



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Biosensado de péptidos β-amiloides basado en
inmunoensayos integrados para el cribado de la
enfermedad de Alzheimer

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Plazas Gómez, Iker

Tutor/a: Tortajada Genaro, Luis Antonio

Cotutor/a: González Martínez, Miguel Ángel

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

INSTITUTO INTERUNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN DE RECONOCIMIENTO
MOLECULAR Y DESARROLLO TECNOLÓGICO

**BIOSENSADO DE PÉPTIDOS β -AMILOIDES BASADO EN
INMUNOENSAYOS INTEGRADOS PARA EL CRIBADO DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TRABAJO DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO ACADÉMICO: 2023-2024

VALENCIA, JULIO 2024

Autor: Iker Plazas Gómez

Tutor: Luis Antonio Tortajada Genaro

Cotutor: Miguel Ángel González Martínez

BIOSENSADO DE PÉPTIDOS β -AMILOIDES BASADO EN INMUNOENSAYOS INTEGRADOS PARA EL CRIBADO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer tienen un alto impacto sanitario, socioeconómico y personal, y su incidencia va en aumento. Sin embargo, la capacidad actual para diagnosticarlas de manera precisa es muy limitada, retrasando su detección y complicando el tratamiento. Actualmente, el diagnóstico clínico se basa en evaluaciones sintomáticas apoyadas en pruebas de neuroimagen y detección de marcadores en líquido cefalorraquídeo. Estas técnicas son de alto coste y naturaleza invasiva, por lo que hay una demanda de nuevas pruebas moleculares.

Este trabajo de fin de grado ha contribuido al desarrollo de un método innovador de biosensado capaz de detectar biomarcadores del Alzheimer en plasma. El método *on-well microarray* está basado en anticuerpos inmovilizados en los pocillos de una placa y detección óptica mediante imágenes digitales. El trabajo se ha llevado a cabo en el contexto del proyecto ProbioA, realizado por los Institutos de investigación IDM de la UPV y el IIS La Fe.

El análisis de las posibles moléculas de interés condujo a la selección de la ratio de concentraciones de dos péptidos β -amiloides (ratio AB_{42}/AB_{40}) como biomarcador. Posteriormente, se desarrollaron inmunoensayos en pocillo para su detección, en un formato de micromatriz con transducción óptica. El intervalo de trabajo alcanzó una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el límite de detección fue 0,01 pg/mL . La reproducibilidad y la selectividad fueron adecuadas, siendo la desviación estándar relativa de ensayos replicados de 15% y la reactividad cruzada inferior al 5%. Por lo tanto, las prestaciones del ensayo cumplieron los requisitos necesarios para la detección de los niveles de concentración de los biomarcadores en suero sanguíneo. Finalmente, se realizó el estudio inicial para su aplicación en muestras biológicas de pacientes.

Los resultados confirmaron que esta tecnología de biosensado puede apoyar al diagnóstico precoz y pronósticar la enfermedad a partir de muestras biológicas poco invasivas. Se estima que este enfoque puede facilitar su implementación en el sistema sanitario como herramienta de cribado poblacional y potencialmente reducir el coste y los riesgos asociados a los métodos de diagnóstico actuales.

Palabras clave: inmunoensayo; enfermedad neurodegenerativa; biomarcador sanguíneo; detección temprana; péptido β -amiloide.

BIOSENSAT DE PÈPTIDS β -AMILOIDES BASAT EN IMMUNOASSAIGS INTEGRATS PER AL CRIBRATGE DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER

Resum

Les malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer tenen un alt impacte sanitari, socioeconòmic i personal, i la seua incidència va en augment. No obstant això, la capacitat actual per a diagnosticar-les de manera precisa és molt limitada, retardant la seua detecció i complicant el tractament. Actualment, el diagnòstic clínic es basa en avaluacions simptomàtiques recolzades en proves de neuroimatgeria i detecció de marcadors en líquid cefalorraquidi. Estes tècniques són d'alt cost i naturalesa invasiva, per la qual cosa hi ha una demanda de noves proves moleculars.

Este treball de fi de grau ha contribuït al desenrotllament d'un mètode innovador de biosensado capaç de detectar biomarcadors de l'Alzheimer en plasma. El mètode *on-well microarray* està basat en anticossos immobilitzats en els pocillos d'una placa i detecció òptica mitjançant imatges digitals. El treball s'ha dut a terme en el context del projecte ProbioA, realitzat pels Instituts d'investigació IDM de la UPV i el IIS La Fe.

L'anàlisi de les possibles molècules d'interés va conduir a la selecció de la ràtio de concentracions de dos pèptids β -amiloides (ràtio AB_{42}/AB_{40}) com biomarcador. Posteriorment, es van desenrotllar immunoassaigs en pocillo per a la seua detecció, en un format de micromatriu amb transducció òptica. L'interval de treball va aconseguir una concentració d'1 $\mu\text{g/ml}$ i el límit de detecció va ser 0,01 pg/ml . La reproducibilitat i la selectivitat van ser adequades, sent la desviació estàndard relativa d'assajos replicats de 15% i la reactivitat creuada inferior al 5%. Per tant, les prestacions de l'assaig van complir els requisits necessaris per a la detecció dels nivells de concentració dels biomarcadores en sèrum sanguini. Finalment, es va realitzar l'estudi inicial per a la seua aplicació en mostres biològiques de pacients.

Els resultats van confirmar que esta tecnologia de biosensado pot fer costat al diagnòstic precoç i pronócticar la malaltia a partir de mostres biològiques poc invasives. S'estima que este enfocament pot facilitar la seua implementació en el sistema sanitari com a ferramenta de cribratge poblacional i potencialment reduir el cost i els riscos associats als mètodes de diagnòstic actuals.

Paraules clau: immunoassaig; malaltia neurodegenerativa; biomarcador sanguini; detecció precoç; pèptid β -amiloide.

INTEGRATED IMMUNOASSAY-BASED BIOSENSING OF AMYLOID- β PEPTIDES FOR ALZHEIMER'S DISEASE SCREENING

Abstract

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease have a significant health, socioeconomic, and personal impact, and their incidence is increasing. However, the current capability for accurate diagnosis is very limited, delaying its detection and complicating its treatment. Currently, clinical diagnosis is based on symptomatic evaluations, supported by neuroimaging tests and the detection of markers in cerebrospinal fluid. These techniques are costly and invasive, creating a demand for new molecular tests.

This undergraduate thesis has contributed to the development of an innovative biosensing method capable of detecting Alzheimer's biomarkers in plasma. The on-well microarray method is based on antibodies immobilized on the wells of a plate and the optical detection through digital imaging. The work was carried out in the context of the ProbioA project, conducted by the IDM research institutes of UPV and IIS La Fe.

The analysis of potential molecules of interest led to the selection of the ratio of concentrations for two amyloid- β peptides (AB_{42}/AB_{40} ratio) as a biomarker. Subsequently, well-based immunoassays were developed for its detection, in a microarray format with optical transduction. The working range reached a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the limit of detection was 0.01 pg/mL . The reproducibility and selectivity were adequate, with a relative standard deviation for assay's replicates of 15% and cross-reactivity below 5%. Therefore, the assay performance met the necessary requirements for detecting the biomarker's concentration in blood serum. Finally, an initial study for its application in biological samples from patients was conducted.

The results confirmed that this biosensing technology can support early diagnosis and predict the disease from minimally invasive biological samples. It is estimated that this approach could facilitate its implementation in the healthcare system as a population screening tool and potentially reduce the cost and risks associated with current diagnostic methods.

Keywords: immunoassay, neurodegenerative disease, blood biomarker, early diagnosis, amyloid- β peptide.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mis padres por darme alas y dejarme volar (incluso en la distancia sois viento bajo mis alas), y a mis abuelos por darme un segundo nido al cual volver.

Quiero darles las gracias a mis tutores por darme la oportunidad de trabajar en este grupo, y en especial a Luis Tortajada por brindarme el apoyo y la paciencia que he necesitado durante el transcurso de este trabajo. Gracias a los compañeros del 5M, por acompañarme tanto en las comidas en el césped como en las tardes largas en la bancada del laboratorio. Gracias por estar ahí en los días de estrés y fatiga del TFG.

Finalmente tengo que agradecer a todos aquellos que me han estado ahí a lo largo de este camino. A toda mi familia, en especial mi tía Erika por transmitirme su amor por la ciencia. A los amigos que dejé atrás en Venezuela y en Madrid pero que nunca me han dejado atrás a mí. A los amigos que me ha traído la carrera, gracias por darme la motivación que necesitaba para afrontar el día a día de la carrera.

Espero poder devolveros todo el apoyo que me habéis dado.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Enfermedad de Alzheimer (EA).....	1
1.2.	Diagnóstico de la EA.....	5
1.3.	Diagnóstico molecular de la EA.....	7
1.4.	Biosensado de marcadores moleculares de la EA.....	12
1.5.	Reto científico.....	14
2.	OBJETIVOS	16
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1.	Reactivos.....	17
3.2.	Biotinilación del anticuerpo anti- β -Amiloide 1-16	17
3.3.	Muestras.....	17
3.4.	Protocolo ELISA.....	18
3.5.	Protocolo <i>on-well</i>	19
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1.	Selección de biomarcadores de la EA	21
4.2.	Análisis estructural de los biomarcadores	22
4.3.	Puesta a punto del formato ELISA convencional.....	24
4.4.	Puesta a punto del formato <i>on-well</i>	26
4.5.	Prestaciones del formato <i>on-well</i>	27
4.6.	Determinación de biomarcadores en sueros humanos	29
4.7.	Análisis comparativo de tecnologías.....	32
5.	CONCLUSIONES	35
6.	BIBLIOGRAFÍA	36
	ANEXO 1.....	40

LISTADO DE ABREVIATURAS

αAB16	Anticuerpo anti- β -Amiloide 1-16
αAB40	Anticuerpo anti- β -Amiloide 1-40
αAB42	Anticuerpo anti- β -Amiloide 1-42
βA	Péptido β -amiloide
AAC	Angiopatía amiloide cerebral
AB₄₀	β -Amiloide 1-40
AB₄₂	β -Amiloide 1-42
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína de membrana precursora del β -amiloide
CB	Tampón de recubrimiento
COGVAL	Grupo de Neurología Cognitiva de la Sociedad Valenciana de Neurología
EA	Enfermedad de Alzheimer
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HRP	Peroxidasa de rábano picante
LCR	Líquido cefaloraquídeo
LOD	Límite de detección
MRI	Imagen por resonancia magnética
NfL	Cadena ligera de neurofilamentos
NFTs	Ovillos neurofibrilares intraneuronales
OMS	Angiopatía amiloide cerebral
OPD	Diclorhidrato de o-fenilendiamina
PBS	Tampon fosfato salino
PBST	Tampón PBS con tensoactivo Tween-20
PET	Tomografía por emisión de positrones
POC	<i>Point of care</i>
PS	Placas seniles extraneuronales
PSEN1	Gen de la presenilina 1
PSEN2	Gen de la presenilina 2
SIMOA	<i>Single-molecule array</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de la EA según los datos del Ministerio de Sanidad	4
Tabla 2. Comparativa de los principales biomarcadores en plasma sanguíneo de la enfermedad de Alzheimer	21
Tabla 3. Secuencias peptídicas de los péptidos amiloides estudiados	22
Tabla 4. Comparativa de las prestaciones de los métodos ensayados en el TFG aplicados al diagnóstico de EA en muestras de plasma sanguíneo	32
Tabla 5. Comparativa de pruebas diagnósticas recientes para la detección de marcadores sanguíneos en la enfermedad de Alzheimer	33

