDMS en un recipiente de plástico. Se empleó para la elaboración de los chips un kit de PDMS comercializado por la empresa Dow Corning (Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning, USA).

Dependiendo del chip a elaborar se emplean dos tipos de relación polímero base : agente curante:

- Para los chips más sencillos de prueba, se mezcla (fuertemente) una cantidad de 1:10 polímero base y el agente, hasta que la consistencia sea homogénea. Para evitar la formación de las burbujas durante el mezclado se introduce la mezcla dentro de una cámara de vacío y se desgasifica. Una vez la mezcla está lista, se vierte en un recipiente (normalmente protegido con papel aluminio para evitar adhesión del PDMS al mismo), en cuya base se encuentre la oblea con el diseño y se deja en el horno a 80 °C por 30 min.
- Para los chips utilizados cuyo diseño es más complejo, se requieren de dos capas de PDMS que posteriormente serán unidas. Una primera capa de PDMS contiene el

diseño de lo que hemos denominado “capa del control”, que está integrada por las válvulas que controlan la dirección del flujo dentro del chip; la segunda capa de PDMS contiene el diseño de los canales donde se encuentra el fluido, el cual hemos llamado “capa del fluido”. Para la elaboración de la capa de control se mezcla el polímero y el agente en una relación 5:1 y se emplea el procedimiento anteriormente descrito para los chips de prueba. Sin embargo, para la capa del fluido se emplea una relación 20:1 de la mezcla y se esparce sobre la oblea de silicio empleando un spin coating a 2200 rpm durante 25 seg para obtener así un grosor de 24 μm de la capa.

Una vez ya este curado el chip, el resultado de este proceso permite obtener un elastómero que es ópticamente transparente, aislante eléctrico, y químicamente inerte. Además, es compatible con los estudios biológicos ya que es impermeable al agua y no es tóxico para las células. Para poder usarlo basta con cortar un cuadrado del molde mediante un bisturí y desprender con cuidado el chip de la oblea. El proceso se describe de manera general en la Figura 27d.

2.1.2.1.3 Creación de la salida y entrada de los canales en el chip.

En lugar de usar conectores plásticos que ocupan gran volumen en la superficie del chip, se emplearon pequeños conectores de acero inoxidable cuyo diámetro (0.6 mm) encaja en los agujeros que se realizan en el chip para la entrada y la salida de los líquidos [Andrew, 2005]. Una vez que se han fabricado los chips, se emplea un montaje óptico casero para visualizar en el diseño las entradas y las salidas. Empleando una aguja especial y bajo presión mecánica, el PDMS es removido quedando el orificio donde se insertan los conectores metálicos. Estos conectores servirán a su vez de conexión entre el chip de PDMS y los cables donde el líquido es colocado para introducirlo en el dispositivo. Debido a la elasticidad del material, al introducir el conector metálico este queda sellado, de manera tal que no se producen ningún escape del líquido cuando este es introducido bajo presión por los canales correspondientes. Esta metodología constituye una herramienta valiosa en la elaboración de dispositivos microfluídicos complejos a gran escala [Melin y Quake, 2007; Thorsen y col, 2002]

Para el caso de los chips conformados por dos capas (chip que se utilizó en los experimentos de detección) se debe realizar un procedimiento diferente (Ver Figura 28).

Una vez el PDMS ha sido curado en el horno se realizan los agujeros en el chip que posee la capa de control (Figura 28b). Esta capa tiene unas entradas que permiten llenar de líquido (normalmente agua miliQ) a las válvulas de control. Estas válvulas son cerradas, es decir no poseen salida. Al ser expandidas las válvulas, por una presión externa, podrán obstaculizar físicamente el paso del líquido en la capa inferior (capa del fluido), más adelante se describirá en detalle su funcionamiento. Una vez las entradas han sido realizadas, se procede a unirlo con el segundo chip más fino que contiene los canales donde el líquido circula. Para ello se debe realizar una minuciosa alineación de ambos chips, de manera tal que las válvulas se sitúen en el lugar adecuado para así operar correctamente (cerrar y abrir el canal según convenga). De

no realizarse una adecuada alineación, el chip no tendrá un óptimo funcionamiento y no podrá ser empleado en la plataforma (ver Figura 28c). Una vez que la alineación se ha realizado y verificado, el sistema unido se calienta a 80 °C por 1 hora y 30 minutos para garantizar que el enlace entre ambas capas de PDMS se realice correctamente. Este proceso es crítico ya que si ambas capas no están unidas fuertemente se producirá un escape de los líquidos dentro del chip afectando en gran medida el ensayo. Al terminar este proceso se realizan finalmente los agujeros de entrada y salida en el conjunto, empleando el mismo procedimiento que hemos descrito anteriormente. De esta manera, el chip microfluídico está listo para ser enlazado con el sustrato donde se encuentran los sensores (ver Figura 28e). Se pueden realizar varios chips y almacenarlos hasta su posterior uso.

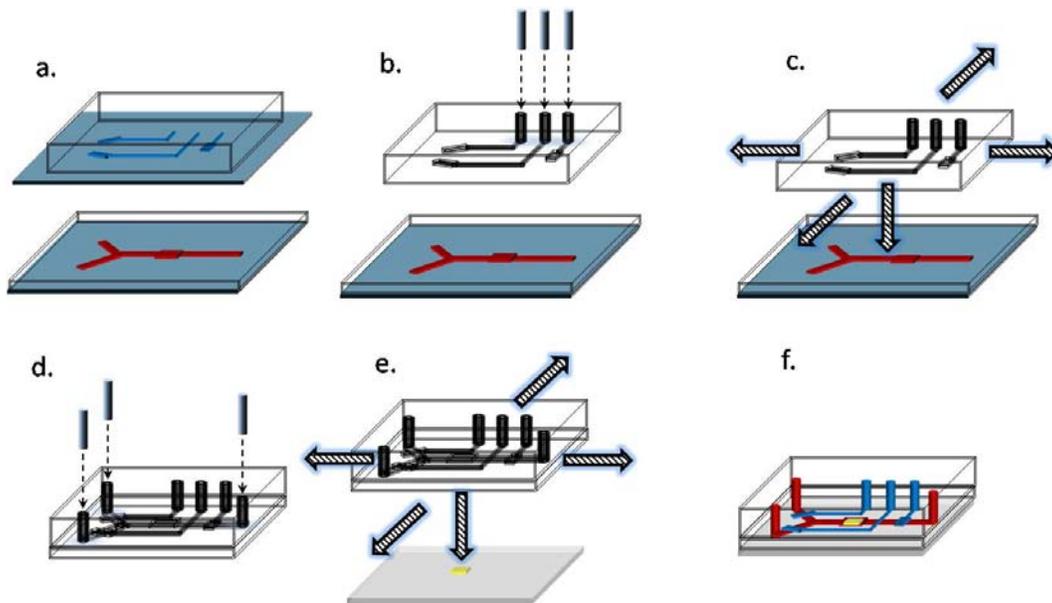


Figura 28. Procesos que describen el tratamiento de aperturas de entradas y salidas y su final ensamblaje con el sustrato. a) Elaboración por separado de los chips para la capa de control y la capa de flujo. b) despegue del chip del sustrato de silicio y apertura de agujeros de las entradas en la capa de control que contiene las válvulas micromecánicas que controlarán el flujo. c) Alineación cuidadosa de ambas capas. Verificar que las válvulas estén situadas correctamente sobre los canales. Enlace de ambas capas d) Despegue del LOC y aperturas de agujeros para las entradas y salidas de los líquidos. e) Alineación del LOC final sobre el sustrato que contiene los sensores. Los sensores deben estar situados dentro de las cámaras de sensado. f) LOC final para el sensado.

2.1.2.1.4. Unión del chip de microfluídica al sustrato

EL chip de PDMS será enlazado a un sustrato de vidrio que contiene las nanoestructuras que servirán de elemento sensor en la plataforma. El PDMS puede enlazar al vidrio de dos maneras: reversible e irreversiblemente. Para enlazar el chip de manera reversible con el

vidrio, simplemente se necesitan condiciones térmicas apropiadas que garanticen una unión débil de ambos materiales. Para ello, se somete el conjunto a temperaturas intermedias (50-80 °C aproximadamente) permitiendo que exista una interacción lo suficientemente fuerte entre el polímero y la sílica que conforma el vidrio, que permita la unión de ellos. Bajo esta modalidad un chip puede ser removido del sustrato sin afectar ambos materiales, sin embargo no podrán ser empleadas presiones (incluso moderadas) para introducir los líquidos dentro del chip. El líquido puede ser introducido por capilaridad, pero un control de ellos dentro del dispositivo no podrá ser realizado.

La otra modalidad es unir ambas superficies de manera irreversible. Esta unión es mucho más fuerte que la anterior y para ello se necesita activar el PDMS para que se cree un enlace covalente con la sílica. Esta activación se realiza empleando un tratamiento con luz UV. La luz UV irradiada con suficiente energía produce la oxidación de los átomos de oxígeno, creando el ozono altamente reactivo. Este ozono reacciona con la superficie de sílica eliminando toda impureza y/o contaminante, dejándola limpia y activa.

Una vez que la superficie está activada se une con el sustrato (previamente lavado con etanol y secado empleando N₂). Para ello, se realiza una alineación a ojo del chip con el área donde se encuentran las nanoestructuras y se coloca de manera que las nanoestructuras queden dentro de las cámaras de sensado (Ver Figura 28e y 28f). Finalmente el sistema unido se calienta en el horno a 50 °C por 10 horas. Este tratamiento garantiza un enlace suficientemente fuerte, capaz de soportar las presiones de trabajo (hasta 20 psi). Así mismo, las temperaturas que se usaron (50 °C) garantizan que no exista una deformación térmica de las nanoestructuras existente en el sustrato, lo que es compatible con este proceso.

2.1.2.2. Funcionamiento del Lab-On-A-Chip final.

Para el control e introducción de los líquidos dentro del chip, se ha empleado un diseño bien elaborado de PDMS que se basa en el uso de válvulas micro-mecánicas. Estas válvulas funcionan empleando una presión externa (aire comprimido de alta pureza) que como ya se mencionó anteriormente, produce una expansión del canal. Esta expansión origina el colapso del canal superior sobre el canal que se encuentra debajo (a una distancia de 20 μm aproximadamente), originando una barrera física que detiene el flujo de líquido sobre dicho canal. Una vez que se deja de ejercer presión, la elasticidad del material (PDMS) así como la presión que lleva el líquido origina que la válvula retorne finalmente a su estado inicial, permitiendo nuevamente el paso del líquido sobre el canal de flujo [Thorsen y col, 2002]. En la Figura 29, podemos observar una imagen clara del funcionamiento de las micro-válvulas que controlan y direccionan el líquido dentro del chip de microfluídica.

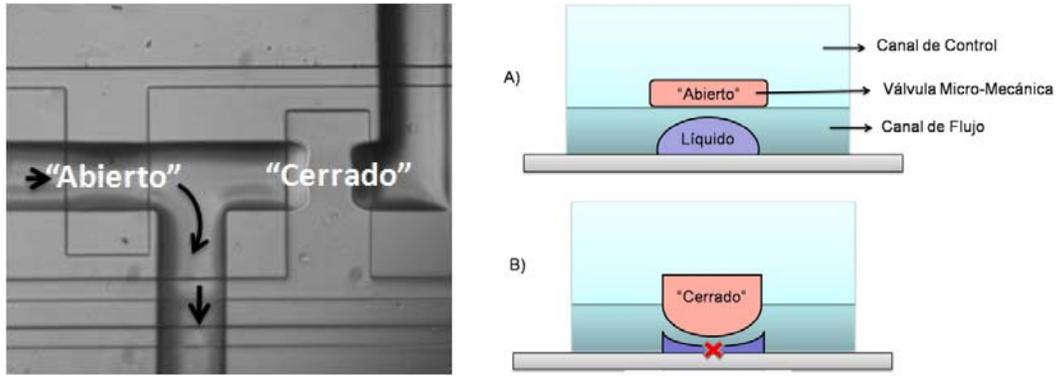


Figura 29. Funcionamiento de las válvulas micro-mecánicas en un chip de microfluídica. En el esquema de la derecha se esquematiza el funcionamiento de las mismas. A) La válvula se encuentra abierta, B) Debido a la expansión de la válvula por presión externa ésta se expande originando el colapso sobre el canal de flujo impidiendo el paso del mismo. En la fotografía de la izquierda se puede observar la imagen real del funcionamiento de las micro-válvulas, en sus estados “abierto” y “cerrado” respectivamente.

El diseño que se ha propuesto como plataforma microfluídica en esta investigación está basado en este tipo de tecnologías de micro-valvulas. En la Figura 30 podemos observar el complejo diseño de los chips empleados. Como se puede ver, éste consta de un conjunto de entradas y salidas, integradas con las micro-válvulas ubicadas en distintas áreas del chip para controlar la dirección del líquido según convenga. Se observa igualmente el área de sensado donde están ubicados el arreglo de nanoestructuras, que atraviesan los 8 canales que integran el chip. Esta área la hemos denominando cámaras de sensado.

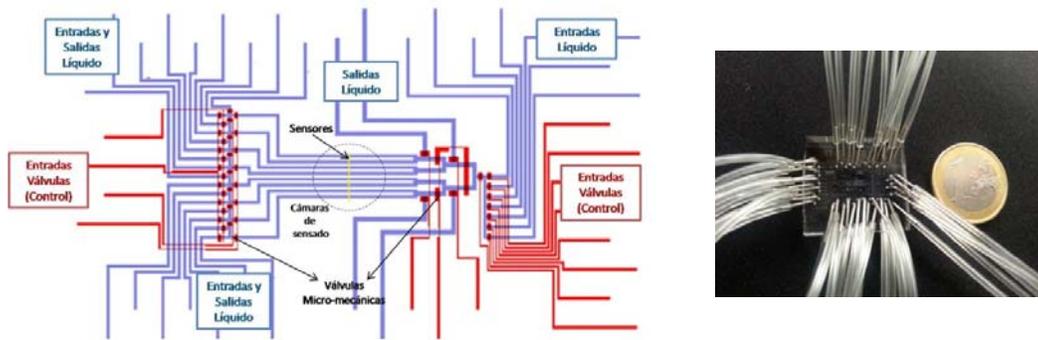


Figura 30. A la izquierda: Esquema del chip de microfluídica empleado para la detección de marcadores oncológicos. Se observa el empleo de válvulas micro-mecánicas que integradas con las salidas y entradas controlan y direccionan los líquidos dentro del chip. Se puede ver las 8 cámaras de sensado donde está ubicado el arreglo de nanocilindros que forman el elemento sensor de la plataforma. A la derecha:

Fotografía real del dispositivo

El chip en general tiene un tamaño de 24 x 24 mm (ver Figura 30), y como ya se mencionó, está enlazado al sustrato de vidrio que contiene las nanoestructuras. El chip consiste de 8 canales individuales (I-VIII), 15 entradas (CTL1-CTL15) que controlan en total 44 válvulas micro-mecánicas en todo el chip, posee 6 entradas generales (EG1-EG-6) en donde el líquido es distribuido uniforme y paralelamente en los 8 canales a la vez. También dispone de 8 entradas individuales (EIn1-EIn8) que permiten introducir líquidos separados para cada canal. Estas entradas individuales poseen 4 salidas generales (SG1-SG4). El chip posee 8 salidas generales e individuales para cada canal (SG1-SG8). Estas salidas, cuando son empleadas las entradas individuales, sirven también para eliminar el aire (burbujas) antes de que el líquido este en contacto con el sensor. Para este mismo fin se dispone de una salida de drenaje para las entradas generales del chip. En la Figura 31 se puede observar el esquema detallado de los elementos antes mencionados.

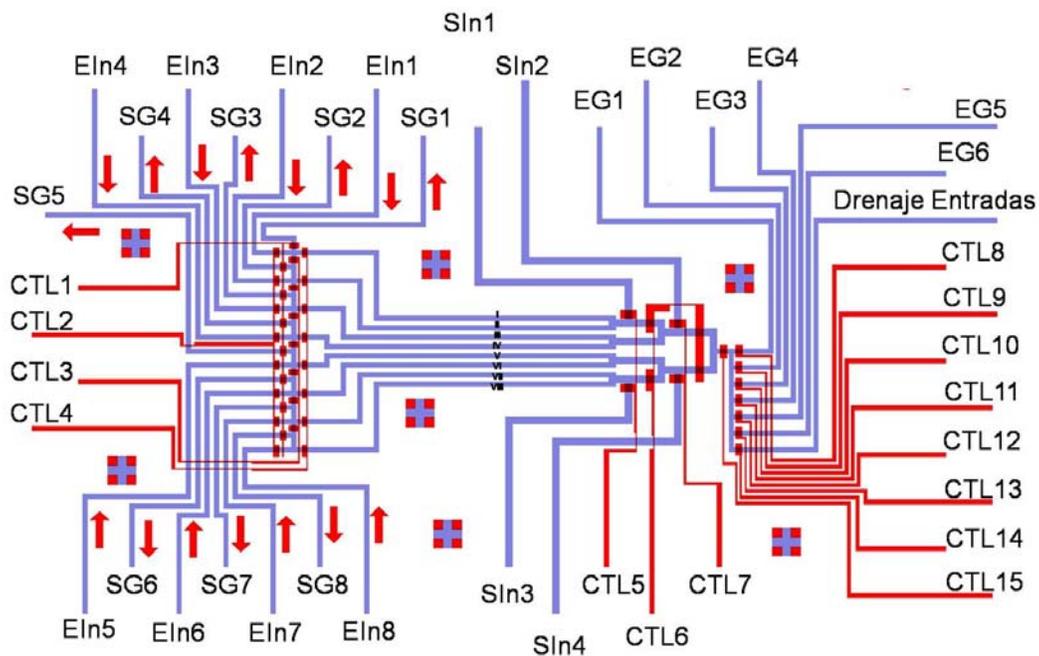


Figura 31. Descripción de cada uno de los componentes que integran el chip de microfluídica (entradas y salidas).

El modo de operación del chip viene dado principalmente por los procesos que en él tiene lugar. Lo primero que se realiza con el chip es la introducción de los líquidos en las entradas correspondientes. Como ya se explicará más adelante, es la química de funcionalización empleada en el experimento, lo que determinó el protocolo a seguir para el funcionamiento de los chips. El área conformada por las entradas generales EG1-EG6 es empleada para aquellas soluciones que se utilizan en la primera etapa de la funcionalización, específicamente en el anclaje del receptor. Por ser esta química común para todos los sensores, se ha diseñado esta área, de manera que los líquidos puedan acceder uniformemente a todos los canales de

manera simultánea. El modo de operación está descrito en la Figura 32a y 32b. Una vez los líquidos son cargados en los tubos y conectados al chip se realiza un procedimiento que hemos denominado de drenaje. Básicamente lo que se realiza es la eliminación de burbujas de aire que fueron introducidas durante la carga del líquido. La presencia de burbujas durante los experimentos afectaría notablemente las medidas en tiempo real de los procesos de reconocimiento que tienen lugar sobre el sensor, de allí la importancia que tiene el proceso de drenaje en este protocolo.

Para ello, como se observa en la Figura 32a, se mantiene cerrada la válvula de control (CTL15) y se mantiene abierta la válvula de control (CTL14), de manera que el líquido pueda ser drenado y las burbujas eliminadas. Una vez que el proceso finaliza, se cierra la válvula de control correspondiente al canal donde ha sido colocado el líquido. Este procedimiento debe realizarse para las 6 entradas generales que posee el chip. Una vez este proceso ha finalizado, y lo que se desea es introducirlo dentro de los canales, se procede a la operación que se observa en la Figura 32b. Si se desea por ejemplo introducir un líquido desde la entrada general EG1 a todos los canales a la vez, se deberán cerrar las válvulas de control (CTL1, CTL2, CTL5, CTL7) y mantener abiertas las válvulas correspondientes a las salidas generales (SG1-SG8). Una presión de 2-3 psi del líquido en la EG1 permitirá que éste sea distribuido por todos los canales de manera efectiva y uniforme.

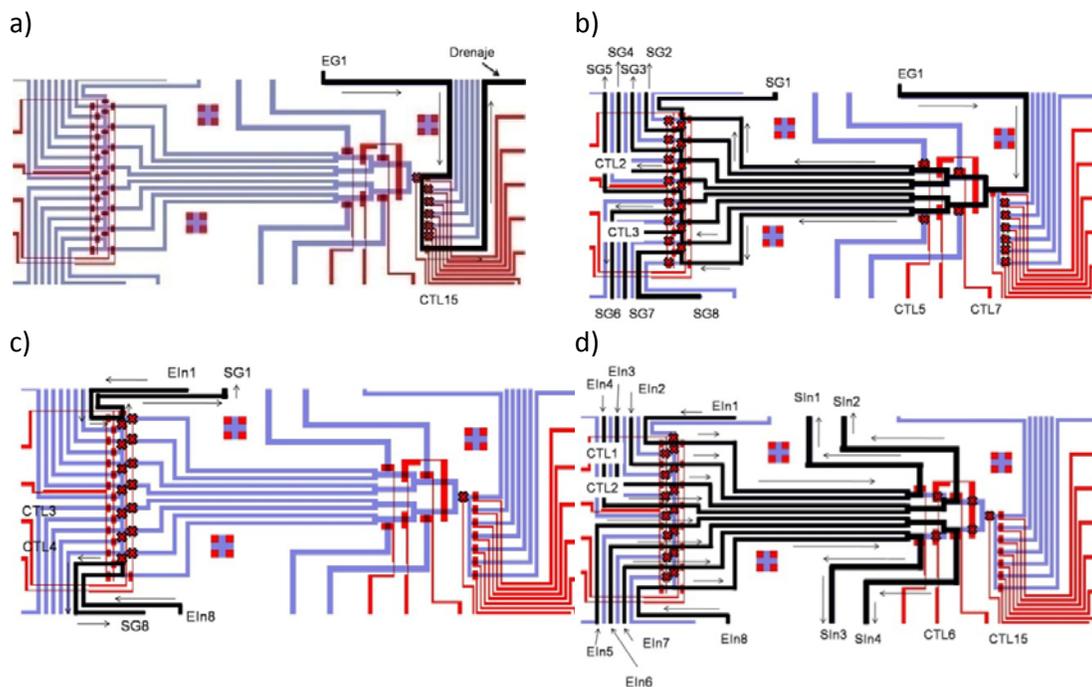


Figura 32. Funcionamiento del chip de microfluídica para las diversas operaciones que se realizan. a) operación de drenaje y carga de las soluciones que serán comúnmente distribuidas dentro del chip, b) operación de introducción de las soluciones uniforme y en paralelo dentro del chip, c) drenaje y carga de las soluciones a ser introducidas individualmente en los canales y d) introducción de las soluciones individualmente en cada cámara de sensorado.

Una vez que la química común en todos los sensores se ha realizado, y se desea incorporar un analito diferente (o de distinta concentración) de manera individual en cada canal, se deberá operar en la parte izquierda del chip (Figura 32c y 32d). Aquí, al igual que en el protocolo anterior se deberá hacer un drenaje de los líquidos para la eliminación de las burbujas. En la Figura 32c se observa el protocolo a seguir si, por ejemplo, se realiza el drenaje para una solución cargada en la entrada individual EIn1 y EIn8. Para esto, se deberán cerrar las válvulas de control CTL4 y CTL3 respectivamente. Una vez realizada esta operación, para los 8 entradas individuales, si se desea incorporar los líquidos al área de sensado, se deberán cerrar las válvulas de control CTL1, CTL2, CTL5 CTL7 y CTL15. De esta manera, las soluciones entraran individualmente en cada canal y serán expulsadas por las salidas individuales (Sin1-Sin4) (Figura 32d).

De manera general, podemos decir que el dispositivo microfluídico ofrece herramientas para realizar introducción de soluciones de manera general a todo el chip, como también ofrece la posibilidad de incorporar soluciones específicas e individuales en cada canal. Con este dispositivo solo será necesario la carga de las soluciones (ya sean individuales o generales) en una primera etapa y el control de éstas será realizado posteriormente de manera externa, mediante válvulas mecánicas que operan con aire bajo presión. Estas válvulas fueron operadas manualmente, sin embargo el sistema puede ser fácilmente acoplado a una plataforma electrónica que permita el manejo automático y controlado de dichas válvulas.

2.1.3 PLATAFORMA OPTO-FLUÍDICA EMPLEADA PARA LA CARACTERIZACIÓN Y MONITOREO DE LA DETECCIÓN DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.

La plataforma opto-fluídica desarrollada y empleada en esta investigación básicamente está integrada por 2 elementos: El montaje óptico que abarca la fuente de excitación, los elementos ópticos necesarios para coleccionar la señal y procesarla; y el ensamblaje microfluídico que, en este caso, está integrado por las válvulas, reguladores y piezas neumáticas que controlan los líquidos dentro del chip de microfluídica. En la Figura 33 se observa como luce la plataforma así como también los elementos que la conforman.

El montaje óptico experimental empleado para monitorear los chips consiste básicamente de un microscopio óptico en modo transmisión de campo claro (bright-field) equipado con elementos de escaneo para la detección, una fuente de luz, un espectrómetro y un conjunto de cámaras que permiten la visualización del chip.

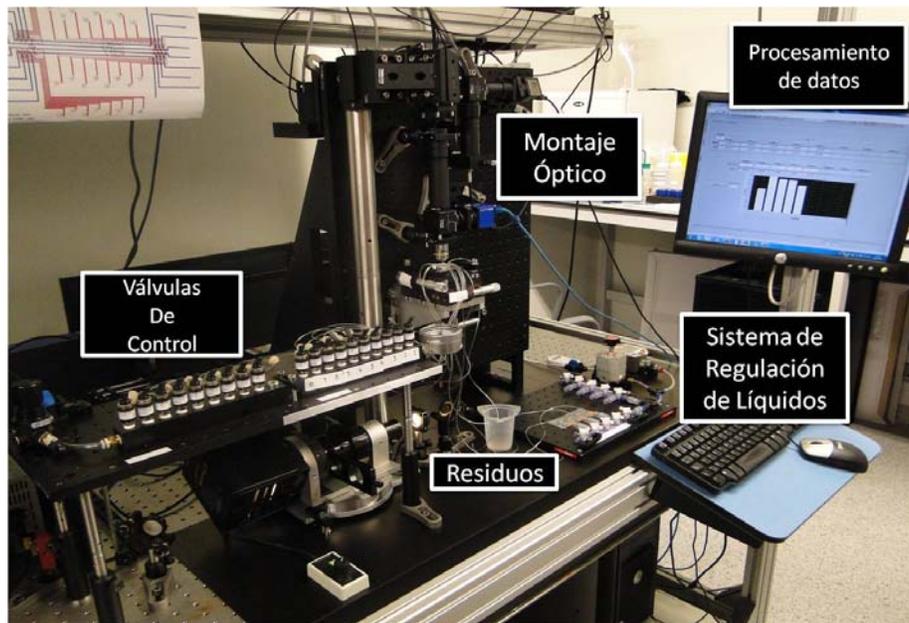


Figura 33. Plataforma opto-fluídica empleada para la medición en tiempo real de los procesos de bioreconocimiento molecular sobre sensores nanoestructurados.

En la Figura 34, podemos observar el montaje óptico y los componentes que lo integran. El diseño y construcción del montaje óptico junto con los controles neumáticos que forman parte del dispositivo microfluídico, fueron realizados por el Dr. Johann Berthelot, investigador del grupo PNO en el ICFO.

De manera general, la luz que proviene de una lámpara comercial (Olympus) con luz en un rango ultravioleta-infrarrojo cercano, atraviesa linealmente un polarizador de banda ancha y es enfocada sobre el arreglo de nanocilindros empleando un conjunto de iris y una lente condensador. Una vez la luz atraviesa la muestra es dirigida hacia el elemento de escaneo empleando un objetivo de microscopio (Olympus). El elemento de escaneo que posee esta plataforma está conformado por unos espejos (X+Y Scan Espejo Galvo, Thorlabs, Alemania) que realizan un escaneo XY del área donde se encuentran ubicados el arreglo de nanoestructuras (cámaras de sensado). Dos cámaras son empleadas para la visualización de la muestra. Una cámara que posee baja magnificación permite observar una gran área del dispositivo microfluídico (se puede visualizar el diseño completo del chip). Esta cámara es de gran utilidad para verificar todo lo relacionado con las entradas y salidas de los líquidos y de manera general el buen estado y funcionamiento del mismo). Una segunda cámara que posee una mayor magnificación es empleada para observar solo el área de sensado (arreglo de las nanoestructuras). Esta cámara está acoplada a la salida de los espejos que realizan el escaneo, con la finalidad de permitir recolectar y seleccionar el área de sensado sobre el arreglo que se empleará en los experimentos. Finalmente, se dispone de un conjunto de lentes que llevan la información a un colimador acoplado con una fibra óptica conectado a un espectrómetro (ANDOR).

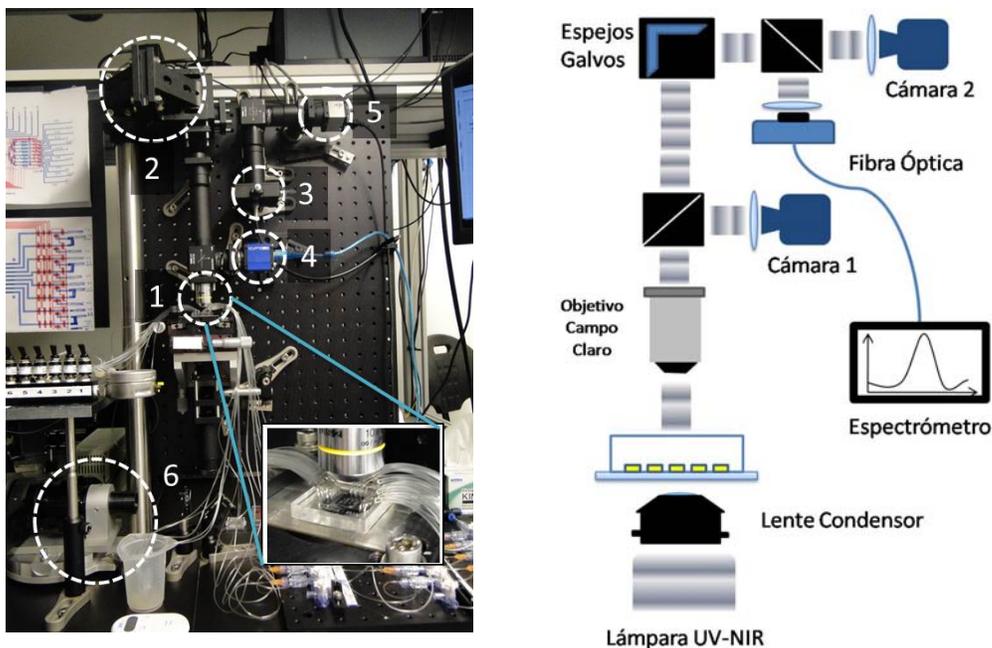


Figura 34. Montaje óptico y los elementos que lo componen. 1) Plataforma XY micromecánica donde es colocado el LOC. 2) Elemento de escaneo –espejo galvo-.3) Fibra óptica que recoge la información y la lleva al espectrómetro. 4) Cámara con baja magnificación para obtener una vista completo del LOC. 5) Cámara con alta magnificación que permite visualizar el arreglo de sensores dentro del chip. 6) Fuente de luz UV-NIR. A la derecha: Se observa un esquema del montaje óptica general.

El espectrómetro, las cámaras y el sistema de escaneo son controlados por una interface informática realizada con el sistema Labview, que se emplea además para la adquisición, análisis y monitorización en tiempo real de los datos que arrojan las interacciones moleculares sobre el sensor (desarrollado por el Dr. Mathieu Juan y el Dr. Johann Berthelot, investigadores de PNO en el ICFO). El sistema es capaz de recoger información sobre el espectro de extinción de las nanoestructuras a una frecuencia de 10Hz, así como también calcular y monitorear el centroide de dicho pico en tiempo real [Dahlin y col, 2006; Dahlin y col, 2009]. El software es capaz de mostrar en paralelo las respuestas de 32 sensores a la vez, mostrando los sensogramas y los parámetros cinéticos correspondientes, así como también es capaz de procesar esta información y graficarla para observar finalmente en tiempo real la relación del cambio de la resonancia de las estructuras, con los procesos de reconocimiento y detección que ocurren en la superficie de las mismas. Adicionalmente, el software guarda toda la información recolectada para realizar, si se desea, el posterior tratamiento de los datos obtenidos.

El montaje óptico también dispone de los dispositivos externos que controlan las válvulas micro-mecánicas en el chip de microfluídica. Para operar la capa de control, se dispone de 15 válvulas neumáticas que son operadas con aire a presión, las cuales hemos denominado válvulas de control (Ver Figura 33). Estas válvulas son las responsables del cierre y la apertura de las micro-válvulas que, como ya lo mencionamos, son las que controlan y direccionan los líquidos dentro del chip. Operan en un rango de presión entre 15-20 psi. Presiones por encima de este rango pueden producir que el chip reviente ocasionando el cese del ensayo.

También se tienen un conjunto de reguladores que controlan el flujo de los líquidos que serán introducidos dentro del chip (anticuerpos, química de activación, antígenos etc.). A este sistema lo hemos denominado sistema de regulación de líquidos. El líquido que se desea introducir es inicialmente cargado (empleando una jeringa) en unos microtubos que serán conectados a los pequeños conectores metálicos ubicados en las entradas del chip de microfluídica. Una vez se realiza la conexión se coloca el extremo libre en los reguladores. Estos reguladores operan a una presión más baja y poseen un mejor sistema de control de la presión que los usados para las válvulas de control. La presión de trabajo que se empleó para introducir los líquidos dentro de los canales está en un rango de 2-4 psi. Este rango garantiza una velocidad de flujo adecuada (0.15 $\mu\text{L}/\text{min}$ aproximadamente) y un consumo óptimo de los líquidos para los ensayos biológicos, especialmente para ensayos con muestras reales donde no es viable el uso de grandes cantidades de muestra.

EL montaje óptico integrado con los LOC's junto con el sistema neumático de válvulas empleado para la operación de los chips, finalmente constituyen nuestra plataforma optofluídica. Una vez que ésta plataforma fue desarrollada, el primer paso fue la optimización y evaluación el mejor sistema de sensado para ser empleado en la detección molecular, así como también optimizar todo lo referente a la funcionalización y colocación de los sistemas de captura sobre los sensores. Una vez que se consiguieron las condiciones óptimas, la plataforma fue empleada y testada en la detección de un sistema de anticuerpos de prueba para finalmente ser utilizada en la detección de sistemas de marcadores tumorales en suero.

2.2 MATERIALES Y REACTIVOS EMPLEADOS EN LOS ENSAYOS DE BIORECONOCIMIENTO MOLECULAR

Para la formación de la SAM sobre los nanocilindros de oro se compararon dos metodologías, empleando HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina (ProChimia Surfaces Sc) y ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) 98% (Sigma Aldrich, USA). Se empleó MeOH $\geq 98\%$ de pureza (Scharlab S.L) y EtOH $>99\%$ altamente puro (Scharlab S.L) para la preparación de las soluciones. En el caso de MUA empleamos HCl 37% (Sigma Aldrich, USA) para acidificar la solución.

Los tampones utilizados para todos los ensayos fueron preparados en agua miliQ 18 Ω y su pH fue ajustado empleando un pHmetro (HANNA Instruments) y ajustado con HCl 0.1 M y NaOH 0.1 M según era necesario. Se utilizó mayoritariamente tampón salino PBS. Para ello se prepararon diferentes concentraciones de fosfato de potasio monobásico KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, USA) en agua con cloruro de sodio NaCl (Sigma Aldrich, USA) 0.15 M y ajustado al pH de trabajo. También se utilizó tampón HEPES [N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico] $\geq 98\%$, C₈H₁₇N₂NaO₄S (Sigma Aldrich, USA) y tampón MES [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico] $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, USA) para diversos procesos químicos llevados a cabo.

En la metodología empleando la molécula HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina, hemos anclado como primer receptor estrepavidina (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). Una vez recibido el

producto, se prepararon alícuotas de 1 mg/mL en tampón fosfato (PBS) pH 7.02 y se congelaron a -20 °C. Una vez descongeladas, las alícuotas de trabajo se mantenían a 4 °C para su uso. Así mismo, durante esta metodología se prepararon conjugados de biotina empleando EZ-Link NHS-LC-Biotina [éster N-hidrosuccinimida biotina] (Thermo Fisher Scientific, USA) para la inmunoglobulina de conejo (Rb-IgG) (Sigma Aldrich, USA). Esta IgG de conejo fue alícuoteada en tampón PBS 0.1M y almacenada a -20 °C hasta su uso. Luego la alícuota de trabajo fue mantenida a 4 °C.

Por otro lado, fueron empleados como receptores diversos sistemas de anticuerpos. Para lo que se define en este trabajo como sistema modelo se utilizó la IgG de conejo antes mencionada en concentraciones que varían desde 0.001-10 mg/mL. Para los ensayos de marcadores tumorales y pruebas con el sistema modelo se ha utilizado los siguientes anticuerpos. Las soluciones de estos bioreceptores fueron preparadas según sugerencia del fabricante y fueron separadas en alícuotas y mantenidas a -20 °C hasta su uso. Luego se mantuvieron a 4 °C.

- Anti-Inmunoglobulina de conejo producido en cabra (Gt-a-RbIgG), (Sigma-Aldrich, USA) Polvo liofilizado en 0.01 M fosfato de sodio, 0.015 M NaCl pH 7.2 reconstituido en 0.15 M NaCl, concentración de 1 mg/mL.
- Anticuerpo monoclonal anti-PSA humano (libre) proveniente de ascitas de ratón (Biospacific, USA) solución madre de 3.7 mg/mL en 15 mM de tampón fosfato, 0.15 M NaCl pH 7.2 (mAb-a-PSA) almacenado a 4 °C sólo por periodos cortos.
- Anticuerpo monoclonal anti-AFP humano proveniente de hibridomas de ratón (In vitro) >95 % en pureza de IgG (Biospacific, USA) 1.5 mg/mL contenidos en 0.9 % NaCl y 0.095 % de NaN₃ como preservativo (mAb-a-AFP)
- Anticuerpo monoclonal anti-CEA humano (Biospacific, USA) 4.18 mg/ml en 0.015 M tampón fosfato, 0.85 % NaCl pH 7.4 (mAb-a-CEA)
- Anticuerpo monoclonal anti-HSP70 humano producido en ratón (Enzo Life Sciences Inc, USA) (mAb-a-HSP70)

En cuanto a las proteínas y marcadores tumorales se emplearon los abajo listados. Se realizaron ensayos de detección tanto en tampón fosfato como en suero humano. Hemos empleado suero humano proveniente de plasma masculina AB (Sigma Aldrich, USA). El suero fue filtrado empleando filtros de jeringa de tamaño de poro 0.8 µm y preparado al 50 % en tampón PBS.

- Antígeno Específico de Próstata (PSA) proveniente de fluidos seminales humanos (Biospacific, USA) >96% de pureza, 2.52 mg/mL en 0.05 M de tampón fosfato, 0.15 M NaCl pH 7.5, y filtrado empleando un tamaño de poro de 0.2 µm. El producto fue almacenado a 4 °C según recomendación del fabricante.
- Antígeno alfa-fetoproteína (AFP) proveniente de suero de cordón humano (Biospacific, USA) >99% de pureza, 1.51 mg/mL en 10 mM tampón fosfato, 0.85 % NaCl, pH 7.2.
- A modo de validación hemos empleado un material de referencia (WHO International Standard) para AFP procedente del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) cuya concentración está calibrada y certificada

- Antígeno carcinoembriogénico (CEA) proveniente de meconio humano (Biospacific, USA), >98 % de pureza, 2.05 mg/mL en 50 mM citrato de sodio, 150 mM NaCl pH 7.2-7.6 y 20 % glicerol. Almacenado a 4 °C.
- HSP70/HSP72 humano recombinante \geq 95% (SDS-Page; Western blot) 72 kDa (Enzo Life Sciences Inc, USA).

Para la amplificación de la señal se ha realizado ensayos tipo sándwich empleado anticuerpos policlonales de las respectivas proteínas empleadas. Para ello, se utilizaron los siguientes anticuerpos policlonales.

- Anti-inmunoglobulina de cabra producida en conejo (Rb-a-Gt IgG) (Sigma Aldrich, USA) 2-2.5 mg/mL reconstituido en 10 mM PBS.
- Anticuerpo monoclonal anti- PSA humano (libre y complejo) proveniente de BALB/C ascitas de ratón (Biospacific, USA) solución madre de 3.5 mg/mL en 15 mM de tampón fosfato, 0.15 M NaCl pH 7.2 (pAb-a-PSA) almacenado a 4 °C solo por periodos cortos. La compañía que lo distribuyerecomienda este anticuerpo como anticuerpo pareja para un ensayo tipo sándwich.
- Anticuerpo policlonal anti-AFP humano producido en cabra (Biospacific, USA) 5.86 mg/mL en 10 mM tampón fosfato, 0.85 % NaCl pH 7.2. Almacenado a 4°C (pAb-a-AFP)
- Anticuerpo policlonal anti-CEA humano producido en cabra (Biospacific, USA) 4.03 mg/mL en 10 mM tampón fosfato, 0.85 % NaCl pH 7.2 almacenado a 4 °C (pAb-a-CEA).

2.3. METODOLOGÍA EMPLEADA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LAS NANOESTRUCTURAS CON BRI.

Para la determinación de la sensibilidad de las nanoestructuras fabricadas se realizó un estudio previo de las nanoestructuras que consistió en la evaluación de la respuesta del pico LSPR cuando están en contacto con soluciones que presentan distintos índices de refracción. Evaluando la respuesta del pico LSPR de estas estructuras es posible predecir la sensibilidad que tendrán para futuros experimentos de detección molecular. Esto se conoce como medidas del índice de refracción del conjunto (BRI del inglés Bulk Refractive Index).

Es conocido que en un experimento típico con LSPR, una molécula que es enlazada a la superficie de la estructura plasmónica origina un cambio de la constante dieléctrica del entorno. Para una proteína típica, el índice de refracción es del orden de 1.46, comparado con el agua que presenta un índice de refracción de 1.33 y, por lo tanto, menor. La cantidad de moléculas absorbidas como lo mencionamos anteriormente se monitoriza a través de la posición máxima del pico de absorción o λ_{max} .

La sensibilidad para los cambios de índice de refracción del sensor se obtiene a través de la relación de la resonancia del plasmón λ_{LSPR} con respecto al índice de refracción del medio n [Svendendhal y col, 2009]

$$\frac{\partial \lambda_{LSPR}}{\partial n} = 2\varepsilon_m^r/n \frac{\partial \varepsilon_m^r}{\partial \lambda} \quad (8)$$

De este modo, se obtiene que la sensibilidad de la partícula es proporcional a la parte real de la función dieléctrica del metal ε_m^r e inversamente proporcional a la pendiente $\frac{\partial \varepsilon_m^r}{\partial \lambda}$. La literatura muestra que el valor absoluto de la parte real de la función dieléctrica ε_m^r es mayor para la plata que para el oro a todas las longitudes de onda, lo que implica que los resonadores plasmónicos de plata presentan una mayor sensibilidad a cambios en el índice de refracción. A pesar de esto, el oro se emplea ampliamente debido a lo inerte que es químicamente hablando en comparación con la plata.

La absorción selectiva de biomoléculas a la superficie normalmente se realiza a través de una primera funcionalización que contienen las moléculas de captura, como los anticuerpos, antígenos, ácidos nucleicos o algún otro sistema biológico que presente afinidad con el analito. La medida de la variación del pico $\Delta\lambda$ puede ser usado para estimar el cambio que se produce en los índices de refracción (conocido como cambio efectivo) Δn_{eff}

$$\Delta\lambda = S_{bulk}\Delta n_{eff} \quad (9)$$

Donde S_{bulk} corresponde a la sensibilidad del sistema a cambios en el índice de refracción. El índice de refracción efectivo toma en cuenta que el campo electromagnético inducido sólo es extensible a pequeñas distancias desde la superficie de la nanopartícula, por lo que define el volumen de sensado para el LSPR. El índice de refracción efectivo depende de manera directa del índice de refracción del medio en el cual el experimento es llevado a cabo, por ejemplo aire, agua o tampón [Haes y Van Duyne, 2002]. S_{bulk} , se mide monitorizando el cambio o respuesta del pico de absorbancia del plasmón de la partícula, para dos soluciones que presenten diferentes índices de refracción, por ejemplo agua con diferentes concentraciones de glucosa. Normalmente, este valor es expresado en el cambio de longitud de onda del plasmón por unidades de índice de refracción (nm/RIU). El lugar más sensible es obviamente la superficie de la nanopartícula. Sin embargo, en la mayoría de los experimentos este lugar está ocupado por una capa que contiene los agentes de captura (por ejemplo anticuerpos), que normalmente presentan un tamaño significativo por lo que restan sensibilidad al sistema. Una de las maneras de aumentar la sensibilidad en sensores basados en LSPR es desarrollar un protocolo de funcionalización que sea sencillo y que no conlleve al uso de varios elementos químico-biológicos que incrementen esta capa inicial sobre la superficie permitiendo así que la detección pueda ser realizada lo más próxima a la superficie de la partícula mejorando notablemente la sensibilidad.

En este sentido, las nanoestructuras obtenidas empleando la técnica de EBL anteriormente descrita, fueron testadas utilizando soluciones de agua con diferentes concentraciones de glucosa (diferentes índices de refracción), para evaluar de esta manera la sensibilidad de las mismas antes de ser utilizadas en los futuros experimentos de detección molecular. Para

realizar la prueba, las disoluciones de glucosa fueron calibradas inicialmente mediante el empleo de un refractómetro Abbe5 (Bellingham & Stanley, UK). Posteriormente, las soluciones calibradas fueron puestas en contacto con los sensores a través de los distintos canales en la plataforma final. La medida empieza con una línea base de agua y posteriormente se introducen las disoluciones de glucosa durante pulsos de 1 minuto aproximadamente. Los valores de desplazamiento del pico obtenidos se graficaron con cada valor de índice de refracción correspondiente y mediante la ecuación 9, la pendiente de dichas curvas proporciona la sensibilidad en nm/RIU del sistema bajo estudio.

2.4 PROTOCOLOS QUIMICOS INVOLUCRADOS EN LOS ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR REALIZADOS CON NANOCILINDROS DE ORO Y APLICACIONES EN LA DETECCION DE MARCADORES TUMORALES

Como se mencionó anteriormente, la plataforma empleada en esta tesis doctoral cuenta como protagonista de sensado principal a nanoestructuras de oro en un sustrato de vidrio fabricados empleando la técnica de nanofabricación EBL. Una vez que estos sensores son fabricados, se procede a su funcionalización con elementos de bioconocimiento que permiten su posterior uso en el diagnóstico de analitos en muestras complejas.

Esta funcionalización se inicia principalmente con la formación de un SAM que, dependiendo de la química de conjugación a utilizar y el analito a detectar, será sometida a diversas modificaciones químicas superficiales mediante las cuales se inmovilizarán los receptores que finalmente permitirán la detección del analito. A continuación, se explicarán los protocolos de la formación de estas monocapas empleando dos tipos de moléculas para el posterior anclaje del receptor. Las moléculas empleadas en esta tesis doctoral son el ácido mercaptoundecanoico (MUA) y un PEG heterobifuncional con tiol y biotina como grupos reactivos y de acoplamiento respectivamente (HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina). Así mismo, describiremos los protocolos de las reacciones químicas y de interacción correspondientes en ambos casos.

2.4.1 PROTOCOLO DE FUNCIONALIZACIÓN DE NANOCILINDROS DE ORO EMPLEANDO HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-BIOTINA

Recientemente, los alcanotioles que contienen grupos poliméricos PEG (polietilenglicoles), están siendo ampliamente usados debido a la reducción de uniones no específicas en diferentes superficies. Así mismo, es bien conocida la fuerte interacción, la gran especificidad y estabilidad que existe entre las biotinas y las avidinas, haciendo de esta interacción una herramienta ampliamente empleada en biosensado. Por estas dos razones se decidió realizar

ensayos de funcionalización combinando estas dos premisas para evaluar las mejoras que puede traer en los ensayos de biosensado.

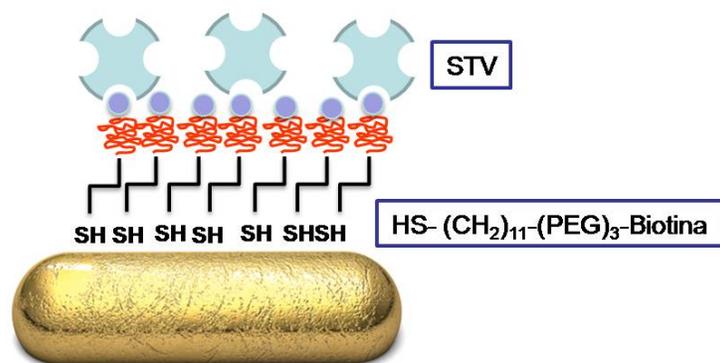


Figura 35. Esquema que visualiza la funcionalización de nanocilindros de oro empleando la molécula HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina y su interacción con estreptavidina (STV).