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema comparativo de la estructura fisiológica del cerebro y neuronas en personas sanas (izquierda) y pacientes con EA (derecha). Adaptada de Breijyeh & Karaman (2020).....	2
Figura 2. Esquema comparativo de las rutas de procesamiento de la APP: A) Ruta no amiloidogénica y B) Ruta amiloidogénica. Figura tomada de Knopman et al., (2021).	2
Figura 3. Mapa de prevalencia y progresión esperada para los casos de demencia, elaborado con las predicciones de la <i>Alzheimer's Disease International</i> (2024).	4
Figura 4. Representación esquemática de las pruebas diagnósticas de la EA. Elaboración propia.	6
Figura 5. Esquema de biomarcadores relevantes y su mecanismo patológico asociado a la EA. Adaptado de Marcucci & Kleiman, (2021).....	8
Figura 6. Fluidos biológicos con interés diagnóstico para la EA. Adaptada de Jain & Sathe (2021).....	11
Figura 7. Representación esquemática del proceso de detección y componentes de un biosensor.....	13
Figura 8. Representación gráfica del proceso de toma y almacenamiento de las muestras de plasma sanguíneo proporcionadas por el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, previo a su análisis en el instituto IDM de la UPV.	18
Figura 9. Tecnología de micromatrices proteicas: A) Representación esquemática de la matriz impresa en una superficie polimérica de un pocillo. B) Imagen del dispensador de microgotas AD-1500 Biodot.....	19
Figura 10. Ejemplo de la lectura del método <i>on-well microarray</i> con cámaras digitales tipo <i>smartphone</i>	20
Figura 11. Predicción mediante AlphaFold de la estructura 3D y gráficos EPE asociados: A) monómero AB ₄₀ , B) monómero AB ₄₂ , C) AB ₄₀ agregado y D) AB ₄₂ agregado	23
Figura 12. Representación gráfica de los inmunoensayos no competitivos de detección de los fragmentos peptídicos de la proteína humana β -Amiloide: aminoácidos 1-40 (A) y aminoácidos 1-42 (B). Elaboración propia.	24
Figura 13. Optimización del inmunoensayo ELISA convencional: (A) Absorbancia en función de la concentración de anticuerpo de tapizado anti- β -Amiloide 1-42 y de anticuerpo de revelado anti- β -Amiloide 1-16; (B) Absorbancia en función de la concentración de agente de	

revelado (HRP: peroxidasa de rábano picante). Analito: péptido AB ₄₂ a 5 µg/L. Número de replicas: 2.	25
Figura 14. A) Descripción gráfica del método <i>on-well microarray</i> . B) Ejemplo de una imagen digital registrada tras realizar el inmunoensayo, observándose las matrices de puntos 3x3 en cada pocillo, cuya intensidad es proporcional a la concentración del biomarcador presente.	26
Figura 15. Ensayo de optimización del método <i>on-well microarray</i> , mostrando la señal relativa de los puntos para el anticuerpo de captura anti-β-Amiloide 1-42 a tres concentraciones en función de la concentración de estreptavidina-HRP. Número de replicas: 3.	27
Figura 16. Rectas de calibración del método <i>on-well microarray</i> : A) péptido AB ₄₀ y B) péptido AB ₄₂ . LOD: señal asociada al límite de detección, obtenida a partir de 5 réplicas del blanco. Número de réplicas: 3.	28
Figura 17. Formato multiplexado del ensayo para tres biomarcadores proteicos. A) Representación esquemática de la micromatriz 3x3. B) Ensayo de selectividad de los anticuerpos anti-β-Amiloide 1-40, anti-β-Amiloide 1-42 y anti-Tau contra el péptido AB ₄₂ en el intervalo 0,01 pg/mL a 1 mg/L. Numero de réplicas: 3.	29
Figura 18. Estudio del efecto matriz del plasma sanguíneo para el péptido AB ₄₂ . Número de replicas: 3.	30
Figura 19. Imágenes obtenidas para disoluciones del péptido AB ₄₂ en el intervalo 0,1 pg/mL, a. A) Dilución en PBST. B) Dilución en 5% (v/v) de plasma. 1: 1000 µg/L, 2: 100 µg/L, 3: 10 µg/L, 4: 1 µg/L, 5: 0,1 µg/L, 6: 0,01 µg/L.	31

1. INTRODUCCIÓN

La demencia, del latín *de* (alejado) y *mentis* (mente), es un término general que describe un conjunto de síntomas causados por afecciones cerebrales. Estas afecciones están caracterizadas por el detrimento de las capacidades ocupacionales o sociales del paciente, motivadas por un deterioro persistente de la memoria asociado a la pérdida de funciones intelectuales, como el lenguaje, la personalidad o la cognición (Ellison et al., 2013). La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común, representando entre el 50 y 75% de los casos totales (Alzheimer's Disease International, 2024). Y a medida que la población mundial envejece se está posicionando como una de las enfermedades más caras, letales y exigentes para los cuidadores, que suelen ser familiares y personal sanitario.

1.1. Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA comienza su etapa clínica con una fase prodrómica en la que aparecen los primeros síntomas de deterioro cognitivo moderado y pérdida de memoria sutil. A medida que la enfermedad progresa, diferentes funciones corticales se ven alteradas, afectando la vida cotidiana de los pacientes, hasta volverse completamente dependientes en los estadios finales. La esperanza de vida actual, tras la aparición de los primeros síntomas, es de 5 a 8.5 años. No obstante, se estima que, de manera previa a la aparición de deterioro cognitivo leve, momento en que se realiza el diagnóstico clínico, la enfermedad ya ha estado desarrollándose durante 10 ó 12 años en una fase preclínica (García-Morales et al., 2021). Esta fase preclínica del EA se reconoce como una etapa celular en la que alteraciones en las neuronas, la microglía y astrogliá conducen a la progresión de la enfermedad antes de la presencia de síntomas cognitivos (Scheltens et al., 2021a).

La mayor proporción de casos de la EA pertenecen a lo que se denomina subtipo esporádico, del cual se desconoce la causa clara de su etiología. No obstante, se han identificado factores de riesgo como la presión sanguínea elevada, el sobrepeso e hipercolesterolemia, llevar una vida sedentaria, tabaquismo, baja actividad intelectual, así como afecciones como la diabetes mellitus y la hiperinsulinemia. La EA familiar, debida a causas genéticas heredables, representa menos del 3% de todos los subtipos, y está caracterizada por un desarrollo temprano de la enfermedad (10-12 años antes) comparado con las formas esporádicas (García-Morales et al., 2021).

1.1.1. Biología de la EA

El neurólogo Alois Alzheimer describió en 1906 los que hasta ahora se mantienen como sellos distintivos de la enfermedad de Alzheimer respecto a otras demencias, representados en la Figura 1. Éstos son la presencia de placas seniles extraneuronales (PS) y ovillos neurofibrilares intraneuronales (NFTs), acompañados de atrofia cerebral severa del hipocampo y córtex entorrinal (García-Morales et al., 2021). Actualmente se conoce que las PS se forman por depósitos del péptido β -amiloide (β A), un péptido de entre 39 y 46 aminoácidos, derivado del corte proteolítico de la proteína de membrana precursora del β -amiloide (APP), una de

las proteínas más abundantes del sistema nervioso. Así mismo, los NFTs están formados por filamentos helicoidales cuyo principal componente es la proteína tau, con otros elementos proteicos decorando los filamentos. La proteína tau también está implicada en la formación de neuritas distróficas e hilos de Neurofil que distorsionan la actividad neuronal (Ellison et al., 2013).

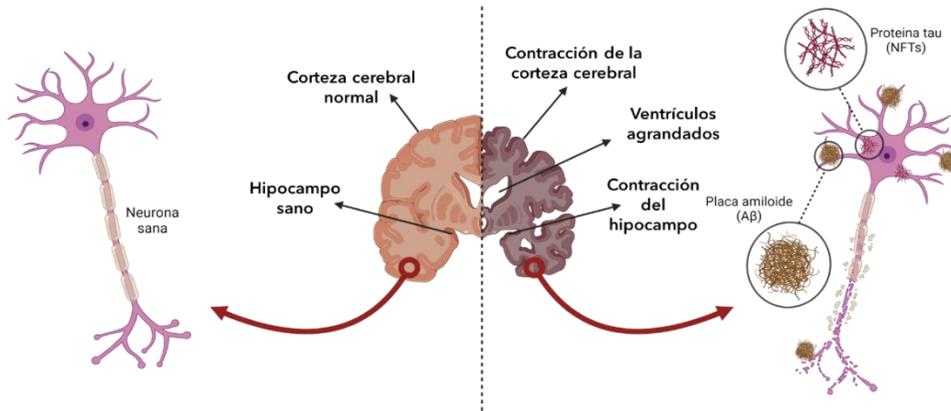


Figura 1. Esquema comparativo de la estructura fisiológica del cerebro y neuronas en personas sanas (izquierda) y pacientes con EA (derecha). Adaptada de Breijyeh & Karaman (2020).

En individuos sanos, el procesamiento de la APP se realiza preferentemente mediante la ruta no amiloidogénica (sin formación del péptido β A) mediada por las γ - y α -secretasas. Los componentes catalíticos de estas secretasas son las presenilinas, codificadas por los genes *PSEN1* o *PSEN2*, descrito en la Figura 2A. En individuos con EA, el corte proteolítico es realizado por los complejos β - y γ -secretasas, formando tres productos peptídicos, uno de los cuales es el β A, descrito en la Figura 2B. Los monómeros del β A son finalmente liberados al espacio extraneuronal donde forman oligómeros que acaban dando las PS, siendo éste el primer sello distintivo observable de la EA.

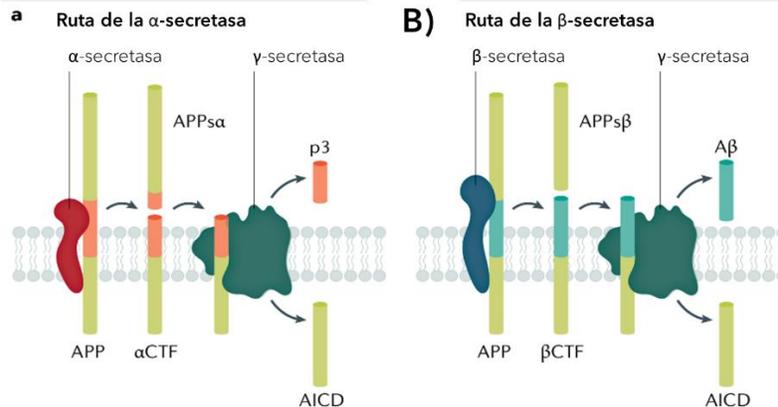


Figura 2. Esquema comparativo de las rutas de procesamiento de la APP: A) Ruta no amiloidogénica y B) Ruta amiloidogénica. Figura tomada de Knopman et al., (2021).

Entre las posibles isoformas del β A, el AB_{40} y AB_{42} (40 y 42 aminoácidos respectivamente) son las más comunes. El péptido 42 presenta mayor facilidad para formar fibrillas y producir, disrupción de la sinapsis y degeneración neuronal, a altos niveles (García-Morales et al., 2021a). El AB_{40} genera la denominada angiopatía amiloide cerebral (AAC), un subtipo de patología β -amiloide frecuente en personas que padecen EA. La AAC reduce la irrigación sanguínea en el tejido cerebral debido a la acumulación de este péptido en arterias cerebrales y leptomeningeas.

La proteína tau es una proteína pequeña de unión a microtúbulos, común en el sistema nervioso central y periférico. Esta proteína se encuentra de forma abundante en los axones, donde los microtúbulos predominan: dichos microtúbulos juegan un rol importante en la estructura de las neuronas, el transporte en los axones y la plasticidad sináptica neuronal. La fosforilación inadecuada o la hiperfosforilación de la proteína tau afectan la estructura de los microtúbulos y las estructuras celulares sinápticas que dependen de éstos, causando alteraciones celulares que llevan a la pérdida de la sinapsis y de las ramificaciones neuronales, lo que finalmente conduce a la muerte celular. Además, las proteínas tau fosforiladas promueven la fosforilación de otras proteínas tau, esparciéndose por dentro y hacia otras neuronas mediante las sinapsis neuronales formando las NFTs. La hiperfosforilación de la proteína tau comienza en el córtex entorrinal y progresa hacia el hipocampo, de forma localizada, ambas zonas relacionadas con la memoria (García-Morales et al., 2021).

1.1.2. Hipótesis amiloidogénica de la EA

Si bien la EA familiar no es el subtipo más común de esta enfermedad, la detección de los genes implicados en su heredabilidad es sencilla, permitiendo estudiar agentes biológicos posiblemente implicados en la etiología de la enfermedad. La EA autosomal familiar dominante es causada por mutaciones en los genes APP, PSEN1 y PSEN2, todos ellos relacionados en el proceso de producción de β A. Mutaciones en estos genes conducen a una aceleración en la acumulación de las placas β -amiloides, causando demencia precoz, AAC o ambos. Sumando que las PS aparecen temporalmente antes que el resto de los elementos, esto llevó a distintos científicos en la década de los 90s, como Hardy y Higgins, a presentar la *hipótesis de la cascada amiloide* o *hipótesis amiloidogénica* (Musiek & Holtzman, 2015), que define a la β A como elemento causal de la EA, de manera que las NFTs, la muerte neuronal, el daño vascular y la demencia se desarrollan como resultado directo de la sedimentación de la β A.

Esta hipótesis está revisándose porque son las NFTs la característica neuropatológica que mejor se correlaciona con el deterioro cognitivo, tanto temporalmente como a nivel anatómico (García-Morales et al., 2021a). De hecho, individuos con una importante carga de PS pueden presentar una cognición normal (Herrup, 2015). Además, los estudios de terapia inmune orientada a reducir las PS en pacientes con EA demuestran reducción de las placas, pero no mejoran la capacidad cognitiva de los pacientes (Herrup, 2015). Por contra, el análisis del factor de riesgo genético asociado al gen de la apolipoproteína E (*APOE*) indica una clara implicación en el metabolismo y la sedimentación de β A (Musiek & Holtzman, 2015).

Pese a la polémica, la *Food and Drug Administration* (FDA) de los EE. UU. aprobó dos nuevos medicamentos considerados como “modificadores de la enfermedad” mediante el *accelerated approval pathway* (Behl, 2023). Éstos promueven la eliminación de las placas β -amiloides mediada por el sistema inmune.

1.1.3. Problemática de la EA

En el 2020 se estimó que había entre 50 y 55 millones de personas con demencia en el mundo, y se prevé que, en el 2050 alcance entre 139 y 152 millones, según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de *Alzheimer’s Disease International*. La EA representa entre el 50 y el 75% de los casos totales de demencia (Alzheimer’s Disease International, 2024). El crecimiento abrupto de la EA se relaciona con el envejecimiento de la población mundial, especialmente a partir de los 65 años, cuando la prevalencia de la enfermedad se duplica cada cinco años (Herrup, 2015). Esta tendencia se puede ver en la población española de acuerdo con los datos recogidos en la Tabla 1, presentados el “Plan Integral de Alzheimer y otras Demencias (2019-2023)”.