Inicialmente se ha empleado un PEG biotinizado de estructura HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina en la funcionalización de los nanosensores para evaluar si la interacción biotina-estreptavidina es adecuada como base de protocolo de funcionalización de los sensores y su aplicación en la detección de biomoléculas de interés. La base del protocolo está representada en la Figura 35. La superficie del sensor es inicialmente funcionalizada con esta molécula que contiene en sus extremos el grupo tiol y en el otro las unidades de biotina. Seguidamente una capa de STV es anclada, que formará la base para la posterior inmovilización del receptor. En este protocolo se requiere un pre-tratamiento del receptor que incorpora unidades de biotina en su estructura, de manera tal que permita su anclaje sobre la base de STV y así poder ser empleado en la detección final del analito de interés.

Para este protocolo se empleó una solución metanólica 1 mM de HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina (Iris Biotech, USA). El sustrato de vidrio con las nanoestructuras una vez fabricado es colocado en una disolución recién preparada de dicha molécula, contenida en una cámara hermética y sellada y posteriormente incubado durante 48 horas. Una vez este tiempo es transcurrido, el sustrato es lavado con MeOH altamente puro, seguido de lavados de EtOH y finalmente secado empleando N₂ de alta pureza. Una vez el sustrato está seco, se procede a realizar la unión con el chip de microfluídica correspondiente.

2.4.1.1 Biotinización de los Anticuerpos monoclonales empleados en la detección de analitos

Como lo hemos mencionado el protocolo basado en la interacción STV-Biotina, requiere un tratamiento previo de biotinización por parte del receptor para ser anclado sobre la base de

STV ubicada sobre la superficie del sensor. A continuación describiremos en detalle este proceso.

Es importante resaltar que la biotina es una vitamina comúnmente usada que interacciona con alta afinidad a proteínas como avidina y estreptavidina. Debido a su pequeño tamaño (244Da), la biotina puede ser conjugada a muchas proteínas sin alterar la actividad biológica de éstas. La molécula etiquetada con biotina, podrá ser usada en diversos ensayos como ELISA, Western blot u otros métodos usando la estreptavidina o avidina como prueba de unión.

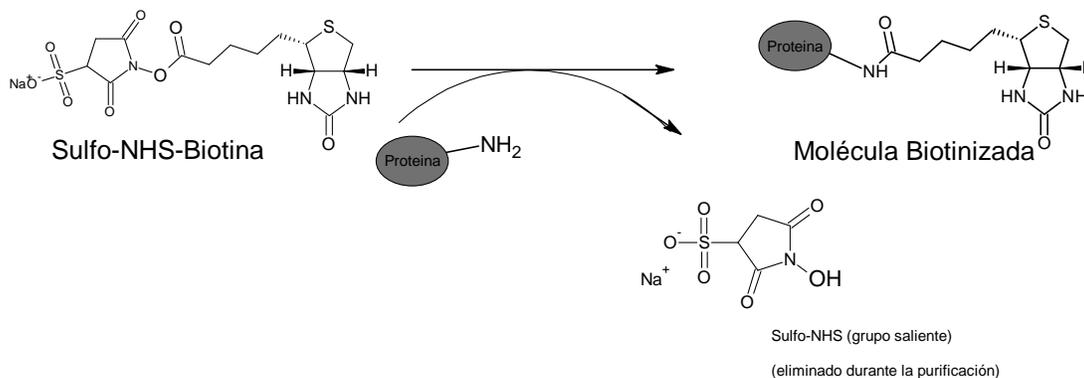


Figura 36. Reacción de sulfo-NHS-Biotina con aminas primarias. No se representan a escala los diferentes grupos implicados en la reacción. Por ejemplo, la proteína a escala es mucho mayor en tamaño que los reactivos y contiene varios grupos aminos. El sulfo-NHS es un grupo saliente en la reacción, que es eliminado durante el proceso de purificación.

Los ésteres de la N-hidroxisuccinimida (NHS) activados a la biotina, son los reactivos más usados empleados en los procesos de biotinización. Los ésteres NHS reaccionan eficientemente con las aminas primarias (-NH₂) a pH básico (7-9), para formar enlaces amidas estables (Ver Figura 36). En el ensayo hemos empleado el éster sulfo-NHS el cual es altamente soluble en agua, y que permite que la reacción sea llevada a cabo en ausencia de solventes orgánicos tales como DMSO (Dimetilsulfoxido) o DMF (Dimetilformamida). Debido a que la mayoría de los anticuerpos y otras proteínas generalmente contienen múltiples residuos de lisinas, así como también los N-terminales de cada polipéptido, en su estructura poseen múltiples aminas primarias disponibles para ser enlazadas con los reactivos NHS-activados.

La cantidad de biotinas que se enlaza a las proteínas depende del tamaño y la distribución de los grupos aminos en esta, y de la cantidad de reactivo utilizado. Para ello, es importante efectuar ciertos cálculos que nos permiten saber cuanto de reactivo se necesita, dependiendo la relación de moléculas de biotina que queremos enlazar sobre la proteína. Por ejemplo, experimentos que usan un exceso molar de biotina de 20 veces, para etiquetar 1-10 mg/mL de anticuerpo (IgG por ejemplo), tienen como resultado 4-6 grupos de biotinas por molécula. Ajustando la relación molar de Sulfo-NHS con respecto a la proteína, se puede obtener el nivel

de incorporación de biotina sobre la molécula deseado. A continuación, se muestra en detalle el cálculo a realizar para este proceso.

1. Cálculo de milimoles de sulfo-NHS-Biotina que se debe añadir para un exceso molar de 20 veces. (20 es un número recomendado para garantizar que la reacción sea eficiente según las recomendaciones de la empresa que distribuye el reactivo (Thermo Scientific, USA), sin embargo, puede ser modificado según convenga).

$$mL \text{ proteína} \times \frac{mg \text{ proteína}}{mL \text{ proteína}} \times \frac{mmol \text{ proteína}}{mg \text{ proteína}} \times \frac{20mmol \text{ Biotina}}{mmol \text{ proteína}} = mmol \text{ Biotina}$$

2. Cálculo de mililitros de 10 mM Sulfo-NHS-Biotina para añadir a la mezcla de reacción.

$$mmol \text{ Biotina} \times \frac{443mg}{mmol \text{ Biotina}} \times \frac{500\mu L}{2.2mg} = \mu L \text{ Solución de Biotina}$$

- 443 = Peso molecular de Sulfo-NHS-biotina
- 500= microlitros de agua en el cual 2.2 mg de Sulfo-NHS-Biotina deben ser disueltos para preparar una solución 10 mM.

EL protocolo a seguir en la reacción de etiquetado con biotina sigue los siguientes pasos:

1. Extraer el vial de Sulfo-NHS-Biotina (almacenado a -20 °C según especificaciones del fabricante) y equilibrarlo a la temperatura ambiente, antes de ser usado.
2. Disolver 1-10 mg de proteína en 0.5-2 mL de tampón PBS, de acuerdo a los cálculos que se han realizado anteriormente.
3. Justo antes de ser usada, preparar 10 mM de la solución Sulfo-NHS-biotina disolviendo 2.2 mg en 500 μ L de agua ultrapura.
4. Añadir de acuerdo a los cálculos realizados anteriormente, el volumen apropiado de Sulfo-NHS-Biotina a la solución de proteína.
5. Incubar la reacción en hielo durante dos horas, o a temperatura ambiente por 30-60 minutos.
6. Una vez la reacción ha finalizado se procede a la purificación e intercambio de tampón, empleando para ello columnas de gel Sephadex. Se emplearon columnas PD-10 de Sephadex pre-empaquetadas comerciales (G&E Healthcare, USA) para este proceso.
7. Una vez purificada la solución se debe almacenar la solución bajo condiciones apropiadas (normalmente a 2 °C si será usada a corto plazo).

Inicialmente, este protocolo fue aplicado por el Dr. Mark Kreuzer (ICFO-PNO) para la conjugación de la proteína IgG de conejo. La concentración de dicha proteína fue calculada a partir del espectro de Absorbancia empleando la Ley de Lambert-Beer;

$$c = \frac{A_{280nm}}{\epsilon l} \quad (10)$$

Donde c es la concentración de la proteína, l el tamaño de paso de la cubeta y ϵ corresponde al coeficiente de extinción. Para proteínas del tipo IgG con peso molecular 150.000 Da, se emplea un coeficiente de extinción de $210.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La proteína IgG de conejo de partida arroja una concentración real de 2.08 mg/mL en el tampón PBS con el valor. En la Figura 37 podemos observar el espectro de absorbancia de la proteína que se ha empleado en el proceso de biotinización.

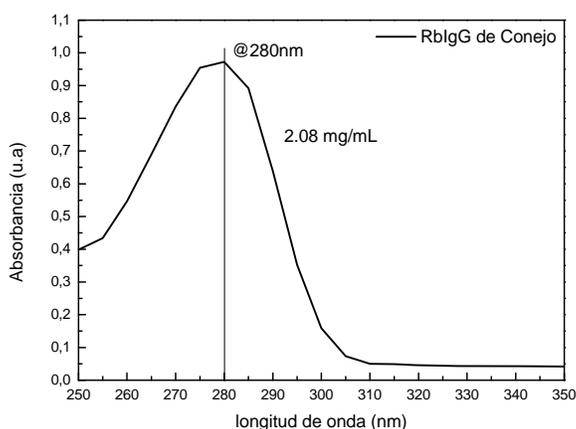


Figura 37. Espectro de Absorbancia de la IgG de conejo. La concentración inicial es de 2.08 mg/mL.

Se realizó la biotinización de la proteína IgG empleando un exceso molar de biotina 20 veces (el cual garantiza según el fabricante del producto, incorporar 4-6 unidades de biotina por molécula de proteína). Sin embargo, se realizó una prueba empleando un exceso molar de 5 para comprobar si es posible incorporar menos unidades de biotina por proteína. En especial para anticuerpo, se espera que mientras menos unidades de biotina posea el receptor, más óptimo puede llegar a ser el bioreconocimiento del analito.

Al ser el proceso de conjugación aleatorio y poco controlado, las unidades de biotina pueden llegar a enlazarse en las áreas destinadas para la interacción del analito (Región Fab donde se encuentran los paratopos que interaccionan con los epítomos del analito) afectando gravemente el bioreconocimiento. Esta premisa no sólo afecta el reconocimiento sino también a la orientación del receptor una vez que este es anclado sobre la base de STV ubicada sobre el sensor. Es por ello que se ha intentado disminuir el número de biotinas por molécula de proteína, con la finalidad de eliminar o reducir estos inconvenientes.

Una vez que la proteína fue sometida al protocolo anteriormente descrito se realizaron diferentes procesos de purificación del conjugado final. La etapa de purificación es crucial para este tipo de conjugación. Una mala purificación del producto dejaría biotinas libres en solución que afectarían notablemente el ensayo, particularmente en la interacción con la STV anclada sobre el sensor dado que la bloquearían.

Para la purificación se emplearon dos metodologías. La primera se basó en el uso de columnas comerciales Zeba (Zeba Spin Desalting columns, Life Technologies, USA), de 40K y 5 mL de capacidad, y la segunda metodología, basada en columnas de gel Shepadex G-25 comercialmente pre-empaquetadas (PD10-Columns GE Healthcare, USA). Se realizó la purificación utilizando los procedimientos y protocolos recomendados para cada producto por el fabricante y el producto final fue sometido a un ensayo de cuantificación para evaluar la calidad del resultado final. Un control de IgG de conejo sin ser sometido al proceso de biotinización se empleó como control.

2.4.1.2 Cuantificación del número de biotinas por proteínas utilizando el método HABA/avidina

El colorante HABA (ácido 4'-hidroxiazobenzene-2-carboxílico) es un reactivo que se usa para realizar una estimación de la cantidad de grupos de biotinas introducidos sobre una anticuerpo, una vez que han sido conjugados con los mismos.

Algunas de las consideraciones a tomar en cuenta en este ensayo son:

- Es un ensayo de tipo colorimétrico, es decir que requiere medir la absorbancia a 500 nm de los reactivos utilizados
- Es un ensayo altamente fiable y fácil de realizar.
- Se requiere de cálculos basados en los valores de absorbancias obtenidos que son fáciles de manejar.
- Es un ensayo robusto. La reacción se puede llevar a cabo en un amplio rango de pH y de concentraciones salinas, así como también en gran variedad de tampones (excepto aquellos que contienen en su composición potasio, ya que pueden causar precipitaciones en el ensayo).
- La proteína modificada con biotina tiene que ser purificada antes de realizar este cálculo para eliminar todas las trazas de biotina que no reaccionaron con la proteína y que interfieren gravemente en el ensayo.

El ensayo se realizó empleando 100 mM del tampon PBS conteniendo 150 mM de NaCl a pH 7.2. La solución de HABA/Avidina se preparó inmediatamente antes de realizar el ensayo, aunque esta solución es estable por dos semanas si es almacenada a 4°C. Para ello, 10 mg de Avidina (Thermo Fisher Scientific, USA) y 600µL de una solución acuosa 10 mM de HABA

(Thermo Fisher Scientific, USA) son añadidos a 19.4 mL del tampon PBS. Si la preparación se ha realizado correctamente, la absorbancia a 500 nm de esta solución en una cubeta de 1 cm deberá estar entre 0.9-1.3

Para estimar la incorporación de la biotina, la solución que contiene la proteína biotinizada, se añade a la solución de HABA/avidina preparada previamente. Debido a la fuerte afinidad con la avidina, la biotina desplaza el HABA, generando un decaimiento de la absorbancia correspondiente al complejo HABA-Avidina (A_{500nm}), que es proporcional a este desplazamiento (Ver Figura 38).

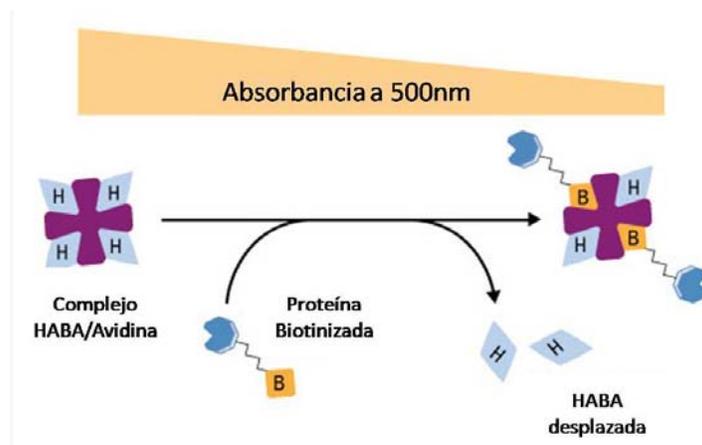


Figura 38. Esquema básico del ensayo HABA/Avidina para la cuantificación de biotinas conjugadas a proteínas.

Para realizar la estimación del grado de incorporación de biotinas en la conjugación biotina-anticuerpo se pipetea 900 μ L de la solución HABA/Avidina en una cubeta de cuarzo de 1 mL, y se mide la absorbancia de la solución a 500 nm ($A_{500 \text{ HABA/Avidina}}$). Posteriormente, se añaden 100 μ L de la muestra a cuantificar (proteína modificada con biotina) en la cubeta que contiene la solución de HABA/Avidina asegurándose de mezclar bien con la pipeta. Luego se mide la absorbancia de la solución en la cubeta a 500 nm hasta que el valor no presente variaciones por al menos 15 min ($A_{500 \text{ HABA/Avidina/muestra Biotina}}$) y, por último, se realiza los cálculos correspondientes.

Los cálculos de moles de biotinas por mol de proteína están basados en la Ley de Beer-Lambert: $A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} b C$, donde A_{λ} es la absorbancia de la muestra a una longitud de onda en particular (λ) (la longitud de onda del ensayo HABA es a 500 nm); ϵ , es el coeficiente de extinción a la longitud de onda (para muestras HABA/Avidina a 500 nm pH 7.0, este coeficiente es igual a $34,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), b , al paso óptico de la cubeta empleada en la medición (1.0 cm) y C , es la concentración de la muestra expresada en molaridad (mol/L).

Una vez conocidos estos valores los datos que se necesitan para los cálculos son, respectivamente: la concentración de la muestra de proteína conjugada con biotina a la cual se le realiza el ensayo, expresada en mg/mL, el peso molecular de la proteína, expresada en gr/mol (por ejemplo para IgG = 150,000 gr/mol), la absorbancia a 500 nm de la solución HABA/Avidin ($A_{500 \text{ HABA/Avidina}}$), así como también la absorbancia a 500 nm de la mezcla HABA/Avidina/Biotina ($A_{500 \text{ HABA/Avidina/Biotina}}$) y, finalmente, el factor de dilución, si la muestra de proteína ha sido diluida antes de ser mezclada con el reactivo HABA/Avidina.

Una vez se conocen estos datos se procede a la realización de los cálculos. A continuación se hace una descripción de los cálculos y las ecuaciones que se han empleado para la cuantificación de las unidades de biotinas en el proceso de conjugación con la IgG [Green; 1965; Green, 1970].

- Cálculo #1 Concentración de la proteína-Biotina en mmol/mL (antes de realizar cualquier dilución, si fuese el caso)

$$\text{mmol proteína por mL} = \frac{\text{concentración de proteína } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{\text{Peso molecular de la proteína } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mmol}}\right)} = \text{Calc\#1}$$

- Cálculo #2 Cambio de la absorbancia a 500 nm

$$\Delta A_{500} = (0.9 \times A_{500 \text{ HABA-Avidina}}) - (A_{500 \text{ HABA-Avidina-Biotina}}) = \text{Calc\#2}$$

EL factor 0.9 corresponde a un factor de corrección a ser incorporado cuando se trabaja en el formato de cubetas en el espectrofotómetro.

- Cálculo #3 Concentración de biotina en mmol por mL de la mezcla

$$\frac{\text{mmol de biotina}}{\text{mL de la solución mezcla}} = \frac{\Delta A_{500}}{(34,000 \times b)} = \frac{\text{Calc\#2}}{(34,000 \times b)} = \text{Calc\#3}$$

- Cálculo #4 Relación mmol de biotina por mmol de proteína

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{mmol de biotina en la muestra original}}{\text{mmol de proteína en la muestra original}} \\ &= \frac{(\text{mmol por mL de biotina en la mezcla})(10)(\text{factor de dilución})}{\text{mmol por mL de la proteína en la muestra original}} \\ &= \frac{(\text{Calc\#3}) \times 10 \times \text{factor de dilución}}{\text{Calc\#1}} = \# \text{ de biotina por molécula de proteína} \end{aligned}$$

De esta manera, se obtiene finalmente el número de moléculas de biotinas por molécula de proteína, resultante de la conjugación realizada.

2.4.2 PROTOCOLO DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE NANOCILINDROS DE ORO EMPLEANDO ÁCIDO MERCAPTOUNDECANOICO (MUA)

El ácido mercaptoundecanoico es una molécula química, cuyo estructura está formada por una cadena alifática capaz de interactuar mediante interacciones de Van der Waals con otras cadenas adyacentes formando un alineamiento bastante rígido y estable cuando se inmoviliza en superficies. Contiene un tiol en uno de sus extremos y un grupo carboxilo en el otro. El tiol interactúa con superficies de oro, mientras que el grupo carboxilo queda expuesto en la superficie de la monocapa formada pudiéndose usar en una etapa posterior para el anclaje del receptor biológico. La molécula de MUA es ampliamente usada en funcionalización de nanosensores de oro, debido a los excelentes resultados que arroja [Barbillon y col, 2007]. El grupo de Barbillon realizó un estudio preliminar del empleo de MUA en la formación de monocapas autoensambladas sobre sensores. En concreto, estos investigadores evaluaron la sensibilidad de los nanosensores de oro obtenidos mediante EBL, estudiando la influencia de la concentración de MUA en el desplazamiento de la longitud de onda del pico LSPR de los sensores. Así mismo, una vez que optimizaron la formación de la capa realizaron el anclaje de biotina empleando la reacción de EDC/NHS y evaluaron la funcionalización detectando estreptavidina (STV). Los resultados arrojaron una alta sensibilidad para la detección de STV una vez lograda la optimización de la concentración de MUA empleada para la formación del SAM.

En nuestro caso, una vez que se finaliza el proceso de fabricación (específicamente luego del proceso de remoción del resist, empleando el RIE), la solución de MUA es preparada. Es importante que se emplee una solución fresca para así evitar cualquier modificación de la molécula por acción del tiempo (degradación y oxidación de los grupos tiol). El MUA de acuerdo a las especificaciones del producto se debe mantener almacenado a 2-8 °C. Por ello, antes de preparar la disolución se deberá equilibrar el reactivo a temperatura ambiente para su uso. Fue empleado MUA 98% de pureza (Sigma Aldrich Co).

Se prepara una disolución de MUA a la concentración de trabajo en etanol 99% de pureza. Las estructuras son sumergidas en esta solución durante un periodo aproximado de 2 días (48 horas) empleando una cámara hermética cerrada que evita el contacto con el aire. Una vez pasado este tiempo, el sustrato es extraído de la cámara, se realizan tres lavados del sustrato con etanol y se seca con nitrógeno. El sustrato está listo para ser ensamblado con el chip de microfluídica.

2.4.2.1 Protocolo para la reacción entre grupos carboxilos del MUA y grupos aminos primarios de anticuerpos monoclonales empleando la reacción EDC/NHS.

En este trabajo, se empleó una activación EDC/NHS con una H-hidroxisuccinimida (NHS). Estos reactivos hay que protegerlos de la humedad para evitar reacciones colaterales como la hidrólisis que se muestra en la Figura 39.

Una vez los reactivos están listos para su utilización, se procede a preparar la solución mezcla de EDC/NHS que es introducida en el dispositivo y que activará los grupos carboxilos del MUA que se encuentran sobre la superficie de los nanocilindros de oro.

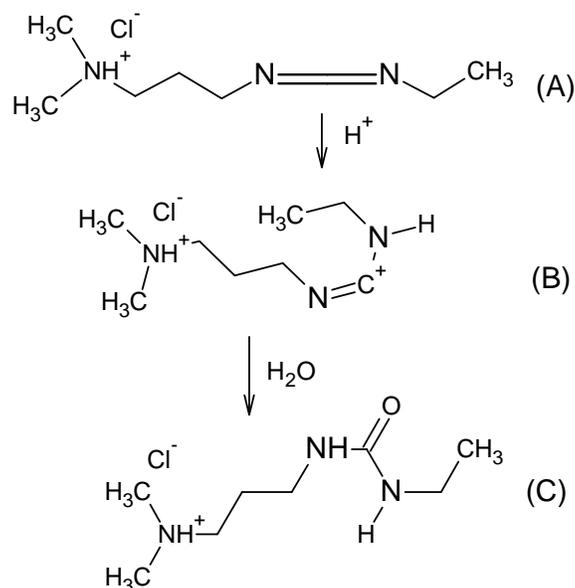


Figura 39. Estructura química irreversible del hidrocuro de *N*-(3-Dimetilaminoprol)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC).

En este trabajo se omiten las condiciones de conjugación y reacción por razones de confidencialidad.

Es importante decir que, normalmente en los experimentos, esta reacción no es completamente monitorizada para que la solución no permanezca a la espera de que el dispositivo esté listo para la medición, y así evitar degradación de los reactivos. El procedimiento normal es introducir los reactivos y empezar la reacción sin monitorización para, posteriormente, poner el dispositivo en marcha y monitorear así los pasos siguientes de anclaje del receptor.

La reacción EDC/NHS bajo estas condiciones muestra ser bastante reproducible y los resultados obtenidos muestran una gran sensibilidad y especificidad en la detección de analitos. Esta reacción fue usada para anclar diversos anticuerpos monoclonales como receptores, que fueron empleados en este trabajo para la detección de proteínas asociadas a diversas enfermedades de tipo oncológico (marcadores tumorales). A modo de introducción se puede decir que se emplearon con esta metodología diversos anticuerpos monoclonales altamente específicos a varias proteínas asociadas a estos marcadores tumorales, algunos de ellos fueron adquiridos de manera comercial y otros se obtuvieron de colaboradores con este proyecto (en el capítulo experimental se explicará en detalle estos procesos).

2.4.3. METODOLOGÍA APLICADA PARA LA DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN A PARTIR DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LOS SISTEMAS ANTICUERPO-ANALITO BAJO ESTUDIO.

Una vez las señales a diferentes concentraciones del analito fueron obtenidas, el siguiente paso es la realización de las curvas de calibración que determinarán el límite de cuantificación de la plataforma hacia ese analito bajo estudio.

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada [IUPAC, 1975], el límite de detección esta definido como un número expresado en unidades de concentración (o cantidad) que describe el más bajo nivel de concentración de una sustancia que puede determinarse como estadísticamente diferente del blanco analítico. La American Chemical Society se refiere al límite de detección como la más baja concentración de un analito que un procedimiento analítico puede detectar fidedignamente [McNaught y Wilkinson, 1997]. Por otro lado, tenemos el límite de cuantificación definido como la cantidad más pequeña de un analito que se pueda cuantificar con precisión y exactitud por un instrumento dado. Generalmente, se acuerda la cuantificación como la señal para una concentración igual a 10 veces la desviación estándar del blanco. El límite de cuantificación es un parámetro manejado en ensayos cuantitativos en particular para niveles bajos de compuestos en matrices de muestras, y se utiliza particularmente para la determinación de impurezas y / o productos de degradación. Ambos conceptos se relacionan a partir de la siguiente definición:

$$LC = 3.3 \text{ (LOD)}$$

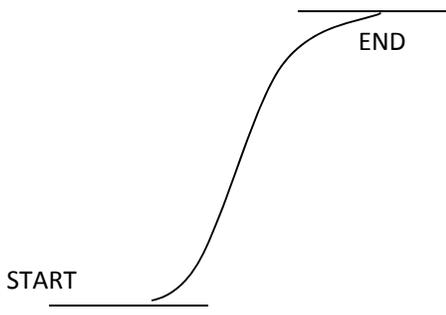
En este sentido, una vez se obtienen los datos, se realiza lo que hemos denominado curva de detección. Consiste en graficar los desplazamientos LSPR obtenidos para cada concentración con cada concentración respectiva. Una vez la gráfica es obtenida se realiza un ajuste sigmoidal tipo Hill. En bioquímica y farmacología, el enlace de un ligando a una macromolécula es favorecido si en la misma macromolécula existen otros ligandos presentes (esto se conoce como unión cooperativa). El ajuste de Hill básicamente, consigue cuantificar este efecto. Se utiliza ampliamente en la determinación del grado de cooperatividad en la unión de un ligando a una enzima o un receptor en general. Fue formulada por primera vez por Archibald Hill en 1910, para describir la unión sigmoidal del O₂ hacia la Hemoglobina [Hill A.V; 1910]. El ajuste fue realizado empleando un programa de análisis y tratamiento de datos, empleando la siguiente función Nolineal de tipo sigmoidal, denominada Hill1

$$y = START + (END - START) \frac{x^n}{k^n + x^n}$$

Donde los valores START y END vienen dados por los siguientes parámetros de la curva.

$$\left(\frac{START - END}{2}, k^n \right)$$

$END - START > 0$
Límites:
 $k > 0$
 $x \geq 0$
 $n > 0$



The diagram shows a horizontal line with a sigmoidal curve rising from it. The curve starts at a point labeled 'START' and ends at a point labeled 'END'. The curve is S-shaped, starting flat, rising steeply, and then leveling off again.

De esta manera, el ajuste sigmoideal permite obtener unos valores ajustados a la tendencia de puntos obtenidos experimentalmente. Es importante resaltar que las curvas de detección son mostradas en escalas logarítmicas para poder espaciar los rangos de concentraciones en las que se trabaja. Se obtuvieron en general ajustes con R promedio de 0.992.

Una vez que el ajuste es obtenido y con los datos de la curva se aplica la definición de límite de cuantificación definida anteriormente. El valor final de LC corresponde al valor de concentración que muestra el 10% del total de todas las señales obtenidas, y es lo que hemos denominado concentración efectiva EC10.

De esta manera queda definida la metodología que hemos empleado en la determinación de esta concentración para todos los ensayos de detección de analitos empleada en esta investigación. Es importante señalar que bajo esta metodología hemos presentado valores de cuantificación que representan la mínima concentración medible con alta precisión por nuestra plataforma. Sin embargo, basados en las definiciones anteriormente mostradas, los valores detectables por la misma (señales por encima del umbral del ruido) están 3.3 veces por debajo de los aquí reportados, lo que constituye una ventaja significativa en la colocación de la plataforma dentro de las técnicas ultrasensibles de detección biomolecular.

2.4.4 PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN EMPLEANDO ELISA DE LOS DIFERENTES SISTEMAS DE MARCADORES TUMORALES Y PROTEÍNAS EMPLEADAS EN ESTA INVESTIGACIÓN.

2.4.4.1 Materiales y Reactivos

- Placas para ELISA de 96 pocillos de Poliestireno transparente (Corning SL)
- Lector de placas de ELISA Biotek (DETALLES)
- Tampón de recubrimiento: 0.05 M NaCO₃/HCO₃ (Sigma Aldrich, USA) pH 9.24
- Tampón Bloqueante: 0.1 M PBS (Sigma Aldrich); 0.15 M NaCl (Sigma Aldrich, USA), 2 % BSA (Sigma Aldrich, USA) pH7.2
- Tampón para los lavados: 0.1 M PBS; 0.15 M NaCl, 0.05 % Tween20 (Sigma Aldrich, USA) pH 7.2
- Las proteínas junto con las diluciones empleadas fueron preparadas en tampón PBS y en el correspondiente suero humano (Sigma Aldrich, USA) 1:1 PBS y luego Filtrado con filtros de jeringa y tamaño de poro 0.8 µm
- Conjugados empleados en las diferentes curvas de calibración realizadas:
 - Anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa Alcalina (Sigma Aldrich, USA)
 - Anti-IgG de cabra conjugada con fosfatasa Alcalina (sigma Aldrich, USA)
 - Anti-IgG de ratón conjugada con fosfatasa Alcalina (Sigma Aldrich, USA)
- Paranitrofenol (PNPP) como sustrato de la reacción enzimática (Thermo Fisher Scientific, USA)

2.4.2.2 Elaboración de curvas de calibración empleando ELISA

A continuación describiremos el procedimiento seguido para la elaboración de las curvas de calibración como método de validación empleando ensayos tipo ELISA. Todas las etapas fueron realizadas por triplicado

- Se realiza inicialmente la inmovilización del anticuerpo monoclonal (en algunos casos para el estudio de reactividad cruzada se han empleado en esta etapas los anticuerpos policlonales respectivos). Para ello se prepara el anticuerpo en el correspondiente tampón de recubrimiento a una concentración de 10 µg/mL y se añaden 50 µL de este en los pocillos. Se recubre la placa con un film plástico y se conserva a 4 °C durante toda la noche
- Al transcurrir este tiempo se realiza el lavado de la placa empleando 200 µL del tampón de lavado en cada pocillo y se coloca la placa en un agitador orbital por 5 minutos. Este procedimiento se realiza por triplicado.

- Se añaden 200 μL del tampón bloqueante a cada pocillo y se incuba durante toda la noche a 4°C .
- Se elimina esta solución y se realizan nuevamente y por triplicado el lavado de los pocillos con 200 μL del tampón de lavado.
- Se realizan las diluciones respectivas del antígeno y se añaden a los pocillos. Se realizaron pruebas de los antígenos en tampón (empleando en esta prueba el tampón bloqueante) y también en suero humano (el mismo empleado en los experimentos de detección). El rango de concentraciones está dentro del rango 0.0001 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada punto de la curva se realiza por triplicado. Se deja incubar por 1 hora a 37°C . En otros experimentos se realizaron únicamente pruebas de afinidad entre los anticuerpos y el analito así como también de reactividad cruzada entre los elementos y efectos de la matriz en la detección.
- Se realizan los lavados de los pocillos por triplicado.
- Se añaden 50 μL del anticuerpo policlonal respectivo a los pocillos. Hemos empleado una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ preparado en el tampón bloqueante para los anticuerpos policlonales utilizados y se deja incubar por 1 h a 37°C .
- Se realizan los lavados de los pocillos por triplicado
- Se incuba con el segundo anticuerpo conjugado con la fosfatasa alcalina según corresponda con el sistema de anticuerpo policlonal empleado. Se prepara una dilución 1/7000 en el tampón bloqueante de este segundo anticuerpo y se añade 50 μL en cada pocillo. Se deja incubar por 1 h a 37°C .
- Se realiza el lavado respectivo de los pocillos. Esta vez el lavado se realiza seis veces bajo el mismo procedimiento
- Finalmente, se añaden 50 μL del sustrato PNPP preparado en el tampón de recubrimiento a cada pocillo. En este paso se recomienda el uso de una multipipeta para ayudar al desarrollo uniforme de la reacción enzimática en todos los pocillos. Se prepara una concentración de 1 mg/mL de PNPP por volumen requerido. Se deja incubar por 30 min a 37°C
- Se realizan las medidas de absorbancia de la placa a 405 nm empleando el lector de placas. En algunos casos la reacción enzimática es rápida por lo que se pueden emplear 50 μL de una solución de NaOH 3 N en cada pocillo para detener la reacción.

Capítulo 3

Parte Experimental

Capítulo 3

Parte Experimental

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LOS NANOSENSORES EMPLEANDO BRI Y SELECCIÓN DEL MEJOR SISTEMA DE NANOESTRUCTURAS PARA SER EMPLEADOS COMO ELEMENTO SENSOR EN LA PLATAFORMA OPTOFLUIDICA DESARROLLADA

Una vez la plataforma optofluídica fue desarrollada y sus parámetros de operación optimizados, los primeros experimentos con dicha plataforma fueron realizados para la determinación de la sensibilidad de los diferentes sistemas nanoestructurados fabricados y la evaluación de los posibles candidatos para pasarían a formar parte del elemento sensor final. Primeramente las medidas fueron realizadas para muestras de nanodiscos bastante espaciados entre sí (200 nm de separación aproximadamente), así como de Nanocilindros con alto potencial para ser empleados como elemento sensor. La sensibilidad de ambos sistemas fue calculada y comparada empleando soluciones de glucosa de diferentes índice de refracción. En el capítulo 2 se describe en detalle la metodología empleada para la determinación de la sensibilidad. En la Figura 40 podemos ver las curvas correspondientes a la determinación de la sensibilidad para muestras de Nanodiscos de oro.

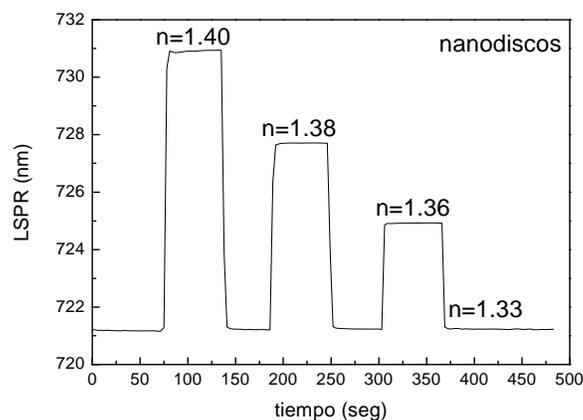


Figura 40. Medidas en tiempo real del BRI de soluciones calibradas de glucosa de distintos índices de refracción sobre Nanodiscos de oro.

Si se grafica el cambio de longitud de onda obtenido con la variación en el índice de refracción correspondiente, la pendiente de dicha grafica nos arroja la sensibilidad del sistema (ver ecuación 9), como se observa en la Figura 41.

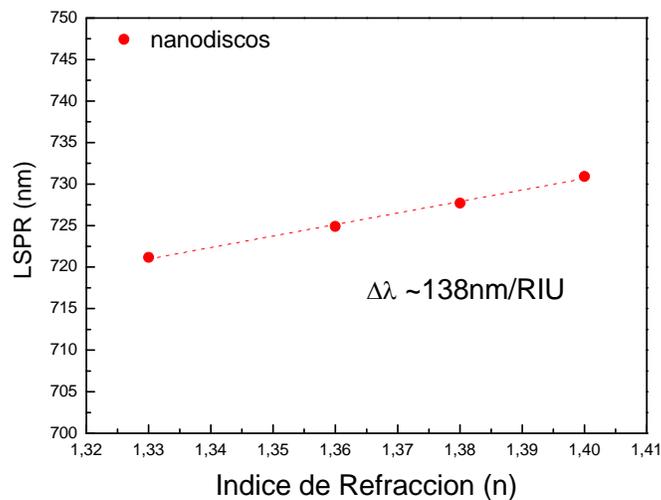


Figura 41. Medida y determinación de la sensibilidad de nanodiscos de oro.

La medida de la sensibilidad mediante el BRI antes de un experimento de detección molecular de un nanosensor también es altamente beneficiosa por las siguientes razones. Frecuentemente, los dispositivos opto-fluídicos que conforman la plataforma son realizados bajo las condiciones de una sala blanca (con control de partículas por área, humedad, atmósfera, etc.). Sin embargo, el dispositivo no está libre de contaminación. Esta contaminación, si la hubiese, puede ser detectada mediante una medida del BRI y así tomar las acciones pertinentes (como lavados del dispositivo) para la posterior utilización del sensor. Igualmente, la medida de BRI es un indicativo de la reproducibilidad de las nanopartículas fabricadas. Si el BRI no es consistente entre muestras preparadas bajo las mismas condiciones, es muy probable que las respuestas de los enlaces moleculares asociados a los experimentos de detección molecular no sean reproducibles.

Para aplicaciones en biosensado, estructuras como nanodiscos podrían ofrecer una buena alternativa, ya que presentan una buena sensibilidad, es relativamente sencilla su fabricación y además permiten que los resultados sean altamente reproducibles ya que no tienen asociados efectos morfológicos significativos que puedan alterar medidas entre un sistema y otro.

Sin embargo, los sensores que se han empleado en este trabajo de investigación están basados en nanocilindros de oro. Se realizó una comparación entre nanodiscos y nanocilindros para evaluar el potencial de las estructuras en el biosensado de biomoléculas. Para ello, el mismo protocolo de funcionalización anteriormente descrito fue empleado en muestras de nanodiscos de 80 nm de diámetro y de nanocilindros con la geometría descrita anteriormente (170 x110 nm aproximadamente, Ver Figura 24A). Podemos ver en la Figura 42 la respuesta en BRI para ambos sistemas, obteniendo *a priori*, que los sistemas de nanocilindros resultan ser más sensibles a cambios grandes de índice de refracción. Se empleó una solución de glucosa de índice de refracción 1.346 para llevar a cabo el ensayo. Para este experimento se

emplearon dos microcanales aislados del dispositivo, donde se efectuó de manera paralela el ensayo, para evaluar así la reproducibilidad obtenida.

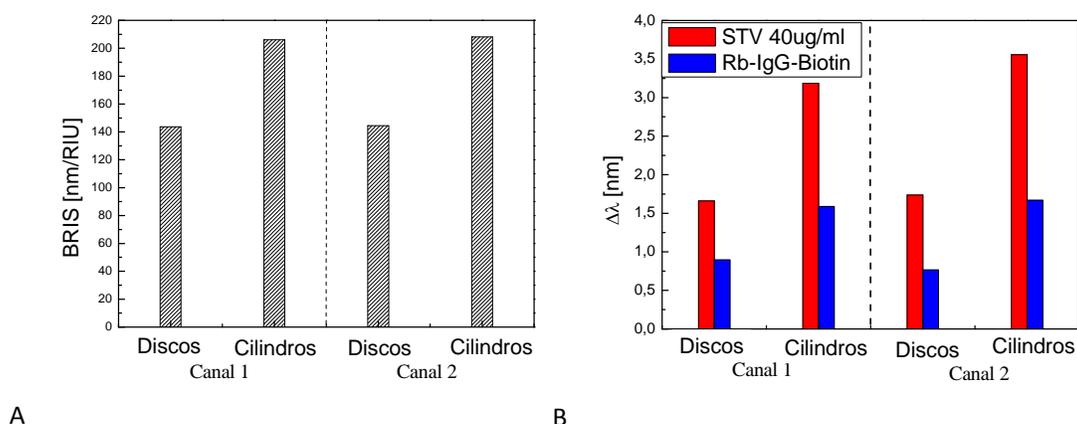


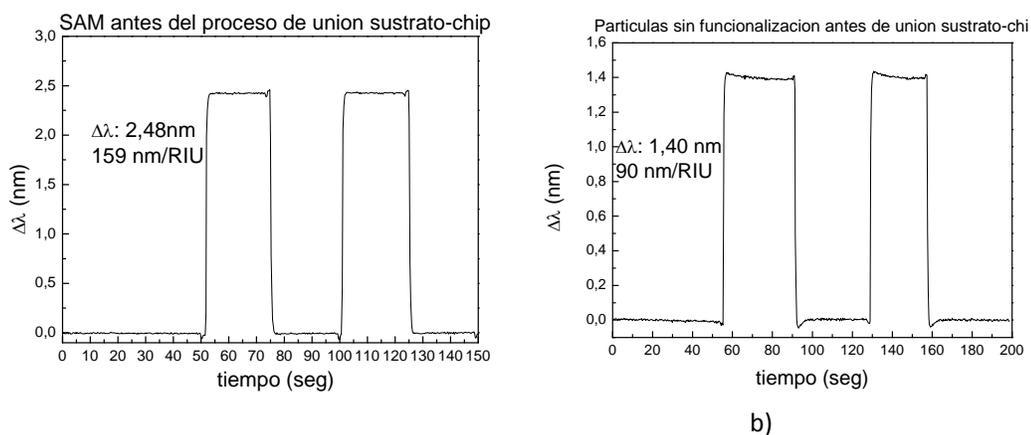
Figura 42. Comparación de la viabilidad en biosensado para nanodiscos y nanocilindros de oro. A) medidas de BRI para ambos sistemas. Se observa como los sistemas de nanocilindros muestran ser más sensibles que los discos. B) Anclaje del receptor STV y detección de la inmunoglobulina conjugada con biotina para ambas estructuras. El máximo desplazamiento del plasmón es producido para los sistemas de nanocilindros, lo que lleva a concluir que es un mejor sistema para ser empleado en detección a nivel molecular.

Cuando se realiza el anclaje de la STV sobre la superficie empleando una química de funcionalización basada en la interacción biotina-STV (que describiremos más adelante), el desplazamiento mayor del pico LSPR fue obtenido para los sistemas de nanocilindros (como se observa en la Figura 42B), así mismo la final detección de la inmunoglobulina conjugada (RbIgG-Biotina) presenta la misma tendencia. Esto es debido a la distribución del campo localizado que presentan los cilindros en cuyas áreas (especialmente en los bordes de la estructuras) se confina el campo y las hacen más sensibles a cambios en los índices de refracción [Ghenuche y col, 2008]. Esta característica hace que estos sistemas experimenten un desplazamiento mayor del plasmón de resonancia localizado cuando las moléculas se encuentran en estas áreas (debido a un enlace específico con el receptor) donde el campo es más intenso, lo que las hace más sensibles en comparación con su equivalente sistema de discos.

Estos resultados llevaron a escoger finalmente el sistema de nanocilindros de oro como el elemento principal de sensado en nuestra plataforma opto-fluídica. Estos experimentos fueron realizados como prueba de concepto y más adelante en los capítulos siguientes se presentarán ensayos de detección molecular más detallados y con diversas aplicaciones en la detección de marcadores tumorales.

Por último, para este sistema de nanocilindros hemos realizado medidas de BRI, antes y después de realizar la formación de SAM sobre ellos, encontrando que el proceso de unión del sustrato con el chip de microfluídica afectaba notablemente a la sensibilidad de las

estructuras. Las razones no han sido identificadas en esta investigación, pero se cree que la atmósfera y el calentamiento que se genera durante la unión de los dos elementos (entre 50-80 °C) afecta la morfología de la estructura, afectando por ende la sensibilidad.



a) b)
 Figura 43. Medidas de BRI para dos sustratos de Nanocilindros de oro a) al realizar la formación de SAM empleando HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina antes de la unión del sustrato al chip y b) sin funcionalización antes de la unión.

En la Figura 43 podemos observar las medidas de BRI correspondientes a dos muestras de nanocilindros de oro preparadas bajo las mismas condiciones. Uno de los sustratos fue sumergido por 48 horas en una solución metanólica 1 mM de la molécula HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina colocado en una cámara especial que mantienen la estabilidad de la solución (más adelante se explicará en detalle este proceso), y el otro sustrato no fue sometido a ninguna funcionalización.

Ambos sustratos antes de ser enlazados al chip fueron lavados con metanol y secados empleando N₂. Se realizó la unión de ambos elementos según el procedimiento antes descrito y las medidas de BRI fueron realizadas empleando una solución de glucosa de índice de refracción 1.3486. Se puede observar como los Nanocilindros de oro presentan una sensibilidad de 159 nm/RIU (Figura 43a) para el caso donde se ha realizado la funcionalización, mucho mayor de la correspondiente al sustrato sin funcionalizar, 90 nm/RIU (Figura 43b). Es de esperar que esta funcionalización previa proteja las estructuras de posibles efectos que puedan producirse durante el proceso de unión sustrato-chip. Durante este proceso, que consta básicamente en mantener la muestra dentro de un horno a una temperatura dada, ocurre un fenómeno (contaminación, deformación, depósito de algún agente externo, etc) que puede estar alterando las estructuras, afectando sustancialmente su sensibilidad. Es esta alteración lo que en principio originaría una disminución notable de la sensibilidad. Es por esta razón que se ha decidido realizar la protección de las estructuras antes de la elaboración del chip final, sin embargo, se sugiere realizar estudios más detallados que puedan corroborar y explicar en detalle este fenómeno observado.

En este sentido para evaluar si es posible recuperar la sensibilidad de las estructuras sin ser necesaria la funcionalización previa antes de este proceso (que igualmente afecta un poco la sensibilidad final por la presencia de estas biomoléculas), se ha realizado un protocolo comúnmente usado para la remoción y limpieza de superficies de sílica y metálicas (Sugerido por el Dr. Mark Kreuzer, ICFO-PNO). Este protocolo se basa en el uso de una mezcla de agentes ácidos-corrosivos que eliminan cualquier contaminación que pueda existir sobre la superficie. Para ello, se ha mezclado en una relación de 5:1:1 Agua desionizada milliQ, peróxido de hidrógeno 30% (Sigma Aldrich, USA) y HCl 37% y se ha hecho circular en el chip cuyas estructuras no han sido funcionalizadas. Posteriormente, la sensibilidad fue medida empleando la misma solución de glucosa empleada anteriormente.

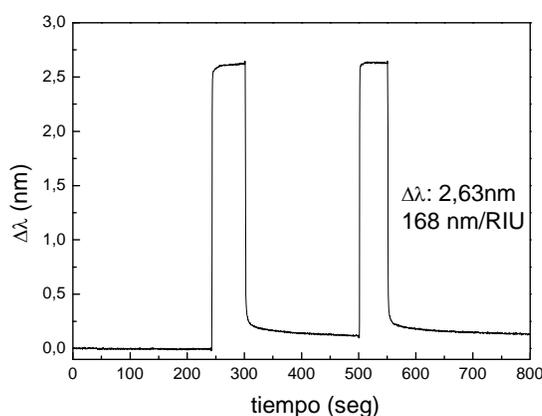
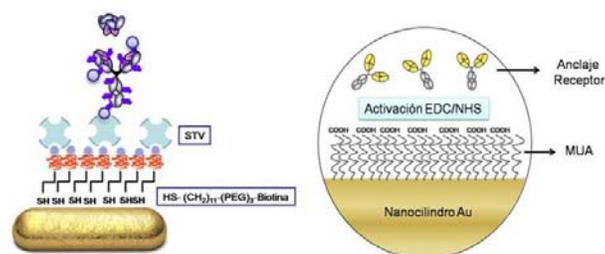


Figura 44. Medidas de BSI después de realizar un procedimiento de limpieza sobre Nanocilindros de oro sin funcionalizar empleando una mezcla 5:1:1 de Agua desionizada milliQ, peróxido de hidrógeno 30 % y HCl 37 %

Como se puede notar en la Figura 44, la sensibilidad luego del proceso de limpieza mejoró significativamente (168 nm/RIU), siendo comparable con la sensibilidad mostrada para las estructuras protegidas por el SAM. Sin embargo el uso de esta solución tan agresiva dentro del chip afectó el PDMS que lo conforma, así como también diversos elementos como tubos y conectores que no son compatibles con esta solución. Se intentó modificar los elementos, buscando materiales compatibles, pero al no poder modificar el material principal (PDMS) se decidió no emplear este protocolo. Otros protocolos menos agresivos pueden ser utilizados, sin embargo, se piensa que el empleo de este tipo de sustancias podrían crear una atmósfera dentro del chip que podría afectar la estabilidad de las especies biológicas (muy sensibles a cambios de pH, solvente, etc) que se emplearían posteriormente. Debido a estos factores, se ha decidido realizar la protección de las nanoestructuras mediante la formación de la SAM (según el protocolo de funcionalización a seguir) antes del proceso de unión final entre el chip de microfluídica y el sustrato. A continuación se describirán en que se basan estas metodologías de funcionalización.

3.2 ENSAYOS PRELIMINARES Y PUESTA EN MARCHA DE LA PLATAFORMA OPTOFLUÍDICA DESARROLLADA PARA LA DETECCIÓN DE ANALITOS EN DISTINTAS MATRICES.

Para la puesta en marcha del dispositivo se pensó primeramente en dos metodologías de funcionalización para la preparación de las Nanocilindros de oro y el respectivo anclaje de los receptores sobre su superficie. En los primeros estudios realizados empleamos una metodología basada en la interacción Biotina-STV, empleando como base del protocolo un SAM de HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina. Posteriormente, debido a las razones que más adelante describiremos en detalle, se realizó un protocolo de funcionalización basado en la activación de los grupos -COOH de una base de MUA, empleando la reacción de activación EDC/NHS. Ambos protocolos fueron testados y empleados en un sistema bien conocido de anticuerpos IgG. En la Figura 45 se muestra un esquema de las distintas metodologías y las aplicaciones en la detección de diversos analitos realizados en esta tesis doctoral.



Protocolo	INTERACCIÓN BIOTINA-STV	ACTIVACIÓN VIA NHS/EDC
SAM	HS-(CH ₂) ₁₁ -(PEG) ₃ -BIOTINA	Acido mercaptoundecanoico (MUA)
Pre-tratamiento previo del receptor	Si (biotinización previa del receptor)	NO
Orientación del receptor	NO (aleatorio)	Posible pseudo-orientación al pH de trabajo
Sistema para la evaluación y optimización de parámetros	IgG/anti-IgG	IgG/anti-IgG
Aplicación en la detección de marcadores tumorales	HSP70	AFP, PSA, CEA y S100A4
Preservación volumen de sensado	Requiere una base de STV (paso adicional)	No requiere pasos adicionales

Figura 45. Esquema que resume las metodologías de funcionalización empleadas en esta tesis doctoral y su aplicación en la detección de diversos sistemas de analitos.

A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos para la metodología empleando la interacción biotina-STV y su aplicación en la detección de un sistema relevante en el área de oncología como lo es la detección de la proteína HSP70.

3.2.1 METODOLOGÍA DE DETECCIÓN BASADA EN LA INTERACCIÓN BIOTINA-STV.

3.2.1.1. Optimización de la capa de STV sobre el sensor funcionalizado CON HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina.

Por ser la STV una molécula que contiene un grupo sensible a las condiciones de trabajo, (por ejemplo, cambios en pH, temperatura y/o solvente, pueden alterar la conformación de la biotina, afectando la posterior interacción con la STV), hemos intentado evaluar primeramente la posible formación de la monocapa bajo condiciones de microfluídica, comparándolo con la incubación previa de los sensores en la solución antes del proceso de ensamblaje (procedimiento que ha sido empleado como general en la formación de SAM empleando las distintas moléculas, descrito en el capítulo anterior).

En un primer ensayo se evaluó la formación de la monocapa dentro del chip, a diferencia del protocolo convencional, se realizó el ensamblaje del chip sobre el sustrato en aire y se dejó en el horno por 10 horas a 50 °C. Una vez finalizado este tiempo, se introdujo la disolución de la molécula HS-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina en los distintos canales del chip y el pico LSPR fue monitorizado a tiempo real. En la Figura 46 se puede observar el sensograma obtenido para este proceso.

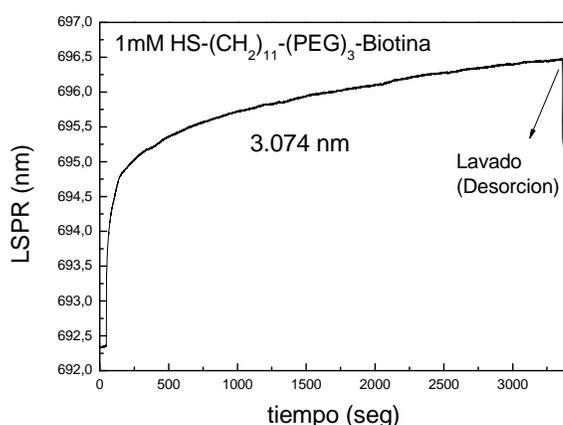


Figura 46. Sensograma donde se muestra la formación del SAM bajo condiciones fluídicas (dentro del chip una vez que ha sido ensamblado al sustrato con los nanosensores)

Se puede observar como en el sensograma final se produce un cambio total de 3.074 nm hasta que alcanza la saturación. Luego se procede a efectuar un lavado con el disolvente para así

eliminar el exceso de la molécula no fuertemente enlazada. La desorción que se observa es pronunciada, lo que *a priori* dice mucho de la calidad de la monocapa. Uno de los inconvenientes que trae el uso de esta molécula (mixtas-alifáticas) se debe principalmente a la peor organización que consiguen en comparación con sus equivalentes cadenas alifáticas. El grupo PEG es un grupo que le otorga movilidad a la monocapa debido al volumen que posee y a las interacciones de repulsión entre estos grupos una vez han sido organizadas las cadenas sobre la superficie. Esto hace que la alineación de las cadenas no sea tan buena como en el caso de las exclusivamente alifáticas donde pueden llegar a formar compactados bien organizados y de alta estabilidad por interacciones de Van der Waals. Es por ello que la presencia del PEG junto con la biotina conjugada, originan un peor ordenamiento de las cadenas, lo que dificulta su ordenamiento, especialmente bajo condiciones fluídicas. Recordemos que la formación de la monocapa bajo condiciones fluídicas no se rige por los mismos principios que en condiciones estáticas, lo que introduce una fuerte desventaja de esta modalidad de formación. Otro de los inconvenientes encontrados es que al emplear en el chip soluciones metánolicas (solvente empleado para la preparación del reactivo) se produce un pequeño hinchamiento del PDMS, producto de la alta volatibilidad de este disolvente, lo que afecta a la monitorización de la medida en tiempo real.

Hemos comparado la unión del receptor para ambos casos. Como receptor hemos empleado STV (Sigma Aldrich & Co) 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón HEPES pH 7.2. Los lavados para eliminar el exceso de moléculas no enlazadas fueron realizados empleando el mismo tampón. En la Figura 47 podemos observar los resultados obtenidos. Se puede ver como el caso donde la monocapa ha sido formada bajo condiciones de incubación se genera un desplazamiento del pico LSPR mayor que en el caso en donde la monocapa se ha formado *in situ* dentro del chip (2.83 nm vs 1.33nm (± 0.26 nm), respectivamente). Atribuimos este efecto al hecho que bajo condiciones estáticas, hay un mayor control del proceso de formación de la SAM, teniendo más tiempo para que las interacciones entre las moléculas que la conforman (en este caso SH-PEG-Biotina) sean las más óptimas y por ende la calidad del ensamblaje final sobre la superficie de oro generado, es mucho mejor, y por ende la capa de STV sobre este también, generando así un mayor desplazamiento del pico LSPR para esta etapa (gráfico rojo).

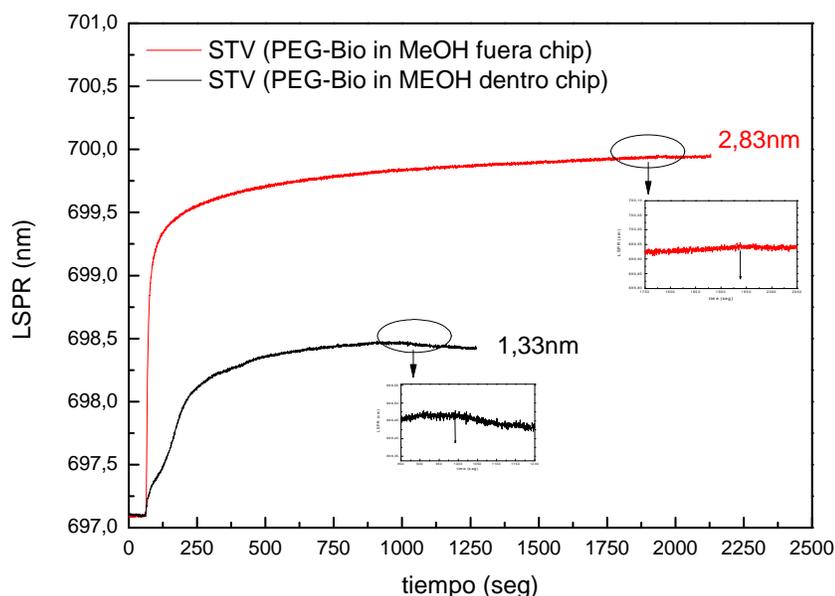


Figura 47. Sensograma que muestra el enlace del receptor STV (40ug/mL) a la monocapa de SH-(CH₂)₁₁- (PEG)₃-Biotina formada fuera del chip bajo incubación (gráfico rojo) y dentro del chip bajo condiciones fluidicas (gráfico negro). Se observa un zoom de la región donde se muestra la desorción debido al lavado con el tampón.

Alternativamente a estos resultados, tenemos indicios que hacen pensar que la formación del SAM antes del ensamblado ayuda notablemente a conservar las condiciones estructurales y morfológicas de los sensores después de la fabricación. Como hemos observado en el apartado de mediciones de sensibilidad empleando medidas de índice de refracción, los sensores si no son “protegidos” por la molécula antes de ser ensamblados al chip durante el proceso de horneado que fija el chip con el sustrato de vidrio, se cree que pueda ocurrir un efecto que modifica y/o altera la morfología de las estructuras, afectando notablemente el plasmón y la sensibilidad de los mismos, pudiendo ocasionar a la vez una afectación de los posteriores procesos de funcionalización para el anclaje del receptor (como es el caso de la inmovilización de STV). Esta es otra importante razón por la que nos hemos decantado a realizar la formación de la monocapa fuera del chip.

Por otro lado, una optimización del enlace entre la STV y la monocapa de SH-(PEG)-Biotina fue realizada, para estudiar la reproducibilidad del enlace cuando la monocapa esta óptimamente formada. En la Figura 48 podemos ver que un valor comprendido dentro del rango (2.737 ± 0.261) nm, nos da un buen indicio de la calidad de la monocapa, así como también de la reproducibilidad del posterior enlace del receptor sobre esta SAM, proceso importante para los siguientes pasos en la detección del analito de interés.

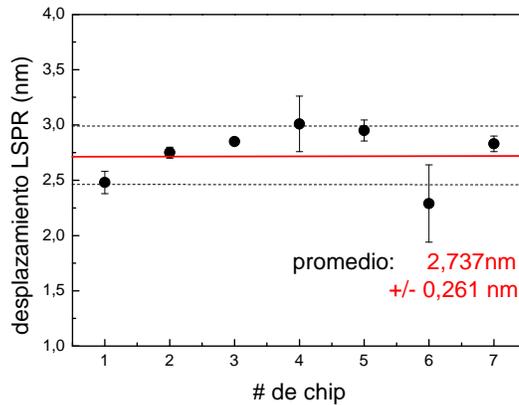


Figura 48. Optimización del enlace del receptor STV a la monocapa SAM de SH-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina.

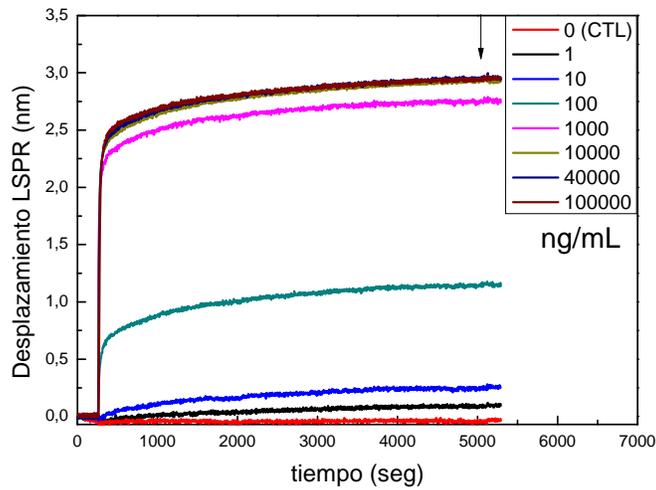
Una vez estudiado la unión de la STV con el SAM, se optimizó la formación de la capa de STV sobre la superficie del sensor. Para ello, se evaluó el grado de saturación de la monocapa con STV estudiando el efecto de la concentración. Esta variable representa un factor importante para la óptima detección posterior del analito en cuanto que afecta a la posterior unión del conjugado anticuerpo-biotina. En la Figura 49A y 49B, podemos observar las curvas de unión de la STV a la monocapa de biotina unida previamente a la superficie del sensor, junto con los correspondientes desplazamientos de plasmón superficial obtenidos para cada concentración de STV testada.

Se ensayó un rango de concentraciones de STV de 1-10000 ng/mL en tampón HEPES 10 mM pH 7.5, junto con el correspondiente control sin STV, inyectando en el chip cada concentración en canales individuales y midiendo por triplicado las correspondientes señales obtenidas. En la Figura 49A, podemos observar los sensogramas obtenidos para cada concentración de STV. La flecha indica el momento donde se ha realizado el correspondiente proceso de lavado con el tampón, donde no se observó una desorción significativa de las moléculas de STV. El proceso de formación de la capa dura un promedio de 85 minutos (bajo condiciones de flujo), obteniendo una saturación de la superficie a una concentración de 10 µg/mL.

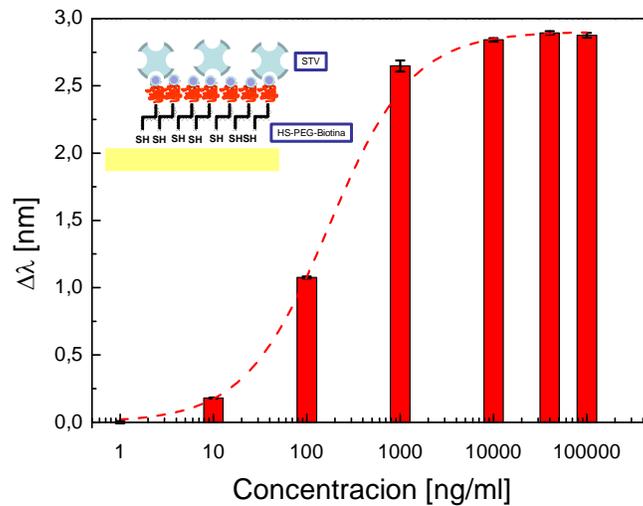
Se observó una dependencia sigmoideal al representar el desplazamiento máximo observado en función de la concentración de STV, con un coeficiente de variación (CV) menor de un 1.5 %, lo que muestra la alta reproducibilidad y precisión de las medidas. La línea discontinua en el gráfico, representa el ajuste no lineal de la curva obtenida, que fue obtenido usando una función de tipo Hill1. El límite de cuantificación se calculó a partir de este ajuste. Este LC está representado por lo que se conoce como concentración efectiva EC10. En este sentido, el LC obtenido de la curva corresponde a 17 ng/mL, lo que implica que es la mínima concentración fiable que puede ser medida para STV empleando estas condiciones.

Sin embargo, la mínima concentración que puede ser detectada corresponde a 1 ng/mL, cuya señal puede ser resuelta en el tiempo después de 900 segundos. Esto implica que para que la

determinación de concentraciones más pequeñas sea resuelta, un mayor tiempo de análisis debe ser aplicado.



A



B

Figura 49. A) Sensogramas donde se muestra el desplazamiento del pico LSPR en tiempo real para diferentes concentraciones de STV enlazadas a la monocapa de HS-PEG-Biotina sobre nanopartículas de oro. La flecha indica la iniciación de la etapa de lavado y la leyenda corresponde a la concentración de STV expresada en ng/mL. B) Representación del desplazamiento del pico LSPR en función de la concentración de STV obtenida a partir de los sensogramas anteriores. Se muestra el ajuste no lineal correspondiente junto con una representación del anclaje que se lleva a cabo.

De la curva obtenida en la Figura 49B, se puede identificar la concentración mínima de STV que puede ser usada en el ensayo que bajo las condiciones de trabajo podría saturar la superficie del sensor cubierta con la SAM. Esta concentración la emplearemos para el posterior bio-reconocimiento de los analitos por parte de los receptores inmovilizados via interacción biotina-STV, sin embargo, depende los sistemas bajo estudio en algunos casos no es

recomendable el saturar la superficie, debido a impedimentos estéricos que pueden dar lugar a una disminución de la sensibilidad. Al observar la gráfica de la Figura 49B, se puede notar claramente como para un rango de concentraciones por encima de 10 $\mu\text{g/mL}$ se alcanza el umbral de saturación con STV en el sensor.

Un efecto que se debe tomar en cuenta es la formación de múltiples capas de STV para altas concentraciones de la misma. En la Figura 50 se muestra un sensograma que muestra el enlace de STV a 40 $\mu\text{g/mL}$ al sensor funcionalizado. En este sensograma se observa un comportamiento característico que se cree pueda producirse por la formación de múltiples capas de esta proteína sobre el sensor. Se evidencia que durante el proceso de lavado existe una desorción significativa de las moléculas que no interaccionan fuertemente con la capa de biotina formada sobre éste. Así mismo, se observa que una vez el lavado se ha realizado, el cambio en LSPR que está asociado a la unión STV-Biotina disminuye de 3.34 nm a un valor de 2.93 nm. Este valor final está dentro del rango característico que define este enlace STV-Biotina situado en $2.737 \pm 0.261\text{nm}$, como lo definimos anteriormente. Partiendo de estas premisas, se decidió utilizar una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ para los ensayos de detección empleando este protocolo.

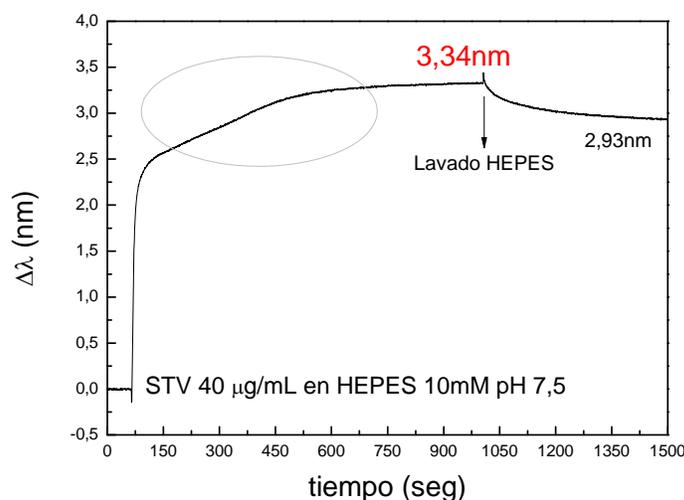


Figura 50. Sensograma que representa la unión de 40 $\mu\text{g/mL}$ de STV sobre el sensor de oro funcionalizado con HS-PEG-Biotina. Se observa un cambio en la cinética de la reacción que podría estar ligado a la formación de múltiples capas por parte del STV. La flecha indica el proceso de lavado con el tampón. Se observa la desorción significativa de las moléculas de STV en el proceso.

A pesar de las múltiples ventajas que ofrece este protocolo en cuanto a la elevada estabilidad y afinidad que presenta el sistema biotina-STV, también se ha encontrado que presenta algunas desventajas con respecto a otros protocolos. En primer lugar, el requerir la STV como enlace entre la monocapa de HS-PEG-Biotina y el receptor, implica un paso más en el ensayo, así como también la ocupación por parte de esta proteína de gran parte del área de sensado (alrededor de 2 nm) lo que puede comprometer, dependiendo del caso, la detección del

antígeno, perdiendo así sensibilidad. Es por esto, que se realizaron algunas medidas de BRIS antes y después de la formación de la capa de STV, con el propósito de evaluar si la presencia de estas moléculas afectan o no la sensibilidad del sensor. Se han realizado primeramente medidas de BRI sobre los sensores simples con SAM, empleando una solución de glucosa de 1.340 de índice de refracción. En cuatro canales se ha hecho circular STV 10 $\mu\text{g/mL}$, hasta lograr la saturación de la señal. Finalmente se han realizado de nuevo las medidas de BRIS bajo las mismas condiciones y ambos resultados fueron comparados.

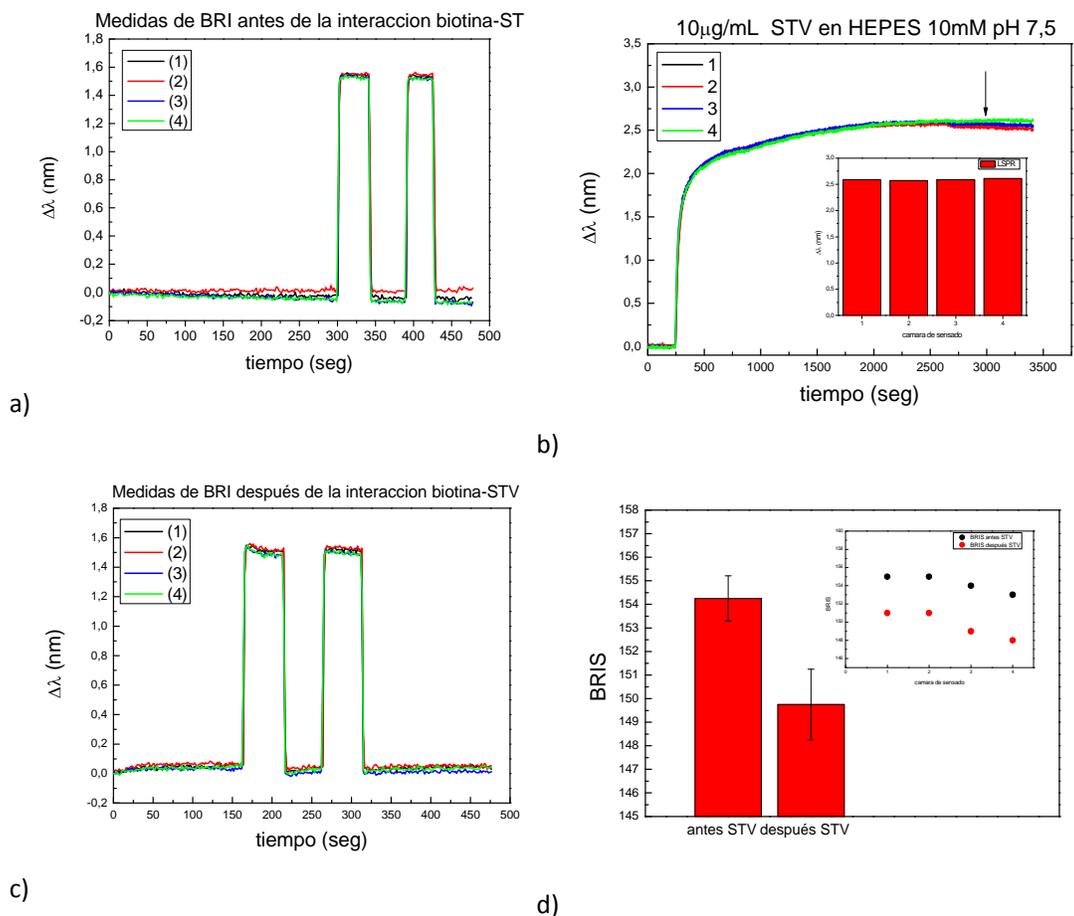


Figura 51. Evaluación de la sensibilidad de los sensores al unir STV empleando el protocolo basado en la interacción STV-biotina para anclar el receptor. a) Medidas de BRIS antes de unir al STV (sensor solo SAM), b) Unión de 10 $\mu\text{g/mL}$ de STV sobre el sensor (se observa el proceso de lavado así como también los histogramas que muestran el desplazamiento del pico LSPR debido a la unión), c) Medidas de BRI después de la unión (bajo las mismas condiciones) y d) finalmente comparación de ambos resultados. Se observa como la STV produce una disminución significativa de la sensibilidad.

En la Figura 51a se observa las medidas de BRIS que indican un comportamiento reproducible de las señales para los cuatro canales. Inicialmente, se tiene en promedio una sensibilidad de (154.25 ± 0.96) nm/RIU. Al incorporar la STV podemos observar en la Figura 51b como se obtiene una unión óptima que arroja un valor comprendido en el rango optimizado para este proceso (2.59 ± 0.02) nm. Una vez realizada la unión, se realizaron las medidas de BRIS de nuevo sobre el sensor, esta vez con la STV incorporada, mostrando una disminución

significativa de los valores de (149.75 ± 1.5) nm/RIU. Estos resultados corroboran la hipótesis de la pérdida de sensibilidad al añadir una capa más en el protocolo de anclaje del receptor. Sin embargo, como veremos más adelante, los resultados para la detección del analito muestran que la plataforma es capaz de resolver concentraciones pequeñas para el sistema de anticuerpos empleado, por lo que la pérdida de sensibilidad no es significativa como para no permitir la detección del analito de interés.

Por otro lado, en esta metodología, la necesidad de modificación del receptor (con biotina) es un punto en contra, debido a que estos procesos, a pesar de que son controlables y ampliamente utilizados, siempre llevan consigo procedimientos y pre-tratamientos de las especies biológicas, que pueden afectar notablemente su posterior interacción con el analito. Hay anticuerpos que dependiendo de la fuente son altamente sensibles a modificaciones de tampón, pH, temperatura, etc., y que, por lo tanto, con este tipo de conjugaciones puede verse comprometida en gran medida su especificidad e interacción con las proteínas.

Como ya se mencionó, el posterior anclaje del receptor conlleva el enlace de la biotina conjugada al anticuerpo a uno de los cuatro sitios que posee la STV para la interacción. Esto representa otra desventaja asociada con este tipo de inmovilización, específicamente el hecho de que no se garantiza la orientación del receptor. Al no poder controlar el sitio de la conjugación de las biotinas sobre el receptor, hace que su inmovilización sea aleatoria, perdiendo probablemente, en algunas moléculas inmovilizadas, la capacidad de detección por la no orientación adecuada de los sitios de interacción con el analito. Hoy en día existen diversos protocolos de conjugación donde es posible enlazar la biotina a determinados sitios del anticuerpo selectivamente (por ejemplo emplear algunos polisacáridos que poseen en la región Fc, induciendo así una posible orientación del mismo). En el siguiente apartado presentaremos el estudio correspondiente al anclaje del receptor conjugado con biotina y se mostrarán algunos ensayos preliminares al respecto con un sistema modelo de anticuerpo IgG/anti-IgG conocido.

3.2.1.2 Detección de Anti-Inmunoglobulina de Conejo (Gt-ha-Rb IgG) empleando como receptor el conjugado Inmunoglobulina-biotina (Rb-IgG-Biotina).

Como se mencionó anteriormente, una de las metodologías de funcionalización utilizadas en los sensores desarrollados en esta tesis doctoral está basada en la formación de una monocapa SAM que contiene moléculas cuyo grupo funcional de cabeza está formado por moléculas biotina ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{PEG})_3\text{-Biotina}$). Esta funcionalización nos deja una superficie activa y cubierta de moléculas de biotina disponible para interactuar con un elemento de enlace al receptor, que, en este caso, ha sido STV. Así, nuestra base que permite el anclaje del receptor está formada por estos dos elementos.

Como prueba de concepto de la plataforma optofluídica desarrollada se utilizó un sistema de anticuerpos IgG– anti-IgG modelo. Este sistema, como se mencionó en anteriores capítulos, es altamente específico y su interacción es fuerte y adecuada para este tipo de estudios. El

anclaje del anticuerpo IgG (receptor) conlleva una biotinyación previa del mismo antes de ser empleado y una posterior purificacón y cuantificacón del número de grupos biotina introducidos en la biomolécula. Basados en el protocolo de biotinyación descrito en el capítulo 2, se realizó la conjugación de las proteínas IgG de conejo incorporando distintas relaciones de unidades de biotina por unidad de IgG.

Primeramente se ha realizado la cuantificacón de la IgG de conejo cuando se ha empleado un exceso molar de 20 veces para la biotina, obteniendo los resultados que se observan en la Figura 52. Se conoce bien que un exceso, según la metodología que hemos aplicado aquí (base de STV sobre el sensor), no favorece este tipo de protocolos, sin embargo hemos decidido seguir las recomendaciones del distribuidor de los reactivos (Fisher Pierce, USA) para la biotinyación del anticuerpo. Al cuantificar las unidades de biotina incorporadas al anticuerpo, se ha encontrado que se tiene a razón de 4-6 unidades de biotinas por molécula de IgG. El control sin purificar presenta un exceso de seña debido a las unidades de biotina libres presentes en la solucón, lo que da confianza en los procedimientos de purificacón realizados.

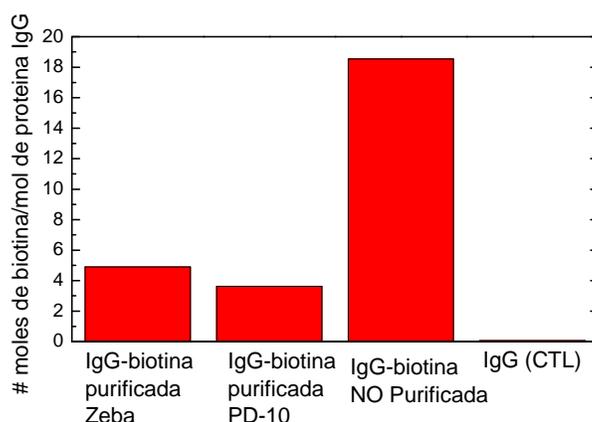


Figura 52. Resultados de la cuantificacón de biotinas para la IgG empleando 20 veces de exceso molar de biotinas en la reaccón de conjugación. Se emplearon columnas Zeba y columnas de gel Sephadex PD-10 respectivamente para la purificacón. Se observan los resultados de la IgG sin purificar y un control IgG sin biotina.

Así mismo, se pudo observar que de las dos metodologías empleadas, es la correspondiente a la purificacón empleando columnas de gel Sephadex, la que presenta el mejor resultado. Las columnas Zeba son columnas cuya eficiencia depende de varios factores que pueden afectar el proceso de purificacón (velocidad de centrifugación, como es añauido el volumen a la columna, tipo de tampón empleado, entre otros). El no control de estos factores puede afectar el proceso general de purificacón. Las columnas de gel son fáciles de usar, sin embargo, presentan como desventaja que la muestra se diluye en el proceso de purificacón al ser columnas húmedas. El control de IgG muestra claramente que no hay seña que proviene de agentes externos a la reaccón.

Para el caso donde hemos empleado un exceso molar de 5 veces hemos obtenido los resultados que se observan en la Figura 53. En ellos podemos observar que se ha incorporado un promedio de 1 biotina por molécula de IgG cuando hemos disminuido a 5 veces el exceso molar de biotina en la reacción. Podemos observar como al igual que en el experimento anterior, la purificación empleando columnas de gel Sephadex parece ser el mejor sistema para eliminar el exceso de biotina sin reaccionar. Hemos observado con el control de IgG sin purificar, una señal en exceso producto de esta biotina libre no conjugada en comparación con las muestras donde se ha realizado un proceso de purificación.

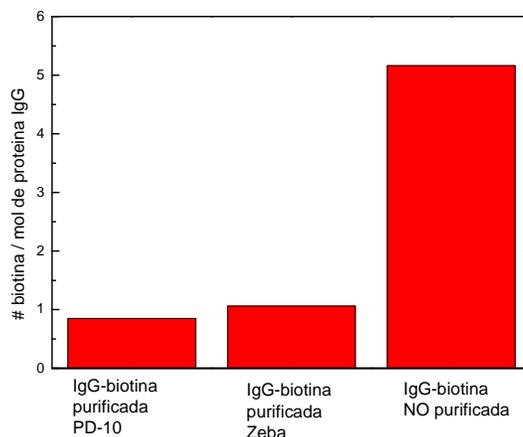
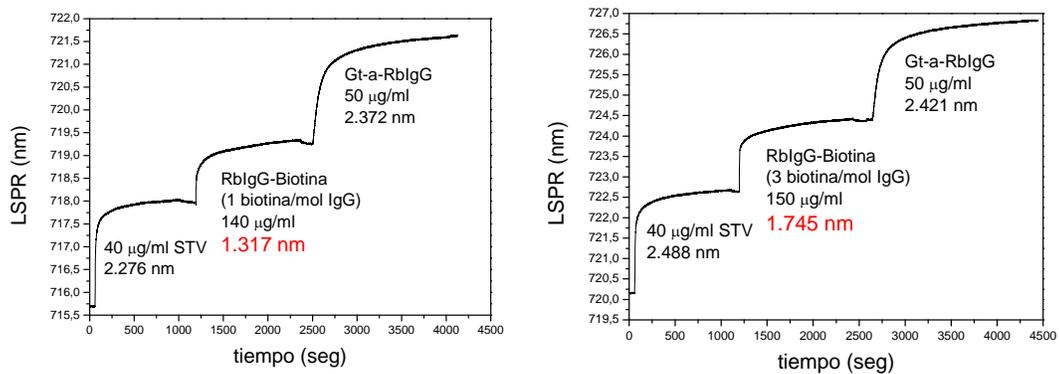


Figura 53. Resultados de la cuantificación de biotinas para la IgG empleando 5 veces de exceso molar de biotinas en la reacción de conjugación. Se han empleado columnas Zeba y columnas de gel Sephadex PD-10 respectivamente para la purificación y se observa el resultado para la muestra sin purificar de la proteína.

Ambos conjugados fueron testados para evaluar tanto el proceso de conjugación como la relación que existe entre el número de biotinas y la interacción con la capa de STV. Se realizó inicialmente la unión de la 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de STV sobre la capa SAM ya preparada previamente. Se anclaron los distintos conjugados y, posteriormente, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo IgG anti-conejo fue introducido para su detección.

Se observa en la Figura 54 los sensogramas obtenidos de la inmovilización de ambos conjugados y la posterior detección del anticuerpo anti-conejo correspondiente. Se observa, como es de esperar, que el receptor conjugado con más unidades de biotina se enlaza en mayor proporción a la capa de STV. Sin embargo la posterior detección del analito para ambos casos es comparable. Parece lógico pensar que mientras más unidades de biotinas posea el anticuerpo conjugado, mayor será la probabilidad de que éstos queden anclados en la superficie de STV. Sin embargo, el favorecer el anclaje del receptor no siempre favorecerá el posterior reconocimiento del analito. Esta etapa dependerá de un equilibrio entre la densidad de receptores y la buena orientación que posea para la interacción con la especie a ser detectada. Así mismo, una mayor densidad de receptores, debido a factores estéricos no

supone que el reconocimiento será mejor, unido al hecho de que una mayor cantidad de biotinas pueden estar conjugadas en los sitios cercanos que intervienen en el reconocimiento (debido en que estos sitios poseen la mayor cantidad de $-NH_2$ terminales reactivos que intervienen en la previa reacción de conjugación con la biotina) bloqueando la posterior interacción con el analito. Estos resultados como lo hemos mencionado son pruebas preliminares un mayor estudio ha de realizarse para estudiar a fondo la relación entre estas variables.



a) b)
 Figura 54. Sensogramas donde se muestra la inmovilización de conjugados de IgG con biotina que presentan diferentes relaciones biotina-proteína. a) 1 biotina por mol de IgG y b) 3 biotinas por mol de IgG. En ambos conjugados fue empleado el ensayo HABA/Avidina para la cuantificación de esta relación. En ambos casos la concentración de RbIgG-Biotina son 140 y 150 µg/mL respectivamente.

Teniendo en cuenta estos resultados, se realizó el estudio del anclaje final del receptor. Primero, se inyectó en un chip disoluciones de 25 µg/mL del conjugado IgG de conejo-Biotina (3 biotinas por mol de IgG) y un control de IgG de conejo sin conjugar para evaluar la especificidad de la unión. Los resultados se observan en la Figura 55. De los sensogramas se observa la reproducibilidad de la unión para este receptor, obteniéndose un desplazamiento promedio de (1.46 ± 0.15) nm. De los sensogramas se observa también la saturación a un tiempo de solo 30 minutos aproximadamente. Así mismo, podemos observar la señal correspondiente al control, que muestra que no existe unión de la STV sin conjugar a biotina como era de esperar.

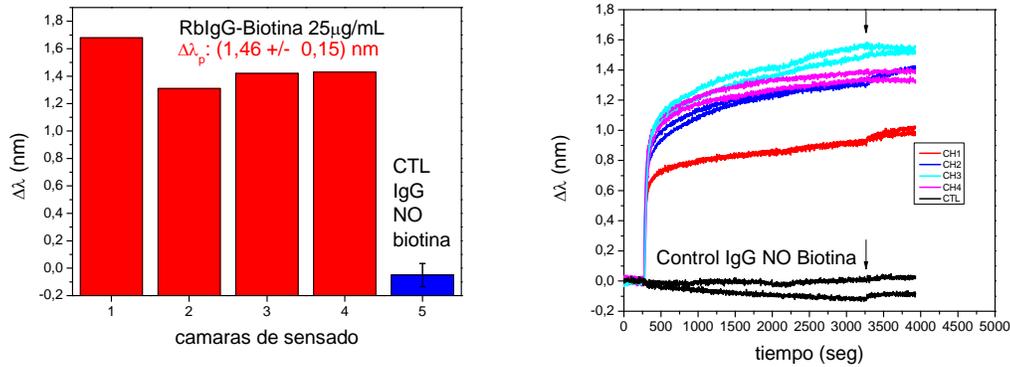
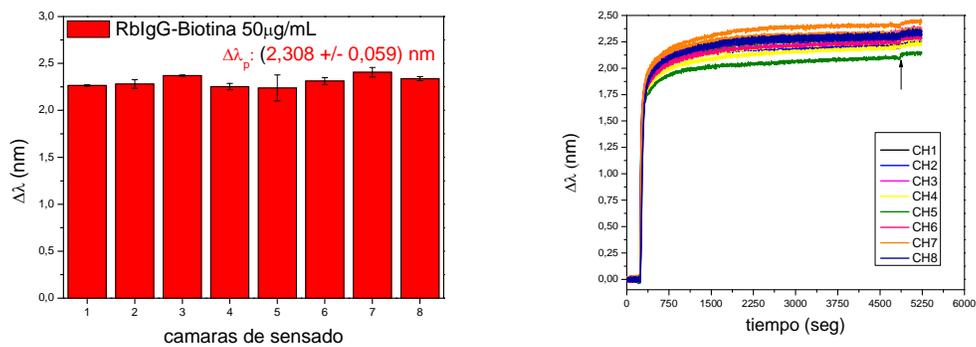


Figura 55. Estudio de la unión de 25 $\mu\text{g/mL}$ del receptor IgG de conejo-biotina a la base de STV sobre el sensor. A) Se muestran los histogramas que muestran la reproducibilidad del proceso y el valor promedio del desplazamiento del plasmón de resonancia que arroja esta unión b) Se muestran los sensogramas que representan esta unión en tiempo real. Se puede observar los controles realizados de IgG de conejo sin biotina que muestran que no existe unión no específica por parte del anticuerpo sin conjugar.

Con el motivo de evaluar el efecto de la concentración del anclaje del receptor, se realizó el mismo ensayo, pero esta vez empleando una concentración mayor de 50 $\mu\text{g/mL}$ del conjugado IgG de conejo-Biotina. Los resultados se muestran en la Figura 56. Se observan los histogramas para cada unión en 8 canales de un mismo chip. Se puede observar como el valor promedio del desplazamiento del plasmón LSPR aumenta a (2.308 ± 0.059) nm en comparación con los obtenidos usando una concentración menor. Se observa una alta reproducibilidad del proceso y la buena definición de las señales en tiempo real. Se decidió emplear estas condiciones para los posteriores estudios de detección empleando esta metodología.



a)

b)

Figura 56. Unión de 50 $\mu\text{g/mL}$ del receptor IgG de conejo-Biotina sobre STV. a) se observan los histogramas donde se muestra el desplazamiento del pico LSPR, alcanzando un valor promedio de 2.308 nm. Se observa la alta reproducibilidad del proceso en los distintos canales del chip. b) Sensogramas de dicha unión en tiempo real, la flecha indica cuando se ha realizado el proceso de lavado.

Como se comentó anteriormente existe una fuerte interacción (de tipo electrostático) entre este tipo de proteínas y los sustratos de vidrio donde los sensores han sido fabricados. Esta interacción puede originar la unión no específica de estas proteínas en áreas circundantes al sensor que introducirían una contribución no específica en el desplazamiento final. En este sentido se han realizado algunos ensayos empleando agentes bloqueantes que en principio protegen al sustrato de la interacción con las proteínas. Específicamente, se han empleado PLL-g-PEG, que como ya se mencionó anteriormente es un co-polímero de polilisina y polietilenglicol, que debido a las cargas que posee en su estructura es capaz de interactuar fuertemente con los grupos -OH de la sílica evitando la adsorción de otras proteínas. Una vez la STV fue enlazada al SAM sobre los sensores, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PLL-g-PEG en tampón HEPES 10 mM pH 7.5 fueron introducidos y posteriormente, el receptor conjugado fue inyectado. El sensograma correspondiente al proceso general se muestra en la Figura 57. Como se puede ver, el anclaje del receptor no muestra el desplazamiento típico para este sistema. Se observó una disminución notable incluso para una alta concentración de receptor empleada (140 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se cree que el uso de este agente interfiere en la unión STV-Biotina que da lugar a este anclaje. En el sensograma se observa que existe una contribución de esta proteína (PLL-g-PEG) que origina un desplazamiento del pico (0.35 nm respectivamente), que puede venir dado, bien por la unión de estas proteínas a las áreas circundantes al sensor (interface vidrio-metal donde existe un confinamiento del campo significativo), o bien a una interacción con la base de STV existente. De hecho, la STV posee un punto isoelectrónico en torno a 5 mientras de la polilisina es más básico, por lo que se favorece la interacción de este agente bloqueante sobre la monocapa de STV. Lo que se puede concluir es que este proceso de pasivación no resulta *a priori* compatible con este protocolo, sin embargo el estudio de la pasivación para este tipo de ensayos sigue abierto.

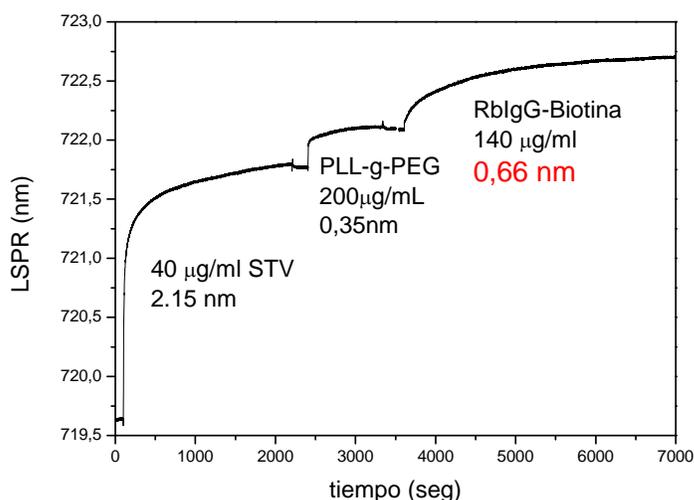


Figura 57. Sensograma que muestra el empleo de PLL-g-PEG como agente pasivante en el proceso de anclaje del receptor conjugado IgG de conejo-Biotina. Se observa como el desplazamiento del pico perteneciente a la unión del receptor se ve afectado por el uso de este agente.

Una vez estos ensayos se llevaron a cabo, se han realizado pruebas para la detección del sistema anti-conejo IgG basados en este protocolo, con el objetivo fundamental de evaluar la viabilidad de la plataforma desarrollada. Los primeros ensayos consisten en la detección del analito en una matriz sencilla de tampón y posteriormente en una matriz compleja (que se asemeja a la real) de suero humano diluida al 50 % en el tampón correspondiente.

El receptor fue anclado bajo las condiciones que hemos considerado como óptimas. Se han inyectado inicialmente diferentes concentraciones de la IgG anti-conejo producida en cabra, preparadas en el tampón HEPES 10 mM pH 7.5. El rango de concentraciones que en una primera etapa se evaluó fue de 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ junto con un control del tampón sin analito para evaluar la señal de fondo que se pueda generar. Con el objetivo de evaluar la capacidad de detección de bajas concentraciones y la resolución por parte del sistema de las señales correspondientes, se aplicó inicialmente un procedimiento que contempla la detección sucesiva de un ascenso en la concentración. Hemos iniciado la detección con la menor concentración para todos los canales a la vez incrementando la concentración cada 30 min sin proceso de lavados intermedios. En la Figura 58 se observan los sensogramas correspondientes para este ensayo. Las señales corresponden a las medidas simultáneas en 7 canales y el correspondiente control de tampón sin analito, que no arroja señal alguna. Se observa cómo se va incrementando la concentración hasta llegar a la saturación del reconocimiento por parte del receptor (conjugado IgG-Biotina). La plataforma y la química de funcionalización desarrollada permiten la detección selectiva de concentraciones de pocos ng/mL .

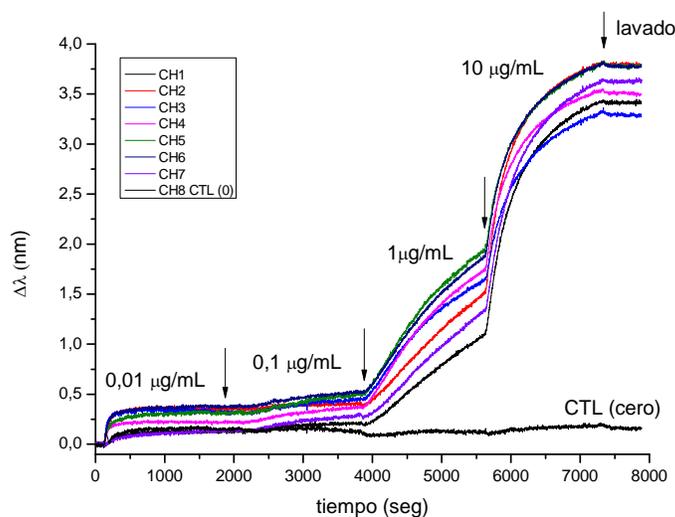
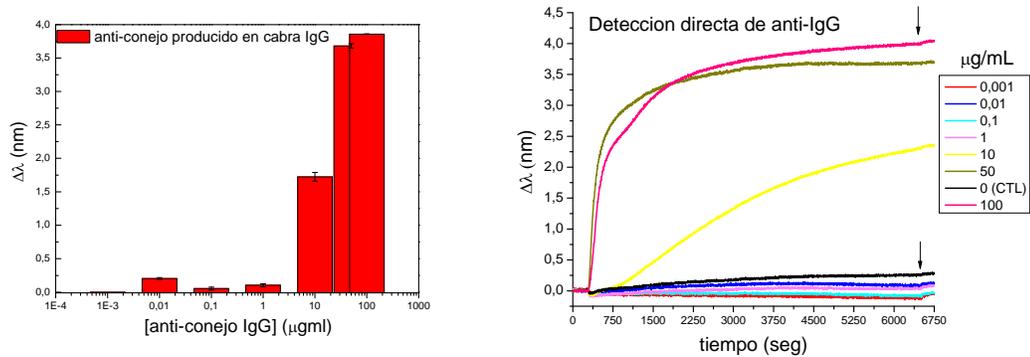


Figura 58. Sensogramas correspondientes a la detección sucesiva de 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la anti-IgG de conejo en tampón. Se observa la poca señal del correspondiente control sin el analito.

Partiendo de estos resultados realizó una curva de calibrado, para evaluar así, la capacidad de detección de la plataforma. En este caso, se inyectaron individualmente el anti-IgG en un rango de concentraciones de 100, 50, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente,

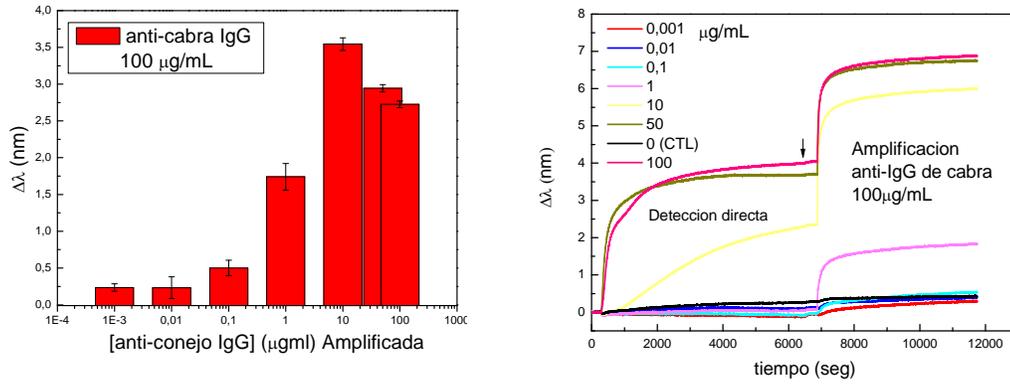
preparadas en tampón HEPES 10 mM pH 7.5. La curva obtenida se puede observar en la Figura 59 así como sus respectivos sensogramas.



a) b)
 Figura 59. a) Curva para la detección directa de anti-IgG de conejo preparadas en HEPES 10mM pH 7.5.
 b) Sensogramas obtenidos para cada una de las concentraciones del analito. La flecha indica el inicio del proceso de lavado con el respectivo tampón

Como se puede ver en la curva, las señales que corresponden a las concentraciones por debajo de 1 µg/mL presentan muy poca resolución en el tiempo que ha durado el ensayo (dos horas aproximadamente). A priori, para una detección directa podemos decir que este sistema no es capaz de resolver estas señales en este tiempo. Cabe destacar que a estas señales se les ha sustraído el respectivo control (cero) que hemos obtenido del tampón sin analito. Con el objetivo de amplificar estas señales hemos inyectado 100 µg/mL de un anticuerpo policlonal anti-IgG de cabra que, al poseer múltiples sitios de reconocimiento pueden enlazar más especies al analito incrementando así la señal obtenida. Este reconocimiento es proporcional a la cantidad de analito que haya sido reconocido por el receptor, de allí que estos valores son una medida igualmente fiable de la concentración detectada.