Tabla 1. Prevalencia de la EA según los datos del Ministerio de Sanidad

Edad (años)	Prevalencia (%)
40-65	0,05
65-69	1,07
70-74	3,4
75-79	6,9
80-84	12,1
85-89	20,1
Mayores de 90	39,2

Según la OMS, el Alzheimer (junto con otras demencias) se posicionó en 2019 como la séptima causa de muerte más común en el mundo y su media de supervivencia fue de unos 6.2 años tras su diagnóstico (Scheltens et al., 2021), previéndose un aumento relativo de la incidencia en países de ingresos bajos y medios como se observa en la Figura 3 (Alzheimer’s Disease International, 2024).

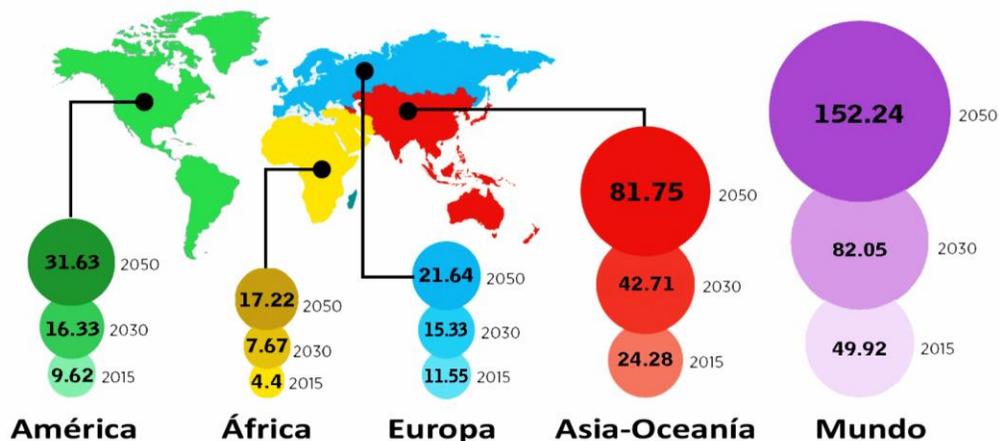


Figura 3. Mapa de prevalencia y progresión esperada para los casos de demencia, elaborado con las predicciones de la *Alzheimer’s Disease International* (2024).

Entre 2010 y 2015 el costo mundial del tratamiento de la EA pasó de 604 mil millones de dólares americanos (USD\$) a 818 mil millones USD\$ y llegó a 1.3 billones USD\$ en 2019. De manera que el coste anual para atender a un paciente ronda entre los 3.000 y los 6.000\$ (García-Morales et al., 2021). Sin embargo, esta cifra aumenta en países desarrollados como España. Según un estudio realizado por la Confederación Española de Alzheimer y otras demencias (CEAFA), el coste medio anual del cuidado de una persona con Alzheimer es de 31.890€, siendo los costes médicos directos casi un cuarto de esta cifra. Este coste afecta a los sistemas sanitarios; en España esta enfermedad es responsable del 11,9% de los años vividos con discapacidades debidas a enfermedades crónicas, según datos del Ministerio de Salud.

A esto se suma el impacto económico en las familias de las personas afectadas. De acuerdo con lo recogido en el "Plan Integral de Alzheimer y otras Demencias (2019-2023)", el 30% de los cuidadores se han visto obligados a hacer ajustes pertinentes para poder combinar la actividad laboral con el cuidado familiar, y de éste total, el 12% ha tenido que dejar de trabajar, y un porcentaje mayor ha optado por la reducción de la jornada laboral. Hay que tener en cuenta, además, que se trata de una enfermedad de larga duración. Para un individuo de 70 años, la etapa preclínica se estima en 10 años, 4 años más para la fase prodrómica y 6 años para la fase de demencia aguda de la EA hasta que se produce la muerte, dando un total de 20 años de desarrollo de la enfermedad (Scheltens et al., 2021).

Respecto a la prevalencia e incidencia de la EA, los datos del Ministerio de Sanidad apuntan a una posible subestimación debido a que la mayor parte de los diagnósticos se realizan en sus fases avanzadas. Se calcula que entre el 50% y 70% de los casos detectados en estudios poblacionales están sin diagnosticar en los sistemas de salud. Además, una detección temprana generalmente permite que los tratamientos sean más efectivos, pero las actuales herramientas de diagnóstico identifican en muchas ocasiones la enfermedad sólo en estados avanzados. Por tanto, surge la urgencia de generar nuevos sistemas de determinación de los biomarcadores como respuesta a la necesidad de diagnóstico precoz, estimar correctamente el número de pacientes y mejorar el seguimiento de estos. Dichos sistemas moleculares deben ser más refinados y capaces de identificar de forma temprana, es decir, durante la fase preclínica.

1.2. Diagnóstico de la EA

En sus inicios, los pacientes se identificaban cuando presentaban síntomas clínicos de demencia y sólo se confirmaba en las autopsias o biopsias (Breijyeh & Karaman, 2020). Pero, con los avances en el conocimiento de la enfermedad se han desarrollado diferentes técnicas diagnósticas, resumidas en la Figura 4. Actualmente, se basa mayoritariamente en patrones clínicos (García-Morales et al., 2021), que presentan una aceptable sensibilidad (66%-98%) pero muy limitada especificidad (23%-75%).

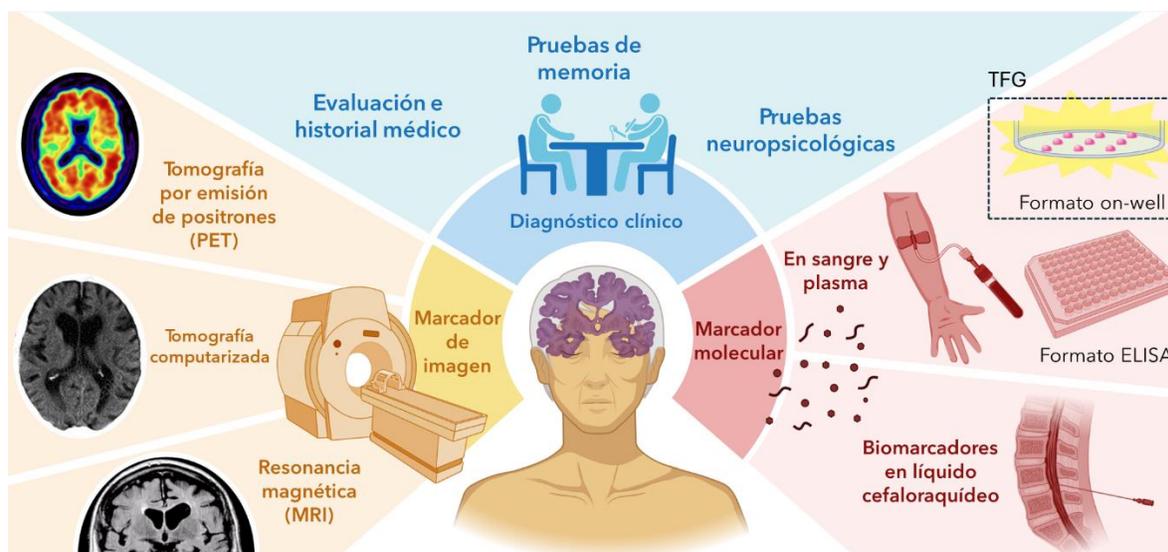


Figura 4. Representación esquemática de las pruebas diagnósticas de la EA. Elaboración propia.

1.2.1. Evaluación neuropsicológica

De acuerdo con los criterios del *National Institute of Neurological and Communicative Disorders* y la *Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) para el diagnóstico de la EA se establece que, además de el examen clínico pertinente, es necesario su confirmación con una evaluación neuropsicológica de deterioro cognitivo. Existen diferentes pruebas que son recomendadas por el Grupo de Neurología Cognitiva de la Sociedad Valenciana de Neurología (COGVAL, 2017).

Valoración cognitiva: Existen distintos tests como el Mini-Mental State Examination (MMSE) o el Montreal Cognitive Assessment (MoCA), los cuales pueden ser usados por personal no especializado, siendo el MoCA más sensible que el MMSE (Porsteinsson et al., 2021). Otras pruebas son el "Test de los 7 minutos" o el *Clock Drawing Test* (TDR).

Valoración funcional: Identifican cambios en la funcionalidad diaria de los pacientes mediante la evaluación de las actividades instrumentales de la vida diaria, como cocinar, comparar o manejar finanzas (Porsteinsson et al., 2021). Las pruebas son Global Deterioration Scale (GDSa), que se complementa con el Functional Assessment Staging (FAST), y el Clinical Dementia Rating, propuesta por la Universidad de Washington.

Valoración conductual: Se relaciona con los síntomas neuropsiquiátricos como la apatía, la depresión (en alrededor del 50% de pacientes), la ansiedad y las ideas delirantes. Tanto la Geriatric Depression Scale (GDSb) como el Neuropsychiatric Inventory Questionnaire (NPI-Q) se pueden usar para evaluarlos en cuadros tempranos de EA (Porsteinsson et al., 2021).

1.2.2. Diagnóstico con biomarcadores

Se ha demostrado que los biomarcadores específicos de la EA ayudan a establecer niveles de certeza para esta patología (Knopman et al., 2021). La *Alzheimer's Association* estimó en un estudio que este diagnóstico temprano, posibilitado por el uso de biomarcadores, podría ahorrar unos 7 billones de USD\$ asociados al tratamiento y cuidado de pacientes con deterioro cognitivo agudo (Porsteinsson et al., 2021). El interés por esta estrategia está

resaltado por las recientes directrices publicadas por la FDA, así como el intento de comercialización de pruebas de riesgo, como el PrecivityAD™ (C2N diagnostics) o como la prueba AD-Detect™ (Diagnostic Quest) que es cubierta por ciertos planes de seguro médico en EE. UU (Kirmess et al., 2021).

En el 2016, en vista del desarrollo del campo de los biomarcadores del Alzheimer, el *International Working Group (IWG)* junto con el *National Institute on Aging* y la *Alzheimer's Association* (NIA-AA) establecieron un marco diagnóstico para la enfermedad preclínica basado en la *presencia in-vivo* de ciertos biomarcadores, como β A y proteína tau (Dubois et al., 2021; Scheltens et al., 2021). En 2018, la NIA-AA hizo el intento de establecer un marco de diagnóstico exclusivamente biológico, aplicable a niveles asintomáticos y sintomáticos de la enfermedad. El modelo ATN, propuesto por Clifford R. Jack Jr. et al. agrupaba los biomarcadores en tres: A (amiloides), T (tau fosforilada) y N (neurodegeneración).

No obstante, el modelo ATN sufre de varios defectos que limitan su aplicación en un contexto clínico generalizado (Dubois et al., 2021; Scheltens et al., 2021). Así, en el 2021 el IWG recomendó que la diagnosis de la EA fuera mixta, es decir clínica-biológica, requiriendo la presencia del fenotípico clínico del Alzheimer y además la evidencia positiva de biomarcadores patológicos de la EA (β A y tau).

1.2.3. Pasos del diagnóstico rutinario

El diagnóstico de la EA suele comenzar con una evaluación clínica en atención primaria, cuando un miembro de la familia o un profesional de la salud expresa preocupaciones sobre el deterioro o disfunción cognitiva en el paciente (Knopman et al., 2021). De acuerdo con lo expuesto por Porsteinsson et al. (2021), esta evaluación incluye el establecimiento de un historial médico para identificar factores de riesgo, que comprende los antecedentes familiares de EA u otras demencias en parientes cercanos. También se aconseja evaluar otros factores de riesgo como la edad, el sexo femenino, el estado de ApoE, baja educación, diabetes y obesidad. Se recomienda revisar la medicación del paciente para descartar medicamentos que pudieran causar impedimento cognitivo. Además, se debe realizar un examen físico y pruebas sanguíneas para identificar condiciones médicas que impliquen comorbilidad o causas reversibles de deterioro cognitivo. Por ejemplo, los niveles de vitamina B12 se evalúan para descartar la deficiencia como posible causa patológica (Breijyeh & Karaman, 2020; Knopman et al., 2021). Finalmente, se realizan pruebas específicas para el diagnóstico, incluyendo la evaluación neuropsicológica, el diagnóstico mediante imagen cerebral o basado en marcadores en fluidos.

1.3. Diagnóstico molecular de la EA

1.3.1. Biomarcadores asociados

De modo genérico, un biomarcador es un elemento biológico que se puede medir o cuantificar con exactitud y que puede servir de indicador de un proceso biológico o patológico. Este término se usa para aludir a moléculas biológicas, analitos, que se pueden detectar de forma cuantitativa o semicuantitativa. Un biomarcador puede ser utilizado para

evaluar procesos fisiológicos normales dentro del cuerpo, procesos patológicos o la respuesta farmacológica a una intervención médica. Desempeñan un rol valioso en los algoritmos diagnósticos de muchas enfermedades, así como en la evaluación de su progresión y posible recurrencia (Marcucci & Kleiman, 2021). La mayoría de los analitos usados como biomarcadores pertenecen a tres grupos básicos de moléculas: proteínas, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas (Petryayeva & Algar, 2015). En la Figura 5 se recogen algunos de los biomarcadores más relevantes en la EA.