En la Figura 60a se pueden observar los histogramas que representan el desplazamiento del plasmón para la amplificación de cada una de las concentraciones de trabajo. Se pueden ver los sensogramas para cada concentración donde se observa tanto la detección directa del anticuerpo anti-IgG de conejo como la amplificación. Se observó que a concentraciones muy elevadas, específicamente 50 y 100 µg/mL, hay una disminución notable de la señal en comparación con la máxima señal obtenida para 10 µg/mL. Se piensa que existe una saturación por parte del receptor con el analito y probablemente la formación de múltiples capas que, debido a factores estéricos, permiten que un número limitado de anticuerpos policlonales puedan unir y así la amplificación en este caso no sea tan efectiva.



a) b)
 Figura 60. Amplificación de la curva empleando un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra. a) Curva de histogramas que muestran el incremento de la señal debido a la amplificación. Las señales a menor concentración del analito son mejoradas empleando este ensayo. b) Sensogramas que muestran el proceso de amplificación. Para la amplificación se empleó 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo policlonal anti-IgG de cabra.

Sin embargo la amplificación ha permitido resolver señales para aquellas concentraciones bajas que no se pudieron generar en la detección directa (0.001 y 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). A partir de estos valores hemos realizado el ajuste no lineal de tipo sigmoidal y el límite de cuantificación fue determinado obteniendo un valor de 34.3 ng/mL (EC10) (Ver Figura 61). Esta sería la mínima concentración efectiva que esta plataforma puede llegar a detectar para este sistema de anticuerpos en el tampón correspondiente. Este valor nos da un indicio de la viabilidad de nuestra plataforma como herramienta versátil en la detección específica de un sistema clínico real relevante.

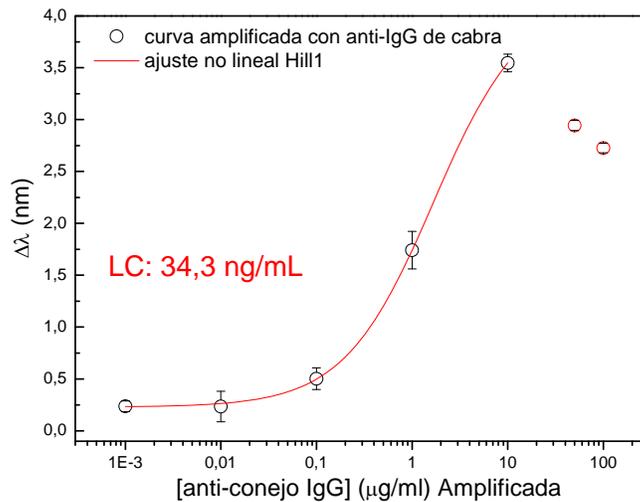


Figura 61. Curva de calibrado para el sistema modelo IgG/anti-IgG estudiado.

Este mismo estudio se realizó para la detección del mismo analito pero empleando una matriz más compleja y parecida a la real. Se empleó suero humano diluido al 50 % en el tampón HEPES 10 mM pH 7.5. Hay que indicar que se realizaron algunas pruebas en suero sin diluir, pero debido a su viscosidad y consistencia, se generaron problemas a la hora de ser inyectado en el chip de microfluídica. Por esta razón se realizó la dilución descrita.

Para este estudio se ensayaron disoluciones de anti-IgG de conejo en un rango de concentraciones de 0.01, 0.1, 0.5, 1, 3, 25, y 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se empleó un control de suero humano sin analito (cero) como control, para evaluar tanto la posible interacción de las proteínas contenidas en dicho suero con el receptor conjugado (anticuerpo monoclonal IgG de conejo) como una posible adsorción inespecífica sobre la superficie del sensor. Los sensogramas correspondientes a la detección se muestran en la Figura 62a. Se observa el incremento de la señal conforme hay un aumento de la concentración de analito. Así mismo, se observó que existe una señal en el control significativa, originado por el cambio de las condiciones de la matriz (tampón a suero). Estas señales pueden ser debidas a la pasivación que se produce paralelamente a la detección del analito. Para evitar este efecto se podría acondicionar el sensor antes de introducir el analito, con soluciones de un agente bloqueante como la albúmina, así el bloqueo tiene lugar antes de la interacción y no se superpone a la señal, sin embargo, a pesar de este efecto, como veremos a continuación, la detección es conseguida. Finalmente, hemos restado este efecto a las señales de detección directa y así se han obtenido los sensogramas de la Figura 62b. En este tipo de ensayos es necesario trabajar con un control que permita restar estos efectos y poder así conocer la señal bruta procedente de la detección directa del analito.

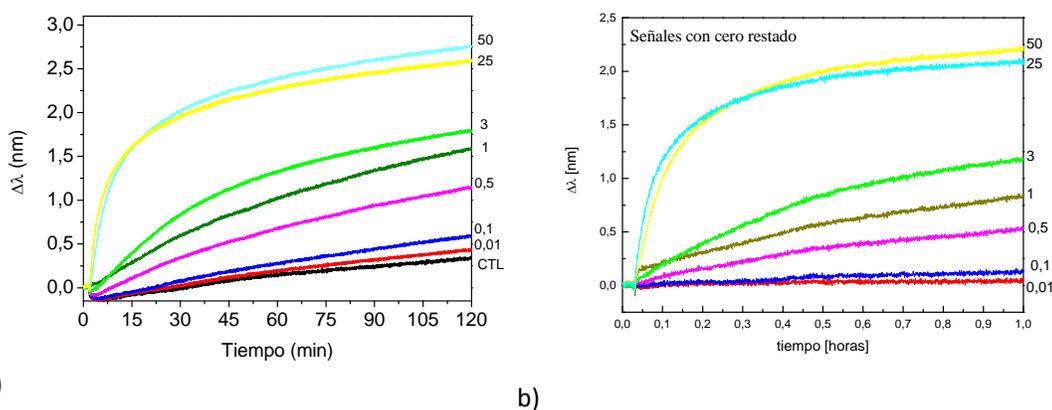


Figura 62. Sensogramas para la detección directa de anti-IgG de conejo en suero humano al 50%. a) Señales de cada concentración incluyendo el control respectivo de suero humano sin analito y b) sensogramas al ser sustraído el control y por ende el efecto de la interacción de las proteínas contenidas en el suero.

Por otro lado, se observó que las señales para la detección directa de concentraciones bajas disueltas en suero pueden ser medidas, por lo que no se empleó una etapa de amplificación en este caso. Sin embargo, si se desea mejorar la sensibilidad del sistema se puede aplicar esta amplificación. Se piensa que la buena resolución de las señales a concentraciones bajas en el

siero, puede venir dado por el efecto pasivante que ejerce el suero en la plataforma microfluídica en general y sobre el sensor, que permite que mayor cantidad de material esté en contacto con éste disminuyendo las interacciones con los distintos componentes de la plataforma (tubos conectores, conectores, paredes del chip de microfluídica, etc.).

Con estos datos se realizó la curva de detección para evaluar el límite de cuantificación del sistema bajo estas condiciones. La gráfica se muestra en la Figura 63. El ajuste no lineal empleado lleva a determinar el límite de cuantificación del analito en esta matriz, que está en torno al valor de 61.4 ng/mL. Esta concentración corresponde al mínimo valor que puede ser cuantificado por el dispositivo y cuya señal puede ser resuelta por el sensor. Sin embargo, basándonos en las definiciones y relaciones expuestas en el capítulo 2, el límite de cuantificación para este sistema estaría en un promedio de 19 ng/mL. Esta concentración corresponde a la mínima que puede ser detectada aplicando esta metodología. Estos resultados son bastante prometedores como un primer paso en la detección final de marcadores tumorales en muestras reales. Estos límites de cuantificación que arroja la plataforma se encuentran en el rango de concentraciones en las cuales estos marcadores son comúnmente detectados por los sistemas más convencionales. Basándonos en estos resultados podemos decir que nuestra plataforma podría representar una alternativa eficiente en el diagnóstico temprano de estas especies en sangre.

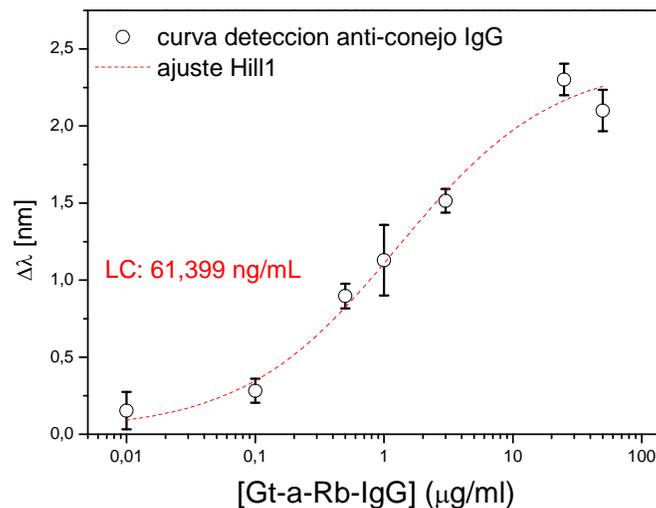
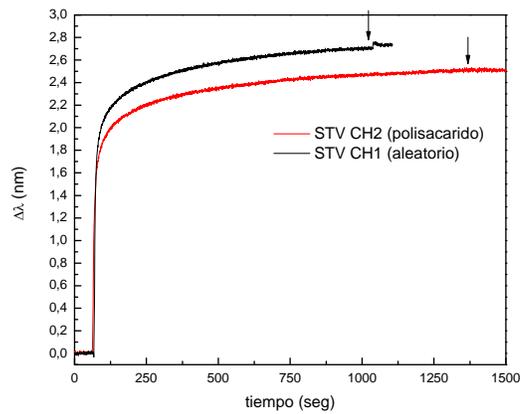


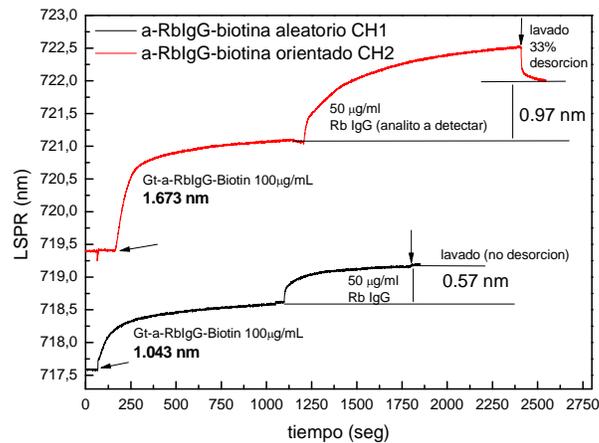
Figura 63. Curva de detección para la anti-IgG de conejo en suero humano. El ajuste no lineal permite determinar el límite de cuantificación del sistema.

Por otro lado, y como resultado muy preliminar, se realizaron pruebas relacionadas con la orientación del anticuerpo receptor con el objetivo de evaluar si la detección puede ser mejorada. Para ello, se llevó a cabo una conjugación, en esta ocasión para la anti-IgG, empleando una química conocida de conjugación selectiva a los grupos polisacáridos que posee en la región Fc, permitiendo que la región donde están localizados los parátomos que

intervienen en el reconocimiento queden libres y orientados para interactuar con los epítomos del analito [Wolfe y Hage, 1995]. Se realizaron los experimentos de anclaje respectivos y la posterior detección del anticuerpo IgG y se compararon con el receptor aleatoriamente conjugado empleando el procedimiento usual descrito. Los resultados se observan en la Figura 66. Inicialmente, como el protocolo lo estipula, se realizó la unión óptima de la STV para ambos casos (Figura 64a). Cabe destacar que los experimentos fueron realizados en chips diferentes, pero garantizando que las condiciones del sensor sean reproducibles para ambos casos.



a)



b)

Figura 64. Estudio de la orientación del anticuerpo receptor. a) Unión de la STV para ambos experimentos b) Sensogramas que muestran el anclaje del receptor conjugado (anti-conejo IgG Biotina) y la detección del analito (IgG de conejo). El sensograma de color rojo corresponde a los ensayos empleando un conjugado cuya química fue realizada de manera selectiva favoreciendo la orientación de éste. El sensograma de color negro corresponde a los ensayos realizados empleando la química de conjugación convencional.

Ambos conjugados fueron introducidos y anclados. En la Figura 64b se muestran los sensogramas correspondiente a esta unión. Se puede observar como el anclaje del receptor orientado produce un desplazamiento mayor del plasmón de resonancia que el conjugado aleatoriamente (1.673 nm respectivamente). Se piensa que al ser la conjugación selectiva, se produce un ordenamiento de los receptores más controlado, permitiendo así una mayor densidad de receptores sobre la base de STV, lo que explica este aumento de señal. Por otro lado se puede observar que la unión del receptor conjugado produce una detección mayor para el anticuerpo IgG de conejo. Esta mejora en la detección es debida a la correspondiente orientación que le otorga la conjugación realizada. Como se comentó anteriormente, el proceso de detección necesita un equilibrio entre ciertas variables (numero de receptores, orientación, selectividad, estabilidad, etc.), pero sin duda la orientación es un factor importante a tomar en cuenta en estos ensayos. Según la sensibilidad requerida se puede emplear uno u otro conjugado, sin embargo el sistema orientado implica un mayor número de pasos incluyendo etapas de purificación que provocan pérdidas de anticuerpo y una mayor complejidad del sistema. Estos resultados representan una guía en el estudio de los factores que están involucrados en los ensayos de detección, un estudio más profundo ha de realizarse en este sentido.

Tomando en cuenta estas consideraciones, este protocolo fue testado en la detección de marcadores tumorales en matrices reales (suero humano), específicamente para la detección de la proteína HSP70 (Heat Shock Protein 70), empleando su correspondiente anticuerpo conjugado, así como también con aptámeros que han demostrado tener una alta afinidad con esta proteína (según estudios realizados por nuestros colaboradores). Estos resultados y todo el estudio al respecto, es mostrado a continuación.

3.2.1.2.1 Estudio empleando la técnica ELISA de la interacción en el sistema de anticuerpos IgG/Anti-IgG.

Con el objetivo de evaluar la unión específica entre el sistema de anticuerpos empleados en los ensayos de detección anteriormente descritos, hemos empleado una serie de pruebas empleando la técnica de ELISA. Se espera que los resultados obtenidos puedan dar un indicio de la calidad de los reactivos empleados, así como también de la especificidad y capacidad de interacción de las especies involucradas. Se realizó un primer ensayo del estudio basado en el esquema que se muestra en la Figura 65.

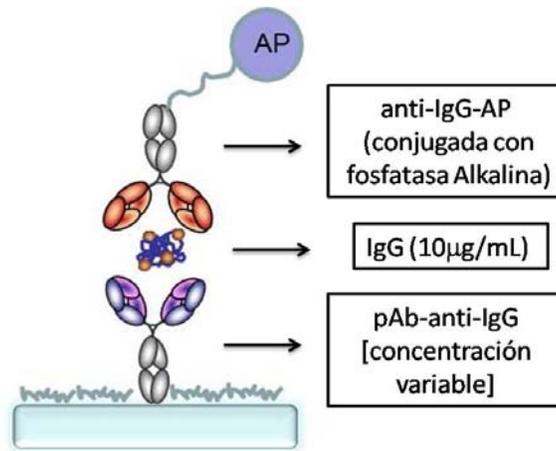


Figura 65. Esquema representativo de la interacción estudiada en el primer ensayo realizado con la técnica ELISA

En el esquema hemos representado por simplicidad el anticuerpo IgG de conejo como una estructura globular, sin embargo, la estructura real es la estructura tipo “Y” típica de anticuerpo. En este primer ensayo hemos variado la concentración del anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo producido en cabra (pAb-anti-IgG). Así mismo, se ha realizado los controles respectivos para evaluar las interacciones no específicas que pueden darse lugar y conocer así su contribución a las respectivas señales específicas. Se ensayaron concentraciones del anticuerpo anti-IgG de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ usando una concentración constante de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el anticuerpo IgG (el cual ha sido el receptor en nuestros ensayos con la plataforma). Posteriormente, se unió un segundo anticuerpo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina y, por último, se reveló la reacción enzimática empleando el respectivo sustrato de PNPP. En la Figura 66, se puede observar la curva de calibrado obtenida con sus respectivos controles.

Los controles que representan la interacción no específica entre las especies IgG y anti-IgG muestran muy poca señal, lo que ratifica la especificidad de la interacción. Así mismo, las señales que se obtienen muestran el buen reconocimiento que poseen estas especies, que tiene una dependencia directa con la concentración. Estos resultados confirman que este sistema de anticuerpos que hemos empleado en los ensayos de biosensado es adecuado en cuanto a especificidad y capacidad de reconocimiento se refiere, otorgándole más confianza a los ensayos realizados con la plataforma LSPR.

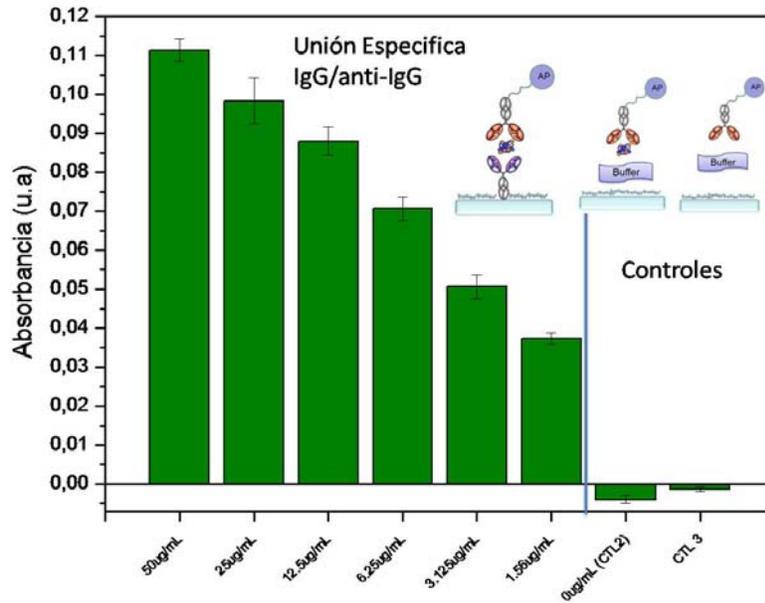


Figura 66. Histogramas que muestran los resultados obtenidos con ELISA del estudio de la interacción específica y no específica del sistema de anticuerpos IgG/anti-IgG.

A modo cualitativo hemos representado las señales obtenidas en función de las concentraciones obteniendo así la gráfica de la Figura 67. Hemos empleado un rango cuyas señales son bastantes resolubles empleando esta técnica. El LC obtenido a partir de esta curva nos arroja un valor de 7 µg/mL (EC10), muy por encima de los valores que manejamos con la detección realizada con nuestra plataforma. Sin embargo, esta comparación requeriría que estos ensayos ELISA sean optimizados y emplear un rango de concentraciones más bajas que permitan realizar un contraste con los resultados obtenidos con el biosensor. Como ya lo hemos mencionado este estudio ha sido elaborado de manera cualitativa para asegurarnos que la interacción del sistema modelo estudiado es eficiente y cuenta con el grado de especificidad que se requiere.

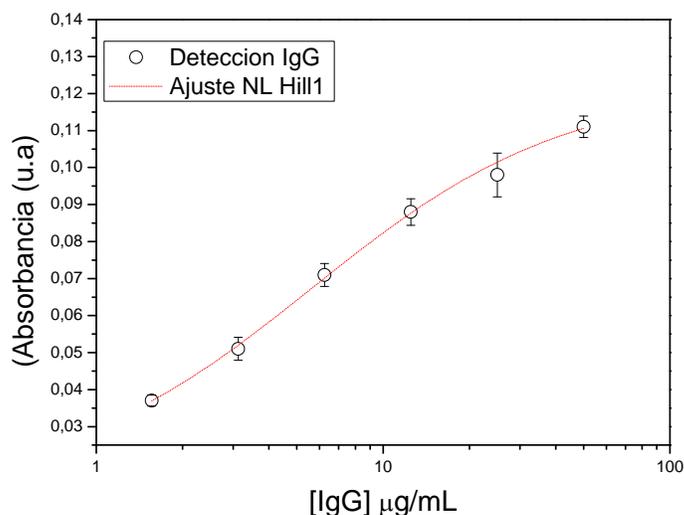


Figura 67. Curva de concentraciones para la anti-IgG de conejo empleada en los ensayos ELISA. A modo cualitativo se ha realizado un ajuste no lineal, y se observa que el rango empleado se encuentra en una zona lineal de concentración.

En este mismo sentido, hemos realizado un ensayo ELISA para evaluar el bioreconocimiento de los conjugados de IgG de conejo preparados, así como también para evaluar la calidad de los receptores (en este caso el anticuerpo IgG) una vez incorporado las unidades de biotina en su estructura. También hemos estudiado las posibles interacciones no específicas que se pudiesen generar en el sistema para este tipo de reconocimiento. Hemos dividido los ensayos en dos sistemas. El sistema que hemos denominado sistema 1, viene dado por un estudio directo de las interacciones conjugado-analito, así como también interacciones conjugado-STV. También en este sistema hemos realizado paralelamente un ensayo con el receptor sin conjugar, como referencia. En la Figura 68 se observa los esquemas que representan los ensayos realizados en el sistema 1, así como también los respectivos controles realizados.

Para el caso del sistema 2, hemos realizado un ensayo similar al que hemos empleado sobre el biosensor. Hemos depositado una capa de STV y realizado el enlace del conjugado. Posteriormente, el anticuerpo anti-IgG fue depositado para el estudio de la interacción entre ambas especies. Hemos realizado también una unión STV-conjugado-STV para analizar la calidad de la conjugación en el anticuerpo IgG respectivo. En la Figura 68 podemos observar igualmente los esquemas que representan el estudio realizado y los controles respectivos para el sistema 2.

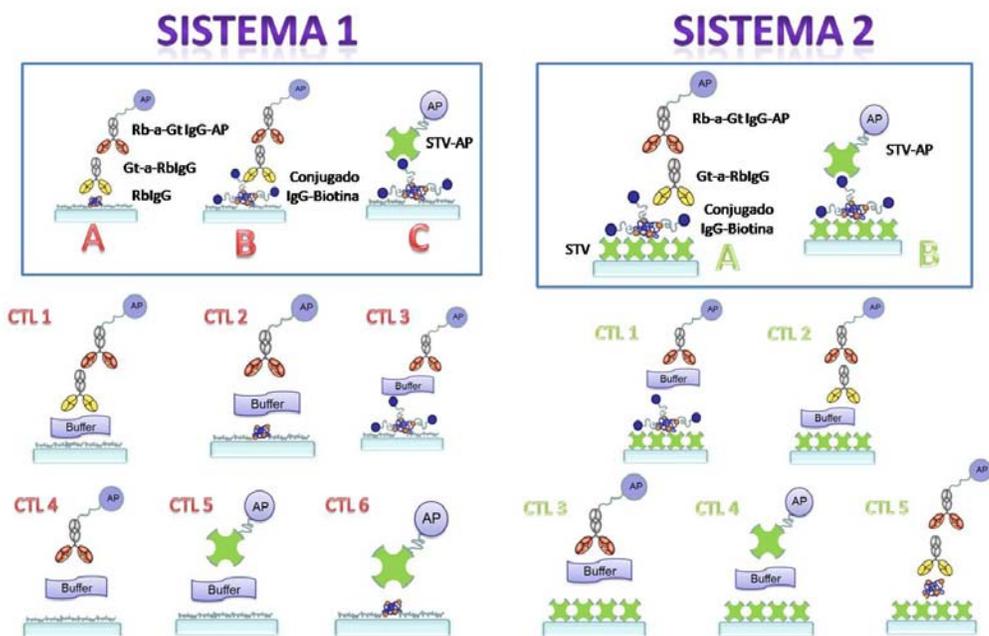


Figura 68. Esquemas que representan el estudio realizado con el conjugado IgG-Biotina empleado en los ensayos con el biosensor mediante la técnica de ELISA.

Para el sistema 1 hemos obtenido las señales representadas en el histograma de la Figura 69. En ella, se observa claramente como las interacciones específicas presentan una alta señal. El reconocimiento por parte del conjugado IgG-biotina hacia la especie anti-IgG genera una señal bastante buena y comparable con la referencia sin conjugar, lo que nos da un indicio de que el proceso de conjugación realizado ha sido óptimo. Recordemos que en muchos casos, dependiendo de la estabilidad de las especies, los tratamientos empleados en las etapas de conjugación pueden afectar en gran medida al posterior reconocimiento del analito, lo que representa una de las mayores desventajas de este protocolo. Sin embargo, para este sistema en particular la conjugación no parece alterar este proceso.

Por otro lado, los resultados muestran también, la buena señal generada de la interacción del conjugado con la STV, lo que presume que los procesos de conjugación han sido exitosos y las unidades de biotina han logrado incorporarse de manera óptima a la estructura del anticuerpo. También nos dan un indicio (indirecto) del buen anclaje que puede tener este conjugado sobre el sensor, etapa crítica para la detección del analito a estudiar. Los controles realizados muestran una baja señal, lo que supone que las interacciones no específicas son mínimas en estos ensayos.

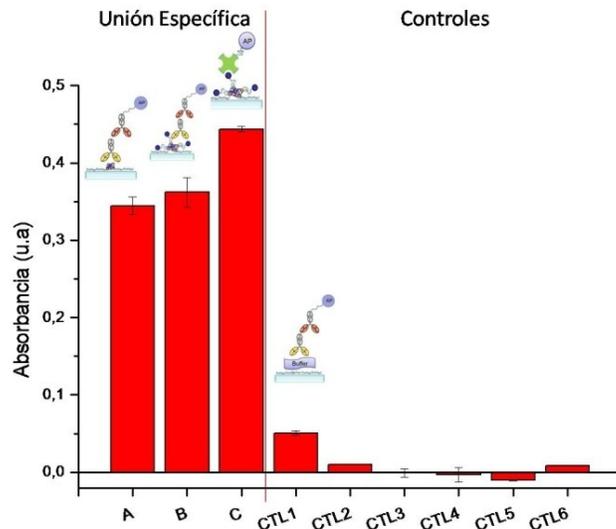


Figura 69. Histograma que muestra las señales (específicas y no específicas) obtenidas en los ensayos ELISA para el estudio del bioreconocimiento en los conjugados de IgG-biotina empleados en los ensayos de nuestra plataforma de sensorado (Sistema 1).

Para el Sistema 2 hemos obtenido los resultados mostrados en la Figura 70. En este caso el ensayo realizado es bastante similar al protocolo empleado en nuestro biosensor. Sin embargo, es importante mencionar que existe una diferencia notoria entre ambos escenarios, y es el hecho de que estos ensayos son realizados en condiciones estáticas. Estas condiciones pueden (depende el sistema bajo estudio) favorecer la interacción, por lo que una comparación directa con ensayos realizados bajo condiciones fluídicas (como es nuestro caso) puede que no sea concluyente.

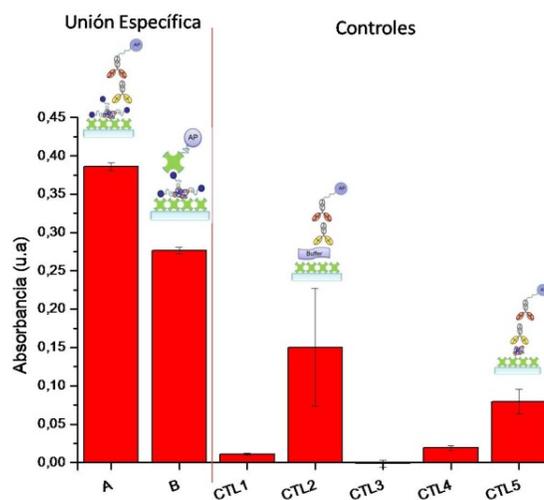


Figura 70. Histogramas correspondientes a las interacciones para el sistema 2 estudiado empleando la técnica ELISA.

Se observa que las señales específicas muestran una señal bastante significativa lo que permite aún dar más confianza a los ensayos de detección realizados con nuestra plataforma. Sin embargo, se puede observar que existe una contribución significativa de la interacción no específica entre la capa de STV formada y el anticuerpo anti-IgG, así como también como la IgG sin conjugar (Controles CTL2 y CTL5 respectivamente).

Para explicar esto se debe tener en cuenta que las condiciones del ensayo no son iguales a las condiciones de trabajo utilizadas en el sensor LSPR. Para este caso en particular la STV fue depositada mediante interacciones electrostáticas sobre los pocillos de las placas empleadas en el ELISA. El punto isoeléctrico de la STV (alrededor de 5) y el empleo de diversos tampones a distintos pH, puede comprometer la fisiabsorción y por ende la fijación de esta molécula sobre la superficie de poliestireno que conforma los pocillos. Esto compromete en gran medida la calidad de la base de STV lo que podría generar estas señales no específicas por parte del analito y del receptor. En el caso del sensor la biotina inicialmente depositada sobre la superficie a través del SAM mediante fuerzas de interacción bien conocidas y estables, garantiza que la capa de STV este bien formada, y más aún cuando se trabaja en concentraciones que según los estudios respectivos, son óptimas para garantizar la buena calidad de dicha capa de STV sobre el sensor. Sin embargo no se descarta una posible interacción no específica del anticuerpo policlonal en este tipo de ensayos, por tal razón los ensayos realizados van acompañados de un control que permitirá sustraer tal efecto, si lo hubiere.

En general, podemos decir que estos estudios realizados nos han permitido conocer la calidad de las especies que conforman el sistema modelo empleado en los ensayos preliminares en nuestra plataforma de sensado. Hemos encontrado que los procesos de conjugación han sido óptimos, permitiendo trabajar con conjugados altamente específicos y selectivos al analito. También las altas señales procedentes de las uniones específicas que intervienen en la detección dan confianza y avalan dichos resultados, teniendo siempre en cuenta que ambas técnicas discrepan en la manera como las especies interactúan (condiciones estática vs fluídicas).

3.2.1.3 Estudio de la detección del marcador tumoral HSP70 en tampón y suero humano

Empleando el protocolo anteriormente descrito y basándonos en los resultados preliminares obtenidos con el sistema modelo empleado, se decidió emplear dicho protocolo en el estudio de la detección de un sistema real con aplicaciones oncológicas. Para ello, se empleó la plataforma en la detección de la proteína HSP70 un marcador tumoral asociado a distintos tipos de cáncer. Este estudio estuvo dentro del marco de un proyecto europeo denominado SPEDOC (Surface Plasmon Early Detection of Circulating Heat Shock Proteins and Tumor Cells) cuyo objetivo fundamental se basa en aplicar la plataforma optofluídica que se ha desarrollado en esta investigación como dispositivo de diagnóstico y seguimiento de estas proteínas de choque térmico. Este proyecto cuenta con la colaboración de diversas instituciones en Europa,

especialmente para el desarrollo de esta parte con colaboradores del instituto INSERM en Francia que han suministrado las proteínas y receptores empleados en los ensayos realizados.

En este sentido, se realizaron las primeras pruebas en la detección de esta proteína evaluando diversos tipos de receptores específicos a ésta. Se trabajó con un anticuerpo monoclonal anti-HSP conjugado empleando el procedimiento ya ampliamente descrito, un anticuerpo policlonal anti-HSP conjugado orientado empleando los polisacáridos en su estructura y un par de Aptámeros denominados A8 que nos han sido suministrados por nuestros colaboradores de Francia.

Los aptámeros en general, son oligonucleótidos de cadena sencilla con tamaños entre 70 y 100 nucleótidos capaces de reconocer de forma específica y con alta afinidad a varios tipos de analitos mediante un plegamiento tridimensional de su cadena. Generalmente, son seleccionados desde genotecas de oligonucleótidos combinatoriales, empleando el método SELEX (de sus siglas en inglés: *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), que permite seleccionar aquel oligonucleótido que se une con más afinidad al analito deseado. Este tipo de moléculas son capaces de adoptar estructuras globulares que les permiten exhibir unas complejas y sofisticadas propiedades de reconocimiento molecular, siendo capaces de unirse de una manera estable y muy específica a los analitos correspondiente. En este sentido, se espera que estos aptámeros posean una gran afinidad con la proteína HSP70. Así mismo, se dispuso de un aptámero mutado, al que hemos denominado A8-mutado, cuya mutación le otorga cierta orientación para el reconocimiento de la proteína. Estos aptámeros son receptores más pequeños que los respectivos anticuerpos, por lo que basándonos en el principio de operación de nuestro sensor, representaría una mejora en la sensibilidad. Así mismo el volumen del sensado se ve menos comprometido al emplear estos pequeños receptores, lo que permite que la distancia entre la superficie del oro y la región de detección se acorte aumentando aún más la sensibilidad.

Basándonos en el protocolo descrito, una vez la monocapa de biotina ha sido empaquetada en una estructura SAM, se realizó el enlace de la STV sobre ella. Las condiciones empleadas para la inmovilización de STV fueron las mismas que hemos empleado en los ensayos anteriores y el desplazamiento es reproducible y comparable en todos los canales, lo que permite tener mismas condiciones y uniformidad para los 4 casos a estudiar, como es de esperar.

Una vez se preparó la base de STV, se procedió a introducir los receptores conjugados con Biotina. Para todos ellos hemos empleado concentraciones sugeridas tanto por el fabricante como por el grupo colaborador que nos ha suministrado los reactivos. Sin embargo, una optimización ha de realizarse en este sentido para garantizar que la cantidad de receptores sobre la capa de STV sea la más óptima para el reconocimiento de la proteína. En la Figura 71, se pueden observar los sensogramas obtenidos para cada anclaje de los receptores estudiados.

En condiciones fluídicas podemos decir que el mejor acople ha sido para el aptámero A8 con un desplazamiento de 0.82 nm para el pico LSPR monitoreado en tiempo real. Los desplazamientos obtenidos en general son más pobres que los obtenidos empleando el sistema modelo con IgG explicado anteriormente. Una posible explicación sería que las moléculas de reconocimiento empleadas en este caso sean más sensibles al tratamiento de

biotinización. Para corroborar la calidad de estos conjugados, hemos realizando ensayos ELISA. Estos resultados serán mostrados más adelante.

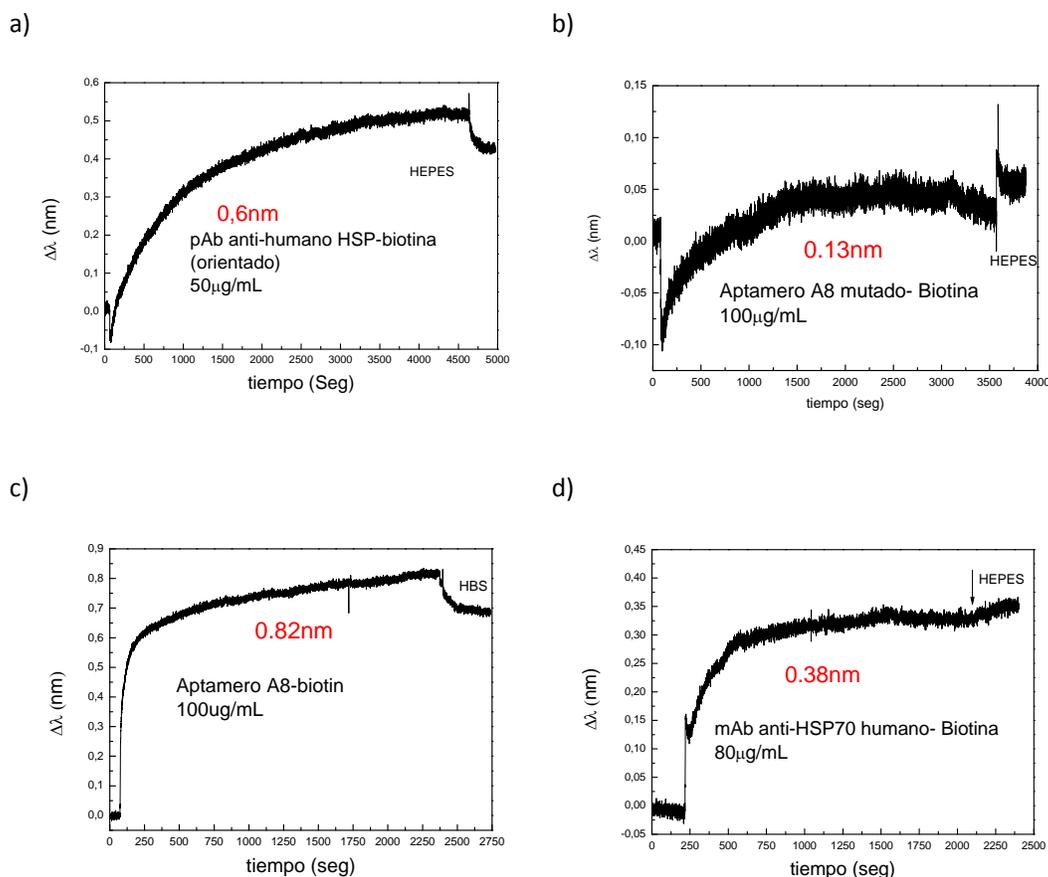


Figura 71. Anclaje de los receptores a) 50 µg/mL del Anticuerpo policlonal anti-HSP humano-Biotina, b) 100 µg/mL del Aptámero-A8 mutado-Biotina c) 100 µg/mL del Aptámero A8-Biotina y d) 80 µg/mL del anticuerpo monoclonal anti-HSP70 humano-Biotina. Se observa que el mayor desplazamiento lo muestra el conjugado para el Aptámero A8-Biotina.

Una vez los receptores han sido anclados, hemos inyectado 10 µg/mL de HSP70 humano preparados en el tampón HEPES. El tampón HEPES que hemos utilizado en todos los ensayos de detección de esta proteína, se le ha añadido 10 mM NaCl, 5 mM MgSO₄ y 2 mM ADP. Estas condiciones según los estudios realizados por nuestros colaboradores garantizan y favorecen el bioconocimiento. Para los lavados respectivos se ha empleado éste tampón, así se evitan posibles efectos debido a la diferencia en el índice de refracción de ambas soluciones. Hemos decidido emplear una concentración elevada con el objetivo de estudiarla capacidad de interacción de los receptores a la proteína. Más adelante se han hecho pruebas de detección con un rango más bajo de concentración, para evaluar la viabilidad de la detección con esta plataforma. En la Figura 72 se muestran las señales de la detección para cada receptor empleado. Se observa como la máxima señal es obtenida para el anticuerpo monoclonal

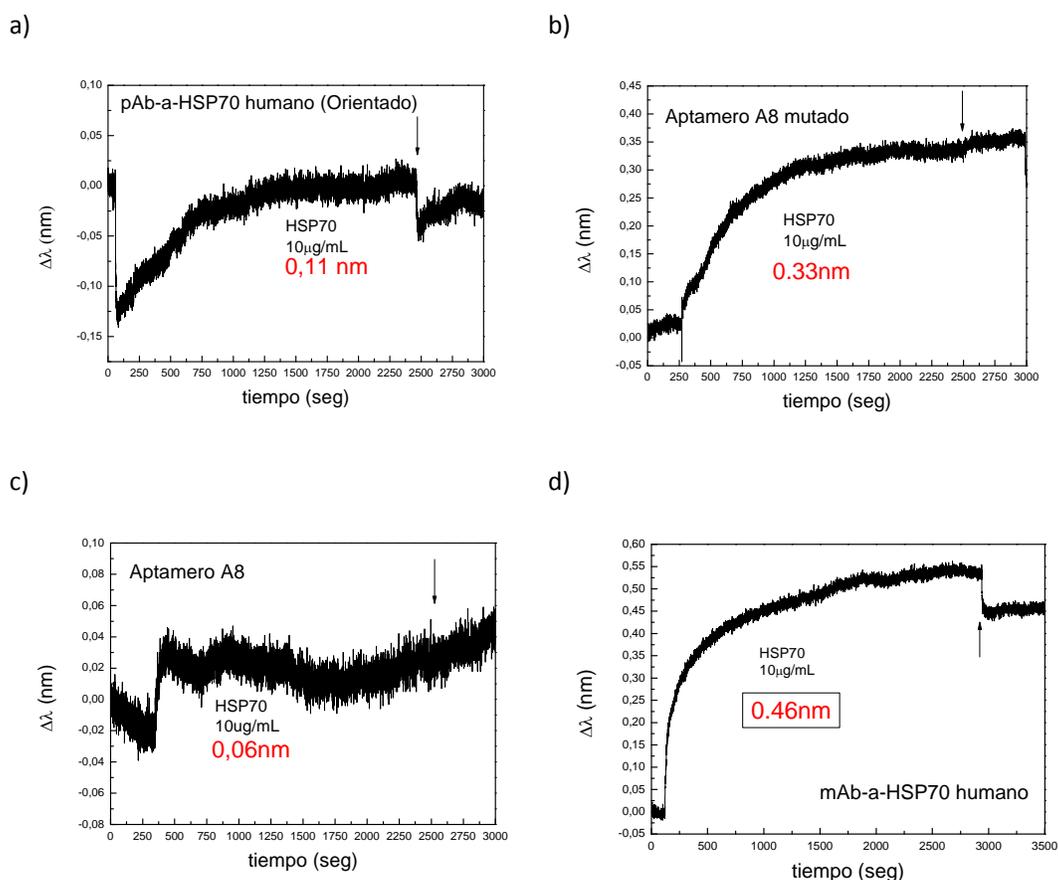


Figura 72. Detección de 10 µg/mL de HSP70 humano en tampón HEPES empleando como receptor a) Anticuerpo policlonal anti-HSP humano-Biotina, b) Aptámero-A8 mutado-Biotina c) Aptámero A8-Biotina y d) Anticuerpo monoclonal anti-HSP70 humano-Biotina, el cual muestra el mejor resultado.

Se puede ver como la mejor detección para esta concentración es alcanzada con el anticuerpo monoclonal anti-HSP70. En general, las señales son bastante pequeñas y ruidosas, lo que en algunos casos (como para el aptámero A8-Biotina) es realmente difícil extraer la información. A pesar de no presentar el máximo desplazamiento para su anclaje, este anticuerpo monoclonal y sus condiciones resultan ser óptimas para una buena detección. El histograma de la Figura 73 compara las señales obtenidas para cada receptor.

Claramente, el mejor sistema corresponde al correspondiente anticuerpo monoclonal, seguido del aptámero mutado A8 que también arroja una señal significativa. El estudio en este sentido sigue abierto, es probable que este tipo de oligonucleótidos representen una alternativa que mejore sustancialmente la sensibilidad en la detección de este tipo de proteínas. Basándonos en estos resultados, hemos elegido el anticuerpo monoclonal anti-HSP70, para las pruebas de detección a bajas concentraciones y evaluar así la sensibilidad de la plataforma en este sistema real.

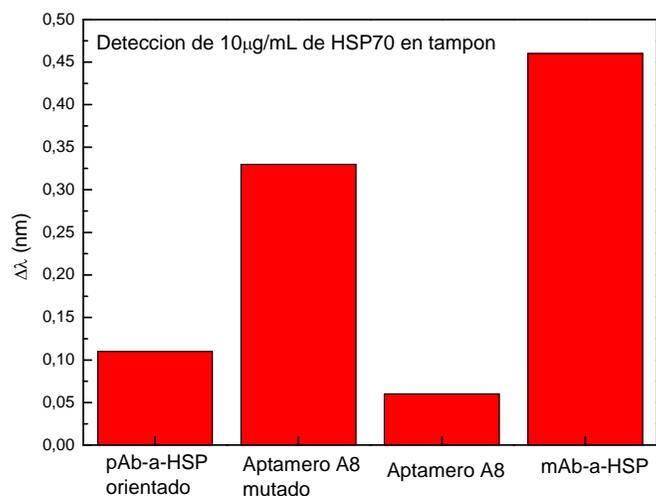


Figura 73. Histograma que esquematiza la capacidad de detección de 10 µg/mL de HSP70 humano, por parte de distintos receptores afines a la proteína.

Por otro lado, estos resultados fueron contrarrestados con un análisis realizado empleando ELISA, donde básicamente se estudió la calidad de los conjugados empleados en este análisis y su interacción con la correspondiente proteína.

En estos estudios, se utilizó un ELISA directo donde se unió a la superficie la proteína HSP70 y posteriormente, se evaluó la eficiencia de la interacción con las respectivas moléculas de reconocimiento conjugadas a biotina. Se realizaron los respectivos controles que darán información de la unión inespecífica. Los resultados se muestran en la Figura 74. En ésta, se observa una representación de los sistemas que se estudiaron y el histograma correspondiente a las señales específicas y controles respectivos.

Al igual que en el sistema evaluado mediante microfluídica, la señal más alta es obtenida por el anticuerpo monoclonal anti-HSP70. Es probable que la STV conjugada con AP (necesaria para el desarrollo enzimático) sea capaz de enlazar en mayor cantidad a los grupos biotinas en este anticuerpo así como también al aptámero-A8, que es el segundo en mostrar una alta señal. Lo que representa que en el proceso de biotinización se han incorporado mayor cantidad de estas unidades por mol de receptor, o bien los grupos biotina unidos se encuentran más expuestos en su superficie. En el caso de aptámero A8-mutado y del anticuerpo policlonal orientado sólo contiene unidades biotina incorporadas en el área seleccionada para la orientación, lo que podría explicar la baja señal obtenida. Los controles muestran una señal despreciable lo que nos sugiere que las interacciones no específicas son despreciables.

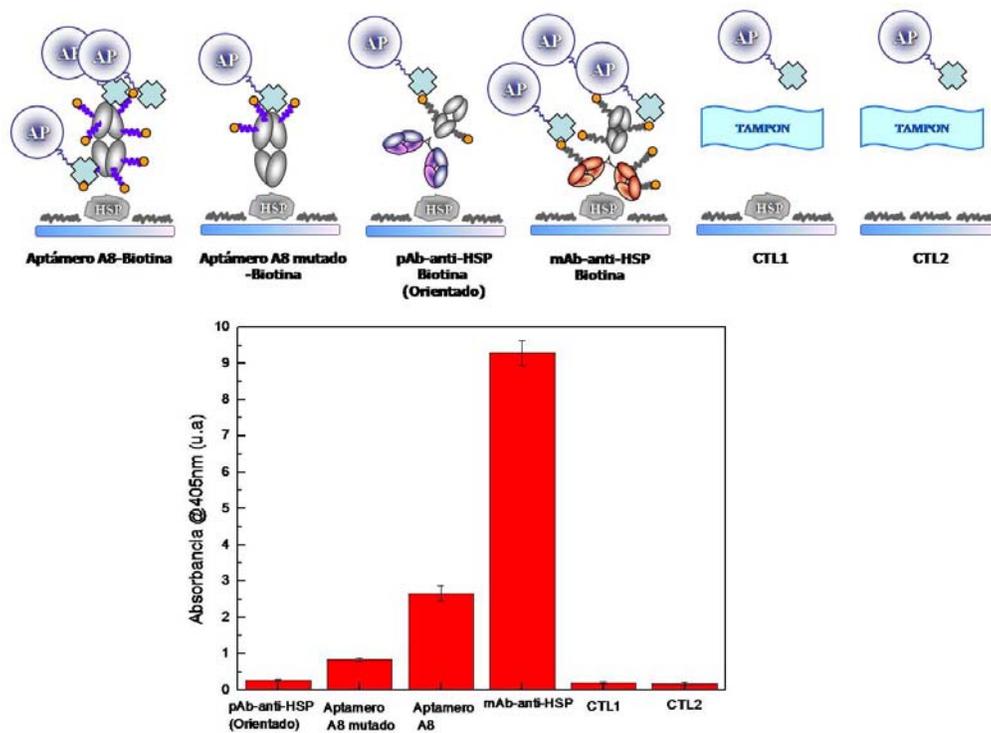


Figura 74. Estudio realizado por ELISA de la calidad de los receptores conjugados empleados en la detección de HSP70. Se observan los esquemas que representan las interacciones estudiadas así como también el histograma que muestra las señales correspondientes. La máxima interacción es alcanzada para el receptor del anticuerpo monoclonal anti-HSP70-Biotina.