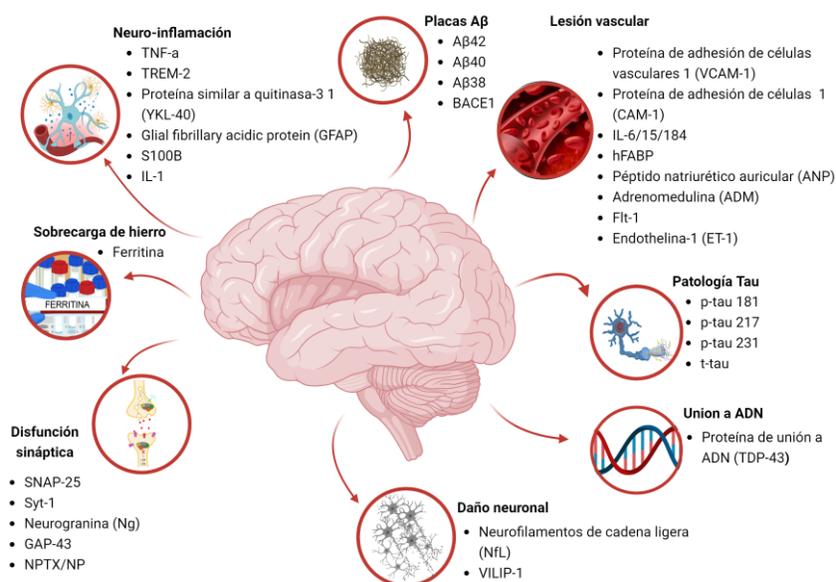


Figura 5. Esquema de biomarcadores relevantes y su mecanismo patológico asociado a la EA. Adaptado de Marcucci & Kleiman, (2021).

En la EA, Breijyeh y Karaman (2020) definen dos grandes grupos de biomarcadores:

- ❑ Marcadores relacionados con la patología amiloide, pudiéndose detectar en el líquido céfalo raquídeo (LCR) y combinado con imágenes estructurales, como la tomografía por emisión de positrones (PET)
- ❑ Marcadores de lesiones neuronales como la proteína tau en fluidos (patología de tau), y la detección de atrofia cerebral mediante la PET con el análogo de glucosa, fluorodeoxiglucosa, (FDG-PET) o la imagen por resonancia magnética (MRI).

Recientes estudios proponen nuevos biomarcadores como serotonina, fenilalanina, lisina, fosfatidilcolina, acilcarnitina o prolina, asociados con una peor evolución de la enfermedad (García-Morales et al., 2021a). Otros autores destacan desregulaciones en elementos esenciales como el zinc, cobre iónico, hierro y selenio como agentes importantes en la etiología de la enfermedad (Lei et al. (2021)). Otros biomarcadores descritos incluyen marcadores vasculares como la proteína de adhesión de células vasculares 1 (VCAM1) o la ICAM1; citoquinas y mediadores de inflamación como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) o la proteína 1 similar a la quitinasa-3 (YKL40); y metabolitos, siendo especialmente relevantes los del metabolismo del colesterol y ácidos grasos y los del metabolismo de aminoácidos (Marcucci & Kleiman, 2021).

La relevancia de los marcadores genéticos también ha crecido, proponiendo mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* en la EA hereditaria; también se han investigado más de 600 genes como potenciales factores de riesgo para la EA esporádica (Knopman et al., 2021). Sims et al. (2020) señalan la existencia de unos 50 *loci* estrechamente asociados con la etiología de la enfermedad implicados en procesos de inmunidad, endocitosis, transporte de colesterol y ubiquitinación, y en el procesamiento del β A y la proteína tau. De todos ellos, el polimorfismo en el gen *APOE* es el mayor factor de riesgo de la EA esporádica en mayores de 65 años (Knopman et al., 2021). El alelo ϵ 4 de este gen en heterocigosis aumenta el riesgo de EA hasta por cuatro y en homocigosis hasta por doce (Musiek & Holtzman, 2015).

Por otra parte, la detección de estos analitos biológicos en fluidos distintos al LCR ha crecido en importancia. Existen grandes esfuerzos para su detección en sangre y plasma sanguíneo, así como en secreción salivar o en orina (Marcucci & Kleiman, 2021).

Sin embargo, establecer umbrales diagnósticos binarios para estos marcadores es complicado, ya que en muchos casos no refleja la naturaleza continua y gradual de los mismos; más aún cuando son marcadores que aparecen de manera inherente al proceso de envejecimiento, varían en el curso de la enfermedad y no están adecuadamente estandarizados (Dubois et al., 2021). Un claro ejemplo es la existencia de resultados discordantes entre pruebas del LCR y de neuroimagen o los casos de formación de depósitos β A sin neurodegeneración. Por tanto, los expertos y las últimas pautas de la NIA-AA, adoptadas por el COGVAL (2017), recomiendan evaluar de manera aditiva la información proporcionada por cada biomarcador, contextualizarla en el historial clínico del paciente y, en caso de ausencia de síntomas de deterioro cognitivo, usarlos como marcadores de riesgo y no como marcadores de diagnóstico (Dubois et al., 2021; Porsteinsson et al., 2021).

1.3.2. Evaluación combinada con imágenes estructurales

La evaluación de imágenes estructurales del cerebro en el diagnóstico de la EA sirve, no sólo para detectar posible atrofia cerebral, sino también para excluir otras posibles patologías cerebrales que generen deterioro cognitivo, y evaluar si pueden ser corregidas mediante intervención quirúrgica (Porsteinsson et al., 2021). Las modalidades más comunes para realizar la evaluación estructural incluyen la FDG-PET y la MRI. La FDG-PET permite detectar regiones cerebrales con metabolismo de glucosa reducido, indicando una posible neurodegeneración en dichas zonas. No obstante, esta técnica no es recomendada para realizar diagnosis preclínica de la EA (Porsteinsson et al., 2021). En cuanto al MRI, permite la identificación de cambios anatómicos en el cerebro y presenta dos modalidades: MRI estructural y funcional. La MRI estructural permite determinar la reducción de la materia gris en el hipocampo mediante análisis volumétricos, mientras que el MRI funcional analiza la conectividad del cerebro de manera anatómica, midiendo la difusión de protones (García-Morales et al., 2021)

Los avances recientes en biomarcadores de imagen han permitido la incorporación de marcadores específicos de la EA mediante PET. El marcador que destaca en esta modalidad

de PET es el β A, siendo éste el único recomendado por la Alzheimer's Association como apoyo en la diagnosis de la EA. El PET amiloide se realiza usando trazadores que se unen de manera específica a la β A y a las PS como florbetapir, flutemetamol, florbetaten que han recibido aprobación por parte de la FDA y la EMA, de manera que se venden comercialmente (Knopman et al., 2021; Porsteinsson et al., 2021). En estadios avanzados, la patología de tau se puede observar mediante trazadores como ^{18}F -THK523, ^{11}C -PBB3 y ^{18}F -flortaucipir (Dubois et al., 2021; García-Morales et al., 2021). No obstante, la presencia positiva de estos marcadores en imágenes cerebrales no implica un diagnóstico positivo de la EA, sobre todo al no existir umbrales consensuados para los distintos trazadores (Dubois et al., 2021).

1.3.3. Diagnóstico molecular en LCR

La concentración de proteínas del LCR se obtienen mediante punción lumbar y reflejan las tasas de producción y eliminación proteica en un momento dado. Presenta una sensibilidad mayor al 95% y especificidad mayor del 85% (Porsteinsson et al., 2021). Destacan que en individuos con EA se observan variaciones en los niveles de la proteína tau y beta-amiloideas (Marcucci & Kleiman, 2021).

La proteína tau fosforilada en la posición 181 (p-tau181) se considera como un marcador específico, mientras que la t-tau se considera como un marcador general de neurodegeneración (Scheltens et al., 2021). La p-tau181 parece correlacionarse sólo de manera moderada con la presencia de NFTs, pero de manera elevada con la t-tau en el LCR y específicamente en pacientes con EA y no en otras enfermedades neurodegenerativas (Scheltens et al., 2021). Por tanto, algunos autores recomiendan sólo la determinación de la tau fosforilada debido a recelos acerca de una baja especificidad de la t-tau, ya que su concentración también se ve aumentada en otras neuropatías (Dubois et al., 2021; Porsteinsson et al., 2021).

En cuanto a la evaluación de la patología amiloide mediante LCR, su presencia se asocia con baja concentración de AB_{42} o un incremento en la ratio $\text{AB}_{40}/\text{AB}_{42}$. Este último marcador es preferido a la evaluación simple de AB_{42} ya que ayuda a normalizar los valores de concentración resultantes de la variación entre individuos (Dubois et al., 2021; Knopman et al., 2021).

La evaluación de marcadores en LCR, en comparación con las técnicas de neuroimagen PET, reduce los costos y permite el estudio simultáneo de ambos marcadores (Dubois et al., 2021). Además, se detectan mucho antes de que se presenten los síntomas clínicos y es más precoz que el PET (Porsteinsson et al., 2021). Sin embargo, muchos pacientes muestran aprensión hacia el dolor y posibles efectos adversos asociados a la punción lumbar (Dubois et al., 2021).

1.3.4. Diagnóstico molecular en otros fluidos

El elevado coste asociado a los exámenes PET y la naturaleza invasiva del análisis de muestras de LCR limitan su interés y aplicabilidad en la práctica clínica, en especial en países de bajos recursos. De aquí que existe un relevante interés por el estudio de biomarcadores en otros fluidos biológicos tales como saliva, orina y sangre (Figura 6). En saliva, hay evidencia de

variaciones de los niveles de cortisol en pacientes con EA respecto a controles sanos (Marcucci & Kleiman, 2021), y se están estudiando técnicas de detección de AB₄₂ y tau fosforilada (García-Morales et al., 2021). En orina, se han identificado patrones en marcadores de estrés oxidativo como la 8-hidroxi-2-deoxi-guanosina (8OHdG), un biomarcador de daño oxidativo en el ADN, e isoprostanos y neuroprostanos, compuestos de la peroxidación de ácidos grasos (Marcucci & Kleiman, 2021).

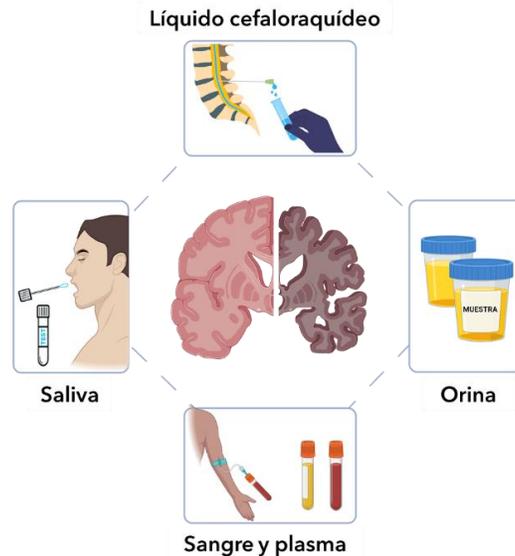


Figura 6. Fluidos biológicos con interés diagnóstico para la EA. Adaptada de Jain & Sathe (2021)

Los marcadores sanguíneos reportados (Marcucci & Kleiman, 2021; Teunissen et al., 2022) incluyen: marcadores amiloides AB₄₀, AB₄₂, y ratio AB₄₂/AB₄₀; marcadores de la proteína tau como t-tau, p-tau181 y tau fosforilada en las posiciones 127 o 231 (p-tau127 y p-tau231); la cadena ligera de neurofilamentos (NfL); la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un biomarcador astrocítico; y marcadores más generales como biomarcadores de inflamación, de deterioro vascular o desregulaciones metabólicas. No obstante, se continúa investigando para establecer la correlación de algunos de estos marcadores con el diagnóstico de la EA. Algunos autores reportan que en particular los β A, tau, NfL y GFAP presentan niveles anormales en el plasma, al mismo tiempo que en el LCR (Teunissen et al., 2022), mientras que la p-tau127 destaca como el marcador con la mayor precisión diagnóstica (García-Morales et al., 2021). Sin embargo, también se reportan variaciones meramente sutiles o solapamientos entre los niveles de los marcadores en los grupos seleccionados (Mahaman et al., 2022), siendo necesarias tecnologías de alta sensibilidad para su detección.

En conclusión, el empleo de los biomarcadores sanguíneos en la práctica clínica aún no es recomendado, hasta que no se avance en su estandarización y validación (Dubois et al., 2021). En un futuro próximo se estima que los exámenes sanguíneos podrían formar parte de las evaluaciones que se hacen en la clínica de manera rutinaria, presentando protocolos bien establecidos para la obtención y manejo de las muestras, y una buena aceptación en la población general. Tendrían como ventaja un muestreo más accesible y rápido, posibilitando

realizar exámenes periódicos y sin necesidad de personal especializado. Esto también permitiría hacer cribados poblacionales de la enfermedad (Mahaman et al., 2022).