Con el propósito de realizar los ensayos de manera similar a como son realizados en el sensor, hemos desarrollado otro estudio con estos conjugados, esta vez con una primera base de STV depositada sobre las placas. Posteriormente, los receptores fueron anclados y testados con una segunda capa de STV. Los resultados y los esquemas que muestran el estudio realizado se muestra en la Figura 75. Se puede observar como es el aptámero A8 es el que muestra la máxima señal, seguido del anticuerpo monoclonal. Este conjugado muestra tener unidades de biotina disponibles en su estructura que permiten enlazar tanto a la primera base de STV formada como posteriormente a la segunda capa de STV-AP. Su conjugación se ha realizado empleando el mismo procedimiento que hemos descrito en el apartado de métodos según estipula que para un anticuerpo IgG 5-6 unidades de biotina son unidas al mismo. Sin embargo debido a que estructuralmente constituye una biomolécula diferente, es probable que más unidades de biotina se hayan enlazado. El equivalente aptámero mutado, presenta menos señal, lo que implica que menos unidades de biotina se han enlazado, producto de esta mutación realizada. Para el anticuerpo policlonal, podemos observar que no presenta señal alguna, lo que se piensa que la orientación, permite que sea anclado con la base de STV, pero no presenta suficiente unidades de biotina como para que el conjugado STV-AP pueda enlazar a él. Por último, el control realizado muestra que no existe señal proveniente de la unión no específica entre las capas de STV.

Una vez evaluados los resultados, se puede concluir que el receptor que muestra una buena relación entre la calidad de su conjugación y especificidad es el anticuerpo monoclonal anti-HSP70. Este receptor es el que se ha escogido para el estudio de la detección de la proteína en bajas concentraciones encontradas en suero humano.

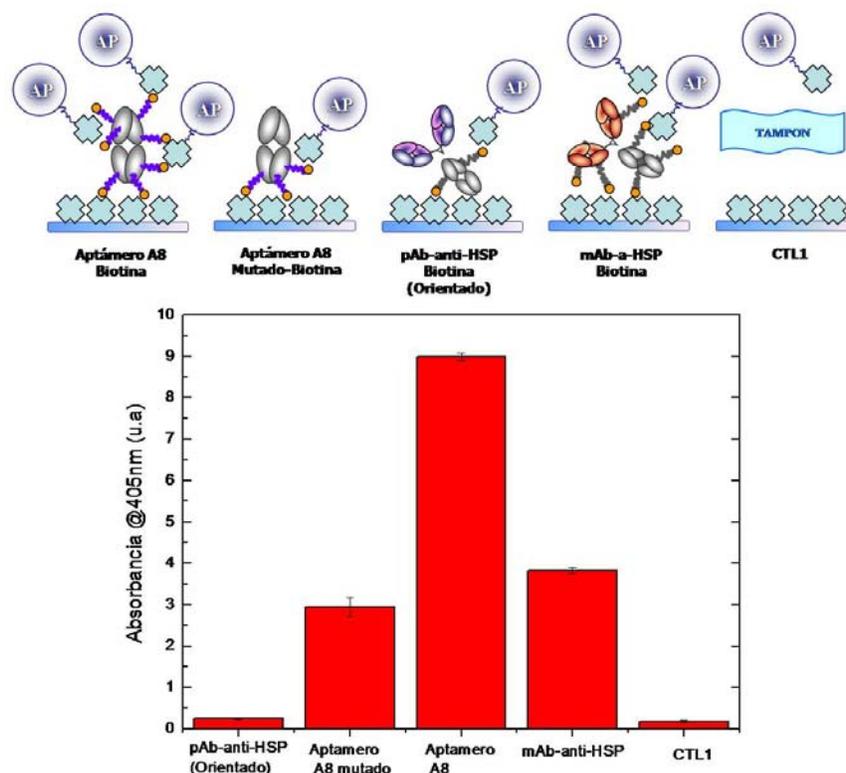
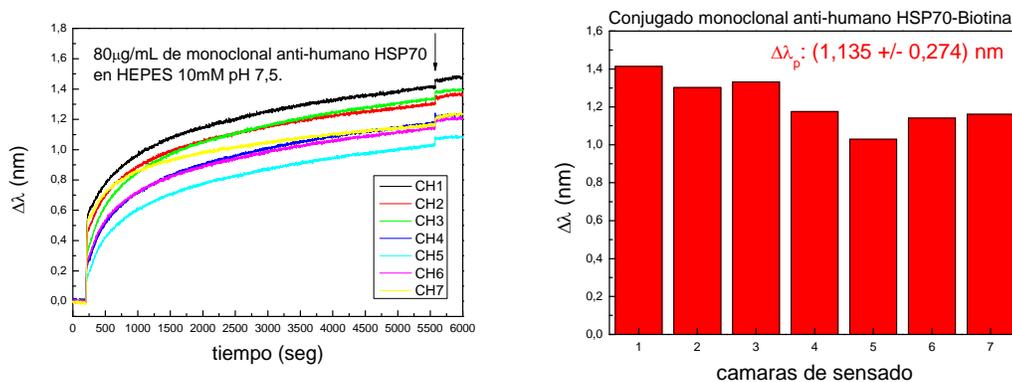


Figura 75. Estudio realizado con ELISA para la evaluación de la calidad de los receptores-biotina estudiados en los ensayos de detección de HSP70. Se observan los esquemas de los ensayos realizados y el histograma con las señales obtenidas.

Una vez se realizó este estudio, se aplicaron estos resultados a la detección de HSP70 en suero humano en la plataforma. Se utilizó 80 µg/mL del anticuerpo monoclonal conjugado con biotina. En la Figura 76 se pueden observar los sensogramas producto del enlace de este receptor y la reproducibilidad de esta etapa. El anclaje de receptor en este caso produce un desplazamiento de (1.135 ± 0.274) nm mayor al encontrado previamente, sin embargo hay una mayor distorsión entre los canales donde se enlaza este receptor.



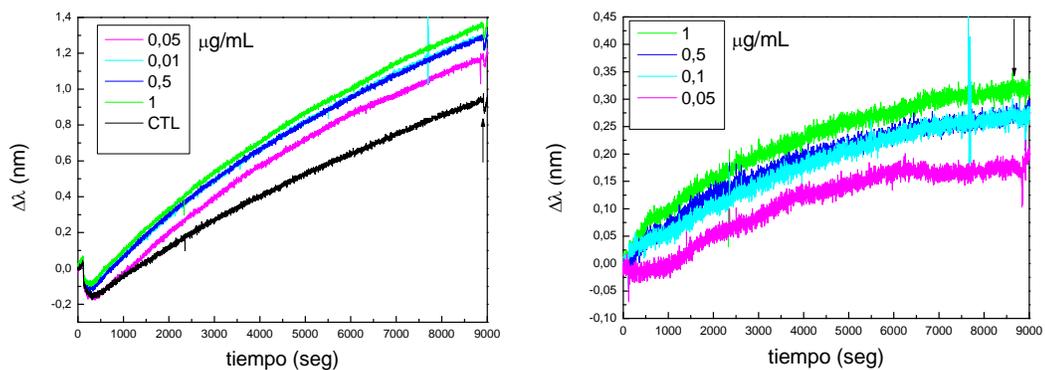
a)

b)

Figura 76. a) Sensogramas correspondiente al anclaje de 80 $\mu\text{g/mL}$ del anticuerpo monoclonal anti-HSP0 en siete canales de un chip de microfluídica, b) Histogramas correspondiente al desplazamiento del pico del plasmón para cada canal. El promedio reflejado es de $(1.135 \pm 0.274) \text{ nm}$

La detección de la proteína en suero humano se realizó para un rango de concentraciones de 0.05; 0.01; 0.5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente en suero diluido al 50 %, incluyendo el respectivo control con suero diluido al 50% sin HSP70. Los sensogramas correspondientes a este proceso de bioreconocimiento se muestran en la Figura 77a.

Es bastante relevante la unión no específica que muestra el control de suero sin analito. Para eliminar este efecto de las señales propias de la detección, esta señal es restada a cada una de las demás señales y así se obtiene la Figura 77b. Este efecto de reactividad cruzada que muestra el anticuerpo monoclonal ha de ser sustraído empleado en cada ensayo el control correspondiente. Señales inferiores a 0.05 $\mu\text{g/mL}$ fueron testadas pero presentaron una relación señal ruido significativa que no permitió su resolución.



a)

b)

Figura 77. a) Sensogramas pertenecientes a la detección de 0.05, 0.01, 0.5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de HSP70 en 50% suero humano. b) señales obtenidas luego de ser sustraído el control (cero) de la matriz sin la proteína.

En la Figura 78, se observa la curva que hemos obtenido a través de estas señales. Como ya lo mencionamos, menores concentraciones no pudieron resolverse, por ello la curva no es del todo completa. Para este ensayo se realizó solo la detección directa de estas concentraciones, lo que una amplificación posterior, permitiría resolver estas señales para las bajas concentraciones. Sin embargo se maneja la hipótesis de una posible interferencia debido a la presencia de $MgSO_2$ y ADP que contiene el tampón. A menores concentraciones este efecto es más pronunciado y puede conllevar a que la interacción no se vea favorecida. Sin embargo, se piensa que optimizando los parámetros de trabajo y empleando la amplificación respectiva con el anticuerpo adecuado, se podría llegar a detectar concentraciones por debajo de 50 ng/mL.

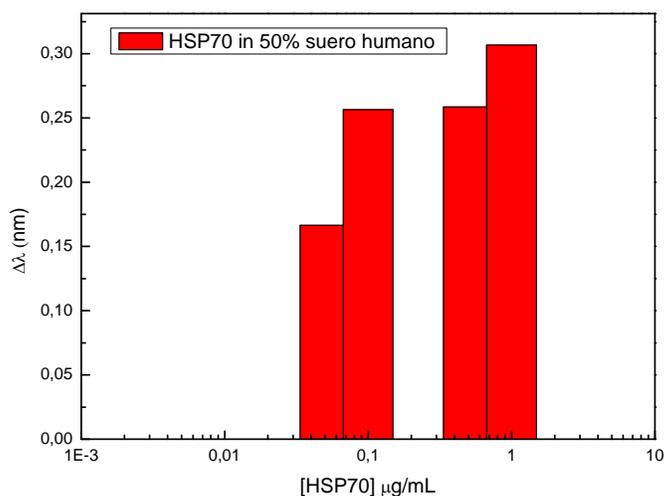


Figura 78. Curva de detección de HSP70 en 50 % suero humano.

Creemos que este sistema es bastante complejo en cuanto a estabilidad se refiere, sin embargo, estos resultados representan un importante avance en las investigaciones relacionadas con el diagnóstico precoz de esta proteína en particular. Sin embargo, procesos de pre-tratamiento, como la biotinylation de los receptores, parecen no favorecer la estabilidad y por ende el bioreconocimiento entre el receptor y la proteína, lo cual es verdaderamente crítico en estos ensayos. Este hecho nos ha llevado a testar otro tipo de protocolos donde no es necesario estos pre-tratamientos y donde se conserva la integridad de las especies biológicas empleadas.

Empleando esta nueva alternativa de funcionalización, hemos realizado estudios con otros sistemas de proteínas relevantes empleadas como marcadores tumorales. Los resultados y los avances en este sentido se muestran en el siguiente apartado. Sin embargo, el estudio realizado con HSP70 ha servido para demostrar la viabilidad en la aplicación de la plataforma de biosensado que hemos desarrollado en esta tesis doctoral, en el diagnóstico y detección de sistemas complejos y clínicamente relevantes, así como también representa particularmente

un avance significativo en las investigaciones relacionadas con el diagnóstico precoz de esta proteína. Los estudios con este sistema siguen abiertos y continúan realizándose en esta dirección.

3.2.2 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS Y MARCADORES TUMORALES EMPLEANDO EL PROTOCOLO DE ACTIVACION CON EDC/NHS PARA EL ANCLAJE DEL RECEPTOR.

3.2.2.1 Optimización general de diversos parámetros involucrados en la reacción de activación EDC/NHS para la inmovilización de los receptores.

Una vez que la capa de MUA se forma sobre las nanoestructuras de oro, el chip es ensamblado y se realizan sobre él las consecuentes reacciones de conjugación. Mediante estas reacciones de conjugación se une el elemento de bioconocimiento (receptor) que, en este caso, es un anticuerpo específico para el analito de interés. La unión del anticuerpo se realiza mediante la reacción EDC/NHS, tras la cual se obtiene un enlace covalente entre el grupo $-COOH$ del MUA y grupos amino ($-NH_2$) del anticuerpo a anclar. Se puede observar un esquema general del proceso en la Figura 79.

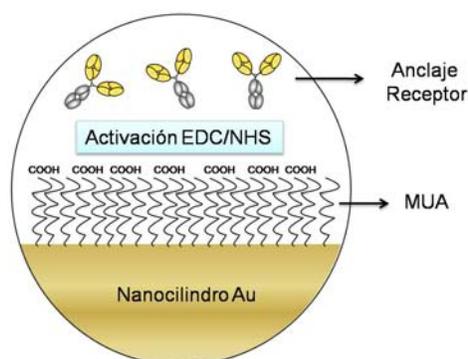


Figura 79. Esquema general de la funcionalización de los nanocilindros de oro con MUA, y el anclaje del receptor empleando la reacción de activación EDC/NHS. Mediante esta reacción los grupos COOH del MUA se vuelven activos para reaccionar con los grupos $-NH_2$ que posee el anticuerpo. EL anticuerpo sirve de receptor del analito que se desea detectar.

Esta metodología en comparación con la anteriormente presentada basada en la interacción biotina-STV, presenta ciertas ventajas que la definieron como el protocolo principal empleado en esta investigación, y el empleado en la detección de marcadores tumorales de gran interés. Uno de las principales ventajas de esta metodología es que permite que el receptor esté lo suficientemente cerca y estable de la superficie, lo que no compromete en principio el volumen de sensado de la plataforma.

Sin embargo, la principal ventaja de esta modalidad, radica en el hecho de anclar al receptor en su forma natural sin la necesidad de tratamientos previos que podrían afectar ciertos aspectos importantes en el reconocimiento del analito. Recordemos que el ester NHS puede ser fácilmente atacado por nucleófilos, y en particular por los grupos aminos que posee el anticuerpo en su estructura.

En la estructura del anticuerpo básicamente existen dos sitios donde se encuentran los grupos aminos reactivos que pueden estar involucrados en la reacción NHS/EDC. En primer lugar tenemos los grupos $-NH_2$ pertenecientes a las cadenas polipeptídicas de la lisina denominados ϵ -aminos ubicados en la region Fab del anticuerpo, los cuales se encuentran más expuestos y los $-NH_2$ terminales ubicados en la region Fv donde se encuentran los parátomos que intervienen en el bioreconocimiento (Ver Figura 80). Los grupos aminos deberán ser desprotonados para atacar el ester NHS. La desprotonación de estos aminos puede ser controlada según el pH de trabajo ya que poseen pKa diferentes [Tochilin, 1995]. Según estos valores de pKa, los grupos amino terminales (pKa = 8.8 a 9.87, excepto cisteína y prolina) estarán más desprotonados que los ϵ -amino de la lisina (pKa = 10.28) presentando mayor reactividad a valores de pH neutro. Sin embargo, los ϵ -aminos de la lisina suelen ser más importantes para la conjugación, ya que se encuentran externamente más accesibles [Trilling y col, 2013].

Es por esta razón que en los procesos de biotización empleados con el anticuerpo en el protocolo basado en la interacción de biotina-STV, se bloquean con mayor probabilidad los grupos amino terminales del anticuerpo con biotinas ubicados precisamente en la zona de reconocimiento del anticuerpo, pudiendo afectar el bioreconocimiento y la orientación del mismo en el anclaje con la STV de base.

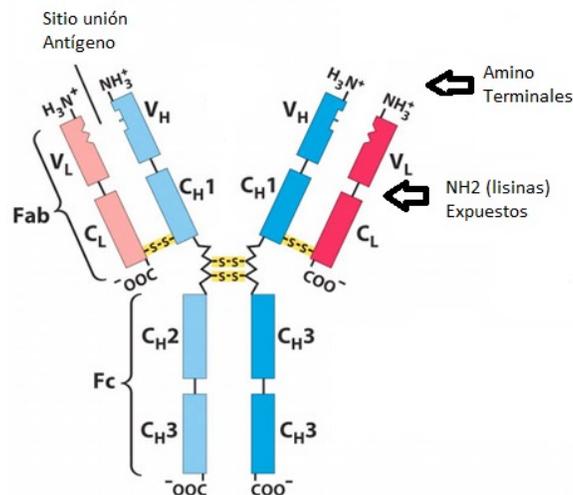


Figura 80. Representación de la ubicación de los diversos grupos aminos en la región Fab de un anticuerpo que puede interaccionar con los grupos $-COOH$ activos del MUA mediante la reacción EDC/NHS sobre el sensor.

Más detalles sobre estos aspectos relacionados con la orientación del anticuerpo receptor fueron omitidos por razones de confidencialidad.

3.2.2.2 Empleo del sistema modelo de anticuerpos IgG/anti-IgG para la evaluación del protocolo de activación con EDC/NHS.

Al igual que en el protocolo anterior, hemos empleado un sistema de anticuerpo IgG/anti-IgG, cuya interacción es bien conocida, para la evaluación y la viabilidad del protocolo y la plataforma en la detección de diversos sistemas de marcadores tumorales. Como prueba de concepto, se empleó el mismo sistema de anticuerpos IgG de conejo/anti-IgG que se usó en los estudios con el protocolo anterior.

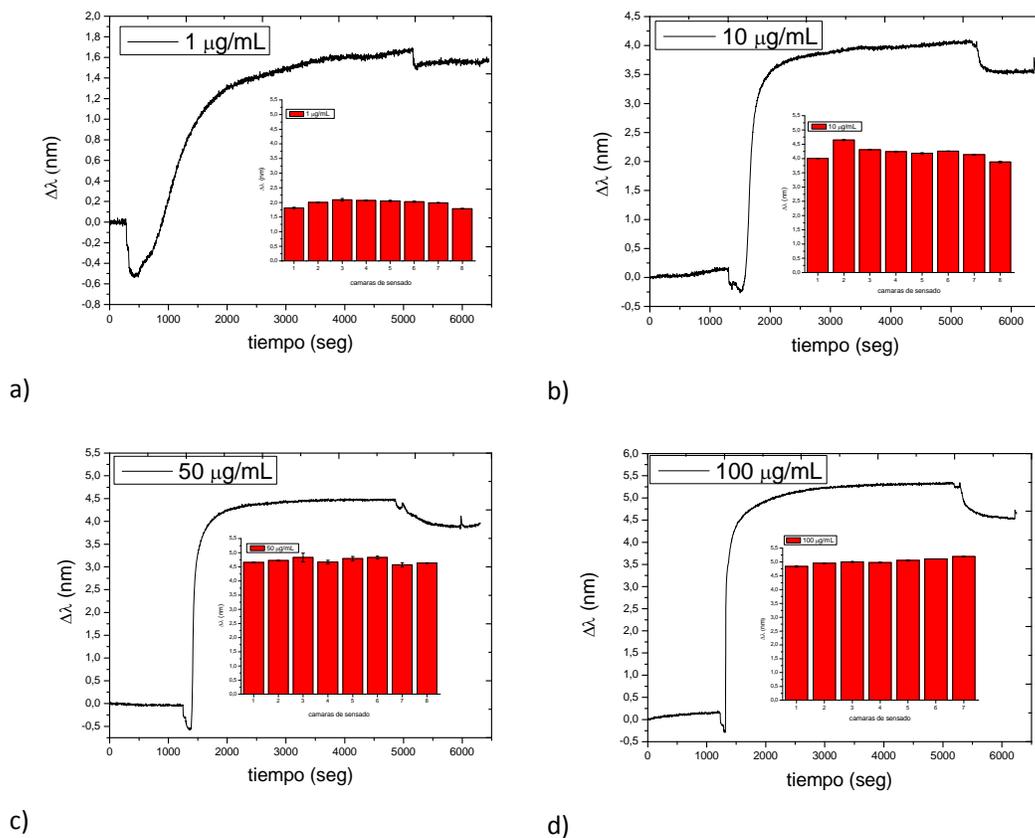


Figura 81. Sensogramas que muestran el anclaje del receptor IgG de conejo a) 1 $\mu\text{g/mL}$ b) 10 $\mu\text{g/mL}$ c) 50 $\mu\text{g/mL}$ y d) 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre la SAM de MUA depositada en nanocilindros de oro.

El estudio se ha iniciado, evaluando el efecto de la concentración del anticuerpo anclado sobre una base de MUA depositada sobre los nanocilindros de oro, según el procedimiento descrito en el capítulo 2. Para ello, se ensayaron concentraciones de 1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de la IgG de conejo en el tampón correspondiente. Este protocolo no requiere procesos de pre-tratamiento

del receptor, por lo que la IgG fue inyectada dentro del chip directamente después de la activación.

En la Figura 81, se pueden observar los sensogramas que muestran la unión del anticuerpo a la base de MUA para las distintas concentraciones empleadas. Los histogramas insertados en cada sensograma, muestran la reproducibilidad del proceso realizado en 8 canales del chip de microfluídica.

Posteriormente, se obtuvo el histograma de la Figura 82, que muestra los desplazamientos promedios del plasmón para cada concentración. Se observa que el desplazamiento del plasmón es proporcional a la concentración de receptor empleado, obteniendo el máximo valor para la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Este protocolo muestra un desplazamiento correspondiente al anclaje del receptor muy por encima que los arrojados por el protocolo anterior (interacción STV-conjugado/Biotina). Esto puede deberse a varias razones. Por un lado, en esta metodología el anticuerpo se inmoviliza directamente sobre una monocapa de MUA formada previamente en la superficie de los sensores de oro mientras que en el caso de la metodología basada en biotina-STV, el anticuerpo se inmoviliza sobre una monocapa de PEG-biotina conjugada a STV. La menor distancia del anticuerpo a la superficie de los sensores, y por tanto, del antígeno unido específicamente al mismo (lo que produce la señal analítica), hace que esta metodología basada en la activación con EDC/NHS sea más sensible. Por otro lado, en este caso se trabaja con el receptor en su forma natural sin modificaciones previas y, por lo tanto, la actividad del anticuerpo inmovilizado es probable que sea mayor. Así mismo, la reacción de activación basada en la reacción NHS/EDC que hemos empleado en este caso, es altamente eficiente para la formación de enlaces covalentes entre los grupos $-\text{COOH}$ de la base (MUA) y las aminas primarias que posee el anticuerpo, lo que garantiza que grandes cantidades de anticuerpos puedan anclarse y permanecer estables para la posterior etapa de reconocimiento del analito.

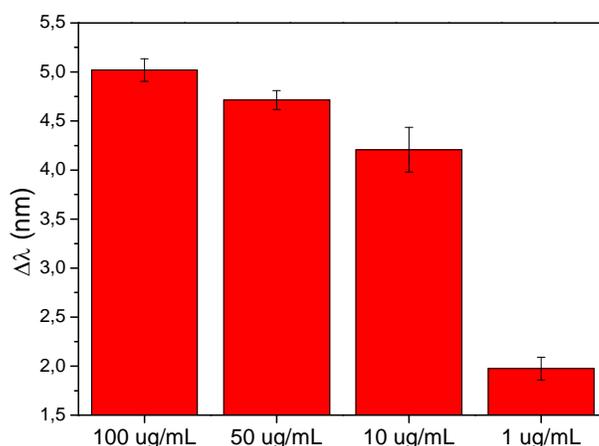


Figura 82. Histogramas que muestran el desplazamiento promedio para 1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG de conejo anclado sobre los biosensores

Por cada concentración del receptor anclado, hemos realizado una curva de detección de anti-IgG a distintas concentraciones, con el objetivo de evaluar como es afectado el límite de detección. Se obtuvo para cada caso la correspondiente curva de calibrado y el límite de cuantificación asociado al valor EC10 de dicha curva. Los sensogramas asociados a las curvas para cada concentración del receptor, son mostrados en la Figura 83.

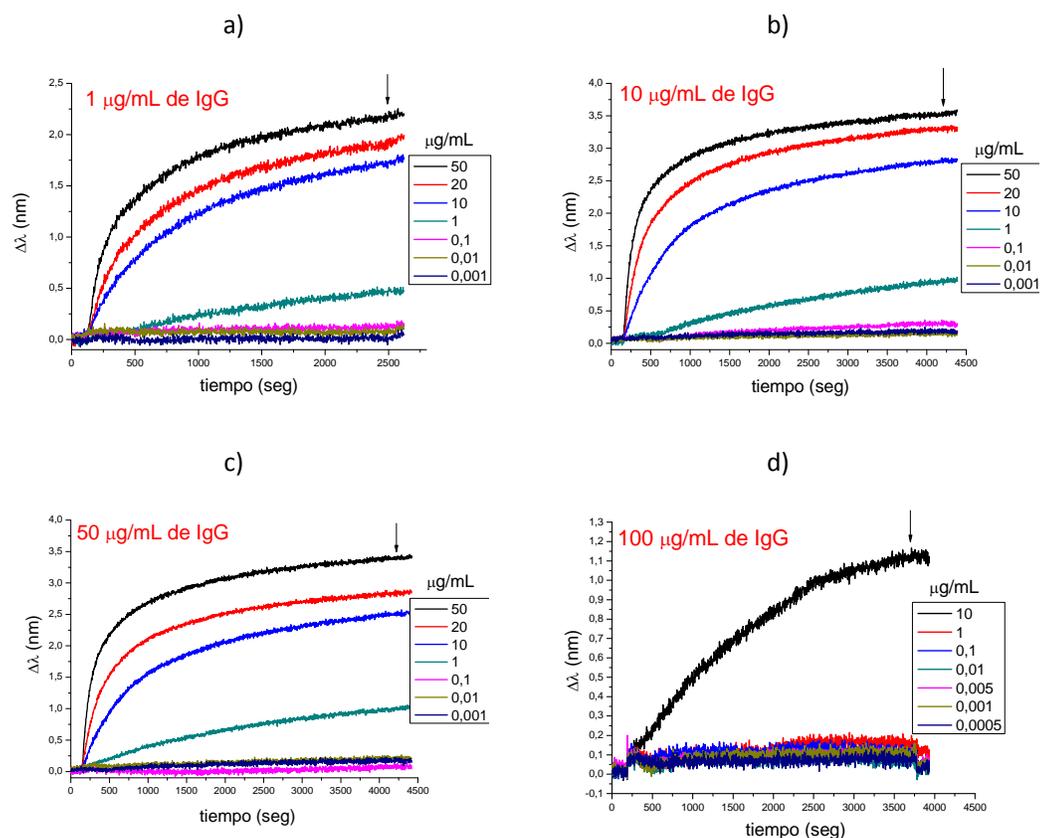


Figura 83. Sensogramas que muestran el desplazamiento del plasmón asociado a la detección de distintas concentraciones del anticuerpo anti-IgG cuando es empleado a) 1 $\mu\text{g/mL}$, b) 10 $\mu\text{g/mL}$. c) 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ del receptor IgG. La flecha muestra cuando el proceso de lavado es iniciado.

Se estudió un rango de concentraciones de anti-IgG entre 50-0.001 $\mu\text{g/mL}$ para cada condición. Los experimentos fueron llevados a cabo en suero humano diluido al 50 %. Con estos datos, se construyeron las curvas de detección que son las mostradas en la Figura 84. Para cada curva se determinó el límite de cuantificación (concentración efectiva al 10 % de la curva o EC10) a partir del ajuste no lineal de tipo sigmoideal. En estos experimentos, podemos apreciar como el límite de cuantificación disminuye significativamente cuando se utilizan concentraciones superiores a 50 $\mu\text{g/mL}$ del receptor IgG. Es probable que para este sistema, esta concentración garantiza un rendimiento de inmovilización y ordenamiento óptimo del receptor sobre la superficie del sensor, lo que permite reconocer más eficientemente las moléculas del analito en las condiciones de trabajo. Sin embargo, cada sistema bajo estudio es diferente, por lo que

se recomienda realizar estos ensayos cada vez que se trabaja con un sistema anticuerpo-analito diferente. Con el objetivo de contrastar los protocolos empleados en esta tesis doctoral para el anclaje del receptor sobre la superficie del sensor, hemos realizado una comparación representando las curvas de detección obtenidas en ambos casos. Se observa en la Figura 85, la curva azul que corresponde a la curva de detección de anti-IgG amplificada empleando el protocolo basado en la interacción STV-Biotina, en donde un pre-tratamiento del receptor es requerido. Por otro lado, tenemos la gráfica roja que muestra la curva de detección del mismo analito pero empleando el protocolo basado en la reacción de activación de EDC/NHS.

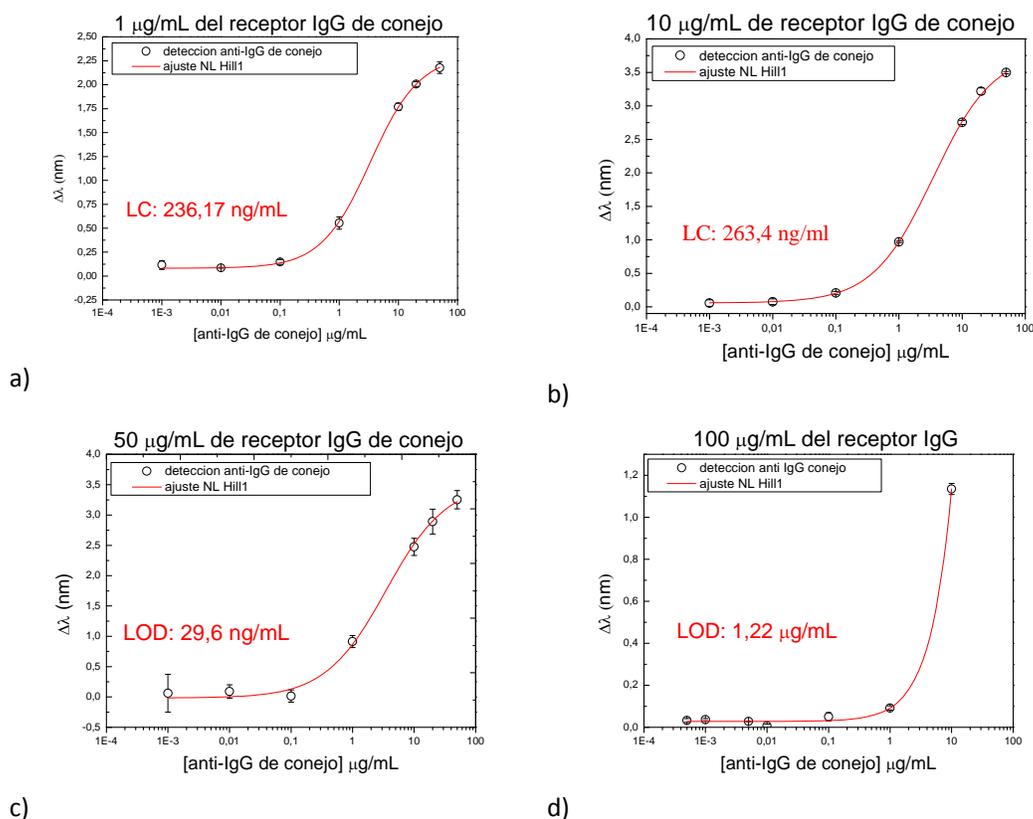


Figura 84. Curvas de detección para diversas concentraciones de anti-IgG empleando diversas concentraciones de receptor IgG, a) 1 $\mu\text{g/mL}$, b) 10 $\mu\text{g/mL}$, c) 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para cada caso el Límite de Cuantificación (LC) fue calculado a partir del ajuste no lineal de tipo sigmoidal empleado.

Al comparar los límites de cuantificación obtenidos para cada caso, podemos observar que el mejor valor es obtenido cuando el protocolo EDC/NHS es empleado, donde es posible detectar un valor promedio de 29.6 ng/mL empleando la plataforma LSPR desarrollada. Cabe destacar que ambos experimentos fueron llevados a cabo en suero humano al 50 % y las condiciones de anclaje del receptor que se usaron fueron las más óptimas según el protocolo.

Ambos métodos muestran ser bastante sensibles y específicos, constituyendo vías de funcionalización competentes para la detección de sistemas con aplicaciones bio-médicas más

relevantes, si bien el método basado en la activación con EDC/NHS muestra una mayor sensibilidad. Al observar los resultados anteriores y tomando como desventaja el pretratamiento a realizar en el protocolo basado en la interacción STV-Biotina junto con la menor distancia del evento de reconocimiento a la superficie del sensor, se decidió seleccionar la metodología basada en activación con EDC/NHS como método a ser empleado en el estudio de la detección de marcadores tumorales mediante la plataforma de sensado LSPR desarrollada en esta tesis doctoral para tal fin.

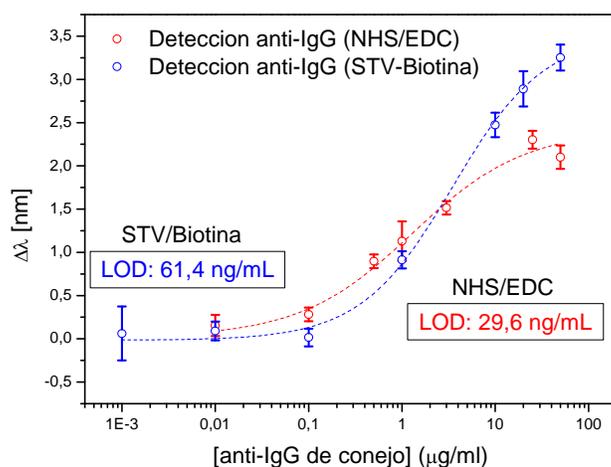


Figura 88. Comparación de las curvas de detección de anti-IgG obtenidas empleando protocolos de funcionalización diferentes. La curva azul corresponde a la detección amplificada para anti-IgG de conejo basada en la interacción STV-Biotina, donde el receptor fue modificado para su anclaje. La curva roja sin embargo, corresponde a la detección directa de anti-IgG de conejo obtenida mediante la activación de los grupos $-COOH$ con la reacción EDC/NHS y el posterior anclaje del receptor en su forma natural. Este protocolo arroja un LC de 30 ng/mL.

3.2.2.3 Detección de alfa feto proteína (AFP) en tampón y en suero humano empleando la plataforma de sensado LSPR.

Una vez evaluado la plataforma con un sistema modelo, cuya interacción es conocida y bien estudiada, hemos decidido emplear sistemas reales relevantes, para evaluar su aplicabilidad en el diagnóstico y monitorización en el área de la oncología. Uno de los sistemas a estudiar está basado en la detección de la alfa feto proteína, empleando su anticuerpo monoclonal como receptor específico y altamente sensible a dicha proteína. Recordemos que esta proteína constituye un marcador importante relacionado con diversos tipos de cáncer, siendo más asociado al cáncer de hígado y testículo.

Antes de realizar los ensayos de detección con este sistema, realizamos unos ensayos de optimización de diversas variables a tomar en cuenta que aportan credibilidad en los posteriores ensayos de detección a realizar. Una vez realizados, se ha continuado con diversas pruebas relacionadas con la monitorización y diagnóstico de esta proteína, primero en tampón (a modo de evaluación del sistema) y posteriormente, en una matriz similar a la real como el suero humano comercial. Estos resultados corresponden una primera etapa del objetivo final: el diagnóstico de marcadores tumorales en una muestra de sangre real (sin pre-tratamiento) empleando la plataforma de sensado LSPR desarrollada.

Inicialmente, el anticuerpo monoclonal anti-AFP fue anclado a la superficie del sensor, después de la activación de los grupos -COOH de la capa de MUA depositada sobre los nanocilindros de oro. Se registró una línea base con el tampón, y al anticuerpo se dejó reaccionar durante aproximadamente 1 hora en condiciones fluidicas sobre el sensor. En la Figura 86, podemos observar los sensogramas característicos de esta etapa, así como también la activación realizada. Se monitorizó el proceso en los 8 canales del chip de microfluídica en paralelo observándose la reproducibilidad de este proceso.

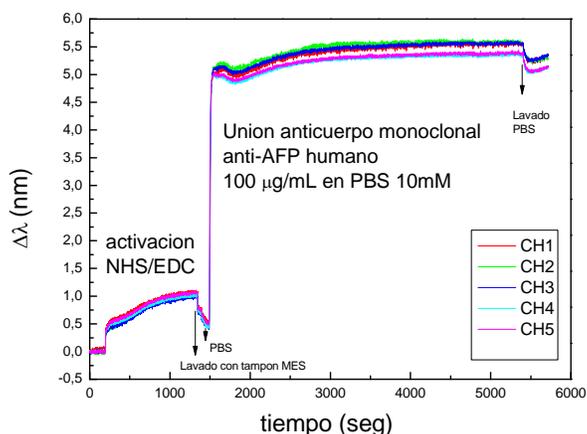


Figura 86. Sensogramas que muestran el anclaje del receptor anticuerpo monoclonal anti-AFP humano. Se observa, así mismo, la activación previa de los grupos -COOH del MUA empleando la reacción NHS/EDC. Las flechas muestran cuando se efectúan los lavados con los respectivos tómpones.

Así mismo, este proceso se realizó en chips diferentes donde un estudio estadístico mostró la robustez y la reproducibilidad de la unión del receptor empleando la plataforma. Un desplazamiento promedio de (4.337 ± 0.350) nm, es asociado a la unión del receptor usando una disolución de $100 \mu\text{g/mL}$ del anticuerpo monoclonal anti-AFP sobre los nanocilindros de oro bajo las mismas condiciones de funcionalización. En la Figura 87 se muestra el estudio estadístico realizado.

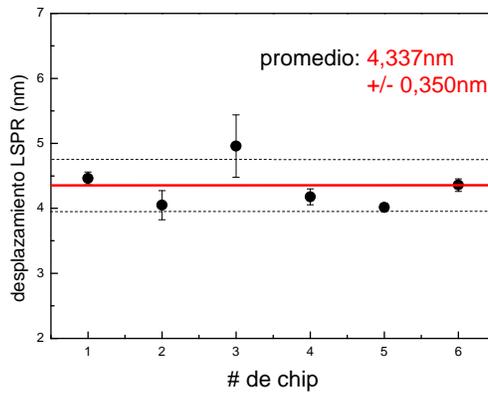


Figura 87. Estudio estadístico que muestra el desplazamiento del pico LSPR correspondiente al anclaje de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo monoclonal anti-AFP humano sobre nanocilindros de oro funcionalizados con MUA y activados empleando la reacción EDC/NHS. Un valor promedio de 4.34 nm es asociado a esta unión.

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de la capa formada por el MUA, luego de realizar el ensamblaje de la muestra con el chip, se realizó una prueba de envejecimiento y/o degradación de la capa en aire. Para ello, se utilizaron tres muestras preparadas el mismo día bajo las mismas condiciones que se utilizaron en diferentes tiempos tras su preparación (después de 1, 3 y 8 respectivamente). La evaluación de la estabilidad consistió en determinar desplazamiento del plasmón LSPR de las nanoestructuras de oro tras la unión del anticuerpo monoclonal anti-AFP. Como este proceso ya fué optimizado y se conoce los valores óptimos que debe arrojar este proceso de anclaje (siempre y cuando se conserven las mismas condiciones de trabajo) se puede evaluar la efectividad de la reacción de conjugación comparándola con ellos.

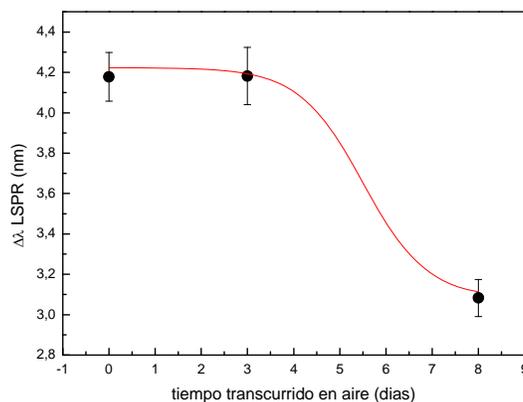


Figura 88. Estudio de estabilidad de la capa de MUA sobre nanocilindros de Au. Medidas realizadas para tres chips fabricados y utilizados bajo las mismas condiciones. Los chips para las medidas pasados 3 y 8 días desde su fabricación fueron conservados en aire hasta su medición. El desplazamiento que se muestra es el correspondiente al enlace del anticuerpo monoclonal anti-AFP a la capa de MUA empleando la reacción de activación con EDC/NHS.

Utilizando las mismas condiciones de reacción de activación con EDC/NHS para la unión del anticuerpo, se observó que la monocapa de MUA permanece estable durante 3 días (Figura 88), sin embargo la eficiencia de la reacción empieza a disminuir una vez transcurrido este tiempo. Este resultado constituye solo una prueba inicial y general en los estudios de estabilidad de la capa de MUA, sin embargo un estudio mas detallado ha de ser realizado, empleando inclusive técnicas mas controladas para el estudio de monocapas en superficie.

Así mismo, se optimizó de manera preliminar el efecto de la reacción NHS/EDC sobre la activación y el posterior anclaje del anticuerpo monoclonal sobre la superficie de los sensores. Los datos pertenecientes a esta optimización son omitidos por razones confidenciales. Sin embargo en la Figura 89, podemos observar un sensograma característicos a las condiciones óptimas de trabajo, que muestra el desplazamiento del pico LSPR en tiempo real para la reacción de EDC/NHS junto con el posterior anclaje del anticuerpo monoclonal anti-AFP utilizando una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.

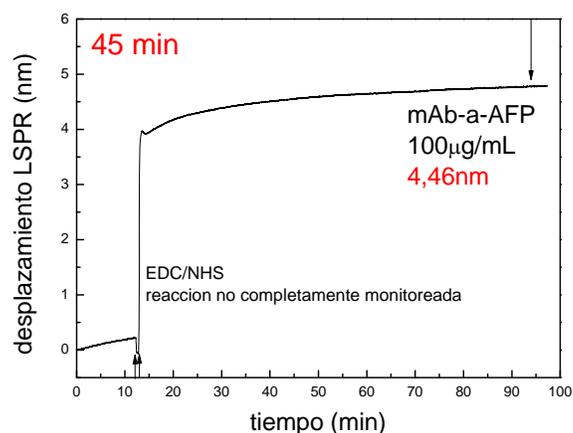


Figura 89. Sensograma que muestra la reacción NHS, seguido del correspondiente anclaje del anticuerpo monoclonal anti-AFP. La flecha muestra los intervalos donde se realizaron lavados con los diferentes tãmpones.

Con el objetivo de evaluar la efectividad de la activación en el anclaje covalente de este receptor, se realizó un ensayo de control. Para este control, se realizaron sobre un canal todos los procesos llevados a cabo para la inmovilización del receptor excepto la activación con EDC/NHS. En los sensogramas mostrados en la Figura 90, se puede observar que el control no muestra señales provenientes de la inmovilización del anticuerpo sobre la capa de MUA sin activar. La posterior inyección de la etanolamina, que bloquea los grupos $-\text{COOH}$ activados sin reaccionar igualmente, no muestra señal de unión significativa. Dado el tamaño pequeño que tiene esta molécula, posiblemente el desplazamiento del plasmon producto de su difusión entre la capa del anticuerpo es pequeño, de allí la poca señal observada. En resumen estos resultados son una evidencia de la eficacia de la reacción de activación y la especificidad alcanzada empleando dicha reacción para este proceso de anclaje.

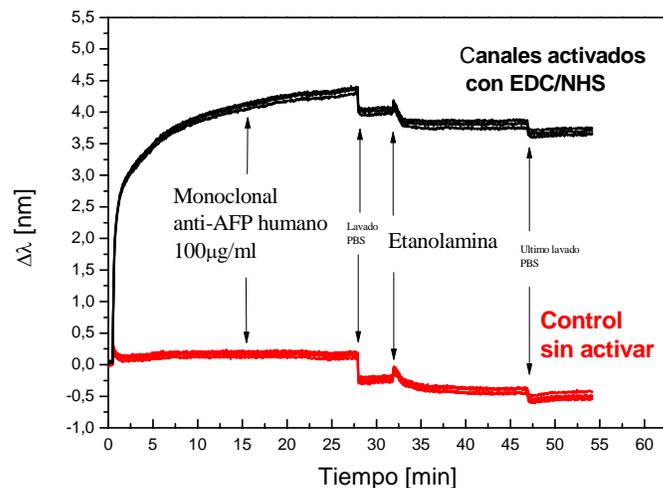
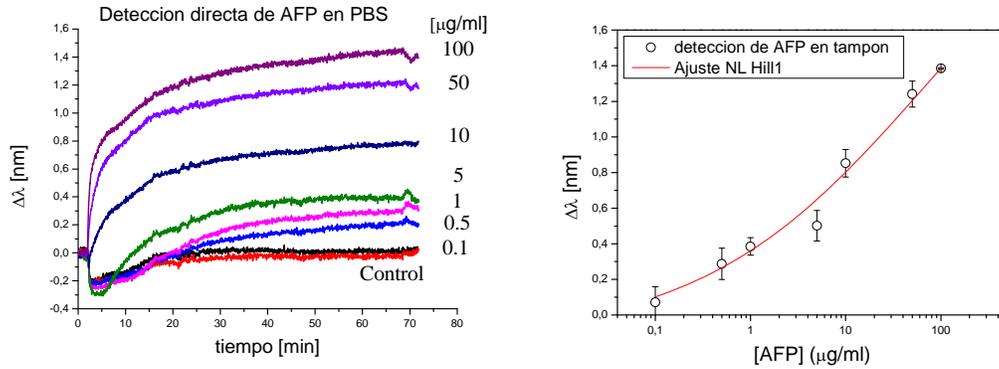


Figura 90. Sensorgramas que muestran la unión específica y covalente del anticuerpo monoclonal anti-AFP humano a los grupos -COOH activos por la reacción EDC/NHS. Los canales sin activar (sensorgramas de color rojo) no muestran señal del anclaje no específico de dicho receptor.

Una vez que el receptor es anclado, se realizaron ensayos de detección de la proteína AFP en tampón, empleando altas concentraciones, para evaluar en un primer momento, el potencial de detección de la plataforma. Se emplearon concentraciones de AFP en tampón PBS en un rango de concentraciones de 100-0.1 $\mu\text{g/mL}$ junto con control sin proteína (cero). En la Figura 91a se muestran los sensorgramas obtenidos para cada concentración de AFP detectada de manera directa.

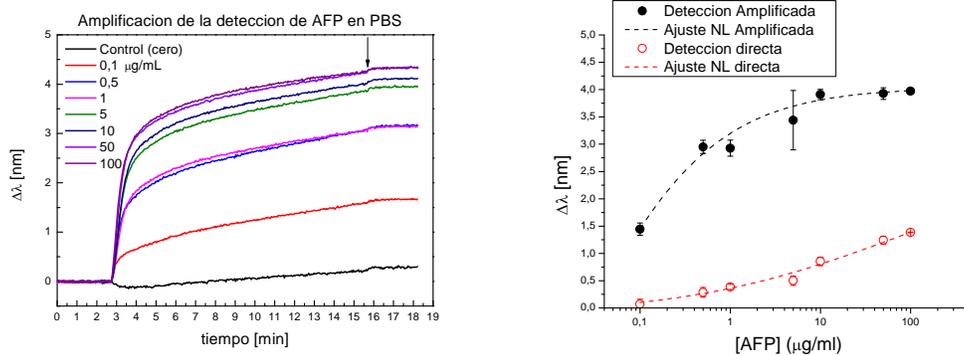
Se observa que el control muestra poca o ninguna absorción no específica. Sin embargo, esta señal es restada a las demás señales, para eliminar cualquier efecto proveniente de esta contribución no específica en las señales de detección. La curva de detección extraída de los sensorgramas se muestra en la Figura 91b.

Con el objetivo de amplificar las señales (especialmente para aquellas correspondientes a las concentraciones más bajas, que son difíciles de resolver en el tiempo que dura el ensayo), se introdujo un paso adicional de amplificación usando un anticuerpo policlonal anti-AFP humano en una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ en el tampón PBS. Este segundo anticuerpo al ser policlonal puede enlazar a la proteína a través de varios sitios, lo que permite que varias unidades de éste puedan interactuar con la proteína detectada por el monoclonal, amplificando así la señal obtenida. Esta amplificación ha permitido el desplazamiento de la curva haciendo el sistema más sensible.



a) b)
 Figura 91. Detección directa de AFP en PBS empleando la plataforma de sensado LSPR. a) Sensorgramas correspondientes a la detección de distintas concentraciones de AFP, se observa la señal proveniente del control (cero) empleado, b) Curva de detección para las concentraciones empleadas.