1.4. Biosensado de marcadores moleculares de la EA

Las tecnologías y servicios de diagnóstico a partir de muestras de fluidos biológicos están disponibles a través de laboratorios centrales del sistema sanitario. Son técnicas bien establecidas y de altos niveles de calidad como el ELISA y los analizadores automáticos. Los equipos de análisis de estas técnicas costosos y voluminosos, por lo que su disponibilidad se limita a centros especializados. Además, estos servicios generan unos altos y crecientes gastos en atención médica, que representan entre el 7% y el 9% del producto interno bruto (PIB) para las naciones del G7 en 2012, con un aumento proyectado del 11% para 2050 (Petryayeva & Algar, 2015). Además, las áreas rurales y remotas de los países desarrollados tienden a estar menos atendidas en comparación con los centros urbanos por el limitado número de laboratorios disponibles. De igual manera, en los países en vías de desarrollo el acceso a estos servicios es reducido debido a falta de recursos, personal cualificado o infraestructura necesaria.

Como alternativa al modelo diagnóstico centralizado, aparecen las tecnologías diagnósticas *point of care* (POC), es decir, mediante sistemas simples e independientes capaces de realizar análisis *in situ* con recursos extremadamente limitados (Brazaca et al., 2020). Para estos dispositivos POC, la OMS propone que deben cumplir los criterios ASSURED: Affordable (económico), Sensitive (sensible), Specific (específico), User-friendly (pocos pasos y mínimo entrenamiento), Rapid and robust (rápido y robusto), Equipment-free (sin equipos), Deliverable to end-users (disponible para usuarios finales). Los dispositivos POC deben ser capaces de trabajar en el intervalo analítico clínicamente relevante en cada caso (Petryayeva & Algar, 2015).

1.4.1. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

El formato estándar para la detección de proteínas es un inmunoensayo como el *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay* (ELISA). Un inmunoensayo es una prueba bioquímica que mide la presencia de biomarcadores utilizando anticuerpos o antígenos, desempeñando un papel importante en el diagnóstico *in situ* de varios tipos de enfermedades (Li et al., 2021). Es una de las pruebas de laboratorio clínico más destacadas en los últimos 20 años (Petryayeva & Algar, 2015). Sin embargo, es relativamente complicado y requiere de varias etapas que consumen tiempo, y puede sufrir también de baja sensibilidad (Li et al., 2021).

En un principio, los formatos de ELISA clásicos no lograron detectar con precisión los marcadores de la EA, lo que los hace inadecuados para su implementación en el cribado diagnóstico (De Meyer et al., 2020). En el caso del βA , no sólo los niveles de βA en plasma son mucho más bajos que en el LCR, sino que la correlación entre los niveles de βA en LCR y plasma se ve afectada por la contribución de βA de otras fuentes periféricas. Se ha detectado disminución de la ratio AB_{42}/AB_{40} utilizando ELISA asociado a la EA, aunque también se

reportan inconsistencias en las mediciones de βA en plasma en diferentes laboratorios (Marcucci & Kleiman, 2021).

1.4.2. Biosensores

Un biosensor es un dispositivo analítico capaz de medir una reacción biológica o bioquímica, generando una señal medible proporcional a la concentración de un analito. Un ejemplo es el glucómetro, que permite a los pacientes diabéticos monitorear los niveles de glucosa en casa, usando una sola gota de sangre. Un biosensor típico contiene cuatro componentes básicos, descritos en la Figura 7 (Li et al., 2021).

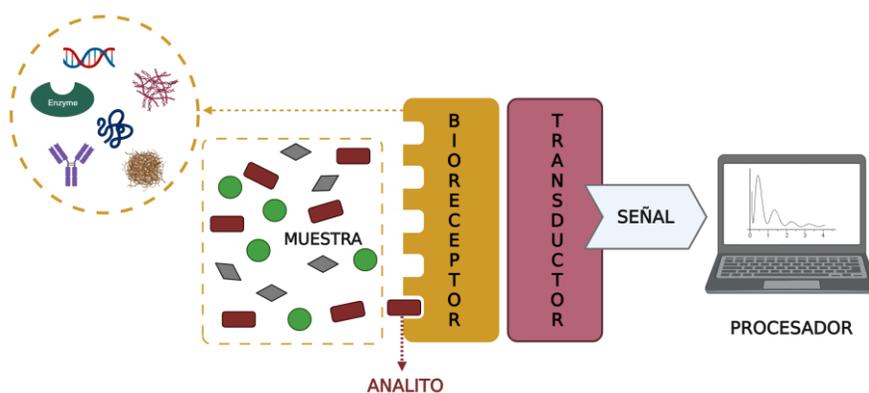


Figura 7. Representación esquemática del proceso de detección y componentes de un biosensor.

Analitos: En el campo clínico, corresponden con los biomarcadores específicos que se miden y se evalúan como indicadores del diagnóstico de enfermedades o evaluación de la salud general de un paciente.

Bioreceptores: Es el elemento responsable del reconocimiento selectivo del bioanalito de interés (Li et al., 2021). Los bioreceptores comunes incluyen anticuerpos, péptidos, aptámeros, enzimas y moléculas de ADN. Los bioreceptores deben ser inmovilizados de manera estable y en una densidad suficiente sobre la superficie de detección, pudiendo realizarse mediante uniones covalentes o uniones no covalentes, dependiendo de los grupos funcionales en la superficie de detección.

Transductor de señal: Elemento que genera una señal medible proporcional a la concentración del biomarcador objetivo. Los biosensores ópticos son la clase de biosensores más comunes. Estos sensores miden los eventos biológicos utilizando la transducción de señales ópticas como absorbancia, fluorescencia, quimioluminiscencia y resonancia del plasmón superficial (Li et al., 2021).

Detector: Capta la señal emitida por el transductor y la convierte en datos cuantitativos o semicuantitativos que se puedan analizar de manera estadística.

Respecto a la EA, los inmunosensores han sido ampliamente explorados, como se recoge en el artículo de revisión de Brazaca et al. (2020).

1.4.3. Inmunoensayo en formato de microarray

Los microarrays se generan mediante la inmovilización de reactivos de captura que pueden reconocer específicamente proteínas particulares de mezclas complejas. El concepto de microarray de anticuerpos, como lo definen Wingren & Borrebaeck (2009), se basa en la dispensación de pequeñas cantidades (escala de pL o menor) de varios anticuerpos en posiciones discretas (puntos de tamaño nm a μm) en un patrón ordenado (una matriz), sobre un soporte sólido. Estos arrays miniaturizados (escala de mm^2 a cm^2), que presentan densidades que van desde unos pocos anticuerpos hasta varios miles, se incuban luego con pequeñas cantidades (escala de μL) de muestra biológica como el plasma sanguíneo. Este tipo de biosensores es muy adecuado para detectar cambios en las abundancias de proteínas en muestras biológicas con un intervalo dinámico relativamente amplio y la evaluación de modificaciones postraduccionales en matrices biológicas complejas (Berrade et al., 2011).

En cuanto al diseño de estos microarrays de anticuerpos, la mayoría se fabrican dispensando las sondas una por una, a escala de pL, utilizando dispensadores de contacto o sin contacto. Las tecnologías sin contacto (tecnologías piezoeléctricas) son más biocompatibles y muestran menos efectos de arrastre (Wingren & Borrebaeck, 2009). Finalmente, las imágenes generadas con estos microarrays pueden transformarse en perfiles de expresión proteica diferencial, revelando la composición de la muestra a nivel molecular (Wingren & Borrebaeck, 2009).

Esta metodología generalmente se ha combinado con sistemas en formato de chip, pero también permite su integración en biosensores, logrando dispositivos miniaturizados y multiplexados, capaces de dirigirse a analitos proteicos de baja abundancia en proteomas complejos y no fraccionados (Wingren & Borrebaeck, 2009).

1.5. Reto científico

Los biomarcadores sanguíneos tienen un gran potencial para mejorar el diagnóstico de la EA (Teunissen et al., 2022). Estos marcadores podrían ser usados en la primera fase de un proceso diagnóstico multietapa de la EA, permitiendo discernir aquellos pacientes que forman parte de grupos de riesgo que requieren un análisis más detallado (Porsteinsson et al., 2021). Pero, para su aplicación a nivel clínico son necesarias tecnologías que usen bajos volúmenes de muestra y proporcionen resultados rápidos de varias proteínas simultáneamente (Brazaca et al., 2020; Zarei, 2017).

Una potencial aproximación son los microarrays de proteínas (Berrade et al., 2011). En estos sistemas, el uso de anticuerpos como elementos de biorreconocimiento permite, además de una alta sensibilidad y selectividad, la posibilidad de regenerarlos y usar un bajo volumen de muestra para el análisis (Brazaca et al., 2020).

Los microarrays más comunes son fabricados en soportes sólidos planos en formato de portaobjetos de microscopio. Como alternativa, se han introducido otros tipos de dispositivos, incluyendo arrays basados en pocillos de placas (Wingren & Borrebaeck, 2009).

De diferentes modos para su anclaje en la superficie, la unión no covalente es una solución eficaz, logrando inmovilizar los bioreceptores a través de la adsorción física por fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas, interacciones iónicas o combinación de éstas (Li et al., 2021).

Respecto a la detección, en los últimos años hay gran interés por dispositivos de bajo coste, como el uso de los teléfonos inteligentes (Zarei, 2017). Después, las imágenes digitales pueden analizarse para extraer información cuantitativa, más frecuentemente en términos de las intensidades de color en escala de grises o RGB. Estos análisis pueden realizarse con software computacional de análisis de imágenes, incluyendo software disponible gratuitamente (por ejemplo, ImageJ), así como aplicaciones para teléfonos inteligentes (Petryayeva & Algar, 2015). Lograr su integración como herramienta de diagnóstico, permitiría la extensión más allá de los laboratorios centrales, por su sencillez, bajo coste de obtención y mantenimiento y su posible distribución en zonas rurales y regiones en desarrollo.

La **hipótesis de este TFG** es avanzar en el diagnóstico de la EA logrando la detección en plasma de biomarcadores relevantes mediante tecnologías de microarrays de anticuerpos específicos en plataformas de pocillos y permitiendo su detección mediante imágenes digitales generadas mediante teléfonos inteligentes.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fin de grado es contribuir en el desarrollo de una tecnología de biosensado que permita obtener datos sobre los biomarcadores asociados a la enfermedad de Alzheimer y relacionarlos con el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad, favoreciendo su implementación en el sistema sanitario. La aproximación se basa en inmunoensayos integrados aplicables a muestras menos invasivas, en un formato de micromatriz *on-well* en placas de 96 pocillos con transducción óptica.

Para la obtención de este objetivo general, se establecen los siguientes objetivos específicos.

- ❑ Seleccionar los biomarcadores de mayor interés diagnóstico a partir de la literatura actual y estudios proteómicos de la enfermedad
- ❑ Poner a punto el inmunoensayo en formato micromatriz *on-well* para la determinación de los biomarcadores seleccionados en plasma sanguíneo
- ❑ Establecer las prestaciones analíticas del ensayo y contrastarlas con otros formatos relevantes

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.			X	
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

El presente TFG está directamente relacionado con el ODS 3 de Salud y Bienestar, en específico con las metas: **meta 3.4** de reducción de la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles, ya que la detección temprana de la enfermedad mejora las posibilidades de tratamiento y control de su progresión; y **meta 3.8** de impulsar la cobertura sanitaria universal, ya que un dispositivo accesible y asequible contribuiría a la disponibilidad del diagnóstico a más personas en comunidades rurales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

A continuación, se recogen las disoluciones tampón empleadas en los ensayos realizados:

- **Tampón fosfato salino (PBS):** 10 mM fosfato, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4.
- **Tampón PBST:** tampón PBS con tensoactivo Tween-20 al 0,05% (p/v).
- **Tampón de recubrimiento (CB):** 0,05 M carbonato (Na_2CO_3 1,06% (p/v), NaHCO_3 0,84% (p/v)) pH 9,6.
- **Tampón de incubación:** PBST con 0,1% (p/v) albumina de suero bovino (BSA).
- **Tampón de bloqueo:** PBST con 1% (p/v) BSA.
- **Tampón citrato:** 25 mM citrato de sodio, 62 mM fosfato de sodio, pH 5,4.

Los marcadores en plasma del Alzheimer fueron los fragmentos peptídicos de la proteína humana β -Amiloide: aminoácidos 1-40 (AB_{40}) (Biolegend, EEUU) y aminoácidos 1-42 (AB_{42}) (Biolegend, EEUU). Para la determinación de los péptidos, se utilizaron como anticuerpo de captura el anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón purificado anti- β -Amiloide 1-40 (αAB_{40}) (Biolegend, EEUU) y el anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón purificado anti- β -Amiloide 1-42 (αAB_{42}) (Biolegend, EEUU). El anticuerpo usado para el reconocimiento de los péptidos AB_{40} y AB_{42} fue el anticuerpo purificado anti- β -Amiloide 1-16 (αAB_{16}) (Biolegend, EEUU).

El agente de revelado usado para detectar las interacciones anticuerpo-analito fue la peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada a estreptavidina (estreptavidina-HRP, Thermo Scientific, EEUU) en tampón de incubación. Como sustratos cromógenos se usaron tanto diclorhidrato de *o*-fenilendiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, EEUU) como el 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) (Stereospecific Detection Technologies, Alemania), deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2,4M en el caso del primero.

3.2. Biotinilación del anticuerpo anti- β -Amiloide 1-16

El marcaje del anticuerpo anti- β -Amiloide 1-16 (αAB_{16}) se realizó con el reactivo de marcaje EZ-Link NHS-PEG4-Biotin 20 mM (Thermo Scientific, EEUU), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, se usaron 20 mol de reactivo de marcaje por cada mol de disolución de anticuerpo purificado αAB_{16} , y se incubó a temperatura ambiente durante media hora en oscuridad. Tras la reacción se eliminó el reactivo de marcaje y se concentró el anticuerpo marcado usando un filtro de 30KDa para purificación por centrifugación de Millipore Corporation (EEUU).

3.3. Muestras

Se usaron muestras de plasma sanguíneo de pacientes sanos proporcionadas por la Unidad de Desordenes Cognitivos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia, España). La toma de estas muestras fue aprobada para este proyecto por el Comité Ético del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (Valencia, España), así como el Comité Ético de la Universidad

Politécnica de Valencia. Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante punción venosa usando tubos con anticoagulante EDTA; tras su centrifugación a 1160x g durante 15 min a temperatura ambiente, se separó la fracción del plasma en un nuevo tubo. Las muestras de plasma fueron conservadas y transportadas a -60 °C hasta su análisis.

Los pacientes fueron evaluados, como describen (Álvarez-Sánchez et al., 2023; Forte et al., 2024), mediante evaluación neurofisiológica y análisis de biomarcadores en el fluido céfalorraquídeo (LCR) en acuerdo con el criterio estándar del *National Institute of Aging-Alzheimer's Association* (Figura 8).

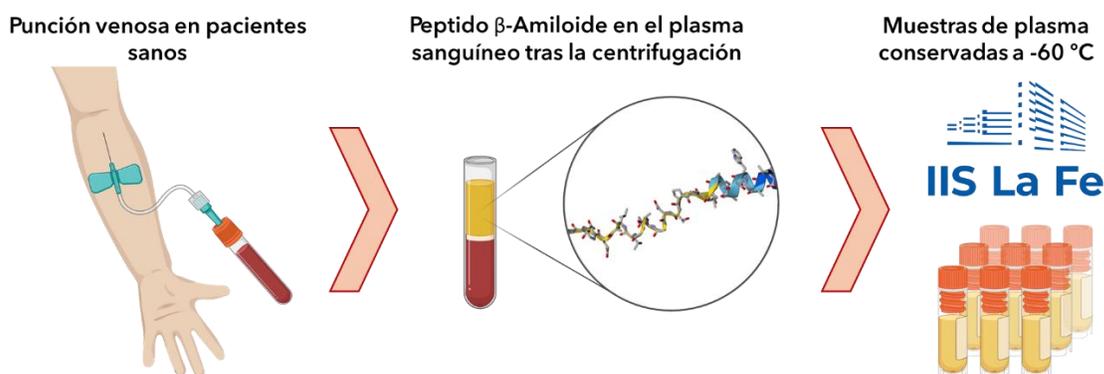


Figura 8. Representación gráfica del proceso de toma y almacenamiento de las muestras de plasma sanguíneo proporcionadas por el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, previo a su análisis en el instituto IDM de la UPV.

3.4. Protocolo ELISA

3.4.1. Preparación de la placa

El anticuerpo de captura anti- β -Amiloide 1-42 (α AB42) (Biolegend, EEUU), fue inmovilizado sobre una placa de 96 pocillos (Poliestireno High Binding Corning®, EEUU), usando 50 μ L reactivo α AB42 a una concentración de 2 mg/L en tampón de recubrimiento (CB). La placa se incubó a 4 °C durante 12 horas, permitiendo la inmovilización por adsorción pasiva del anticuerpo.

Después de la inmovilización se procedió a bloquear la placa para evitar el riesgo de interacciones inespecíficas durante el ensayo. Primero se retiró el anticuerpo no inmovilizado lavando hasta cinco veces con tampón PBST. Después se incubó la placa durante 30 minutos a 37 °C con 300 μ L de tampón de bloqueo, repitiendo el paso de lavado al finalizar el bloqueo.

3.4.2. Inmunoensayo

Se prepararon las diluciones de estudio de analito β -Amiloide 1-42 (AB_{42}) en tampón de incubación, añadiendo 50 μ L a cada pocillo de la placa con los anticuerpos de captura inmovilizados. La placa se incubó durante 30 min a 37 °C y se lavó con tampón PBST hasta cinco veces. Se dispensaron 50 μ L de anticuerpo biotinilado anti- β -Amiloide 1-16 (α AB16) a

4,5 mg/L en tampón de incubación y se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, se eliminó el reactivo sobrante mediante lavados con tampón PBST y se añadieron 50 μ L de estreptavidina-HRP a 0,25 mg/L en tampón de incubación y se incubó a 37 °C durante 30 min. Como reactivo de revelado para el protocolo ELISA se usó el diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, EEUU) y peróxido de hidrógeno con una relación 5mg:1 μ L, respectivamente, en tampón citrato. Se añadieron 100 μ L de disolución de revelado por pocillo, incubando 20 min a temperatura ambiente (25 °C) en agitación. Tras la incubación, se detuvo la reacción de revelado usando H₂SO₄ 2,4M.

3.4.3. Lectura y análisis de los resultados

La lectura de los inmunoensayos en formato ELISA se realizó usando el lector de placas EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer), midiendo la absorbancia a 490 nm con el *software* EnSpire Manager. Se generó una matriz con los datos de la señal y los datos fueron tratados usando los programas de análisis estadístico Excel (Microsoft) y Prism 8 (GraphPad).

3.5. Protocolo del método *on-well microarray*

3.5.1. Preparación de la micromatriz con anticuerpos de captura

La micromatriz *on-well* para el estudio de marcadores del Alzheimer fue dispensada sobre cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Poliestireno High Binding Corning®, EEUU). Se dispensaron hasta tres tipos de anticuerpos de captura distintos, incluyendo el anti- β -Amiloide 1-40 (α AB40) (Biolegend, EEUU), el anti- β -Amiloide 1-42 (α AB42) (Biolegend, EEUU), el anticuerpo anti-Tau como control negativo, o bien, el fragmento peptídico de la proteína humana β -Amiloide: aminoácidos 1-42 (AB₄₂) (Biolegend, EEUU) como control positivo. El formato de la matriz siguió una distribución de 3 filas x 3 columnas, con 3 réplicas/reactivo (Figura 9). La impresión se realizó a temperatura ambiente (25 °C) y 80% de humedad relativa mediante un dispensador de microgotas (40nL) sin contacto (AD-1500 Biodot, Irvine, CA). La placa se incubó a 4 °C durante 12 horas, permitiendo la inmovilización por adsorción pasiva.

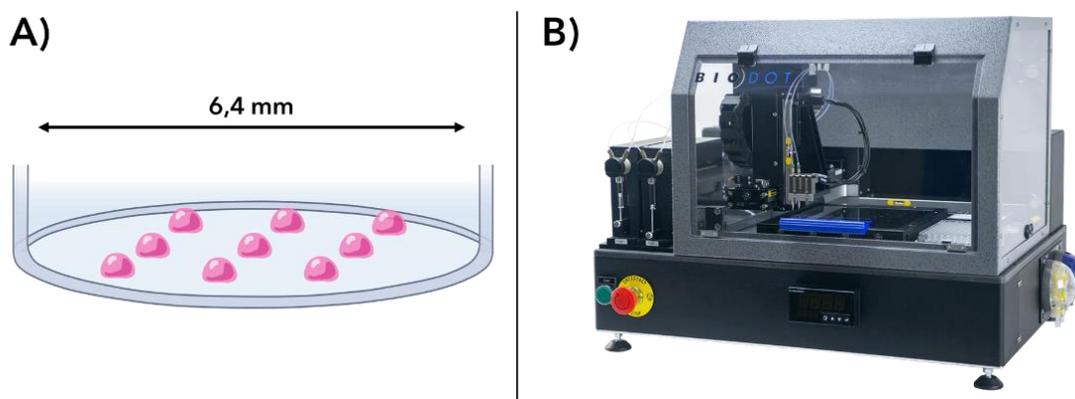


Figura 9. Tecnología de micromatrices proteicas: A) Representación esquemática de la matriz impresa en una superficie polimérica de un pocillo. B) Imagen del dispensador de microgotas AD-1500 Biodot.

Después de la inmovilización, se bloqueó la superficie de la placa para evitar el riesgo de interacciones inespecíficas durante el ensayo. Primero se retiró el anticuerpo no inmovilizado lavando de tres a cinco veces con tampón PBST. Después se incubó la placa durante 30 minutos a 37 °C con 30 µL de tampón de bloqueo, repitiendo el paso de lavado al finalizar el bloqueo.

3.5.2. Inmunoensayo para la detección de analitos

El biorreconocimiento antígeno-anticuerpo se realizó sobre las placas previamente preparadas.

Patrones: Se prepararon las diluciones de los analitos β -Amiloide 1-42 (AB_{42}) y β -Amiloide 1-40 (AB_{40}) en tampón de incubación, añadiendo 30 µL a cada pocillo y se incubaron durante 30 min a 37 °C.

Muestras de plasma: Se preparó una disolución de los analitos en el plasma sanguíneo de los pacientes estudiados en tampón PBST en una proporción entre 1 y 5 % v/v. Se transfirieron 30 µL a cada pocillo y se incubaron durante 30 min a 37 °C.

Tras la incubación se retiró la disolución de patrón o de plasma sin interaccionar y se lavó con tampón PBST hasta cinco veces. Para la detección los péptidos reconocidos, se dispensaron 50 µL de anticuerpo biotinilado anti- β -Amiloide 1-16 (αAB_{16}) a 4,5 mg/L en tampón de incubación y se incubó a 37 °C durante 30 min. Tras la incubación con el anticuerpo detector se eliminó el reactivo sobrante mediante lavados con tampón PBST y se añadieron 50 µL de estreptavidina-HRP a 0,25 ppm en tampón de incubación y se incubó a 37 °C durante 30 min. Como reactivo cromógeno de revelado se usó 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB), añadiendo 30 µL a cada pocillo e incubando a temperatura ambiente y en oscuridad durante un máximo de 10 min.

3.5.3. Lectura y análisis de los resultados

La lectura de los inmunoensayos en formato *on-well* se realizó usando tanto escáneres de superficie plana como cámaras digitales (Figura 10), en algunos casos utilizando discos de papel para mejorar el contraste de las imágenes. Las imágenes fueron analizadas usando el software libre ImageJ, midiendo la intensidad colorimétrica de cada punto de la micromatriz y del fondo. los datos fueron tratados usando los programas de análisis estadístico Excel (Microsoft) y Prism 8 (GraphPad).

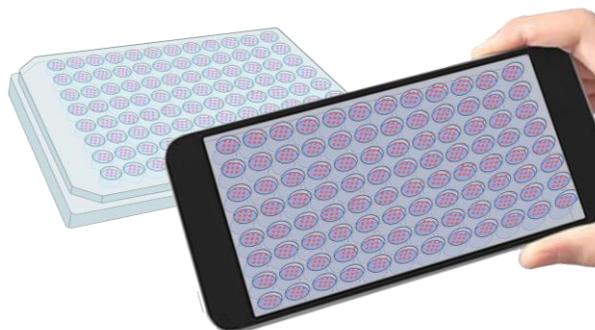


Figura 10. Ejemplo de la lectura del método *on-well microarray* con cámaras digitales tipo *smartphone*

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección de biomarcadores de la EA

La selección de los biomarcadores está limitada por su relevancia clínica y las prestaciones del sistema analítico utilizado para su detección o cuantificación, especialmente la selectividad y sensibilidad de diagnóstico y el coste final de la prueba generada. El estudio bibliográfico realizado mostró que no todos los biomarcadores descritos asociados a la enfermedad son válidos para su detección en el plasma sanguíneo. Algunos marcadores no están presentes en este fluido en las etapas tempranas de desarrollo de la enfermedad, no presentan niveles diferenciales respecto a los individuos sanos o presentan una fluctuación incompatible con una correcta discriminación. Por lo tanto, son pocos los biomarcadores interesantes en su aplicación diagnóstica. En la Tabla 2 se recogen los marcadores en plasma más importantes de acuerdo con la bibliografía revisada y se comparan sus características más destacables.