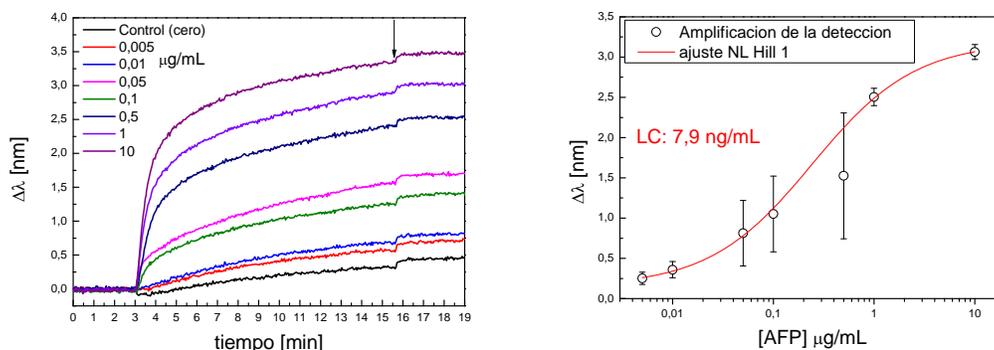
En este caso, al igual que en la detección directa, la señal del control fue restada a todas las demás señales. Los sensorgramas producto de la amplificación para la detección de cada concentración trabajada, se muestran en la Figura 92a. Con estos sensorgramas se construyó la curva de la Figura 92b donde se observa que este rango de concentraciones trabajada, se encuentra ubicado en un rango superior no lineal de la curva característica de detección, lo cual indica, como ya lo hemos mencionado que el sistema es sensible y capaz de detectar concentraciones más bajas.



a) b)
 Figura 92. Amplificación de la detección directa de AFP en tampón empleando 20 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo policlonal anti-AFP humano. a) Sensorgramas que muestran la amplificación de la detección de AFP a distintas concentraciones, b) curva de detección producto de la amplificación de la señal, desplazada con respecto a la detección directa.

Con el objetivo de determinar el límite de detección de AFP empleando nuestra plataforma, hemos repetido los ensayos realizados, esta vez trabajando con bajas concentraciones de la

proteína en PBS. En este caso empleamos un rango de concentraciones de 10 - 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AFP. Para este rango de concentraciones la detección directa no pudo ser resuelta en el tiempo empleado para el ensayo, por lo que sólo se muestran los resultados provenientes de la amplificación de la señal. Hemos empleado igualmente 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo policlonal anti-AFP para esta amplificación y los sensogramas obtenidos junto con la curva de detección mostrada en la Figura 93.

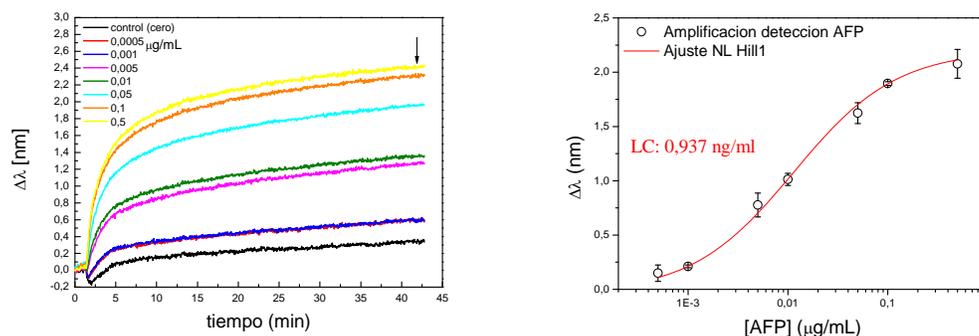


a)
 b)
 Figura 93. Detección amplificada de AFP en tampón para un rango bajo de concentraciones. a) Sensogramas que muestran las señales amplificadas para las distintas concentraciones empleadas 10, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Un control sin AFP (cero) fue realizado, y la señal sustraída a las demás señales. b) Curva de detección obtenida para la detección de AFP. El ajuste no lineal arroja un LC de 7.9 ng/mL para la detección de AFP en tampón.

En la Figura 93a se pueden ver los sensogramas para cada concentración. Para 5 ng/mL, que corresponde a la menor concentración testada, se observa un desplazamiento que puede ser claramente medido por nuestro sistema, lo que es un indicio de lo sensible que puede llegar a ser. Así mismo, el control que hemos realizado muestra una señal significativa, la cual ha sido sustraída de las señales de detección. Esta señal corresponde a la absorción no específica del anticuerpo policlonal al receptor monoclonal anclado, ya que a diferencia de cuando se trabaja en suero, no se establece ninguna pasivación que disminuya este efecto de absorción inespecífica de las especies involucradas. Este efecto ha sido en principio eliminado al sustraerlo de las demás señales. De allí la importancia de realizar en cada ensayo un control de este tipo. Este efecto fue confirmado empleando ensayos con ELISA, resultados que presentaremos más adelante.

Una vez han sido procesados los sensogramas, la curva de detección mostrada en la Figura 93b es obtenida. El ajuste no lineal de tipo sigmoidal arrojó un LC de 7.9 ng/mL. Esta sería la concentración mínima efectiva que el sistema puede llegar a detectar para la proteína AFP en tampón de una manera confiable. Estos resultados preliminares en tampón, son considerados como exitosos, lo que nos ha llevado al siguiente paso: la detección de la proteína en una matriz más compleja y real como lo es en suero humano. Para ello, hemos realizado el mismo procedimiento, pero esta vez las soluciones de AFP a detectar fueron preparadas en suero

humano diluido al 50 %. Las condiciones de anclaje del receptor y de operación de la plataforma de sensado se mantuvieron iguales. Los sensogramas y la curva de detección obtenida se muestran en la Figura 94. Con los sensogramas que se obtuvieron a las bajas concentraciones detectadas (500-0.5 ng/mL respectivamente), se obtuvo la curva de la Figura 94b. El control de suero humano sin AFP muestra señales significativas provenientes del posible AFP endógeno existente en esta matriz de suero humano, así como también pueden estar presentes efectos como el reconocimiento cruzado por parte del receptor a especies existentes en esta matriz. Sin embargo esta señal fue restada a las demás para eliminar este efecto. En este sentido la curva de detección arrojó un LC de 0.94 ng/mL.



a) b)
 Figura 94. Amplificación de la detección de AFP en suero humano al 50% empleando la plataforma de sensado LSPR. a) Sensogramas que muestran la detección amplificada de AFP en suero en concentraciones de 500, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5 ng/mL respectivamente. Un control sin AFP muestra las señales no específicas producto de la matriz empleada. b) Curva de detección donde se calculó el LC de 0.94 ng/mL para este sistema en suero humano.

Recordemos que los rangos de concentración normal de AFP en sangre en humanos están por debajo de 10 ng/mL [Ball y col, 1992], esto significa que nuestra plataforma es altamente sensible para la detección de esta proteína a estos niveles y representa una alternativa viable en la detección temprana de este marcador tumoral en sangre.

Con el objetivo de evaluar la reproducibilidad de estos resultados, los ensayos fueron repetidos en otro chip, bajo las mismas condiciones de operación y de funcionalización empleadas en el experimento anterior. La curva de detección que arrojó el ensayo es mostrada en la Figura 95. Se observa como el LC encontrado es comparable con los experimentos anteriores, confirmando así que la plataforma constituye una alternativa confiable en el diagnóstico temprano de marcadores tumorales asociados al cáncer, lo que representa un futuro prometedor en la lucha contra esta enfermedad.

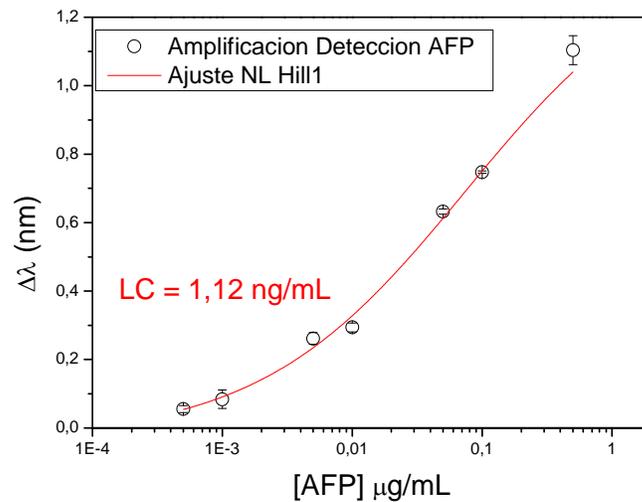
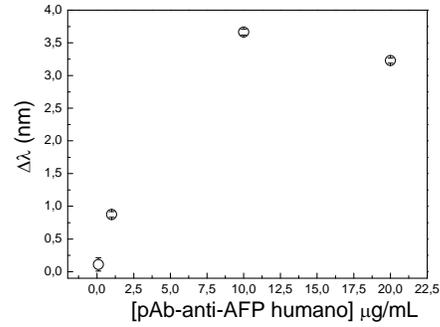
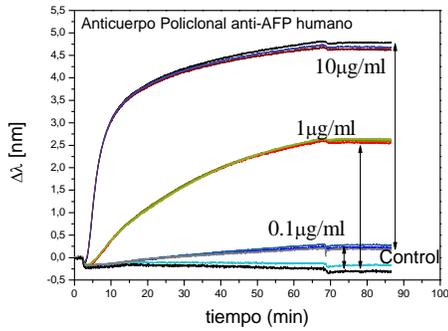


Figura 95. Curva de detección amplificada de AFP en suero humano en un chip diferente bajo las mismas condiciones. El LC obtenido muestra la alta reproducibilidad y la robustez del método.

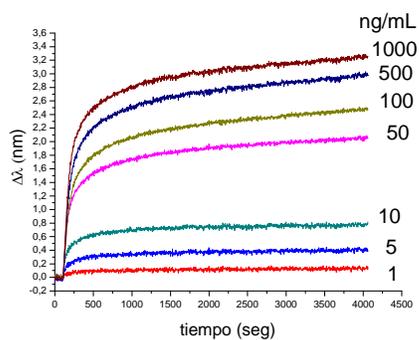
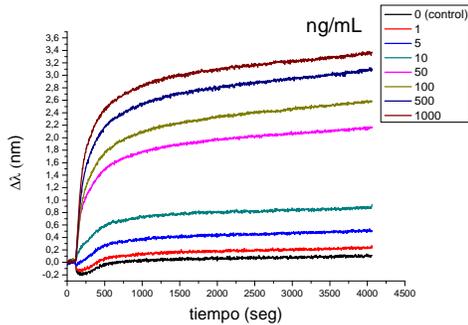
Por otro lado, para evaluar la amplificación por parte del anticuerpo policlonal anti-AFP, se realizó un ensayo variando la concentración del anticuerpo sobre una base de la proteína fija anclada sobre el MUA activado. El estudio se realizó usando 100 µg/mL de AFP en tampón. Por ser una proteína pequeña en tamaño, las señales del anclaje sobre el sensor no pudieron ser resueltas, por ello se muestran las señales provenientes de la interacción directa con el anticuerpo. Hemos empleado un rango de concentraciones de 0.1, 1, y 10 µg/mL del anticuerpo policlonal, y un control sin anticuerpo fue realizado. Los sensoigramas obtenidos son mostrados en la Figura 96a. Con estos resultados, y los obtenidos para el valor de 20 µg/mL del policlonal bajo las mismas condiciones (Figura 96), hemos construido la gráfica de la Figura 96b. Para unificar criterios, cada punto corresponde al desplazamiento del plasmón para sólo 15 minutos de inyección, tiempo en el cual la saturación ha sido alcanzada empleando una concentración de 20 µg/mL. Se puede observar como la saturación es alcanzada con 10 µg/mL del anticuerpo secundario, lo que nos hace pensar que las concentraciones que hemos venido empleando han garantizado una buena amplificación de la detección correspondiente.

Con el objetivo de dar validez a los resultados que obtenidos con la plataforma en la detección de esta proteína, se realizaron ensayos empleando un material de referencia de AFP suministrado por el National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), una institución líder en el suministro de materiales de referencia biológicos. A partir de este material de referencia se prepararon diluciones en el tampón PBS 10mM, 0.15 M NaCl, 1 % de BSA y empleado como control el mismo tampón sin proteína. Se empleó esta matriz para evitar la interferencia del posible AFP endógeno en el suero y así obtener una curva libre de este efecto.



a) b)
 Figura 96. a) Sensogramas producto de la unión de diferentes concentraciones del anticuerpo policlonal anti-AFP humano a una base de la proteína anclada sobre el sensor. b) curva que muestra el desplazamiento del pico LSPR para diferentes concentraciones del anticuerpo en un tiempo de 15 minutos en condiciones fluidicas.

La matriz utilizada simula la matriz compleja de suero empleado. El rango de soluciones empleados fue de 1-1000 ng/mL. Finalmente, la amplificación arrojó los sensogramas que se muestran en la Figura 97a. Estos sensogramas muestran la poca señal asociada a las absorciones no específicas del tampón-BSA sobre el sensor, sin embargo, esta señal al igual que en todos los casos anteriores fue sustraída de las señales de detección obteniendo así los sensogramas de la Figura 97b.



a) b)
 Figura 97. Detección amplificada de AFP estándar calibrado a diferentes concentraciones 1-1000 ng/mL. a) Sensogramas obtenidos donde se observa la señal correspondiente al control sin AFP (tampón + 1 % BSA). b) Sensogramas finales luego de sustraer el control.

Finalmente, con las señales obtenidas se obtuvo la curva de detección de la Figura 98 y mediante un ajuste no lineal se calculó el límite de cuantificación para este sistema, arrojando un valor promedio de 1.3 ng/mL. Esta concentración corresponde a la mínima cantidad que puede ser medida de este estándar con gran confianza empleando la plataforma de sensado

LSPR. Podemos ver que este valor es similar al anteriormente obtenido para el sistema AFP en una matriz de suero humano al 50% (1.12 ng/mL). La correspondencia en los valores obtenidos con este material de referencia y con el patrón de AFP utilizado en suero real, permite validar los resultados obtenidos y da confianza del método empleado.

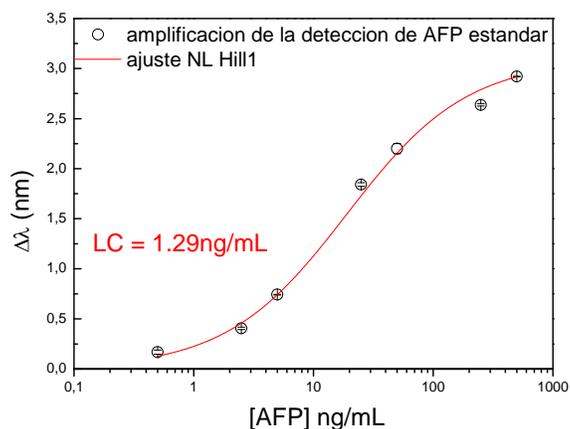


Figura 98. Curva de detección amplificada de diversas concentraciones de AFP estándar calibrado. El límite de detección del ensayo fue determinado a partir del ajuste no lineal de tipo sigmoide empleado.

Con este estándar de AFP se realizaron ensayos de ciertos controles importantes en este tipo de reconocimiento. En primer lugar se probó la especificidad de la detección del anticuerpo monoclonal anti-AFP hacia la proteína. Una vez el anticuerpo fue anclado, se introdujo en uno de los canales un control de 10 ng/mL de IgG de conejo en PBS 10 mM con 1% BSA y contrastado con diferentes concentraciones de AFP en la misma solución, específicamente 0.25, 0.5, 1, 10 y 100 ng/mL. Los sensogramas obtenidos luego de sustraer los respectivos controles sin analito son mostrados en la Figura 99a.

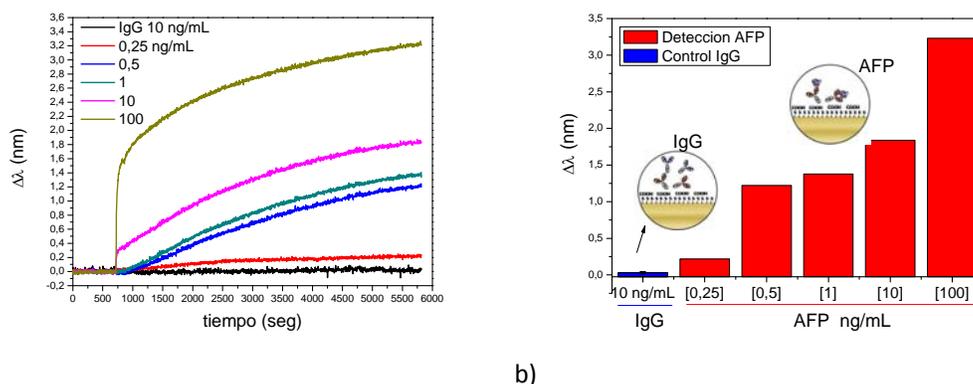


Figura 99. Estudio de la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-AFP. a) Sensogramas que muestran la detección de distintas concentraciones de AFP y de 10 ng/mL de IgG de conejo empleado como control. b) Histogramas que muestran el desplazamiento del pico LSPR para la detección de AFP y el control de IgG realizado. Se observa la poca señal que genera el control, indicio de la alta especificidad del anticuerpo en el reconocimiento de la proteína.

Los desplazamientos mostrados en la Figura 99b, muestran la poca señal que produce la interacción con el control de IgG de conejo empleado, en comparación con la alta señal específica para la detección de la proteína a la misma concentración empleada (10 ng/mL). Estos resultados muestran a priori, la alta selectividad del anticuerpo monoclonal en el reconocimiento de la proteína AFP, lo que representa un punto importante en la estrategia de detección de este marcador en muestras clínicas complejas.

Por otro lado, hemos realizado un control inverso. En este control, en uno de los canales se inmovilizó al anticuerpo IgG de conejo en las mismas condiciones que el anticuerpo monoclonal para AFP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo IgG de conejo en el respectivo tampón PBS) y se evaluó la interacción con 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AFP en PBS con 1% BSA. EL anclaje del anticuerpo monoclonal anti-AFP junto con el del anticuerpo IgG de conejo, se muestra en la Figura 100a. Una vez los anticuerpos fueron inmovilizados, se introdujeron las disoluciones de AFP y se evaluó su respuesta en el sensor. La Figura 100b muestra los sensogramas de la interacción de los anticuerpos con la proteína. Los controles sin proteína (solo PBS + 1 % BSA) para ambos casos fueron sustraídos de las señales observadas.

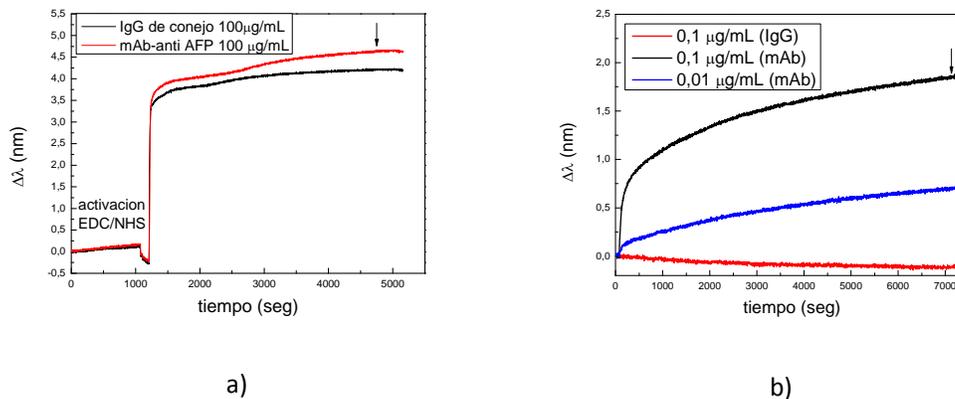


Figura 100. a) Anclaje de los receptores IgG de conejo y anticuerpo monoclonal anti-AFP para el estudio de la especificidad de la detección de AFP por parte del anticuerpo monoclonal correspondiente. b) Sensogramas que muestran la detección directa de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AFP por parte de los distintos receptores empleados.

La información de los sensogramas anteriores se ha resumido en el histograma de la Figura 101, donde claramente se puede apreciar como la interacción de la proteína con el anticuerpo IgG (interacciones no específicas) no produce señal en comparación con el equivalente empleando el anticuerpo monoclonal específico. Estos resultados confirman la especificidad de la interacción entre el anticuerpo monoclonal y la proteína, reforzando aún más la viabilidad del protocolo y del método sugerido como herramienta en el diagnóstico efectivo de marcadores tumorales de este tipo.

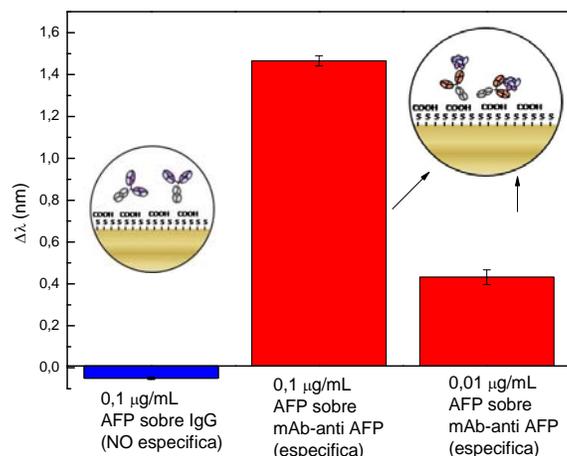


Figura 101. Histograma que muestra la especificidad de la interacción entre el anticuerpo monoclonal anti-AFP y la proteína AFP. Se observa la poca señal proveniente del control empleando el anticuerpo IgG de conejo en la detección no específica de 0.1 μg/mL de AFP en tampón +1 % BSA. Así mismo se observan los ensayos positivos de la detección específica empleando el anticuerpo monoclonal correspondiente.

Uno de las pruebas más significativas que se realizó, fue la correspondiente a la robustez de los resultados obtenidos con la plataforma, esto quiere decir la reproducibilidad de los resultados para ensayos realizados bajo las mismas condiciones pero en diferentes días. Esto representa una información importante si se desea aplicar la plataforma en el diagnóstico consecutivo de analitos en muestras reales. Por esta razón hemos realizado como prueba una curva de calibración para la detección de diversas concentraciones de AFP en diferentes días y chips. Los resultados se muestran en la Figura 102.

Hemos realizado la curva en 1% de BSA para todos los casos y empleado las mismas condiciones de preparación tanto del chip, como de las soluciones. Hemos empleado concentraciones en el rango de 0.01; 0.005; y 0.001 μg/mL de la proteína pensando en que se estaría trabajando en una parte lineal de la curva. Se utilizó un blanco sin proteína, como control. Se observa que existe una alta reproducibilidad de los resultados entre sí. Esto muestra a priori, la robustez del método y representa un resultado relevante desde el punto de vista comercial, pensando en la futura implementación del método para su aplicación en ensayos de diagnóstico en áreas médicas.

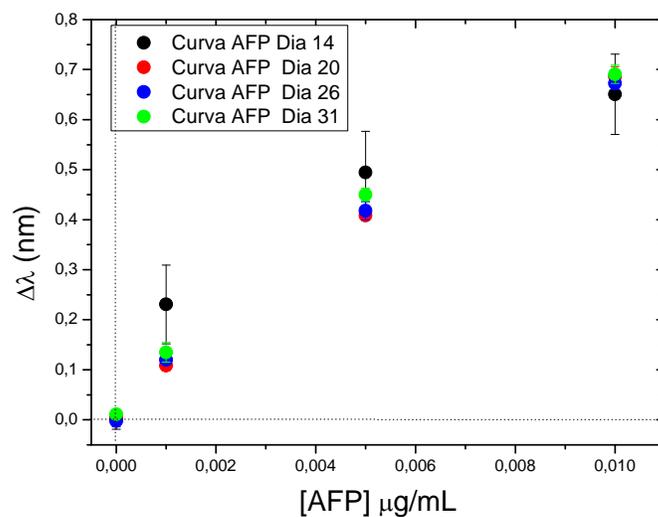


Figura 102. Curvas de calibración para diversas concentraciones de AFP en 1% BSA realizada en diferentes días bajo las mismas condiciones. Se observa la alta robustez del método.

3.2.2.3.1 Empleo de ELISA como método para evaluar el reconocimiento de los anticuerpos anti-AFP empleados y como método de validación de los resultados obtenidos en la detección de la proteína empleando la plataforma optofluídica de sensado LSPR.

Se realizaron algunos ensayos ELISA con el objetivo de evaluar los reactivos utilizados en los experimentos de reconocimiento realizados con el sistema AFP. Inicialmente, se desarrolló un ensayo tipo sándwich (del mismo tipo del que hemos empleado en el protocolo de funcionalización para el sensor de nuestra plataforma LSPR) empleando el receptor monoclonal anti-AFP como base del mismo.

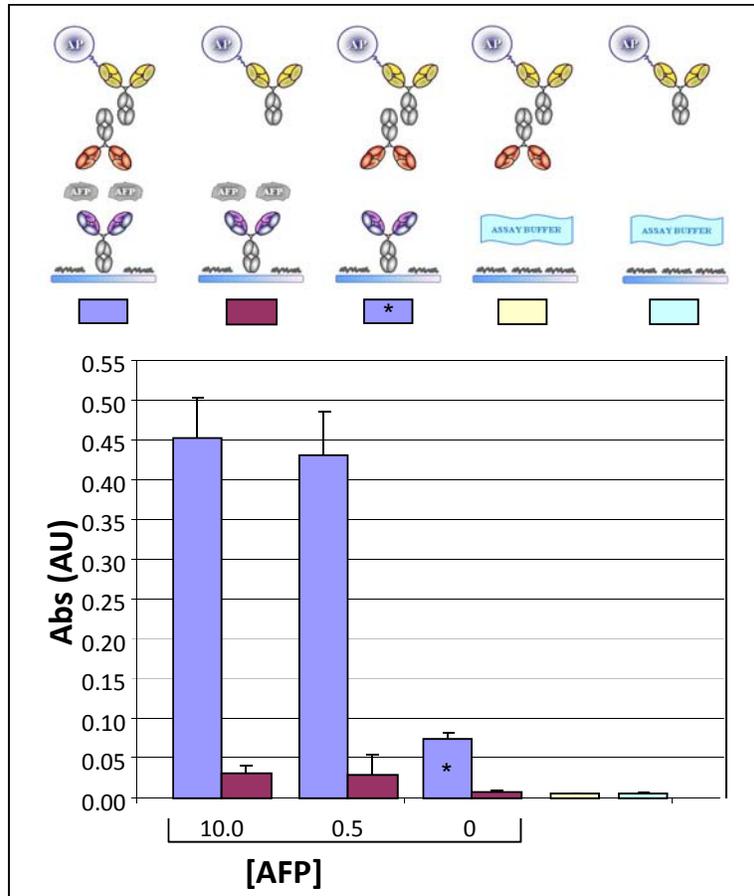


Figura 103. Histogramas que muestran las interacciones específicas entre las especies involucradas en la detección de AFP. Se muestran esquemas que representan los ensayos realizados así como sus controles.

Posteriormente, la proteína fue depositada en dos concentraciones, 10 y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. El anticuerpo policlonal anti-AFP fue empleado para evaluar la amplificación y un segundo anticuerpo marcado con AP fue empleado para la reacción enzimática. Diversos controles fueron realizados para comprobar el enlace no específico entre las especies. El ensayo fue llevado en cabo en el tampón correspondiente. La Figura 103 recoge la información obtenida por la técnica ELISA. Los resultados obtenidos en este ensayo confirman la alta selectividad del anticuerpo monoclonal con la proteína AFP, así mismo muestra que las especies presentan una calidad óptima para ser empleadas en los ensayos de detección con la plataforma LSPR. Los controles muestran la baja señal de las interacciones no específicas entre las especies. El control que corresponde al cero de AFP, muestra cierta señal que confirma una cierta reactividad cruzada entre los anticuerpos monoclonal y policlonal. Es por esta razón que esta señal es sustraída para eliminar este efecto en los experimentos de detección.

Así mismo, se realizó el mismo ensayo, pero esta vez contrastando el efecto de la matriz del suero humano en el reconocimiento con el equivalente ensayo en tampón. Para ello, se realizaron los ensayos esquematizados en la Figura 104 y sus respectivos controles. Los resultados de la Figura 104, confirman la especificidad del anticuerpo monoclonal hacia el AFP. Sin embargo, se observa un ligero incremento de la señal cuando la proteína está en la matriz

de suero humano. Este incremento puede venir dado por cantidades de AFP endógeno existente en el suero empleado, que pueden ser detectadas al mismo tiempo que el AFP añadido. A pesar que estas cantidades endógenas (normales) son bajas, nuestro sensor resulta ser bastante sensible para detectarlas de allí su contribución significativa en las señales de detección.

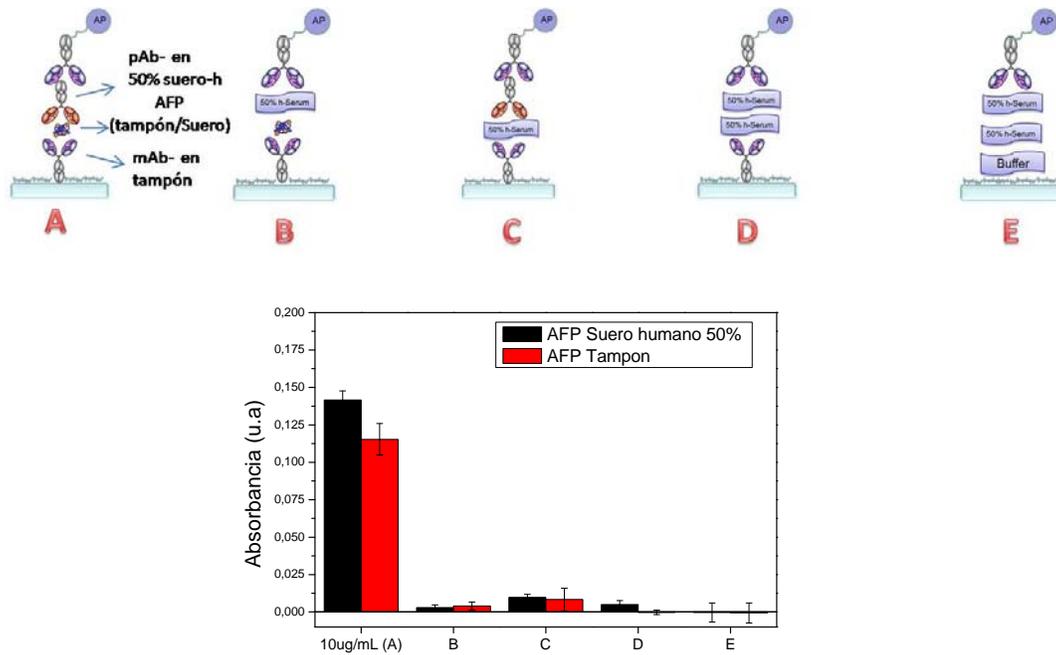


Figura 104. Estudio del efecto del suero humano en la detección de AFP por parte del anticuerpo monoclonal anti-AFP empleando ELISA. Se muestran los esquemas que representan los ensayos realizados y sus controles.

En este mismo sentido, se evaluó la reactividad cruzada entre el anticuerpo monoclonal y otro tipo de analito. Para ello, se realizó un ELISA usando la proteína PSA y evaluado su interacción con dicho receptor. Así mismo, se realizó el ensayo específico con la proteína AFP para contrastar los resultados obtenidos. Los experimentos fueron realizados en tampón y en suero humano al 50 %. Los resultados son recogidos en el histograma de la Figura 105. Se puede observar en primer lugar la señal específica proveniente de la interacción entre 45 ng/mL de AFP y su anticuerpo monoclonal (Histograma A). Las señales resultan ser equivalentes tanto en suero como en tampón.

Sin embargo, los controles pertenecientes al cero de AFP muestran un aumento cuando es empleado el suero humano, posiblemente por el AFP endógeno que hemos mencionado en los ensayos anteriores. Por otro lado, se observa que en tampón no existe reactividad con el analito PSA (Histograma C), lo que confirma la selectividad del anticuerpo hacia el AFP. El aumento que se observa cuando el PSA se añade en el suero humano probablemente sea

debido al AFP endógeno. Los controles realizados no muestran contribución de señales no específicas en este ensayo.

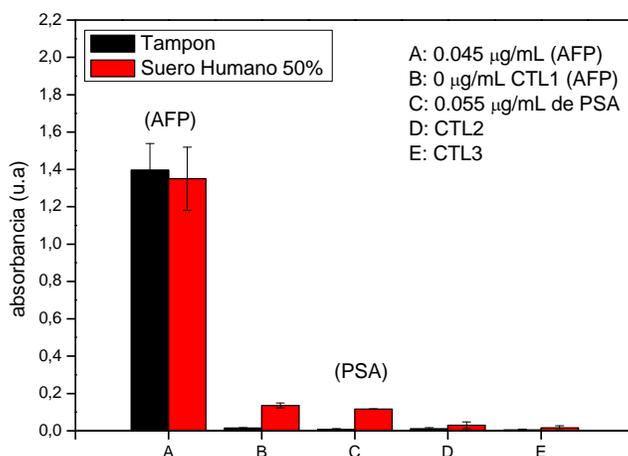


Figura 105. Ensayos de selectividad y especificidad a la detección de AFP, por parte del anticuerpo monoclonal anti-AFP empleado estudio realizado cuando la proteína fue disuelta en tampón (graficas de color negro) y en suero humano al 50 % (graficas de color rojo). Se estudió la reactividad cruzada con el analito PSA (Control C) mostrando un resultado negativo, así mismo se confirma de los controles (B) la presencia de AFP endógeno existente en el suero humano empleado.

Una vez se realizó este estudio de los reactivos empleados y de las diversas interacciones entre estos, se utilizó la técnica de ELISA como método de validación de los resultados de detección obtenidos por la plataforma LSPR desarrollada. Para ello, se realizó una curva de calibrado con diferentes concentraciones de AFP en suero humano al 50 % (semejante a la realizada con la plataforma), y mediante el ajuste no lineal se calculó el LC. La gráfica se muestra en la Figura 106. El límite de detección obtenido empleando esta metodología arroja un valor promedio de 3 ng/mL de concentración mínima detectada. Este valor está por encima (dos veces el valor) del obtenido con la metodología propuesta en esta tesis doctoral (1.2 ± 0.1 ng/mL en promedio, según Figura 95 y 98 respectivamente). Esta validación apunta que nuestra plataforma resulta ser, *a priori*, más sensible en la detección de este tipo de marcadores tumorales, y además presenta ciertas ventajas (poco consumo de muestra, ensayos más rápidos, monitorización en tiempo real, paralelismo en los ensayos para detecciones simultáneas, entre otros) que la sitúan en competencia directa con los métodos más eficaces y comúnmente usados para el diagnóstico temprano de este tipo de proteínas en sangre.

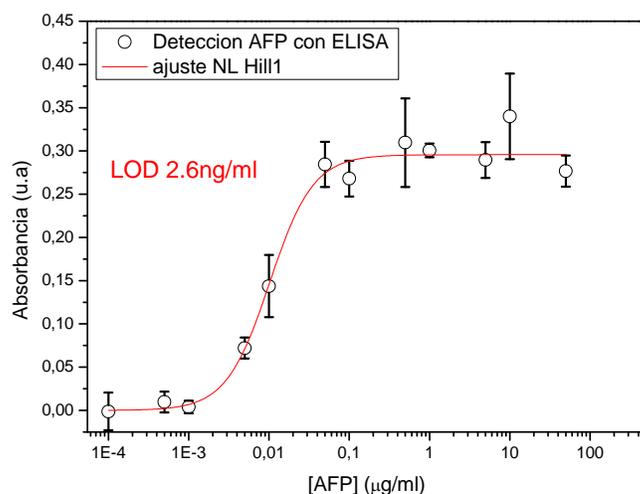


Figura 106. Curva de detección de diversas concentraciones de AFP en suero humano al 50 % realizada empleando ELISA como validación de los resultados obtenidos con la plataforma LSPR. El límite de detección conseguido es el doble del alcanzado con la plataforma.

3.2.2.3.2 Determinación cuantitativa de la cantidad de AFP endógena en el suero humano de trabajo, empleando el método de adición estándar.

En los experimentos realizados tanto con la plataforma como con la técnica de ELISA hemos detectado la presencia de AFP endógeno en el suero humano de trabajo, es por esta razón que se planteó su cuantificación empleando la plataforma de sensado, con ayuda del método de adición estándar.

La técnica de adición de estándar es especialmente útil para analizar muestras cuya matriz compleja hace altamente probable la presencia de interferencias. Este método puede aplicarse de diferentes formas. Una de las más habituales implica la preparación de diferentes soluciones, mediante la adición de diferentes volúmenes de una disolución patrón a una misma alícuota de muestra. Todas las soluciones se llevan a un volumen final fijo. Las medidas, se van haciendo en la muestra original y después de cada adición del patrón en la muestra. En la mayoría de las versiones del método de la adición de estándar, la matriz de la muestra es casi idéntica después de cada adición y la única diferencia es la concentración del analito agregado, o la concentración de reactivo en el caso de que se añada un exceso de un reactivo analítico.

Como los patrones se preparan en alícuotas de la muestra y la dilución de la muestra es la misma en cada solución, la matriz es idéntica. Por esta razón, en cada solución, las señales son afectadas de manera similar por las interferencias no espectrales producto de la matriz de la muestra por lo que la curva obtenida permite, en principio, realizar la determinación cuantitativa de manera adecuada. Es importante destacar que esta técnica no elimina las

interferencias sino que las compensa, ya que permite obtener la señal de patrones y muestra bajo las mismas condiciones de matriz.

Para llevar a la práctica el método, usualmente se toman volúmenes iguales de disolución problema, y se añaden cantidades conocidas y diferentes de analito a todas las muestras, excepto a una, diluyendo, finalmente, todas al mismo volumen. Seguidamente, se obtienen las señales instrumentales para todas esas disoluciones, y los resultados se representan como se muestra en la Figura 107. La señal medida se representa en el eje Y, mientras que en el eje X, la escala se expresa en términos de las cantidades de analito añadidas, ya sea como masa o como concentración.

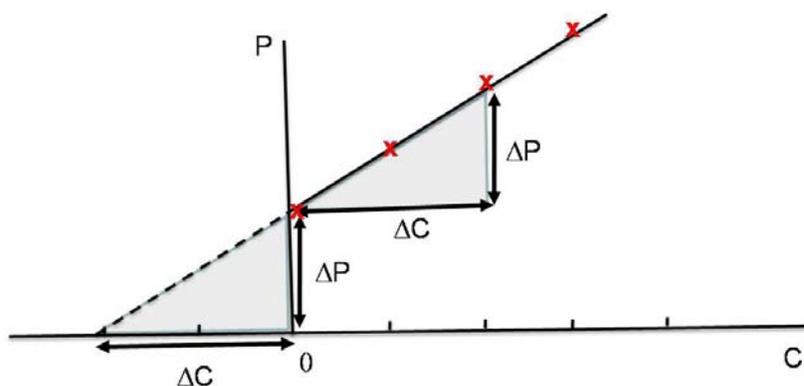


Figura 107. Esquema que resume el método de adición estándar

La recta de regresión calculada se extrapola al punto del eje X donde $Y=0$. La concentración de la muestra se puede deducir por extrapolación, como se demuestra por simple igualdad de triángulos, ya que el ΔC (Figura 107) necesario para producir un incremento de P es el mismo cuando se parte del blanco o de la propia muestra. En consecuencia, la base del triángulo en unidades de C proporciona la concentración de la muestra.

En términos estadísticos, el principal inconveniente es que se trata de un método de extrapolación; por lo tanto, menos preciso que los de interpolación. De hecho, el resultado se obtiene en una zona de la gráfica donde no hay puntos experimentales, por lo que cualquier variación en la pendiente de la recta por errores indeterminados se traduce en una variación apreciable en el resultado. En este sentido, influye el tamaño de la adición, pues hay que procurar que el tramo incierto no sea demasiado grande, y realizar adiciones del mismo orden de magnitud que el esperado en la muestra para el analito a cuantificar. Sin embargo, y tomando en cuenta estas consideraciones, este método puede ser implementarlo como método cuantitativo en la determinación de proteínas en el suero humano (como se verá más adelante), así como también en líneas futuras de la continuación de este trabajo, como lo es la multidetección paralela de varios analitos en una muestra.

En este sentido, se realizó en la plataforma una curva de adición para el AFP adquirido por la empresa Biospacific, el cual ha sido usado para todos los ensayos anteriormente descritos. En esta curva de adición estándar, la cantidad fija viene dada por el AFP endógeno existente en el

suero humano que es común para todas las muestras y a su vez es la cantidad a cuantificar. Se realizó en paralelo la misma curva pero en una matriz de 1% BSA como referencia. Los histogramas de la Figura 108 muestran tanto la detección directa de las distintas concentraciones de AFP como su amplificación empleando el anticuerpo policlonal anti-AFP.

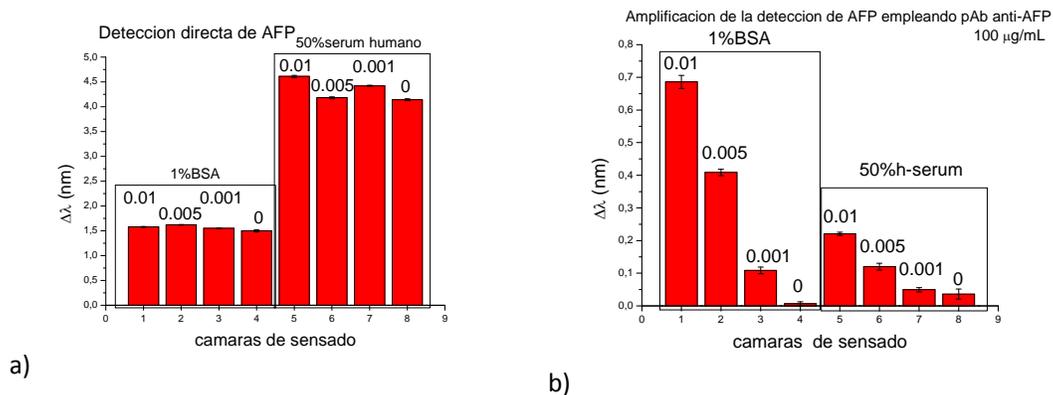


Figura 108. Histogramas que muestran a) la detección directa de distintas concentraciones de AFP en suero humano y en un matriz de 1%BSA, donde la tendencia en ambos casos es difícil de descifrar y b) la amplificación de las señales y mejor resolución empleando un anticuerpo policlonal anti-AFP.

De la amplificación se obtuvieron las gráficas de la Figura 109, donde se muestra la linealidad del rango escogido justo con el ajuste lineal realizado. El rango de concentraciones trabajado en este caso es bastante bajo, donde se piensa que el comportamiento de la curva es lineal. Se observa como para la curva realizada en 1% BSA no se produce el desplazamiento en Y observado para la curva realizada en suero humano (debido a la presencia de AFP endógeno).

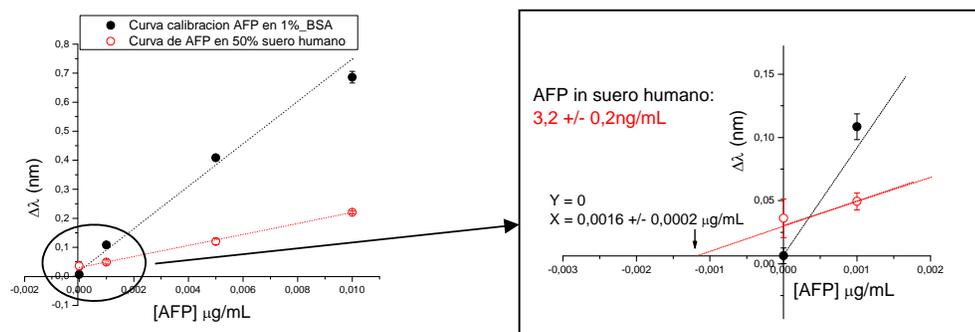


Figura 109. Determinación cuantitativa de la cantidad de AFP endógeno en suero humano empleando el método de adición estándar. Se ha realizado una curva en 1% BSA (curva negra) como referencia. El método ha arrojado un valor de $3.2 \pm 0.2 \text{ ng/mL}$ de AFP en el suero humano de trabajo.

Una vez que se realizó la extrapolación de la curva de AFP contenida en el suero humano, se obtuvo un valor de la concentración de 1.6 ng/mL (cuando $Y=0$) correspondiente al valor de AFP contenido en el suero humano al 50%. Por tanto, la cantidad de AFP existente en el suero humano que hemos empleado para los ensayos teniendo en cuenta el factor de dilución corresponde a 3.2 ± 0.2 ng/mL. Este valor coincide con los datos descritos por múltiples trabajos, donde aseguran que la cantidad endógena de AFP en suero humano en un paciente sano está en rangos inferiores a 10 ng/mL [Ball y col, 1992]. Estos resultados son un avance significativo en el empleo de la plataforma como herramienta en el diagnóstico cuantitativo de marcadores tumorales. Sin embargo, las investigaciones siguen abiertas y ensayos de optimización más exhaustivos (principalmente, un estudio de correlación completo con muestras reales de suero) han de realizarse para verificar la autenticidad y confiabilidad del método.

Con el objetivo de validar estos resultados y aumentar el grado de confianza se realizó el mismo ensayo pero empleando la técnica de ELISA. Al igual que en el procedimiento anterior, se prepararon dos curvas para bajas concentraciones de AFP, en suero humano al 50% y en 1% BSA como referencia. Las curvas obtenidas se muestran en la Figura 110. Se observa igualmente un zoom del área donde se ha realizado la extrapolación.

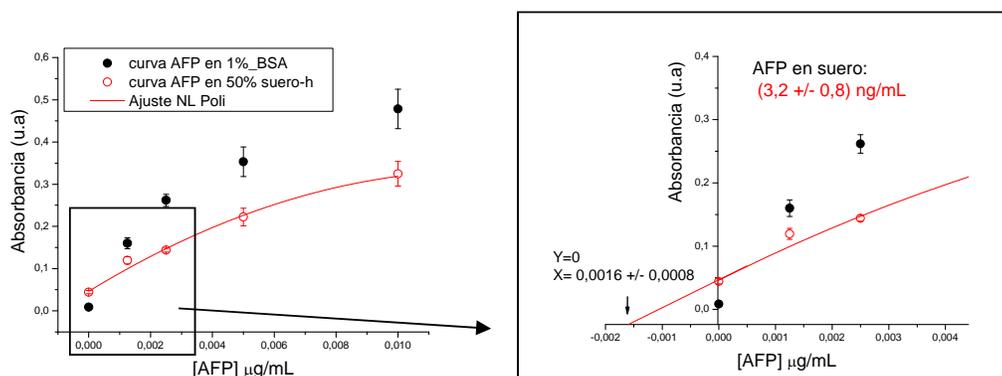


Figura 110. Determinación cuantitativa de la cantidad de AFP endógeno empleando la técnica ELISA. Se ha realizado un ajuste no lineal de tipo polinomial para los puntos, su extrapolación permitió determinar que la concentración de AFP en el suero humano es de 3.2 ng/mL.

Para este caso, a diferencia del anterior, no se obtuvo una respuesta lineal en el rango de concentraciones trabajado. Esto representa un problema para la realización de la extrapolación y la determinación final de la concentración de AFP endógeno.

En este sentido, existen diversos métodos empleados hoy en día para aplicar la adición estándar a respuestas no lineales. Algunos estipulan el uso de funciones que se ajustan al comportamiento no lineal y que predicen la concentración desconocida, sin embargo el procedimiento resulta ser, en muchos casos, bastante complejo [Müller y Oelschläger, 1981]. Para la determinación de la concentración incógnita nos hemos basado en el trabajo de Koscielniak [Koscielniak, 1999]. En este trabajo se muestra como realizar la extrapolación,

siempre y cuando los puntos se ajusten a una regresión parabólica. El trabajo está basado en un complejo estudio estadístico-matemático que garantiza la validez y la confianza en el valor incógnita encontrado. En la Figura 111 se muestra el principio del método donde n_x representa el valor a determinar. Existen diversas alternativas que pueden ser usadas, sin embargo consideramos que esta aproximación es sencilla de usar y se ajusta a nuestra metodología.

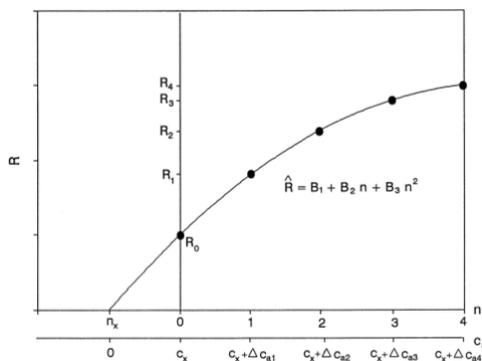


Figura 111. Determinación de la concentración incógnita para el método de adición estándar no lineal según Koscielniak [Koscielniak, 1999].

Aplicando esta aproximación y el ajuste polinomial correspondiente ($Y = Cx^2+Bx+A$) a los puntos obtenidos, hemos encontrado la concentración correspondiente cuando $Y=0$ en las gráficas de detección de la Figura 110. En este caso hemos tomado el valor real de la resolución de la ecuación de segundo orden de la regresión polinomial aplicada, obteniendo así una concentración de 1.6 ng/mL de AFP en 50% suero humano, lo que significa una concentración final de 3.2 ± 0.8 ng/mL. Este valor corresponde con el obtenido empleando el método de adición estándar con la plataforma de sensado LSPR, lo que valida el método y da confianza a la metodología de cuantificación desarrollada en este trabajo doctoral.

3.2.2.4 Detección del marcador tumoral antígeno específico de próstata (PSA) en tampón y suero humano empleando la plataforma de sensado LSPR.

Con el objetivo de aplicar la plataforma en la detección de otro sistema de marcadores tumorales relevantes en el campo de la oncología, se seleccionó el antígeno específico de próstata (PSA) para realizar el mismo estudio de detección tanto en tampón como en suero humano. Recordemos que el PSA es un marcador tumoral bien conocido hoy en día, asociado principalmente al cáncer de próstata y que ha sido protagonista de estudio en múltiples investigaciones, siendo hoy en día uno de los marcadores tumorales más monitorizados en sangre para la evaluación, diagnóstico, seguimiento y evolución del cáncer de próstata. Por esta y muchas otras razones hemos decidido aplicar la plataforma en el estudio de su detección a bajas concentraciones.

Antes de iniciar los experimentos de detección, se evaluó mediante ELISA dos candidatos receptores que poseen gran afinidad para la detección de PSA. En primer lugar, el anticuerpo monoclonal anti-PSA libre que posee una constante de afinidad de 2×10^{10} l/mol para el PSA proveniente de fluidos seminales. Por otro lado, un anticuerpo monoclonal-anti PSA complejo que es mostrado por Biospacific como un receptor con gran afinidad a la proteína PSA que ellos mismos suministran.

Recordemos que el PSA está presente en la sangre en dos formas principales. La mayoría circula en la sangre rodeada y unida a proteínas plasmáticas (al que hemos denominado PSA complejo) y una pequeña cantidad circula libre de uniones proteicas, llamado PSA libre. Por esta razón hemos decidido estudiar la capacidad de reconocimiento de estos anticuerpos para emplear aquel que represente un mejor receptor en la detección de la proteína con nuestra plataforma.

En este sentido, se realizó un ELISA con ambos anticuerpos monoclonales, directamente en la matriz de suero humano al 50 %. La Figura 112 muestra los resultados obtenidos así como también los esquemas de los ensayos y controles realizados.

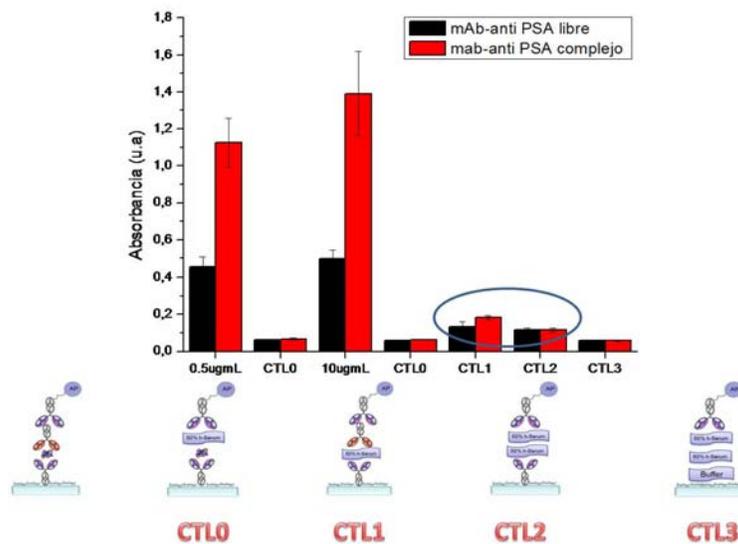


Figura 112. Estudio del mejor receptor anticuerpo monoclonal empleando ELISA (anti-PSA libre vs anti-PSA complejo). Se observan un esquema de los ensayos realizados con sus controles respectivos. El estudio fue realizado en la matriz de suero humano al 50 %.

Para las dos concentraciones de PSA usadas en el inmunoensayo (0.5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente) podemos observar que la mayor respuesta está asociada al anticuerpo monoclonal anti-PSA complejo, lo que en principio hace pensar que presenta la mayor afinidad a la proteína. Del experimento también se observa que los controles donde no está presente la

proteína, presentan cierta señal, lo que hace pensar que existe cierta interferencia por parte del PSA endógeno existente en el suero. Esta hipótesis será posteriormente corroborada en estudios más detallados. Basados en estos resultados, se seleccionó al anticuerpo monoclonal anti-PSA complejo como receptor específico en el reconocimiento de PSA.

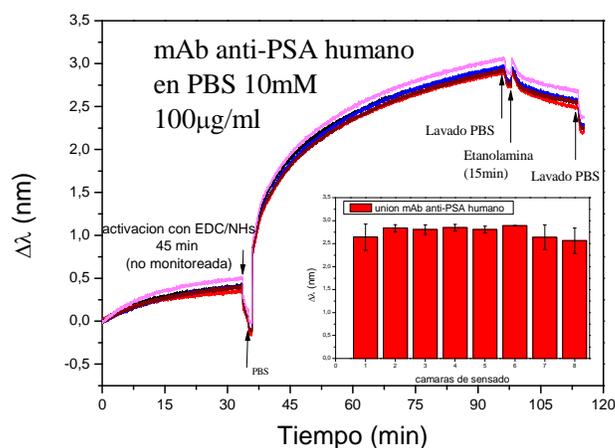


Figura 113. Inmovilización del receptor anticuerpo monoclonal anti-PSA humano complejo. Los histogramas que muestran el desplazamiento del pico asociado a la inmovilización. Se observa la gran reproducibilidad del proceso.

Posterior a la activación de los grupos $-\text{COOH}$ empleando la reacción EDC/NHS, el anticuerpo monoclonal fue anclado. La inmovilización fue monitorizada y los sensogramas característicos a este anclaje mostrados en la Figura 113. Se puede observar la alta reproducibilidad del proceso.

El proceso de inmovilización fue repetido en varias ocasiones en distintos chips y los desplazamientos fueron analizados con el objetivo de evaluar la robustez de la funcionalización. En la Figura 114 se muestra un estudio estadístico de este proceso. Podemos observar que el anclaje del receptor arroja un promedio de $2.69 \pm 0.26\text{nm}$.

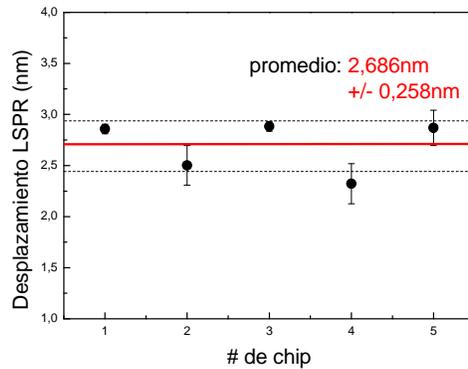


Figura 114. Estudio estadístico de la inmovilización del anticuerpo monoclonal anti-PSA humano complejo. Se muestra la robustez del proceso en diferentes chip mostrando un desplazamiento promedio de 2.7 nm.

Una vez el receptor es anclado, se realizó la detección de PSA en tampón PBS. Se empleó un rango de concentraciones de 50-0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un control sin PSA. La señal fue sustraída a las demás señales. La detección directa no pudo ser realizada y se necesitó una amplificación empleando 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo policlonal anti-PSA. Los sensogramas finales luego de la amplificación se muestran en la Figura 115a.

La curva de detección amplificada se realizó y el LC fué calculado. El límite de cuantificación promedio mostrado fue de 170 ng/mL (Figura 115b). A solo 15 minutos de transcurrido el ensayo se observa un valor de LC bastante bueno, brindando a la plataforma una gran ventaja con respecto a otros métodos de detección que necesitan grandes tiempos para desarrollar los inmunoensayos. Se espera que una matriz como la de suero humano permita que más cantidad pueda ser unida al sensor y el límite de detección disminuya.

Por esta razón y por aplicabilidad, al igual que en el sistema AFP, se realizaron los mismos experimentos pero esta vez en una matriz de suero humano al 50%. La detección directa no permitió la detección de PSA pero sí con la etapa de amplificación realizada. Se empleó el mismo rango de concentraciones empleado para la realización de la curva en tampón. En la Figura 116a, se muestran los sensogramas de esta amplificación, luego de ser restado el respectivo control de suero humano sin PSA.

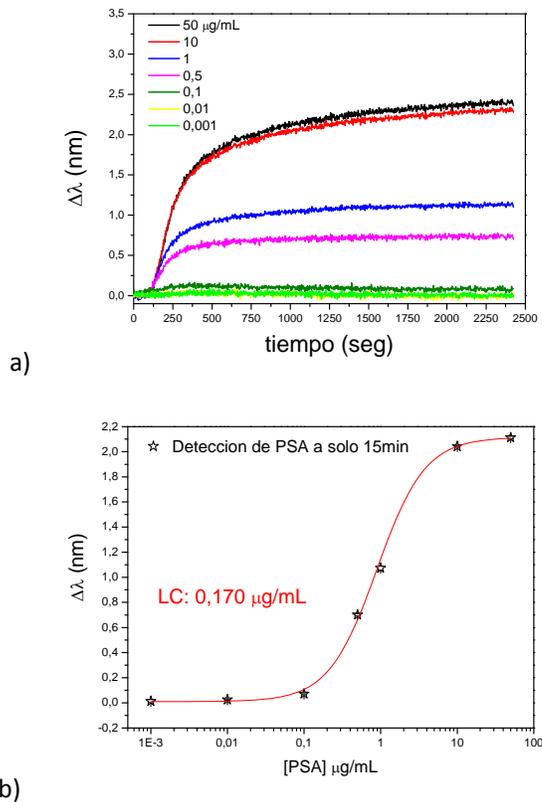
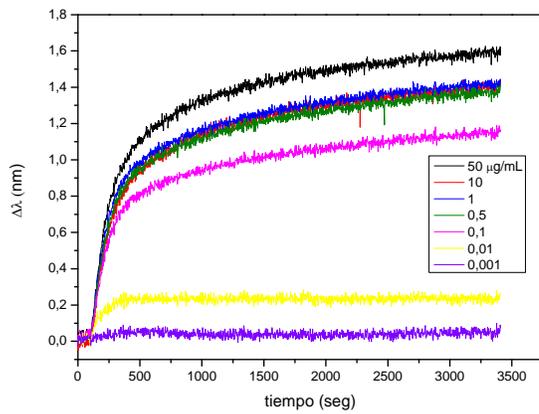
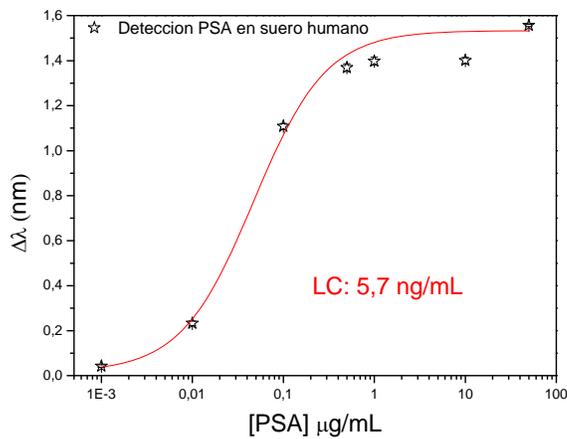


Figura 115. a) Sensogramas que muestran la detección amplificada de un rango de concentraciones de PSA de 50-0.001 $\mu\text{g/mL}$ en tampón PBS b) curva de detección de distintas concentraciones de PSA evaluada a diferentes tiempos. Se calculó el límite de cuantificación del sistema obteniendo un valor de 170 ng/mL aproximadamente para solo 15 min de reacción.

Las curvas de detección construidas a partir de los sensogramas y mostradas en la Figura 116b muestran una disminución significativa del LC para este sistema alcanzado con la plataforma LSPR. Se consiguió un promedio de 6 ng/mL cuando la matriz empleada es de suero humano. Estos resultados confirman el efecto pasivante del suero, que permite que mayor cantidad de analito pueda ser unida a la superficie del sensor de forma específica y así una menor concentración puede ser detectada. Según los estudios realizados, la concentración normal de PSA en un paciente humano es inferior a 4 ng/mL. Concentraciones en un rango mayor a 10 ng/mL empiezan a ser sospechosas de que alguna patología carcinógena puede estar sucediendo dentro del organismo [Kuriyama y col, 1980]. Basándonos en estos valores nuestra plataforma y los resultados preliminares hasta ahora obtenidos, resultan ser lo suficientemente sensibles para poder detectar alteraciones de los niveles normales de esta proteína en suero humano con un alto grado de especificidad y selectividad.



a)



b)

Figura 116. Detección amplificada de diversas concentraciones de PSA en suero humano al 50 %. a) Sensogramas que muestran la detección amplificada de concentraciones de PSA en un rango de 50-0.001 $\mu\text{g/mL}$, b) Curva de detección de PSA obtenida, cuyo LC fue de 5.7 ng/mL .

3.2.2.4.1 Estudio de la interacción anticuerpo-analito empleados en la detección de PSA y validación de los resultados obtenidos en los ensayos de detección, empleando el método ELISA.

Al igual que para el sistema de AFP, se empleó ELISA como método de evaluación del potencial de reconocimiento por parte de las especies empleadas y de estudio de la especificidad por parte de los receptores hacia la proteína. En este sentido, se evaluaron posibles interferencias por parte del PSA endógeno que pudiese tener el suero humano, fenómeno que hemos podido encontrar en los resultados de detección obtenidos con la plataforma optofluídica. En la Figura 117 se muestran los resultados obtenidos, así como también un esquema que muestra los inmunoensayos realizados junto con los controles respectivos. Se realizaron ensayos

específicos con la misma estructura que los realizados en la plataforma LSPR, alternando la matriz del analito PSA (tampón y suero humano al 50 %) junto con la del anticuerpo policlonal empleado para la amplificación, para evaluar así el origen de las posibles interferencias encontradas. Se realizaron controles de la matriz sin analito y sin anticuerpo policlonal, respectivamente.

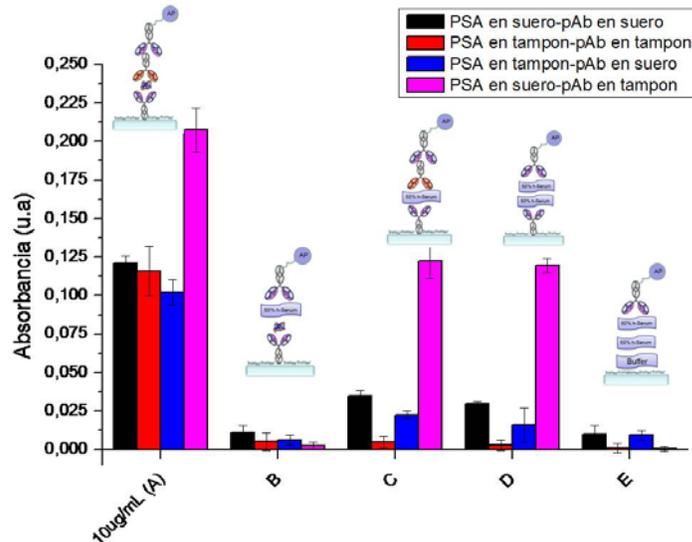


Figura 117. Histogramas que muestran el efecto de la interferencia producida por el PSA endógeno en el suero humano. Los ensayos fueron realizados empleando ELISA y los controles C y D muestran la contribución significativa y la presencia de PSA endógeno en el suero de trabajo.

En primer lugar, hay que destacar el efecto predominante de las señales no específicas mostradas por los controles C y D que muestran la interacción de la matriz cuando el analito no está presente. Este efecto es alto cuando la matriz es suero humano como se observa en el histograma de color morado en la Figura 117. El efecto es bastante alto si se compara con la señal específica producida por la detección de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSA (Histograma A). Así mismo, la detección específica en suero humano produce señales que duplican las correspondientes a la detección en tampón, probablemente por el PSA endógeno existente en dicha matriz.

Estos ensayos terminan por confirmar que existe una contribución significativa a la señal de detección de la proteína por parte del PSA endógeno que se encuentra en el suero de trabajo. Sin embargo, este efecto se puede eliminar al sustraer el respectivo control sin proteína realizado en todos los inmunoensayos realizados con la plataforma. No obstante, se podría realizar la cuantificación empleando una matriz exenta de este PSA endógeno. Los resultados muestran por otro lado, que los reactivos muestran una alta especificidad en la detección y posterior amplificación de PSA y que es un sistema altamente viable para ser empleado en la prueba de concepto de nuestro dispositivo.

Con la finalidad de validar los límites de detección obtenidos en los ensayos de detección empleando la plataforma LSPR se realizó la curva de detección empleando ELISA. Los resultados son mostrados en la Figura 118.

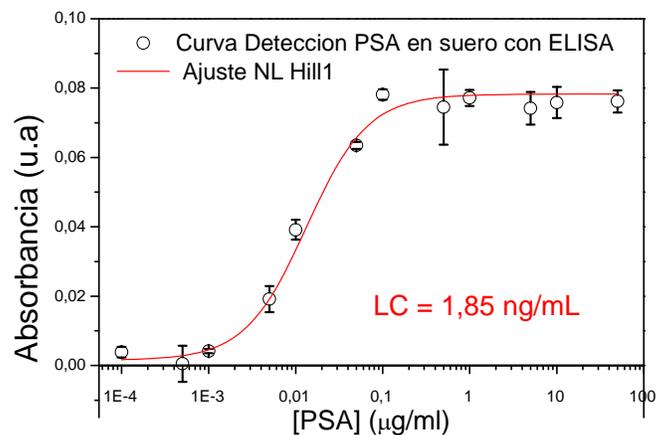


Figura 118. Curva de detección de PSA en suero humano 50 % realizada con ELISA como validación de los resultados obtenidos con la plataforma LSPR.

La curva realizada con ELISA muestra un mejor límite de detección para este sistema de 2 ng/mL , resultando ser a priori más sensible que la plataforma, la cual arrojó un valor promedio de 6 ng/ml como concentración mínima fiable que puede llegar a detectar. Sin embargo, la ventaja que posee nuestra plataforma frente a otros métodos de detección, con los resultados obtenidos para este sistema en particular, está determinado por el tiempo en que es posible detectar estas cantidades mínimas. La plataforma es capaz de resolver bajas concentraciones de PSA en tan sólo 5 minutos, en comparación con horas (e incluso días) que puede llegar a tomar los ensayos tipo ELISA. En líneas generales, la plataforma ha logrado ser altamente fiable en la detección de este sistema de marcador tumoral, sin embargo, los estudios siguen abiertos para realizar pruebas de otro tipo de metodologías y protocolos que pudiesen disminuir, aún más, el límite de detección de este sistema en particular.

3.2.2.4.2 Determinación cuantitativa de la cantidad de PSA endógeno en el suero humano empleado, utilizando el método de adición estándar.

Como pudimos verificar en diversos ensayos de detección con la plataforma LSPR y posteriormente con ELISA, el suero humano que hemos venido empleando en dichos ensayos presenta una cantidad de PSA endógena que ha contribuido notablemente en la detección de las muestras de PSA preparadas. Por esta razón, se empleó el método de adición estándar

anteriormente testado con la proteína AFP para la cuantificación de la cantidad de PSA existente en esta matriz.

Los procedimientos empleados fueron los mismos del sistema AFP y se basaron en los mismos principios para la elaboración de las curvas tanto de adición como de referencia. En la Figura 119 podemos observar las curvas de detección obtenidas para PSA en suero humano y en PBS 1% BSA. Se observa nuevamente una tendencia no lineal, por lo que se aplicó la metodología propuesta en los casos anteriores de AFP donde una tendencia no lineal es observada. En este sentido, se realizó una regresión polinómica no lineal ($Y=Cx^2+Bx+A$) y de la extrapolación de dicha regresión ($Y=0$), resolviendo la ecuación de segundo orden se obtuvo el valor correspondiente al punto de corte en concentración que representa la cantidad de PSA común en cada muestra preparada.

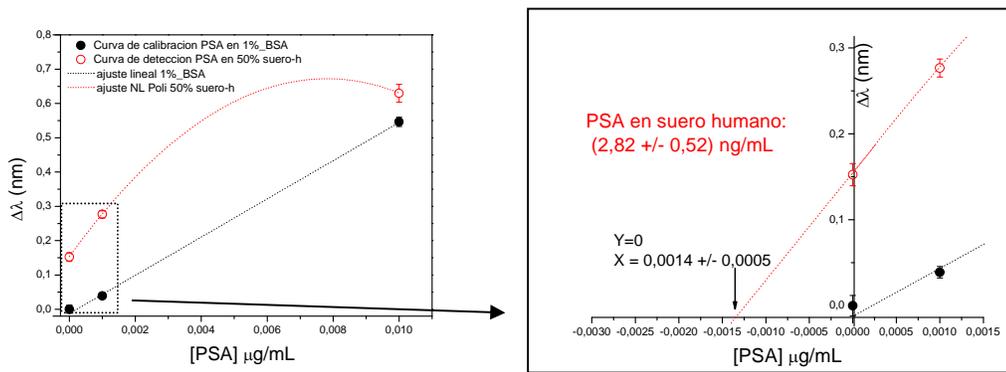


Figura 119. Cuantificación de la cantidad endógena de PSA en el suero humano de trabajo empleando el método de adición estándar y la plataforma de sensado LSPR. Se empleó como referencia una curva de PSA en 1%BSA. Se realizó un ajuste no lineal parabólico y la extrapolación de la curva cuando $Y=0$ arrojó un valor de 3 ng/mL de PSA en el suero.

Los resultados muestran que la cantidad de PSA endógeno es de aproximadamente 3 ng/mL en el suero humano utilizado en todos los inmunoensayos realizados. Según la empresa distribuidora (Sigma Aldrich Co, Alemania) este suero humano proviene de hombres sanos que, en principio, deben presentar valores de proteínas dentro de los rangos normales. Como ya se mencionó anteriormente, en el caso de PSA según los estudios realizados, los valores normales están por debajo de 4 ng/mL, que está de acuerdo con los resultados obtenidos.

Recordemos que estos métodos basados en extrapolación siempre van asociados a errores intrínsecos del método, por lo que estos valores no son completamente confiables, sugerimos realizar un estudio estadístico y analítico más detallado con este sistema donde se realicen múltiples ensayos para diferentes rangos de concentraciones evaluando la precisión de las extrapolaciones realizadas. Sin embargo, con el objetivo de validar estos resultados hemos realizado los mismos experimentos empleando esta vez ELISA. Las gráficas de detección en suero humano 50 % y en PBS 1 % BSA se muestran en la Figura 120.

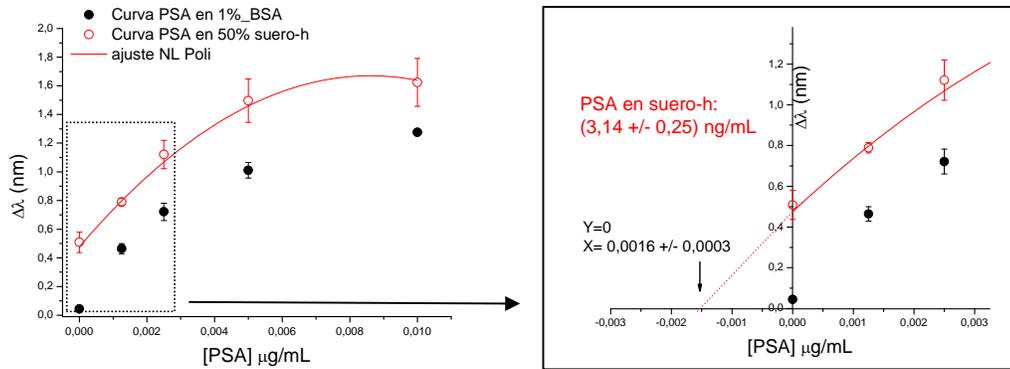


Figura 120. Cuantificación de la cantidad de PSA endógeno empleando el método de adición estándar y la técnica ELISA como método de validación que contrastan los resultados obtenidos con la plataforma LSPR. Un ajuste no lineal de la curva de detección y la extrapolación de la misma cuando $Y=0$ arrojó un valor de aproximadamente 3 ng/mL de PSA en el suero, valor que concuerda con los obtenidos con la plataforma LSPR desarrollada.

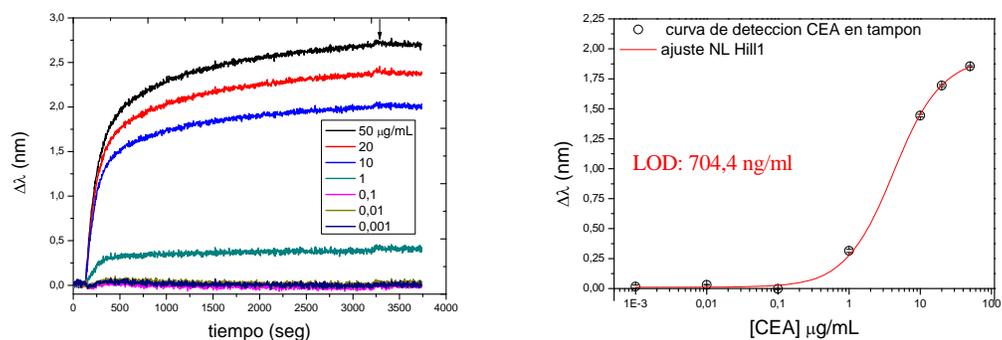
En estos resultados, al igual que en la curva obtenida con la plataforma, se observa un comportamiento no lineal de la curva, que se trató con un ajuste no lineal polinómico. De dicha extrapolación, se obtuvo que empleando la técnica ELISA la cuantificación de la cantidad de PSA endógeno indica un valor de 3.14 ± 0.25 ng/mL, valor que concuerda con el obtenido empleando el método de adición estándar con nuestra plataforma de sensado LSPR. Estos resultados constituyen la validación de que dicha plataforma representa un método fiable tanto para el diagnóstico cualitativo como cuantitativo de sistemas de marcadores relevantes en oncología, aunque las investigaciones en este sentido continúan abiertas para realizar un estudio más completo en este sentido.

3.2.2.5 Ensayos preliminares en la detección de otros sistemas de marcadores tumorales relevantes empleando la plataforma de sensado LSPR.

3.2.2.5.1 Detección de antígeno carcinoembrionario (CEA) en tampón.

Con el objetivo de testar otros sistemas relevantes se decidió usar el sistema de CEA en nuestra plataforma de LSPR y evaluar la capacidad de detección de esta proteína. Inicialmente, se realizó la detección en tampón PBS, empleando como receptor 100 $\mu\text{g/mL}$ del respectivo anticuerpo monoclonal anti-CEA. El protocolo empleado y la metodología corresponden a la empleada anteriormente por los otros sistemas estudiados. No se logró la detección directa de la proteína, por lo que se emplearon 50 $\mu\text{g/mL}$ del anticuerpo policlonal para la amplificación.

La Figura 121a muestra los sensogramas obtenidos para la detección amplificada de un rango de concentraciones entre 50-0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón, luego de haber sustraído el control correspondiente (cero).



a) b)
 Figura 121. Detección de CEA en tampón empleando la plataforma de sensado LSPR. a) Sensogramas que muestran la amplificación de la detección de CEA empleando un anticuerpo policlonal anti-CEA humano. b) Curva de detección para CEA en tampón y su correspondiente ajuste no lineal que permitió la obtención del LC del sistema.

La curva de detección obtenida para este sistema (Figura 121b), muestra un límite de detección de 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para este sistema. Es un LC alto en comparación con los sistemas anteriormente estudiados. Sin embargo, el estudio sigue abierto para la optimización de parámetros que podrían disminuirlo. La detección de la proteína en la matriz de suero humano fué realizada, pero los resultados encontrados no fueron reproducibles y concluyentes. Sin embargo, se cree que este sistema representa un sistema potencialmente importante para continuar con su estudio en la plataforma de sensado LSPR desarrollada.

3.2.2.5.2 Detección en tampón de la proteína S100A4 empleando como receptor el anticuerpo monoclonal 5C3 empleando la plataforma de sensado LSPR.

En colaboración con grupos de investigación de institutos de biología molecular y oncología en Barcelona, hemos iniciado proyectos confidenciales que contemplan el estudio de la interacción de anticuerpos con determinadas proteínas aisladas y de interés importante para el avance en el diagnóstico y terapias contra diversas patologías asociadas al cáncer [Hernández y col, 2013].

En este sentido, se suministró un sistema de anticuerpo-antígeno para el estudio del reconocimiento e interacción de las especies para ser testado en la plataforma desarrollada. Específicamente, se trata de un anticuerpo monoclonal 5C3 que es afín a la proteína S100A4 (11.7 kDa). Las aplicaciones y más información al respecto no pueden ser relevadas por la

confidencialidad del proyecto. El objetivo fue realizar un estudio preliminar sobre el reconocimiento del anticuerpo hacia la proteína y de las señales que la plataforma pueda ofrecer para ensayos de detección en dicho sistema. Una vez se tenga esta información, el estudio será ampliado para las diversas aplicaciones que tendrán las investigaciones asociadas.

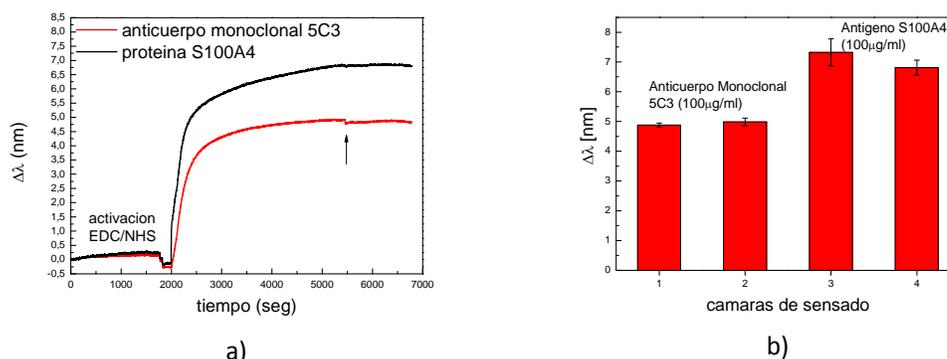
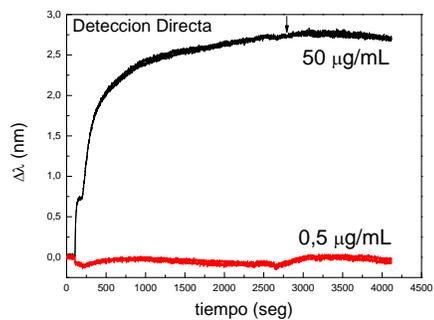
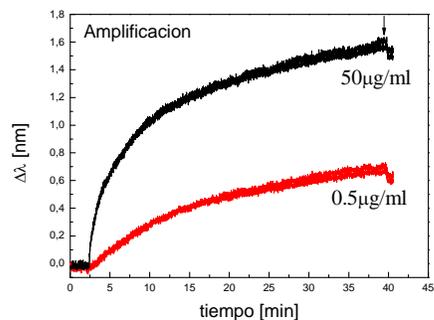


Figura 122. a) Sensogramas que muestran el anclaje del anticuerpo monoclonal 5C3 y de la proteína S100A4 en un chip de 4 canales. b) Histogramas que muestran el desplazamiento del pico LSPR para este proceso.

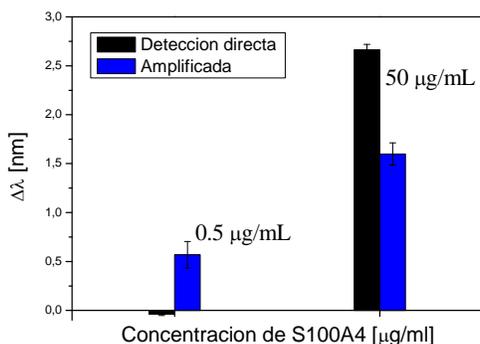
Por ello, la detección para este sistema fue realizada en un chip de cuatro canales paralelos, en los cuales dos canales fueron empleados para el anclaje del receptor y 2 canales para el anclaje directo de la proteína S100A4. Fue empleado al igual que en los casos anteriores el protocolo basado en la activación de los grupos carboxilos del MUA depositado sobre nanocilindros de oro, empleando la reacción EDC/NHS. Se emplearon 100 µg/mL en el anclaje del anticuerpo, así como también de la proteína, ambos en tampón PBS. Los sensogramas y los histogramas correspondientes se muestran en la Figura 122a y 122b, respectivamente. De estos resultados podemos decir que la inmovilización de ambas especies fue llevada a cabo exitosamente. Por otro lado, de acuerdo al desplazamiento mostrado se piensa que la proteína presenta una estructura conformada por varias subunidades (específicamente tetramérica), lo que podría explicar por tanto, el desplazamiento mayor del pico LSPR observado. Para verificar la inmunoreactividad de los productos, se utilizaron dos concentraciones del antígeno 0.5 y 50 µg/mL respectivamente. La respuesta de la detección directa pasados 45 minutos de reacción se muestra en la Figura 123a. Así mismo, con el objetivo de comprobar la posible estructura tetramérica de la proteína, se inyectaron 20 µg/mL del mismo anticuerpo monoclonal 5C3. Los sensogramas de esta posible amplificación se muestran en la Figura 123b. Finalmente, la información tanto de la detección directa de la proteína como de la amplificación de la concentración más baja es recogida por el histograma de la Figura 123c.



a)



b)



c)

Figura 126. Detección de la proteína S100A4 empleando como receptor el anticuerpo monoclonal 5C3.

a) Sensogramas que muestran la detección directa de 0.5 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína por parte del anticuerpo monoclonal, b) Sensogramas que muestran el ensayo tipo sándwich realizado con el mismo anticuerpo monoclonal para estudiar posible amplificación de la señal, y c) Histogramas que muestran la buena detección por parte del anticuerpo y la amplificación de la concentración baja de la proteína.

Este estudio nos muestra en primer lugar, que el sistema es aparentemente viable para ser empleado bajo el protocolo y los esquemas de funcionalización sugeridos, así mismo, que la plataforma representa una herramienta de gran ayuda para las investigaciones que el proyecto contempla. Nos encontramos con una proteína que presenta una estructura tetramérica que en principio debido a esta conformación posee múltiples sitios de reconocimiento y que puede ser un buen sistema a estudiar en profundidad empleando esta plataforma. La investigación en este sentido sigue abierta.

Conclusiones

El estudio presentado en esta tesis doctoral se inscribe dentro del marco del proyecto multidisciplinario SPEDOC cuyo objetivo fundamental consistió en el desarrollo de una plataforma de sensado para la detección específica de ciertas proteínas con gran potencial para lograr ser un marcador tumoral universal. En esta investigación, gracias a la contribución de diversas especialidades de investigación, se logró desarrollar una plataforma que combina los últimos avances en plasmónica, microfluídica, nano-fabricación y química de superficie. Esta plataforma fue finalmente validada al biosensado altamente sensible y específico en la detección de concentraciones de analitos de unos pocos ng/mL, con la mayor precisión y exactitud posibles. Esta tesis doctoral se centró sobre la implementación de diversas metodologías de inmovilización de anticuerpos en superficies sensoras de LSPR (uno de los elementos principales de esta plataforma optofluídica) que permitió desarrollar un dispositivo final con aplicaciones a la oncología.

El dispositivo en el que se basa este trabajo doctoral, está conformado por sensores LSPR nanoestructurados altamente sensibles, integrados en microcanales de un chip microfluídico. Este Lab-on-a-Chip (LOC), está interrogado por una plataforma óptica que permite el monitoreo de las señales provenientes de los procesos de bioreconocimiento que se dan lugar sobre la superficie de los sensores LSPR. Los sensores están funcionalizados con una química altamente selectiva que permite la inmovilización de los receptores que detectarán específica y selectivamente a los analitos de interés. De esta manera al inyectar una gota de suero en el chip, esta circulará a través de los microcanales, y si los marcadores de cáncer están presentes en la misma, serán reconocidos por las nanoestructuras funcionalizadas, provocando cambios en el plasmón de dichas estructuras. Este cambio estará relacionado directamente con la concentración/número de estos marcadores en la sangre del paciente, proporcionando así una evaluación directa del riesgo para el paciente de desarrollar un cáncer.

Así mismo, en este trabajo se presentaron todos los detalles que involucran a la plataforma optofluídica, sin embargo, la contribución más significativa radica en la implementación de la misma para el estudio de diversas metodologías para la funcionalización del sensor, con el objetivo de aumentar la sensibilidad en la detección de analitos de interés.

Hemos empleado dos protocolos de funcionalización, basados en químicas de interacción diferentes para el anclaje del receptor. El primer protocolo estudiado se basó en la interacción STV-biotina. Para ellos se depositó una base de STV sobre una monocapa de SH-(CH₂)₁₁-(PEG)₃-Biotina depositada previamente sobre los sensores de oro. Finalmente el receptor fue inmovilizado sobre la STV, luego de realizársele una previa conjugación con biotina. Diversos ensayos fueron realizados y los límites de cuantificación obtenidos para los sistemas estudiados. Este protocolo fue aplicado a la detección en suero de un marcador tumoral conocido como lo es el HSP70, sin embargo a pesar de obtener resultados prometedores, se

piensa que la metodología aplicada no fue la apropiada para la detección de bajas concentraciones en este tipo de proteínas.

En este sentido, realizamos un estudio basándonos en un segundo protocolo de funcionalización, esta vez basándonos en la inmovilización del receptor vía covalente mediante una reacción de activación conocida como lo es la EDC/NHS. Para este protocolo hemos depositado inicialmente una monocapa de ácido mercaptoundecanoico (MUA) sobre los sensores de oro y posteriormente la reacción de activación de los grupos $-\text{COOH}$ del MUA fue realizada con el fin de reaccionar covalentemente con los grupos aminos que el receptor (anticuerpo) posee disponibles en su estructura, que finalmente permitieron el anclaje en su forma natural y sin procesos previos de conjugación. Para ambos protocolos se realizaron inicialmente optimizaciones y diversos ensayos, empleando un sistema de anticuerpos cuya interacción es conocida como lo es el sistema de anticuerpos IgG/anti-IgG. Finalmente basados en esos resultados y en las ventajas que ofrece (pseudo orientación al pH de trabajo, no requiere tratamientos previos del receptor, menor cantidad de procesos en la reacción, entre otros) se eligió la química de activación EDC/NHS como la más óptima para aplicarla en los estudios iniciales en la detección en suero de marcadores tumorales de gran relevancia relacionados con diversos tipos de cáncer, como lo fueron específicamente el antígeno específico de Próstata (PSA), la alfafeto proteína (AFP) y otros sistemas de interés.

Los resultados alcanzados son prometedores, llegando a poder detectar y cuantificar estos analitos de manera muy precisa en muy bajas concentraciones (del orden de pocos ng/mL) en matrices complejas como el suero humano. La plataforma arrojó límites de cuantificación de 1 y 6 ng/mL en suero humano para los sistemas de AFP y PSA respectivamente, lo que representa la mínima concentración que puede medir de manera confiable y precisa, en un tiempo aproximado de tan solo 5 minutos, siendo capaz de resolver también señales provenientes de concentraciones más bajas a las anteriormente citadas. Las concentraciones que se pudieron detectar y los límites de cuantificación obtenidos con la plataforma están por debajo de los valores normales en sangre reportados para los sistemas estudiados, lo que representa un futuro prometedor en el diagnóstico precoz de los mismos. Así mismo estos resultados fueron validados y contrastados empleando técnicas como ELISA (así como diversos ensayos de reconocimiento relacionados), que representa una técnica universal ampliamente utilizada en este tipo de estudios, obteniendo valores cercanos a los obtenidos con el dispositivo presentado, lo que le otorga un grado más de confiabilidad al método.

La investigación realizada, del cual esta tesis doctoral forma parte, finalmente constituye un importante y gran avance en el desarrollo de nuevas herramientas de última generación ultrasensibles que permitan la detección temprana de muy bajas concentraciones de marcadores tumorales que van asociados al cáncer, que podría contribuir al clivaje temprano de la enfermedad, así como en el seguimiento del tratamiento. A pesar de los excelentes resultados alcanzados, muchos de los estudios aquí presentados son preliminares y siguen abiertos, requiriendo ser ampliados y optimizados, por lo que una investigación futura ha de realizarse en este sentido, para poder así finalmente aplicar todo la tecnología aquí desarrollada en casos clínicos reales.

Para ello se recomienda optimizar más a fondo y exhaustivamente diversos parámetros y etapas involucradas en el protocolo de funcionalización, como por ejemplo:

- Se deberá optimizar y estudiar a fondo el efecto de la concentración del anticuerpo receptor sobre la base del sensor
- Un estudio más detallado sobre la pseudo-orientación de los anticuerpos receptores, variando por ejemplo condiciones de pH, que favorecerían (Según el pKa de los amino terminales y ϵ -aminos de la lisina) la unión controlada y selectiva de los grupos amino disponibles en el anticuerpo para la reacción. También se podría incorporar en el protocolo elementos que favorecen la orientación como es el caso de la proteína A/G.
- Se deberá estudiar a fondo mecanismos pasivantes que disminuyan interacciones no específicas que pueden aparecer cuando se trabaja con matrices reales como el suero, de manera que permitan realizar los ensayos sin diluciones de dicha matriz.
- La realización de diversos controles que confirmen aún más la especificidad de los ensayos realizados.
- Un estudio más exhaustivo sobre la formación y estabilidad de la capa de MUA y de los anticuerpos receptores ha de realizarse, de manera tal que los sensores sean funcionalizados previamente y se mantengan listos para realizar los ensayos de detección deseados.
- La implementación final de la plataforma en estudios de detección de muestras reales de origen clínico.

En cuanto a futuras mejoras de la plataforma, se está estudiando en el grupo PNO un nuevo diseño que podría realizar ensayos paralelos de múltiples analitos para una misma muestra, lo que representaría una mejora significativa en los tiempos de los análisis y simplicidad de los procesos, así como también la posibilidad de automatización de dispositivo Lab-on-a-Chip en general.

BIBLIOGRAFIA

- Abe M, Manola J. B, Oh W. K, Parslow D. L, George D. J, Austin C. L, Kantoff P. W. (2004). Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer. *Clinical Prostate Cancer*. 3, 1, 49-53.
- Acevedo B, Perera Y, Ruiz M. (2002). Development and validation of a quantitative ELISA for the measurement of PSA concentration. *Clinica Chimica Acta*. 317: 55-63
- Acimovic S. S. (2013). Localized Surface Plasmon Resonance for Biosensing Lab-on-a-Chip Applications. UPC-ICFO. PhD Thesis.
- Acimovic S. S, Kreuzer M. P, Gonzalez M. U, Quidant R. (2009). Plasmon Near-Field Coupling in metal dimers as a step toward single-molecule sensing. *ACS Nano*, 3 (5) 1231-1237.
- Aizpurua J, Hanarp P, Sutherland D. S, Kall M, Bryant G W, García de Abajo F. J. (2003). Optical properties of Gold nanorings. *Physical Review Letters*. 90 (5), 057401.
- Ajdari, Bontoux N, Stone H. (2006). Hydrodynamic Dispersion in Shallow Microchannels: the Effect of Cross-Sectional Shape. *Annals of the New York Academy of Science*. 2, 387- 392.
- Anderson R. R, Chiu D. T, Jackman R. J, Cherniavskaya O, Mcdonald J. C, Wu H. K, Whitesides S. H, Whitesides G. M. (2000). Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping. *Analytical Chemistry*. 72, 3158-3164.
- Andersson H, Berg A. (2004). Microfluidics Devices for Cellomics. *Lab-on-a-chips for Cellomics*. 1-22.
- Arlett J. L, Myers E. B, Roukes M. L. (2011). Comparative Advantages of Mechanical Biosensors. *Nature Nanotechnology*. 6, 203-215.
- Asharani P. V, Sethu S, Vadukumpully S, Zhong S, Lim C. T, Hande M. P, Valiyaveetil S. (2010). Investigations on the Structural Damage in Human Erythrocytes Exposed to Silver, Gold, and Platinum Nanoparticles. *Advanced Functional Materials*. 20, 8, 1233–1242.
- Asharani P. V, Low Kah Mun G, Hande M. P, Valiyaveetil S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 3(2), 279-90.
- Auerswald J, Knapp H. (2003). Quantitative assesment of dielectrophoresis as a micro fluidic retention and separation technique for beads and human blood erythrocytes. *Microelectronic Engineering*. 67-68, 879-886.
- Auerswald J, Widmer D, de Rooij NSigrist A, Staubli T, Stökli T, Knapp H. (2005). Fast immobilization of probe beads by dielectrophoresis-controlled adhesion in a versatile microfluidic platform for affinity assay. *Electrophoresis*. 26, 3697-3705.

- Avrameas S, Uriel J. (1966). Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 262, 2543-2545.
- Avrameas S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry.* 6, 43-52.
- Bader D, Riskin A, Vafsi O, Tamir A, Peskin B, Israel N, Merksamer R, Dar H, David M. (2004). Alpha-fetoprotein in the early neonatal period--a large study and review of the literature. *Clin. Chim. Acta.* 349 (1-2), 15-23
- Ball D, Rose E, Alpert E. (1992). Alpha-fetoprotein levels in normal adults. *Am. J. Med. Sci.* 303 (3), 157-159
- Baralia G. G, Duwez A. S, Bernand N, Jonas A. M. (2005). Kinetics of Exchange of Alkanethiol Monolayers Self-Assembled on Polycrystalline Gold. *Langmuir.* 21, 6825-6829.
- Barbillon G, Bijeon J L, Plain J, Lamy de la Chapelle M, Adam P M, Royer P. (2007). Electron beam lithography designed chemical nanosensor based on localized surface plasmon resonance". *Surf Sci.* 601, 5057-5061.
- Behm J, Lykke K, Pellin M, Hemminger J. (1996). Projection Photolithography Utilizing a Schwarzschild Microscope and Self-Assembled Alkanethiol Monolayers as Simple Photoresists. *Langmuir,* 12, 2121.
- Berggren K, Bard A, Wilbur J, Gillapsy J, Helg A, McClelland J, Rolston S, Phillips W, Prentiss M. (1995). Microlithography by using neutral metastable atoms and self-assembled monolayers. *Science,* 269, 1255.
- Bharadwaj P, Bouhelier A, Novotny L. (2011). Excitation of propagating surface Plasmon with a scanning tunnelling microscope. *Phys. Rev. Lett.* 106, 226802.
- Bigbee W, Herberman R. B. (2003). Tumor markers and immunodiagnosis. *Cancer Medicine.* 6th ed. Hamilton, Ontario: BC Decker, pp.209-220.
- Billaud, P, Huntzinger J. R, E. Cottancin, Lerme J, Pellarin M, Arnaud L, Broyer M, Del Fatti N, Vallee F. (2007). Optical extinction spectroscopy of single silver nanoparticles. *European Physical Journal D.* 43(1-3), 271-274
- Bingham J. M, Willets K. A, Shah N. C, Andrews D. Q, Van Duyne R. P. (2009). Localized surface Plasmon resonance imaging: simultaneous single nanoparticle spectroscopy and diffusional dynamics. *The Journal of Physical Chemistry C.* 113, 16839-16842.
- Blodgett K. (1935). Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *J. Am. Chem. Soc.* 15, 1007.
- Blodgett K, Lagmuir I. (1937). Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties. *Phys. Rev.* 51, 964.
- Braun S, Naume B. (2005). Circulating and disseminated tumor cells. *J Clin Oncol.* 23, 1623-1626.

- Briand E, Salmain M, Henry J. M, Perrot H, Compère C, Pradier C. M. (2006). Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency?. *Biosensors and Bioelectronics*. 22, 440-448.
- Brondani Da Rocha A, Regner A, Grivicich I, Schunemann D. P, Diel C, Kovaleski G. (2004). Radioresistance is associated to increased HSP70 content in human glioblastoma cell lines. *International Journal of Oncology*. 25, (3), 777-85.
- Brorson S. H. (1997). Bovine Serum Albumin (BSA) as a Reagent Against Non-Specific Immunogold Labeling on LR-White and Epoxy Resins. *Micron*. 28, 189-195.
- Brust, M, Kiely, C. J. (2002). Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review". *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 202, 175-186.
- Burg T. P, Manalis S. R. (2003). Suspended microchannel resonators for Biomolecular Detection. *Applied Physics Letters*. 83, 2698-2700.
- Calleja M, Nordström M, Álvarez M, Tamayo J, Lechuga L. M, Boisen A. (2005). Highly sensitive polymer-based cantilever-sensors for DNA detection. *Ultramicroscopy*. 105, 215.
- Cambrosio A, Keating P. (1992). Between fact and technique: the beginnings of hybridoma technology. *Journal of the History of Biology*. 25 (2), 175–230
- Campbell G, Uknalis J, Tu S-I, Mutharasan R. (2007). Detect of Escherichia coli O157:H7 in ground beef samples using piezoelectric excited millimetersized cantilever (PEMC) sensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 22, 1296-1302.
- Capobianco J. A, Shih W. H, Leu J. H, Lo G. C. F, Shih W. Y. (2010). Label free detection of white spot syndrome virus using lead magnesium niobatelead titanate piezoelectric microcantilever sensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 26, 964-969.
- Carroll P, Coley C, McLeod D. (2001). Prostate-specific antigen best practice policy-part I: Early detection and diagnosis of prostate cancer. *Urology*. 57, 217-224.
- Carter H. B (2004). Prostate cancers in men with low PSA levels--must we find them?. *N Engl J Med*. 350 (22). 2292–4.
- Catalona W, Smith D, Ornstein D. (1997). Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements. *JAMA*. 277 (18), 1452–5
- Cha B. H, Lee S. M, Park J. C, Hwang K. S, Kim S. K, Lee Y. S, Ju B. K, Kim T. S. (2009). Detection of Hepatitis B Virus (HBV) DNA at femtomolar concentrations using a silica nanoparticle-enhanced microcantilever sensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 25, 130-135.
- Chabinyk M, Love J, Thywissen J, Cervelli F, Prentiss M, Whitesides G. (2003). Self-Assembled Monolayers Exposed to Metastable Argon Beams Undergo Thiol Exchange Reactions. *Langmuir*, 19, 2201.