Tabla 2. Comparativa de los principales biomarcadores en plasma sanguíneo de la enfermedad de Alzheimer

BIOMARCADOR	VARIACIÓN EN PLASMA	VALOR PREDICTIVO	LIMITACIONES	FUENTES
AB₄₂	Concentración reducida asociada a la EA.	-Marcador bien establecido -Exactitud predictiva baja -Mejora al combinarse con otros marcadores	- Variabilidad en la concentración -Requiere de técnicas de alta sensibilidad	(García-Morales et al., 2021b; Mahaman et al., 2022)
AB₄₂/AB₄₀	Disminución de la ratio asociada a la EA	Alta exactitud (62-79%) a la hora de predecir el estado de amiloidosis cerebral	El valor de la ratio reportada varía, según los estudios, entre 0,089 y 0,102	(Mahaman et al., 2022; Pais et al., 2023; Teunissen et al., 2022)
t-Tau	Incremento de la concentración asociada a la EA	-Precisión predictiva moderada -Útil en paneles de marcadores múltiples	Menos específica que los niveles de proteína tau fosforilada	(Marcucci & Kleiman, 2021)
pTau181	Incremento de la concentración asociada a la patología de tau	- Alta correlación con el diagnóstico PET de la EA -Predictivo para el deterioro cognitivo	Puede presentar fluctuaciones en otras patologías cerebrales	(Mahaman et al., 2022; Teunissen et al., 2022)
pTau217	Incremento de la concentración asociada a la EA	-Alta correlación con el diagnóstico PET de la EA -Es levemente más específico que la pTau181	Disponibilidad reducida de ensayos	(Marcucci & Kleiman, 2021; Teunissen et al., 2022)
pTau231	Incremento de la concentración asociada a la patología de tau	-Alta correlación con la EA -Candidato prometedor para el diagnóstico temprano de la EA	Menos estudiado que el pTau217 y pTau231	(Teunissen et al., 2022)
NfL	Niveles elevados indican daño axonal y neurodegeneración	Alta correlación como marcador de neurodegeneración	No es un marcador específico de la EA	(Marcucci & Kleiman, 2021; Stevenson-Hoare et al., 2023; Teunissen et al., 2022)
GFAP	Niveles elevados están relacionados con indicación de activación astrocítica y neuroinflamación	-Buena correlación con los patrones de neuroinflamación observados en la EA - Útil en paneles de marcadores múltiples	No es un marcador específico de la EA	(Stevenson-Hoare et al., 2023; Teunissen et al., 2022)

Atendiendo a la comparativa de la Tabla 2, destacan las isoformas de la proteína tau fosforilada (pTau181, pTau217 y pTau231) y los péptidos amiloides AB₄₀ y AB₄₂ por su alta correlación con la EA y porque son biomarcadores altamente reconocidos por los expertos en la enfermedad. Sin embargo, los reactivos necesarios para estudiar las isoformas de la proteína tau poseen menor disponibilidad.

La patología amiloide constituye, también, uno de los primeros cambios biológicos que se observan en pacientes con EA (Musiek & Holtzman, 2015). De manera que la detección rutinaria de los péptidos amiloides AB₄₂ y AB₄₀ puede ser una de las mejores soluciones para generar herramientas de diagnóstico molecular temprano. Además, la aparición y aprobación de medicamentos que buscan reducir la carga β -amiloide en el cerebro, este método de detección podría también tener aplicaciones relacionadas con el seguimiento de los tratamientos.

En concreto, el uso de la ratio AB₄₂/AB₄₀ como biomarcador permite obtener altas prestaciones diagnósticas, mayores que las del uso del péptido AB₄₂ por sí sólo (Mahaman et al., 2022). De hecho, la tendencia actual es combinar medidas de distintos marcadores de manera que se pueda reducir el error asociado a la variabilidad biológica. Así lo evidencian estudios como los de Álvarez-Sánchez et al., (2023), H. J. Kim et al., (2023) o K. Kim et al., (2020). De manera que para poder realizar el biosensado simultáneo de estos paneles de biomarcadores es necesario realizar ensayos en paralelo, o incluso mejor, utilizar plataformas que permitan el multiplexado.

Como resultado de este estudio comparativo, el biomarcador elegido para el biosensado de la EA en este proyecto fue la ratio AB₄₂/AB₄₀, lo que implica la detección de los fragmentos peptídicos de la proteína humana β -Amiloide 1-40 (AB₄₀) y aminoácidos 1-42 (AB₄₂).

4.2. Análisis estructural de los biomarcadores

En los sistemas de biosensado basados en inmunoensayos, es crucial el correcto reconocimiento entre el analito y los anticuerpos de captura y revelado, dado que se basa en interacciones débiles entre los grupos funcionales de ambas moléculas. El estudio bibliográfico indicó que los péptidos seleccionados tienen una alta tendencia a formar agregados *in vivo* (Lattanzi et al., 2021). En esta sección del trabajo, se estudiaron la estructura de los péptidos AB₄₀ y AB₄₂ mediante la herramienta de predicción web de *AlphaFold*, usando las secuencias de aminoácidos de estos Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias peptídicas de los péptidos amiloides estudiados

AB₄₀	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
AB₄₂	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

Este programa *AlphaFold* es una herramienta de inteligencia artificial como las redes neuronales profundas y técnicas de aprendizaje automático para generar la predicción de estructuras protéicas a partir de sus secuencias (Jumper et al., 2021).

En la Figura 11, se muestran las estructuras tridimensionales estimadas de los biomarcadores de forma de molécula individual y de forma agregada, usando 20 copias del péptido. Además, se han incluido los gráficos de *Expected Position Error (EPE)*; este valor indica el error esperado para la posición entre dos pares de residuos cualquiera, en forma de distancia medida en Ångströms.

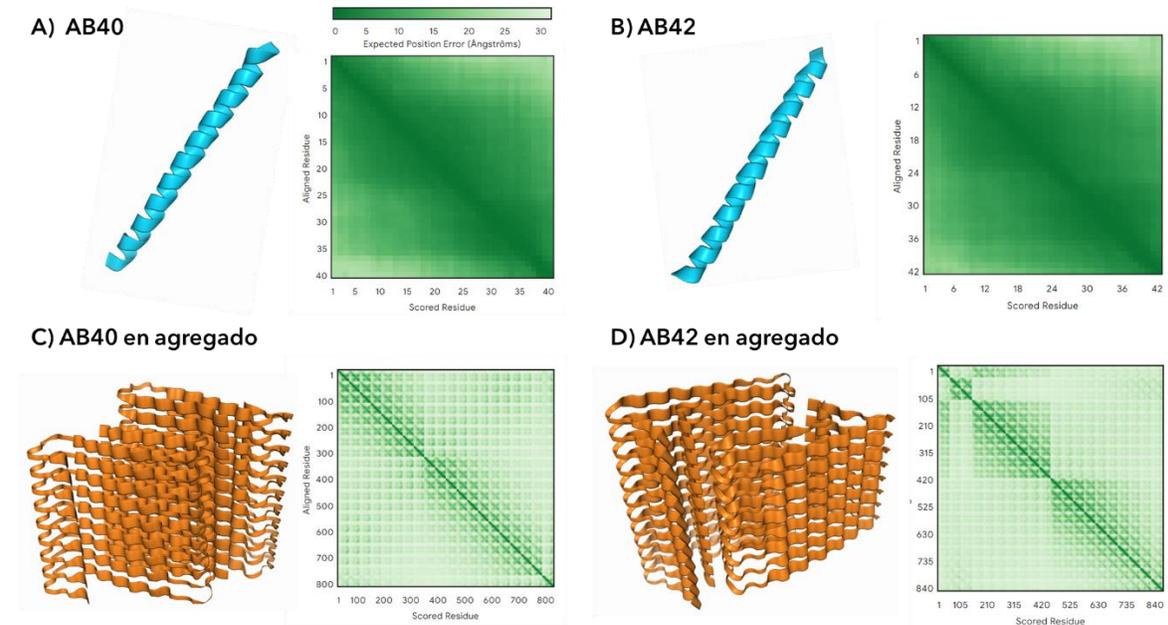


Figura 11. Predicción mediante AlphaFold de la estructura 3D y gráficos EPE asociados: A) monómero AB₄₀, B) monómero AB₄₂, C) AB₄₀ agregado y D) AB₄₂ agregado

Pese a tener peor confianza en la predicción de la estructura de los agregados, los resultados indicaron que se asemejan a las estructuras reportadas por la literatura (Colvin et al., 2016; Lattanzi et al., 2021), correlacionadas la conformación fibrilar que toman estos péptidos *in vivo*. Si esta estructura también estuviera presente en el flujo sanguíneo, la presencia de agregados puede perjudicar a la interacción con los anticuerpos. No obstante, este estudio no permite evaluar en qué grado de asociación se encontrarán las moléculas en las condiciones del ensayo. De hecho, se estima que en las condiciones pH y de alta salinidad de los tampones de incubación los biomarcadores se encontrarán de forma individual.

Por otra parte, los resultados también muestran que hay diferencias estructurales significativas entre los agregados formados por el péptido AB₄₀ y AB₄₂, causadas por la presencia de los aminoácidos finales. Por lo tanto, es factible la existencia de anticuerpos capaces de discriminar de forma significativa entre ambos péptidos de acuerdo con las diferencias tanto en secuencia como en conformación.

La búsqueda de reactivos disponibles comercialmente permitió la selección de los anticuerpos anti- β -Amiloide 1-42 (α AB₄₂) (Biolegend, EEUU) y el anti- β -Amiloide 1-40 (α AB₄₀) (Biolegend, EEUU) para la captación específica de cada uno de estos marcadores.

También, se localizó un reactivo capaz de reconocer la región común de ambos péptidos, lo que permitía su utilización en un ensayo conjunto, anti- β -Amiloide 1-16 (α AB16) (Biolegend, EEUU).

De manera que el esquema del inmunoensayo para este TFG es el representado en la Figura 12. El ensayo propuesto consiste en: (1) la inmovilización de los anticuerpos específicos vía adsorción no covalente, (2) reconocimiento selectivo de los biomarcadores por los anticuerpos, (3) unión específica del anticuerpo de revelado biotinilado a los biomarcadores, (4) interacción de la estreptavidina-HRP con la biotina que marcaba al anticuerpo de revelado y (5) reacción enzimática del reactivo cromogénico catalizada por la HRP.

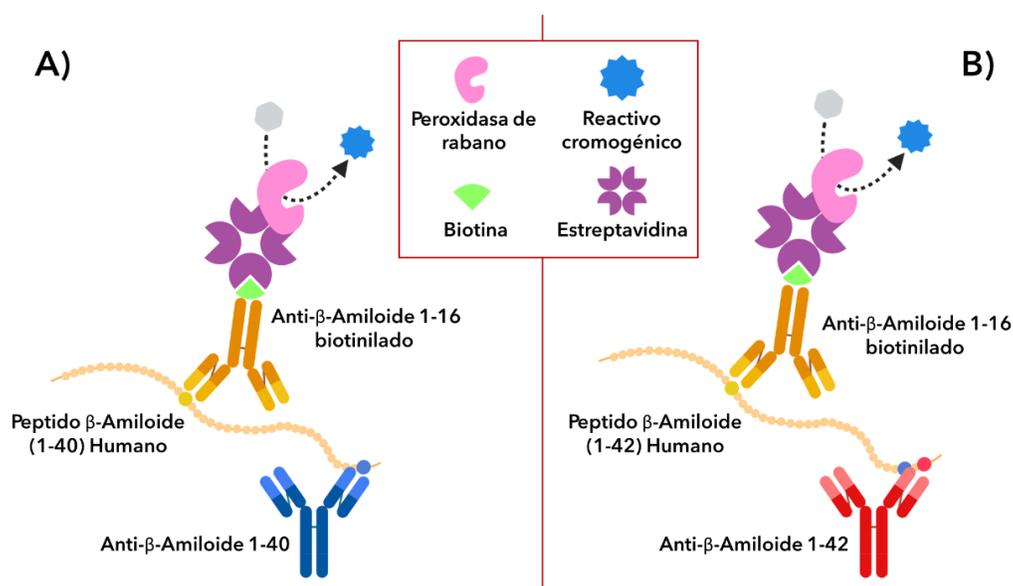


Figura 12. Representación gráfica de los inmunoensayos no competitivos de detección de los fragmentos peptídicos de la proteína humana β -Amiloide: aminoácidos 1-40 (A) y aminoácidos 1-42 (B). Elaboración propia.

4.3. Puesta a punto del formato ELISA convencional

4.3.1. Optimización del ensayo

Las prestaciones de los inmunoensayos son altamente dependientes de la capacidad de respuesta de los anticuerpos utilizados. Por ello, se procedió a estudiar las concentraciones de los reactivos en el formato convencional ELISA, con el fin de obtener una respuesta reproducible y detectable para las concentraciones de los biomarcadores esperables en el plasma, antes de pasar al formato de micromatrices.

Consecuentemente, se realizaron ensayos de optimización de los anticuerpos seleccionados para la detección del AB₄₂: el anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón purificado anti- β -Amiloide 1-42 (α AB₄₂) y el anticuerpo purificado anti- β -Amiloide 1-16 (α AB₁₆) entre 2 y 8

mg/L en tampón de recubrimiento (CB). La cantidad de péptido AB₄₂ usada en este ensayo fue de 50 µL a 5 µg/L en tampón de incubación. Además, el anticuerpo de revelado αAB16 se determinó entre 0,85 y 4,25 mg/L en tampón de incubación. Paralelamente se realizaron controles negativos. Los resultados de la absorbancia de cada ensayo a 490 nm se reflejan en la Figura 13A. Se observó una correlación entre el aumento de la concentración del αAB42 y el aumento de la señal obtenida en el intervalo 0-4 mg/L. A concentraciones mayores, la señal se mantuvo constante, o incluso se redujo, siguiendo la tendencia marcada por el *efecto hook*. Este efecto explica la pérdida de señal en inmunoensayos a concentraciones elevadas del anticuerpo de recubrimiento, debido a la ocupación de los puntos de biorreconocimiento específicos para el anticuerpo de revelado impidiendo así la formación de inmunocomplejos. La gráfica también muestra una buena correlación entre el aumento de concentración del anticuerpo de revelado αAB16 y el aumento de señal del ensayo. No obstante, cuando el anticuerpo de revelado se encuentra en concentraciones elevadas también se observa señal en ausencia de analito, lo que puede indicar interacciones inespecíficas. Por lo tanto, las concentraciones seleccionadas fueron 2 mg/L y 0,85 mg/L para el anticuerpo de captura y al anticuerpo de revelado, respectivamente, al presentar ambas una diferencia de señal significativa respecto a los blancos.