- Chen S, Svedendahl M, Duyne R. P. V y Kall M. (2011). Plasmon-Enhanced Colorimetric ELISA with single molecule sensitivity. *NanoLetters*. 11 (4), 1826-1830.
- Chen S, Svendandahl M, Kall M, Gunnarson L, Dimitriv A. (2009). Ultrahigh sensitivity made simple: nanoplasmonics label free biosensing with an extremely low limit-of-detection for bacterial and cancer diagnostic. *Nanotechnology*. 20 (43), 434015.
- Cheng M-C. M, Cuda G, Bunimovich Y, Gaspari M, Heath J, Hill H, Mirkin C, Nijdam A. J, Terracciano R, Thundan T, Ferrari M. (2006). Nanotechnologies for biomolecular detection and medical diagnostics. *Curr Opin Chem Biol*. 10, 11-19.
- Chin C. D, Linder V, Sia S. K. (2006). Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. *Lab on a Chip*. 7, 41 – 57.
- Chou S. Y, Krauss P. R, Renstrom P. J. (1996). Nanoimprint Lithography. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*. 14(6), 4129-4133.
- Chou S. Y, Krauss P. R, Zhang W, Guo L, & Zhuang L. (1997). Sub 10nm imprint lithography and applications. *J. Vac. Sci. Technol. B*. 15 (6), 2897-2904.
- Ciocca D. R, Calderwood S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 10, (2), 86-103.
- Clark L. C, Lyons C. (1962). Electrode systems for monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 102, 29-45.
- Clark M. S, Peck LI. S. (2009). HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: A mini-review. *Marine Genomics*. 11-18.
- Colin D. B. (2001). Motion of liquids on surfaces. *ChemPhysChem*. 2, 580-582.
- Conroy P. J, Hearty S, Leonard P, O’Kennedy R. J. (2009). Review Antibody production, design and use for biosensor-based applications. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 20, 10-26.
- Coulet, P. R. (1991). What is a Biosensor?: Biosensor Principles and Applications. Marcel Dekker, New York, p.p 1-6.
- Cowen S, Legge C. (2001). The “lab on a chip” and its impact on drugs discovery”. *Drug Discovery World Fall*, 51-56.
- Craighead H. (2006). Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature*. 442, 387-393.
- Creighton, J. A, Blatchford C. G, Albrecht M. G. (1979). Plasma Resonance Enhancement of Raman Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*. 75(0), 790-798.
- D’Souza S. F. (2001). Microbial Biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. 16, 337-353.

- D' Orazio P. (2003). Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 334 (1-2), 41-69.
- Dahlin A. B, Chen S, Jonsson M P, Gunnarsson L, Käll M, Höök F. (2009). High-Resolution Microspectroscopy of Plasmonic Nanostructures for Miniaturized Biosensing. *Anal Chem*, 81, 6572-6580.
- Dahlin A. B, Tegenfeldt J. O, Höök F. (2006). Improving the Instrumental Resolution of Sensors Based on Localized Surface Plasmon Resonance. *Anal Chem*. 78, 4416-4423.
- Daniel M. C, Astruc D. (2004). Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-size- related properties, and applications toward biology, catalysis and nanotechnology. *Chem. Rev.* 104, 293-346.
- De Juan Franco Elena. (2013). Estrategias de Inmovilización de anticuerpos para la detección de directa de hormonas mediante Inmunosensores de Resonancia de Plasmon Superficial. PhD Tesis. UAB-Barcelona.
- De Mello A. J. (2006). Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*. 442, 394-402.
- Delamarche E, Gerber M, Anselmetti D, Güntherodt H, Wolf H, Ringsdorf H. (1994). *Langmuir*, 10, 2869.
- Deng T, Wu H. K, Brittain S. T, and Whitesides G. M. (2000). Prototyping of Masks, Masters, and Stamps/Molds for Soft Lithography Using an Office Printer and Photographic Reduction. *Analytical Chemistry*. 72, 3176-3180.
- Diaconescu, K. Pohl, L. Vattuone, L. Savio, P. Hofmann, V. M. Silkin, J. M. Pitarke, E. V. Chulkov, P.M. Echenique, et al. (2007). Low-energy acoustic plasmons at metal surfaces. *Nature*. 448, 57–59
- Dittrich P. S and Manz A. (2006). Lab-on-a-Chip: Microfluidics in Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 5, 210-218.
- Do J, Ahn Ch. H. (2008). A polymer lab-on-a-chip for magnetic immunoassay with on-chip sampling and detection capabilities. *Lab on a Chip*. 8, 542 – 549.
- Dondapati S. K, Sau T. K, Hrelescu. C, Klar T. A, Stefani F. D, Feldmann J. (2010). Label free biosensing based on single gold nanostars as plasmonics transducers. *ACS Nano*. 4, 6318-6322.
- Dornelles Mello L, TatsuoKubota L. (2002). Review of the Use of Biosensors as Analytical tools in the Food and Drink Industries. *Food Chemistry*. 77, 237-256.
- Dufour I, Josse F, Heinrich S, Lucat C, Ayela C, Menil F, Brand O. (2010). Unconventional uses of cantilever for chemical sensing in gas and liquid environments. *Procedia Engineering*. 5, 1021-1026.
- Dykes P. W, King J. (1972). Carcinoembryonic antigen (CEA). *Gut*. 13(12), 1000–1013.

- Egan M. L, Lautenschleger J. T, Coligan J. E, Todd C. W. (1972). Radioimmune assay of carcinoembryonic antigen. *Immunochemistry*. 9(3), 289–299
- Egins B. R. (2002). Chemical Sensors and Biosensors. John Wiley Editions. England, 1, pp 4-7.
- El-Ali J, Sorger P. K, Jensen K. F. (2006). Cells on chips. *Nature*. 442, 403-411.
- El-Sayed M. A. (2004). Small is different: shape, size and composition-dependent properties of some colloidal semiconductor nanocrystals. *Accounts of Chemical Research*. 37(5), 326-333.
- Emre F. B, Ekiz F, Balan A, Emre S, Timur S, Toppare L. (2011). Conducting Polymers with benzothiadiazole and benzoselenadizole units for biosensor applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 158, 117-123.
- Endo T, Yamamura S, Nagatani N, Morita Y, Takamura Y, Tamiya E. (2005). Localized surface plasmon resonance based optical biosensor using surface modified nanoparticle layer for label-free monitoring of antigen-antibody reaction". *Sci Tech Adv Mat*. 6, 491-500.
- Englebienne, P. (1998), Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes. *Analyst*. 123, 1599-1603.
- Engvall E, Perlmann P. (1971). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8, 871-875.
- Enoch S, Quidant R, Badenes G. (2004). Optical sensing based on plasmon coupling in nanoparticle arrays. *Optics Express*. 12(15), 3422.
- Esser P. (1988). Principles in adsorption to polystyrene. *Nunc Bulletin*. 11(6), 1-5.
- Fano U. (1941). The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves). *J. Opt. Soc. Am*. 31, 213– 222.
- Fariña D, Álvarez M, Sendra J. R, Lechuga L. M. (2011). Biosensores opto-nanomecánicos basados en microcantilevers. *Intekhnia*. 6 (1), 45 – 55
- Fenter P, Eberhardt A, Eisenberger P. (1994). Self-Assembly of *n*-Alkyl Thiols as Disulfides on Au(111). *Science*. 266, 1216.
- Fernández D. (1985). El complejo avidina-biotina y su uso en la biología molecular. *Interferón y Biotecnología*. 2, (2), 137-141.
- Ferretti S, Paynter S, Russell D. A, Sapsford K. E, Richardson D.J. (2000). Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces trends in analytical chemistry. *Trends in analytical chemistry*. 19(9), 530-540.
- Feuz L, Jönsson M. P, Höök F (2012a). Material-selective surface chemistry for nanoplasmonic sensors: optimizing sensitivity and controlling binding to local hot spots. *Nanoletters*. 12 (2), 873-879.

- Feuz L, Jönsson P, Jönsson M. P, Höök F. (2010). Improving the limit of detection of nanoscale sensors by directed binding to high sensitivity areas. *ACS Nano*, 4 (4), 2167-2177.
- Finklea H O (2000). *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*. Wiley and Sons, New York.
- Finklea H O. (1996). *Electrochemistry of Organized Monolayers of Thiols and Related Molecules on Electrodes, Electroanalytical Chemistry*. Marcel Dekker, New York, v.19.
- Frank T. J, Griffin J. F. T, Spittle E, Rodgers C. R, Liggett S, Cooper M, Bakker D, Bannantine J. P. (2005). Immunoglobulin G1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Johne's Disease in Red Deer (*Cervus elaphus*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12 (12), 1401–1409.
- Galaktionov V. G. (2004). Evolutionary development of the immunoglobulins super family. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, (2), 133-45
- Gardeniers J. G. E, Van den Berg A. (2004). Lab-on-a-chip systems for biomedical and environmental monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 7, 378, 1700-1703.
- Gerion D, Day G-J. (2010). Label free and labelled technology for protein characterization and quantitation. *Biopharm International*. 23(9), 38-45.
- Geyer W, Stadler W, Eck W, Golzhauser A, Grünze M, Sauer M, Weimann T, Hinze P. (2001). *J. Vac. Sci. Technol. B*, 19, 2732.
- Gfeller K. Y, Nugaeva N, Herner M. (2005). Micromechanical oscillators as rapid biosensor for the detection of active growth of *Escherichia coli*. *Biosensors and Bioelectronics*. 21, 528-533.
- Ghenuche P, Cherukulappurath S, Taminiau T. H, Van Hulst N. F, y Quidant R. (2008). Spectroscopic Mode Mapping of Resonant Plasmon Nanoantennas. *Physical Review Letter*, 101, 116805.
- Ginger D, Zhang H, Mirkin C. (2004). The evolution of dip-pen nanolithography. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43, 30.
- Glemmie M. J, Johnson W. M. (2000). Clinical trials of antibody therapy. *Immunology Today*. 21, 8, 403-410.
- Gold J. M, Freedman S. O, Gold P. (1972). Human anti-CEA antibodies detected by radioimmuno-electrophoresis. *Nat New Biol*. 239(89), 60–62
- Gold P, Freedman S. O. (1965). Demonstration of Tumor-specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. *J Exp Med*. 121, 439–462
- Gold P, Freedman S. O. (1965). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*. 122(3), 467–481.
- Gooding J. J, Hibbert D. B. (1999). The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. *Trend in Analytical Chemistry*, 18, 525-533.

- Graham E. (2005). *Lab-on-a-chip Technology. Forensic Science, Medicine, and Pathology*. 1, 2005, 221-223.
- Gray J, Voldman T. J, Chen C. (2004). Dielectrophoretic registration of living cells to a microelectrode array. *Biosensors and Bioelectronics*. 19, 1765-1774.
- Green N. M. (1965). A spectrophotometric assay for avidin and biotin based on binding of dyes by avidin. *Biochem. J.* 94, 23c-24c.
- Green N. M. (1970). Spectrophotometric determination of avidin and biotin. *Methods in Enzymol.* Vol XVIII, Academic Press: New York, p. 418.
- Green R J, Frazier R A, Shakesheff K M, Davies M C, Roberts C J and Tendler S J B. (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*. 21, 1823-1835.
- Grieshaber D, MacKenzie R, Vörös J, Reimhult E. (2008). Review paper Electrochemical Biosensors – Sensor principles and Architectures. *Sensors*. 8, 1400-1458.
- Grisham C. M, Reginald H. G. (1999). *Biochemistry*. Philadelphia: Saunders College Pub. pp. 426–7.
- Guisan J. M. (2006). Immobilization of Enzymes and Cells. *Methods in Biotechnology*, Humana Press, pp 22.
- Gustin G. A. (2007). *Emerging Markets for Microfluidics Applications*, Yole developpement.
- Hacker C. A, Richter C. A, Gergel-Hackett N, Richter L. J. (2007). Origin of Differing Reactivities of Aliphatic Chains on H-Si(111) and Oxide surfaces with Metal. *Journal of Physical Chemistry C*. 111 9384-9392.
- Haes A. J, Van Dyne R. P. (2002). A nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 124 (35), 10596-10604.
- Haes A. J, Zou S, Schatz G. C, Van Duyne R P. (2003). A nanoscale Optical Biosensor: The long range distance dependence of the localized surface Plasmon resonance of noble metal nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 108 (1) 109-116.
- Halas N. J, Lal S, Chang W. S, Link S, Nordlander P. (2011). Plasmons in strongly coupled metallic nanostructures. *Chemical Reviews*. 111 (6), 3913-3961.
- Hamilton J. W. (2007). Evaluation of indicators of stress in populations of polar bears (*Ursus maritimus*) and grizzly bears (*Ursus arctos*). University of Waterloo, Waterloo, MSc Thesis.
- Hansen K. M, Thundat T. (2005). Microcantilever Biosensors. *Methods*. 37, 57-64
- Harlow E, Lane D. (1998). *Immunoassays: Antibodies. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. pp 553-612.

- Harrison D, Fluri K, Seiler K, Fan Z, Effechauser C, Manz A. (1993). Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical-Analysis Systems on a chip. *Science*. 261 , 895-897.
- Hayes D. F. (2011). Biomarkers. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, pp 694- 701
- Haynes C. L, Van Duyne R. P (2001). Nanosphere Lithography: A versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size –Dependent Nanoparticle Optics. *The Journal of Physical Chemistry B*. 105 (24), 5599-5611.
- Hellings J. A, Theunissen H, Keur W, Siebelink-Liauw A. (1987). New developments in ELISA verification of anti-HIV screening of blood donors. *Journal of Virological Methods*. 17, 1–2, Pages 11-17.
- Hermanson G. T. (1996). *Bioconjugate Techniques*. Pierce Chemical Company. Rockford, Illinois Elsevier.
- Hernández J. L, Padilla L, Dakhel S, Coll T, Hervas R, Adan J, Masa M, Mitjans F, Martinez J. M, Coma S, Rodriguez L, Noé V, Ciudad J. C, Blasco F, Messeguer R. (2013). Therapeutic Targeting of Tumor Growth and Angiogenesis with a Novel Anti-S100A4 Monoclonal Antibody. *PLoS-ONE*. 8, 9, e72480.
- Hill A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol*. 40, iv–vii.
- Hill R. T. (2015). Plasmonics Biosensors. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*. 7, 152–168
- Holmberg A, Blomstergren A, Nord O, Lukacs M, Lundeberg J, Uhlén M. (2005). The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis*. 26, 501–510.
- Homola J, Koudeka I, Yee S. S. (1999). Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 54, 16-24.
- Homola J. (2008). Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chem. Rev*. 108, (2), 462-493.
- Homola, J. (2006). *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Berlin: Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co.K.
- Hong C. C, Murugesan S, Kim S, Beaucage G, Choi J-W, Ahn C. H. (2003). A functional on-chip pressure generator using solid chemical propellant for disposable lab-on-a-chip. *Lab on a Chip*. 3, 281 – 286.
- Horn A, Fernández J. L, Skulse M. (1981). Ultramicroelisa for alpha-fetoprotein with the chamber analytical technique. *J Clin Chem Clin Biochem*. 19, 702.

- Huang X, Jain P, El-Sayed I, & El-Sayed M. A. (2008). Plasmonic Photothermal Therapy (PPT) using Gold Nanoparticles. *Laser in Medical Science*. 23 (3), 217-228.
- Hughes, Michael P. (2002). Nanoelectromechanics in Engineering and Biology. UK, CRC PRESS, pp 1-5.
- Hughes, Michael P. (2002). Strategies for dielectrophoretic separation in laboratory-on-a-chip systems. *Electrophoresis*, 23, 2569-2582.
- Hung B, Wu H, Kim S, Zare R N. (2005). Coating of poly(dimethylsiloxane) with n-dodecyl-[beta]-D-maltoside to minimize nonspecific protein adsorption. *Lab on a Chip*. 5 (10), 1005-1007.
- Hwang K. S, Lee J. H, Park J, Yoon D. S, Park J. H, Kim T. S. (2004). In situ quantitative analysis of prostate-specific antigen (PSA) using nanomechanical PZT cantilever. *Lab on a Chip*. 4, 547-552.
- Hwang K. S, Lee S-M, Kim S. K, Lee J. H, Kim T. S. (2009). Micro- and Nanocantilever Devices and Systems for Biomolecule Detection. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2, 77-98.
- Hyun Soo J, Kwang No P, Chang Duk K, Jun Pyo K, Sang Jun S, Kyung Shik L. (2009). Optical Fiber SPR biosensor with sandwich assay for the detection of prostate Specific Antigen. *Optics Communications*. 282, 2827-2830.
- Irawan R, Meng Tay C, Chuan Tjin S, Fu C. Y. (2006). Compact fluorescence detection using in-fiber microchannels—its potential for lab-on-a-chip applications. *Lab on a Chip*. 6, 1095-1098.
- Ireland E, Leoni F, Altaie O, Birch C, Coleman R, Hunter-Lavin C, Williams J. H. H. (2007). Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. *Methods*. 43, 176-183,
- Jacobson S, Hergenroder R, Koutny L, Ramsey J. (1994). High-Speed Separations on a Microchip. *Analytical Chemistry*. 66, 1114-1118.
- Jacobson S, Hergenroder R, Koutny L, Ramsey J. (1994). Open-Channel Electrochromatography on a Microchip. *Analytical Chemistry*. 66, 2369-2373.
- Janasek D, Franzke J, Manz A. (2006). Scaling and the Design of Miniaturized Chemical-Analysis System. *Nature*. 442, 374-380.
- Jokerst J, Raamanathan A, Christodoulides N, Floriano P. N, Pollard A. A, Simmons G. W, Wong J, Gage C, Furmaga W. B, Redding S. W, McDevitt J. T. (2009). Nano-bio-chips for high performance multiplexed protein detection: Determination of cancer biomarkers in serum and saliva using quantum dots bioconjugate labels. *Biosensors and Bioelectronics*. 24, 3622-3829.
- Jonsson M. P, Dahlin A. B, Feuz L, Petronis S, & Hook F. (2010). Locally Functionalized Short-Range Ordered Nanoplasmonics Pores for Bioanalytical Sensing. *Analytical Chemistry*. 82 (5), 2087-2094.

- Jung Y. K, Kim T. W, Jung C, Cho D. Y, Park H. G. (2008). A Polydiacetylene Microchip Based on a Biotin–Streptavidin Interaction for the Diagnosis of Pathogen Infections. *Small*. 4, 1778–1784.
- Karlsson R. (2004). SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *J. Mol. Recog.* 17, 151-161.
- Kausaite A, van Dijk M, Castrop J, Ramanaviciene A, Baltrus J P, Acaite J, Ramanavicius A. (2007). Surface plasmon resonance label-free monitoring of antibody antigen interactions in real time. *Mol. Biol. Educ.* 35, 57-63.
- Kawachi M. H, Bahnson R. R, Barry M. (2007) Prostate cancer early detection. Clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 5, 714-36.
- Kean W. F, Kean I. R. (2008). Clinical pharmacology of gold. *Inflammopharmacology*. 16, 112-125.
- Kelly K. L, Coronado E, Zhao L. L, Schatz G. C. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape and dielectric environment. *Journal of physical Chemistry B*. 107, 668-677.
- Kim J, Junkin M, Kim D. H, Kwon S, Shin Y. S, Wong P. K, Gale B. K. (2009). Applications, techniques, and microfluidic interfacing for nanoscale biosensing. *Microfluidics and Nanofluidics*. 7, 149-167.
- Klauser R, Hong I, Wang S, Zharnikov M, Paul A, Goelzhaeuser A, Terfort A, Chaung T. (2003). Imaging and Patterning of Monomolecular Resists by Zone-Plate-Focused X-ray Microprobe. *J. Phys. Chem. B*, 107, 13133.
- Knowlton A. A, Kapadia S, Torre-Amione G, Durand J. B, Bies R, Young J, Mann D. L. (1998). Differential Expression of Heat Shock Proteins in Normal and Failing Human Hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Vol. 30, (4), 811-818.
- Köhler G, Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256, 5517, 495–497.
- Kopf-Sill R. (2002). Successes and challenges of lab-on-a-chip. *Lab on a Chip*. 2, 42–47.
- Kos´cielniak P. (1999). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 47, 275–287.
- Kraemer S, Fuierer R, Gorman (2003). Scanning Probe Lithography Using Self-Assembled Monolayers. *C. Chem. Rev.* 103, 4367.
- Krestshmann, E. (1968). Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. *Z. Naturforsch.* 23A, 2135–2136.
- Kreuzer M, Quidant R, Salvador J. P, Marco M. P, Badenes G. (2008). Colloidal-based localized surface Plasmon resonance (LSPR) biosensor for the quantitative determination of stanozolol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391 (5), 1813-1820.

- Krupey J, Gold P, Freedman S. O. (1967). Purification and characterization of carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *Nature*. 215 (5096), 67–68
- Kuriyama M, Wang M. C, Papsidero L. D, Killian C. S, Shimano T, Valenzuela L, Nishiura T, Murphy G. P, Chu T. M. (1980). Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. *Cancer Research*. 40, (12), 4658–62.
- Lamb D. R. (1997). Some Electrical Properties of the Silicon-silicon Dioxide System. *Thin Solid Films*. 5, 103-117.
- Lang H. P, Hegner M, Gerber C. (2005). Cantilever array sensors. *Materials Today*. 30-36.
- Lapizco, Davalos R, Simmons B, Cummings E, Fintschenko Y. (2005). An insulator-based (electrodeless) dielectrophoretic concentrator for microbes in water. *Journal of Microbiological Methods*. 62, 317-326.
- Lapizco, Simmons B, Cummings E, Fintschenko Y. (2004). Dielectrophoretic concentration and separation of live and dead bacteria in array of insulators. *Annals of the New York Academy of Science*. 76, 1571-1579.
- Lavrik N. V, Sepaniak M. J, Datskos P. G. (2004). Cantilever transducer as a platform for chemical and biological sensors. *Review of Scientific Instrument*. 75, 2229-2253.
- Le Ru E. C, Etchegoin P. G, Meyer M. (2006). Enhancement factor distribution around a single surface-enhanced Raman scattering hot spot and its relation to single molecule detection. *Journal of Chemical Physics*. 125 (20), 204701-204714.
- Le Ru E. C, Etchegoin P. G. (2009). Phenomenological local field enhancement factor distributions around electromagnetic hot spots. *Journal of Chemical Physics*. 130, (18).
- Lechuga L. M, Prieto F, Sepúlveda B. (2003). Interferometric biosensors for environmental pollution detection. *Optical Sensors for Industrial*, Editorial Springer.
- Lee S-W, Lee K-S, Ahn J, Lee J-J, Kim M-G y Shin Y-B (2011). Highly Sensitive Biosensing Using Arrays of plasmonics Au nanodisks realized by nanoimprint lithography. *ACS Nano*. 5 (2), 897-904.
- Lenshof A, Laurell T. (2010). Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems. *Chem. Soc. Rev*. 39, 1203–1217.
- Lequin R (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem*. 51 (12), 2415–8
- Li N, Tang H, Gai H, Dong X, Wang Q, & Yeung E (2009). Determination of protein surface excess on a liquid/solid interface by single molecule counting. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 394 (7), 1879-1885.
- Li Y, Kaler K. (2004). Dielectrophoretic fluidic cell fractionation system. *Analytica Chimica Acta*. 507, 151-161.

- Liedberg B, Nylander C, Lundstrom I. (1995). Biosensing with surface Plasmon resonance – how it all started. *Biosensors and Bioelectronics*. 10, i – ix.
- Ligler F. S. (2008). Optical biosensors: Today and tomorrow. Elsevier.
- Lilja H. (2003). Biology of Prostate-Specific Antigen. *Urology*. 62 (5), 27–33.
- Linqiu Cao. (2006). Carried-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design. John Wiley & Sons.
- Lipman N. S, Jackson L. R, Trudel L. J, y Weis-García F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing Characteristic, Applications and Information Resources. *ILAR Journal*. 46, 258-268.
- Litman G. W, Rast J. P, Shamblott M. J. (1993). Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 10 (1), 60–72
- Liu G, Xu S, Qian Y. (2000). Nanofabrication of Self-Assembled Monolayers Using Scanning Probe Lithography. *Acc. Chem. Res.* 33, 457.
- Lo Gerfo P, Krupey J, Hansen H. J. (1971). Demonstration of an antigen common to several varieties of neoplasia. *N Engl J Med*. 285(3), 138–141.
- Love J, Estroff L, Kriebel J, Nuzzo R, Whitesides G. (2005). Self Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* 105(4), 11003.
- Love J. C, Anderson J. R, Whitesides G. M. (2001). Fabrication of three-dimensional microfluidics systems by soft lithography. *MRS Bulletin*. 26, 523-528.
- Maboudian R. (1998). Surface processes in MEMS technology. *Surface Science Reports*. 30, 207-269.
- Maier S. A. (2007). Plasmonics: Fundamentals and applications, Springer, New York.
- Malaquin L, Kraus T, Schmid H, Delamarche E, & Wolf H. (2007). Controlled particle placement through convective and capillary assembly. *Langmuir*. 23 (23), 11513-11521.
- Manz A, Eijkel J. C. T. (2001). Miniaturization and chip technology. What can we expect?. *Pure Appl. Chem*. 73, 1555-1561
- Manz A, Graber N, Widmer H.M. (1990). Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sens. Actuators B*. 1, 244-248.
- Manz A. (1992). Planar Chips Technology for miniaturization and Integration of Separation Techniques into Monitoring Systems-Capillary Electrophoresis on a Chip. *J. Cromatogr*. 593, 253-258.
- Martin F, Martin M. S. (1972). Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen in extracts of human colon and stomach. *Int J Cancer*. 9(3), 641–647.
- Mateo D, Morales P, Ávalos A, Haza A. I. (2013). Gold nanoparticles: Applications and in vitro cytotoxicity. *Acta Toxicol. Argent*. 21 (2), 102-109.

- Matzinger P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 296 (5566), 301–305.
- Mauk M. G, Ziober B. L, Chen Z, Thompson J, Bau H. H. (2007). Lab-on-a-chip technologies for oral based cancer screening and diagnostics: capabilities, issues and prospects. *Annals of the New York Academy of Science*. 467-475.
- May J. E, Pemberton R. M, Hart J. P, McLeod J, Wilcock G, Doran O. (2013). Use of whole blood for analysis of disease-associated biomarkers. *Analytical Biochemistry*. 437, 1, 59-61.
- Mazza G, Whiting A. H, Day M. J, Duffus W. P. H. (1994). Preparation of monoclonal antibodies specific for the subclasses of canine IgG. *Research in Veterinary Science*. 57, 140-145.
- Mcdonald J. C, Chabinye M. L, Metallo S. J, Anderson J. R, Stroock A. D, Whitesides G. M. (2002). Prototyping of Microfluidics Devices in Poly(Dimethylsiloxane) using solid-object printing. *Analytical Chemistry*. 74, 1537-1545.
- Mcenery M, Tan A, Alderman J, Patterson J, O'mathuna S, Glennon J. (1999). Liquid Chromatography on-Chip: Progression Towards a micro-total Analysis System. *Analyst*. 125, 25-27.
- McFarland A. D, Van Duyne R. P, (2003) Single Silver Nanoparticles as Real-time optical sensors with Zeptomolar Sensitivity. *Nanoletters*. 3, (8), 1057-1062.
- McNaught A. D, Wilkinson A. (1997). Compendium of Chemical Terminology. 2nd Edition. Blackwell Science. [ISBN 0-86542-6848].
- Michel B, Bernard A, Bietsch A, Delamarche E, Geissler M, Juncker D, Kind H, Renault J, Rothuizen H, Schmid H, Schmidt-Winkel P, Stutz R, Wolf R.(2001). Printing Meets Lithography: Soft Approaches to High-Resolution patterning. *IBM J. Res. Dev.* 45, 697.
- Midwood K. S, Carolus M. D, Danahy M. P, Schwarzbauer J. E, Schwartz J. (2004). Easy and Efficient Bonding of Biomolecules to an Oxide Surface of silicon. *Langmuir*. 20, 5501-5505.
- Mie, G. (1908). Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* 25, 377-445.
- Mijatovic D, Eijkel J. C. T, Van Den Berg A. (2005). Technologies for Nanofluidic Systems: Top-Down vs. Bottom-up- a review. *Lab on a Chip*. 5, 492-500.
- Minas G, Wolffenbuttel R. F., Correia J. H. (2005). A lab-on-a-chip for spectrophotometric analysis of biological fluids. *Lab-on-a-chip*. 5, 1303-1309.
- Mizejewski G. J. (2001). Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Experimental Biology and Medicine*. 226 (5), 377–408
- Montserrat M, Sanz D, Juan T, Herrero A, Sánchez L, Calvo M, Pérez M. D. (2015). Detection of peanut (*Arachis hypogaea*) allergens in processed foods by immunoassay: Influence of selected target protein and ELISA format applied. *Food Control*. 54, 300-307.

- Moreno F, Albella P, González F, García-Cámara B. (2010). Fundamentos de espectroscopía plasmónica con nanopartículas metálicas. *Plasmónica: Detección Sobre Nanoestructuras Metálicas*, C.d.E.d.I.S.E.d. Óptica, Madrid. p. 41-60.
- Mouradian S. (2002). Lab-on-a-chip: Applications in Proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*. 6, 51-56.
- Mozsolit H, Thomas W. G, Aguilar M. I. (2003). Surface Plasmon Resonance Spectroscopy in the Study of Membrane-Mediated Cell Signalling. *J. Peptide Sci.* 9, (2), 77-89.
- Mukhopadhyay R. (2005). Surface plasmon resonance instruments diversify. *Analytical Chemistry*, 77, 313-317.
- Müller M. A, Oelschläger H. (1981). Standard addition for strongly non-linear calibration curves. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*. 307, 2, 109-114.
- Mulvaney P. (1996). Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir*. 12, 788-800.
- Murphy G. P. (1995). The second Stanford conference on international standardization of Prostate Specific Antigen assays. *Cancer*, 75, 122-8.
- Myrtle J. F. (1989). Normal levels of prostate-specific antigen (PSA). Clinical aspects of prostate cancer: assessment of new diagnostic and management procedures. New York: Elsevier. pp. 183-189
- Nakane P. K, Pierce G. B. (1967). Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol*. 33, 307-318.
- Neumann T, Junker H. D, Schmidt K, Sekul R. (2007). SPR-based fragment screening: Advantages and applications. *Cur Top Med*. 7, 1630.
- Nguyen N. T. (2002). Fundamentals and Applications of Microfluidics, Norwood, MA: Artech house, Inc.
- Nieuwenhuis J. H, Vellekoop M. J. (2004). Simulation study of dielectrophoretic particle sorters. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 103, 331-338.
- Norde W. (1996). Driving forces for protein adsorption at solid surfaces. *Macromolecular Symposia*. 103, (1), 5-18.
- Nordlander P, Oubre C, Prodan E, Li K, Stockman M. I. (2004). Plasmon hybridization in nanoparticle dimers. *Nano Letters*. 4 (5), 899-903.
- Novotny L, Hecht B. (2006). Principles of nano-optics. Cambridge University Press.
- Nugaeva N, Gfeller K. Y, Backmann N, Lang H. P, Duggelin M, Hegner M. (2005). Micromechanical cantilever array sensors for selective fungal immobilization and fast growth detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 21, 849-856.

- Nuzzo R. G, Allara D. L. (1983). Adsorptions of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 4481.
- O'Malley S. (2008). Recent advances in label-free biosensors applications in protein biosynthesis and HTA screening. Protein Biosynthesis, Ed: Toma E. Esterhouse and Lado B. Petrinis.
- Ostuni E, Yan L, Whitesides G. M. (1999). The Interaction of proteins and cells with self assembled monolayers of alkanethioles on gold and silver. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces.* 15, 3-30.
- Otto. (1968). Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. Physik.* 216, 398–410.
- Pancer Z, Cooper M. D. (2006). The evolution of adaptive immunity. *Annual Review of Immunology.* 24, 497–518
- Parham P. (2009). The Immune System, 3rd Edition, Taylor and Francis Group, LLC, pp. G2.
- Pérez-Castillejos R. (2003). Study and Applications of Ferrofluids in microfluidics, PhD Thesis in Department d'Enginyeria Electronica. Universitat Politecnica de Catalunya: Barcelona.
- Pohanka M, Skládal P. (2008). Review Electrochemical Biosensor-principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine.* 6, 57-64.
- Prasad S, Zhang X, Yang M, Ni Y, Parpura V, Ozcan C, Ozcan M. (2004). Separation of individual neurons using dielectrophoretic alternative current fields. *Journal of Neuroscience Methods.* 135, 79-88.
- Prasad S, Zhang X, Yang M, Ozcan C, Ozcan M. (2004). Neurons as sensors: individual and cascaded chemical sensing. *Biosensors and Bioelectronics.* 19, 1599-1610.
- Puchades R, Maquieira Á. (2013). Chapter 7- ELISA Tools for Food PDO Authentication. *Comprehensive Analytical Chemistry.* 60, 145-193.
- Quidant R, Zelenina A. S, Vespertinas-Nieto M, (2007). Optical manipulation of plasmonic nanoparticles. *Appl. Phys. A,* 89, 233–239.
- Quinn J, Patel P, Fitzpatrick B, Manning B, Dillon P, Daly S, O'Kennedy R, Alcocer M, Lee H, Morgan M, Lang K. (1999). The use of regenerable, affinity ligand-based surfaces for immunosensor applications. *Biosensors & Bioelectronics.* 14, 587-595.
- Raether. H. (1988). Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings, Springer.
- Rai M, Yadav A, Gade A. (2008). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances.* 27 (1), 76-83.
- Rayleigh L. (1907). On the Dynamical Theory of Gratings. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Science.* 79, 399–416.

- Regatos Gómez Renato. (2012). Biosensores ópticos de alta sensibilidad basados en técnicas de modulación plasmónica. Tesis Doctoral.
- Reimhult K, Peterson K, Krozer A. (2008). QCM-D Analysis of the Performance of Blocking Agents on gold and Polystyrene Surfaces. *Langmuir*. 24, 8695-8700.
- Reimhult K, Petersson K, Krozer A. (2008). QCM-D analysis of the performance of blocking agents on gold and polystyrene surfaces. *Langmuir*. 24, (16), 8695-700.
- Rerole A. L, Gobbo J, De Thonel A, Schmitt E, Pais de Barros J. P, Hammann A, Lanneau D, Fourmaux E, Demidov O. N, Micheau O, Lagrost L, Colas P, Kroemer G, Garrido C. (2011). Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer Research*. 71, 2, 484-495.
- Ritchie R. H (1957). Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. *Phys. Rev.* 106, 874.
- Ritchie R. H, Arakawa E. T, Cowan J. J, Hamm R. N. (1968). Surface-Plasmon Resonance Effect in Grating Diffraction. *Phys. Rev. Lett.* 21, 1530.
- Roitt I. M. (1980). *Inmunología Esencial*. 6ª edición. Editorial JIMS S.A.
- Roussel B. (2013). How will microfluidics applications change the material mix and quadruple the microfluidics device market in five years?. Yole Développement.
- Roy A, Sharma V. P, Chauhan V. S. (1994). The use of peptide ELISA in determining malaria endemicity. *Journal of Immunological Methods*. 167, (1-2), 139-143.
- Ruoslahti E, Seppälä M. (1971). Studies of carcino-fetal proteins. 3. Development of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein. Demonstration of alpha-fetoprotein in serum of healthy human adults. *Int J Canc.* 8, 374-83
- Rus H, Cudrici C, Niculescu F. (2005). The role of the complement system in innate immunity. *Immunologic Research*. 33 (2), 103-12
- Rusmini F, Zhong Z, Feijen J. (2007). Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. *Biomacromolecules*. 8, 1775-1789.
- Sadana A. (2002). *Engineering Biosensors Kinetics and Design Applications*, Elsevier Inc.
- Saftocs A, Agócs E, Fodor B, Parkó D, Petrik P, Kolari K, Aalto T, Fürjes P, Horvath R, Kurunczi S. (2012). Investigation of thin polymer layers for biosensor applications. *Applied Surface Science*. 281, 66-72
- Sagiv J. (1980). Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 92.
- Sánchez C, López-Fierro P, Zapata A, Domínguez J. (1993). Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulins. *Fish & Shellfish Immunology*. 3, 237-251.

- Sanchis A. P. Brown, Sancho M, Martinez G, Sebastian J. L, Muñoz S, Miranda J. M. (2007). "Dielectric characterization of bacterial cells using dielectrophoresis". *Bioelectromagnetics*. 28, 393-401.
- Santos Coelho J, da Silva Soares I, Antunes de Lemos E, Sarti Jimenez M. C, Erikó Kudó M, do Lago Moraes S, Ferreira A. W, Arroyo Sanchez M. C. (2007). A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria, Chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 58, 2, 223-230.
- Sanz V, Borowiak E, Lukanov P, Galibert A. M, Flahaut E, Coley H. M, Ravi S, Silva P, McFadden J. (2010). Optimising DNA binding to carbon nanotubes by non-covalent methods. *Carbon*, 49(5), 1775-1781.
- Sanz V, Conde J, Hernández Y, Baptista P. V, Ibarra M. R, M de la Fuente J. (2012). Effect of PEG bifunctional spacers and TAT peptide on dsRNA loading on gold nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. 14, 6.
- Sapsford K. E, Ligler, F. S. (2004). Real Time analysis of protein adsorption to a variety of thin films. *Biosensors and Bioelectronics*, 19 (9), 1045-1055.
- Sassolas A, Blum L. J, Leca-Bouvier B. D. (2012). Immobilization Strategies to develop enzymatic Biosensors. *Biotechnology Advances*. 30, 489-511.
- Schoth, Jurischka R, Blattert C, Tahhan I, Reinecke H. (2006). The evolution of Lab-on-a-chip: The Micro-Tele-Biochip. *Electrónica Medical Device Technology(EMDT) Magazine*. 17, 3, 10-13.
- Scott M. G, Briles D. E, Nahm M. H. (1990). Selective IgG subclass expression: biological, clinical and functional aspects. In: *The Human IgG Subclasses*. Ed. F. Shakib. Oxford, Pergamon Press. pp. 161-183.
- Scrheiber F. (2004). Self-assembled monolayers: from "simple" model systems to biofunctionalized interfaces. *J. Phys.: Condens. Matter*. 16, R881-R900
- Sepúlveda B, Angelomé P. C, Lechuga L. M, Liz-Marzán L. M. (2009). LSPR based nanobiosensors. *Nano Today*. 4, 244-251.
- Shadnan M, Kirkwood S, Fedosejevs R, Amirfazli A. (2004). Direct Patterning of Self-Assembled Monolayers on Gold Using a Laser Beam. *Langmuir*, 20, 2667.
- Sherry L. J, Jin R. C, Mirkin C. A, Schatz G. C, Van Duyne R. P. (2006). Localized surface plasmon resonance spectroscopy of single silver triangular nanoprisms. *Nano Letters*. 6 (9), 2060-2065.
- Silin V, Weetall H, Vanderah D. J. (1997). SPR studies of the Nonspecific Adsorption Kinetics of human IgG and BSA on gold surfaces modified by Self-Assembled monolayers (SAMs). *J. Coll. Int. Sci*. 185, 94-103.
- Squires T. M, Quake S. R. (2005). Microfluidics: Fluid Physics at the Nanoliter Scale. *Reviews of Modern Physics*. 77, 977-1026.

- Steven P. B, Yoo-Joung K, Glenn J. B. (2003). Biology of Prostate-Specific Antigen. *Journal of Clinical Oncology*. 28 (2), 383–91.
- Stone H. A, Stroke A. D, Ajdari A. (2004). Engineering flows and small devices: Microfluidics toward a lab-on-a-chip. *Annual Review of Fluid Mechanics*. 36, 381-411.
- Subramanian A, Kennel S. J, Oden P. I, Jacobson K. B, Woodward J, Doktycz M. J. (1999). Comparison of techniques for enzyme immobilization on silicon supports. *Enzyme and Microbial Technology*. 24, 26-34.
- Sun S, Chong K. S. L, Leggett G. (2002). Nanoscale Molecular Patterns Fabricated by Using Scanning Near-Field Optical Lithography. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 2414.
- Suzuki N, Quesenberry M. S, Wang J. K, Lee R. T, Kobayashi K, Lee Y. C. (1997). Efficient immobilization of proteins by modification of plate surface with polystyrene derivatives. *Analytical Biochemistry*. 247, 412-6.
- Svatek R, Shulman M, Benaim E. (2008). Change in Prostate Specific Antigen Following Androgen Stimulation is an Independent Predictor of Prostate Cancer Diagnosis. *J Urol*. 179, 2192-2196.
- Svedendahl M, Chen S, Dmitriev A, Kall M. (2009). Refractometric Sensing Using Propagating versus Localized Surface Plasmons: A Direct Comparison. *Nano Letters*. 9(12), 4428-4433.
- Tai Yu-Chong, Zheng Siyang. (2004). Blood test lab-on-a-chip. *Electrónica TFOT: The future of things*.
- Torchilin V. P. (1995). *Handbook of Targeted Delivery of Imaging Agents*. CRC Press. pp 308.
- Tehrani Z. R, Azadmanesh K, Mostafavi E, Soori S, Azizi M, Khabiri A. (2015). Development of an integrase-based ELISA for specific diagnosis of individuals infected with HIV. *Journal of Virological Methods*. 215–216, 61-66.
- Thissen P, Seitz O, Chabal Y. J. (2012). Wet chemical surface functionalization of oxide-free silicon. *Progress in surface science*. 87, 272-290.
- Thompson I. M, Pauler D. K, Goodman P. J, Tangen C. M, Lucia M. S, Parnes H. L, Minasian L. M, Ford L. G, Lippman S. M, Crawford E. D, Crowley J. J, Coltman C. A. (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*. 350 (22), 2239–46
- Thompson S. G, Kienast J, Pyke S. D. M, Haverkate F, Van De Loo J. C. W. (1995). Hemostatic Factors and the Risk of Myocardial Infarction or Sudden Death in Patients With Angina Pectoris. *The New England Journal of Medicine*. 332, 10, 635-641.
- Thomson D. M, Krupey J, Freedman S. O, Gold P. (1969). The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 64(1), 161–167

- Tijssen P. (1993). The immobilization of immunoreactants on solid phases. En: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and theory of enzyme immunoassays. London: Elsevier, p.297-328.
- Trilling A. K, Beekwilder J, Zuilhof H. (2013). Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyst*. 138, 1619-1627.
- Tüdos A. J, Besselink G. A. J, Schasfoort R. B. M. (2001). Lab on a chip: Trends in miniaturized total analysis systems for point-of-care testing in clinical chemistry. *Lab on a Chip*. Vol I, (2), 83–95.
- Ulman A. (1996). Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* 96, 1533.
- Valen G, Hansson G. K, Dumitrescu A, Vaage J. (2000). Unstable angina activates myocardial heat shock protein 72, endothelial nitric oxide synthase, and transcription factors NFkB and AP-1. *Cardiovascular Research*. 47, (1), 49-56.
- Vargas-Roig L. M, Gago F. E, Tello O, Aznar J. C, Ciocca D. R. (1998). Heat Shock Protein Expression and Drug Resistance in Breast Cancer Patients Treated with Induction Chemotherapy. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol)*. 79, 468-475.
- Vega A, Thissen P, Chabal Y. J. (2012). Environment-Controlled Tethering by aggregation and Growth of Phosphonic Acid Monolayers on silicon Oxide. *Langmuir*. 28, 8046-8051.
- Vericat C, Vela M. E, Salvarezza R. C. (2005). Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111): surface structures, defects and dynamics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7, 3258 – 3268
- Vo-Dinh T, Cullum B. (2000). Biosensor and Biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 366, 540-551.
- Wakizaka Y, Hakoda M, Shiragami N. (2004). Effect of electrode geometry on dielectrophoretic separation of cells. *Biochemical Engineering Journal*. 20, 13-19.
- Wan X. S, Xu Y. A, Ware J. H, Kennedy A. R (2003). Three immunoassays based on monoclonal antibodies specific for prostate specific antigen (PSA), alpha-1-antichymotrypsin (ACT), and the PSA-ACT complex. *Prostate*. 56, 131-41
- Wang H, Brandl D. W, Le F, Nordlander P, Halas N. J. (2006). Nanorice: A Hybrid Plasmonic Nanostructure". *Nano Letters*. 6, 827-832.
- Wang T, Boer-Duchemin E, Zhang Y, G. Dujardin. (2011). Excitation of propagating surface Plasmon with a scanning tunnelling microscope. *Nanotechnology*. 22, 175201.
- Wang X, Zhang Q-Y, Li Z-J, Ying X-T, Lin J-M. (2008). Development of high-performance magnetic chemiluminescence enzyme immunoassay for α -fetoprotein (AFP) in human serum. *Clinica Chimica Acta*. 393, 2, 90-94.
- Weigl B. H, Bardell R. L, Cabrera C. R. (2003). Lab-on-a-chip for Drug Development. *Advances Drug Delivery Reviews*. 55, 349-377.

- Wensenk H, López F. B, Hermes D, Verboom W, Gardenics H, Reinhoudt D, van den Berg A. (2005). Measuring reaction kinetics in a lab-on-a-chip by microfluidic NMR. *Lab on a chip*. 5, 280-284.
- Whitesides G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 442, 368-373.
- Williams R. A, Blanch H. W. (2011). Covalent Immobilization of protein monolayers for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 8, 77-84.
- Wilson S. A, Jourdain R. P. J. (2007). New materials for microscale sensors and actuators: An engineering review. *Materials Science and Engineering*. 56, 1-29.
- Wolfbeis O. S (1991), *Fibre Optic Chemical Sensors and Biosensors*. CRC Press, Boca Raton, FL, cap. I-II.
- Wolfe C. A. C, Hage D. S. (1995). Studies on the Rate of Antibody Oxidation by Periodate. *Analytical Biochemistry*. 231, 1, 123-130.
- Wong H. M. K, Righini M, Gates J. C, Smith P. G. R, Pruneri V, Quidant R. (2011). On a chip surface Plasmon tweezers. *Applied Physics Letters*. 99 (6) 061107-061103.
- Wood R. W. (1902). On a Remarkable Case of Uneven Distribution of light in a Diffraction Grating Spectrum. *Proc. Phys. Soc. London*. 18, 269-275.
- Xia Y, Whitesides G. (1998). Soft Lithography. Review. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37, 550-575.
- Xiao Y, Isaacs S. N. (2012). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)—not all BSAs are alike. *Journal of Immunological Methods*. 384, (1-2), 148-151.
- Yager P, Domingo G. J, Gerdes J. (2008). Point-of-Care Diagnostics for Global Health. *Annu. Re. Biomed. Eng.* 10, 107-144.
- Yeganeh M. S, Dougal S. M, Polizotti R. S, Rabinowitz. (1995). *P. Phys. Rev. Lett.* 74, 1811.
- Yonzon C. R, Jeoung E, Zou S, Schatz G. C, Mirsch M, Van Duyne R. P. (2004). A Comparative Analysis of Localized and Propagating Surface plasmon Resonance Sensors: The binding of Concanavalin A to Monosaccharide Functionalized Self-Assembled Monolayer. *JACS*. 126, 12669-12676.
- Yu X, Munge B, Patel V, Jensen G, Bhirde A, Gong J. D, Kim S, Gillespie J, Gutkind J. S, Papadimitrakopoulos F, Rusling J. F. (2006). Carbon Nanotube Amplification Strategies for Highly Sensitive Immunosensing of Cancer Biomarkers in Serum and Tissue. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 11199-11205.
- Zhan-Hui W, Gang J. (2004). Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry. *Journal of Immunological Methods*. 285, 237-243.
- Zhao J, Frank B, Burger S & Giessen H. (2011). Large-Area-Quality Plasmonics Oligomers Fabricated by Angle-Controlled Colloidal Nanolithography. *ACS Nano*. 5 (11), 9009-9016.

Zheng S, Choi J. H, Lee S. M, Hwang K. S, Kim S. K, Kim T. S. (2011). Analysis of DNA hybridization regarding the conformation of molecular layer with piezoelectric microcantilevers. *Lab on a Chip*. 11 (1), 63-69

Ziober B, Mauk M. G, Falls E. M, Chen Z, Ziober A. F and Bau H. H. (2008). Lab-on-a-chip for oral cancer screening and diagnosis. *Head and Neck*. 111-121.