El efecto de la concentración de estreptavidina-HRP en el intervalo 0,125 a 2 mg/L, fue investigado usando concentraciones constantes del resto de reactivos (Figura 13B). Se observó que la intensidad de la señal crece de acuerdo con la concentración del reactivo de revelado. La diferencia de señal respecto al blanco fue adecuada usando una concentración de estreptavidina-HRP de 0,125 mg/L.

Estos resultados implican sensibilidades buenas para los reactivos seleccionados, pudiéndose optimizar a futuro sus concentraciones para reducir las concentraciones de anticuerpos y los costes asociados a estos.

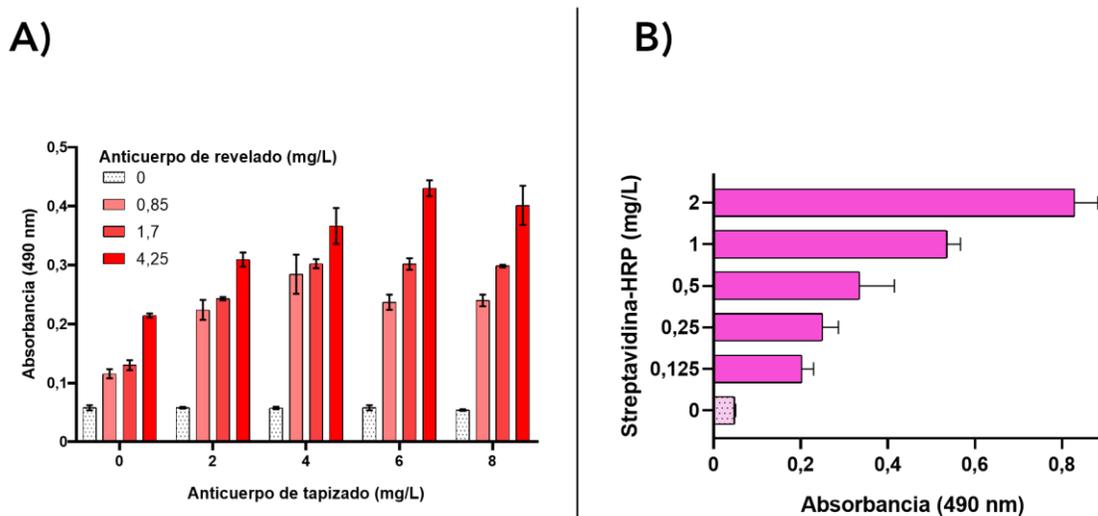


Figura 13. Optimización del inmunoensayo ELISA convencional: (A) Absorbancia en función de la concentración de anticuerpo de tapizado anti-β-Amiloide 1-42 y de anticuerpo de revelado anti-β-Amiloide 1-16; (B) Absorbancia en función de la concentración de agente de revelado (HRP: peroxidasa de rábano picante). Analito: péptido AB₄₂ a 5 µg/L. Número de replicas: 2.

4.4. Puesta a punto del método *on-well microarray*

La detección simultánea de varios biomarcadores en una misma muestra se puede lograr realizando ensayos en formato paralelo donde se dispensan alícuotas de la muestra a compartimentos de una plataforma. En cada una de esas zonas diferenciadas, se disponen cada uno de los reactivos que reconocen a cada uno de los biomarcadores, obteniendo una respuesta diferenciada. Esta estrategia es la empleada en técnicas como ELISA con placas de 96 pocillos y SIMOA con cientos de nanopocillos. La aproximación utilizada en este TFG presenta una estrategia alternativa miniaturizada. Está basada en el desarrollo de una plataforma multiplexada donde se utiliza una única alícuota de la muestra que se dispensa sobre el compartimento del ensayo, que contiene inmovilizado en formato de micromatriz los diferentes reactivos de reconocimiento separados espacialmente en forma de puntos. En concreto, el ensayo se realiza en el interior de los pocillos de una placa, denominándose inmunoensayo en formato *on-well*.

El formato diseñado para este inmunoensayo se recoge en la Figura 14A, de manera que en cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos se ha dispensado los reactivos en una matriz de 3 x 3 puntos (o *spots*) con un volumen de 50 nL. En la Figura 14B se puede observar el resultado del inmunoensayo con el formato *on-well*. El sistema de revelado es colorimétrico lo que permite detectar los puntos generados por este ensayo a simple vista o con sistema de captación de imágenes. A diferencia de los sistemas de revelado fluorescentes, el montaje de detección es simple, evitando elementos ópticos como lámparas, filtros, etc.

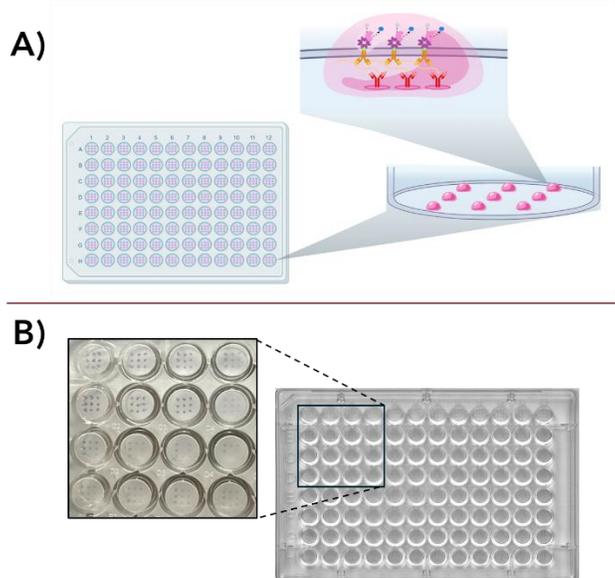


Figura 14. A) Descripción gráfica del método *on-well microarray*. B) Ejemplo de una imagen digital registrada tras realizar el inmunoensayo, observándose las matrices de puntos 3x3 en cada pocillo, cuya intensidad es proporcional a la concentración del biomarcador presente.

Con el objetivo de obtener respuestas detectables y reproducibles mediante el formato miniaturizado de inmunoensayo se estudiaron nuevamente las concentraciones de los reactivos, tomando como base las pautas establecidas en el formato ELISA.

De manera que se realizó un ensayo de optimización para el anticuerpo de captura seleccionado para el péptido AB₄₂, α AB₄₂, imprimiendo la matriz a tres concentraciones en el intervalo 0,5 a 5 mg/L usando tres replicas. Simultáneamente se probó el reactivo de revelado estreptavidina-HRP en el intervalo 0 a 0,5 mg/L en tampón de incubación. Los resultados del estudio de intensidad colorimétrica de la imagen digital obtenida de la placa se muestran en la Figura 15. La señal relativa al fondo del ensayo muestra un comportamiento lineal para la concentración de estreptavidina-HRP en el intervalo 0 a 0,11 mg/L. Por encima de dicha concentración, la respuesta es constante para luego descender ligeramente cuando llega a 0,5 mg/mL. Este comportamiento puede ser producido bien por un *efecto hook* motivado por la saturación de los sistemas enzima sustrato, o bien por un efecto de competencia por el sustrato. En cuanto a la concentración del anticuerpo de tapizado, se puede observar que las curvas producidas por las tres concentraciones estudiadas generan trayectorias paralelas, mostrando una escasa mejora de la señal a altas concentraciones. A concentraciones cercanas a 0,1 mg/l de estreptavidina-HRP la señal a las tres concentraciones de anticuerpo es similar y distinta de los valores del blanco. Por tanto, la combinación de 0,1 mg/L de reactivo de revelado y 0,5 de α AB₄₂ permite obtener resultados sensibles para el ensayo usando concentraciones de los reactivos mínimas.

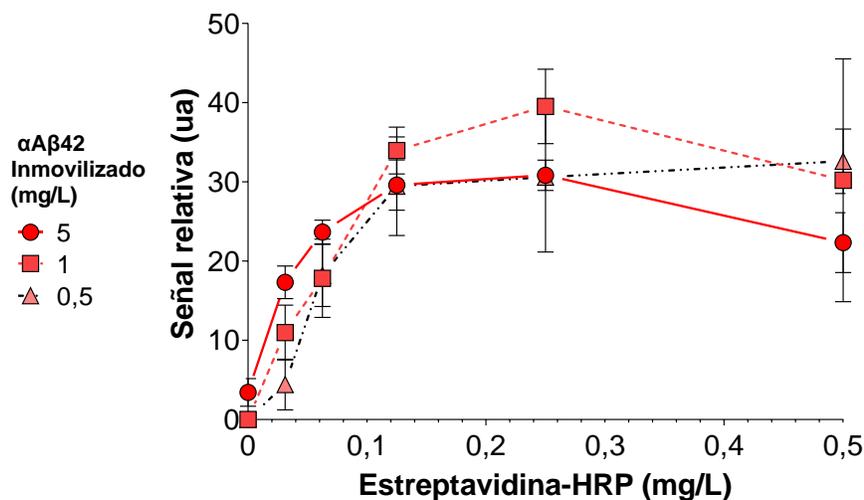


Figura 15. Ensayo de optimización del método *on-well microarray*, mostrando la señal relativa de los puntos para el anticuerpo de captura anti- β -Amiloide 1-42 a tres concentraciones en función de la concentración de estreptavidina-HRP. Número de replicas: 3.

4.5. Prestaciones del método *on-well microarray*

El estudio combinado de múltiples biomarcadores permitirá establecer con mayor confianza la presencia de la EA. Por tanto, un formato multiplexado de ensayo es ventajoso en términos de capacidad de trabajo porque además reduce el número de ensayos realizados y réplicas por cada individuo.

Se procedió a analizar la sensibilidad y el intervalo analítico de concentraciones del ensayo para los biomarcadores de Alzheimer seleccionados. Para ello, se inmovilizaron los anticuerpos de captura (3 réplicas) y se estudiaron las respuestas usando concentraciones de AB₄₀ y AB₄₂ hasta 1 mg/L, recogidas en la Figura 16.

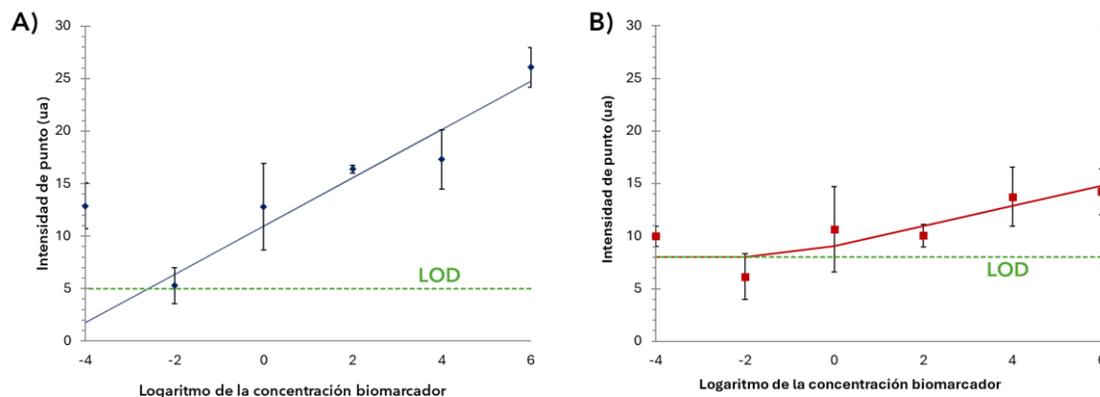


Figura 16. Rectas de calibración del método *on-well microarray*: A) péptido AB₄₀ y B) péptido AB₄₂. LOD: señal asociada al límite de detección, obtenida a partir de 5 réplicas del blanco. Número de réplicas: 3.

La respuesta en el estudio péptido AB₄₀ muestra un comportamiento lineal en el intervalo estudiado, siendo el límite de detección (LOD) de este péptido de 0,01 pg/mL. De manera que la sensibilidad de este ensayo es adecuada, dado que se encuentra muy por debajo del intervalo de interés clínico de la enfermedad, entre 130 y 330 pg/mL (M. Y. Kim et al., 2016). En cuanto al péptido AB₄₂, la respuesta obtenida fue lineal hasta 1 mg/L. El LOD obtenido fue 0,5 pg/mL. La sensibilidad fue válida para su futura aplicación clínica al encontrarse por debajo del intervalo clínico reportado por la literatura, que es de 2 y 30 pg/mL (M. Y. Kim et al., 2016; Zecca et al., 2018).

La reproducibilidad del ensayo fue calculada realizando determinaciones replicadas de los patrones. Las desviaciones estándar relativas fueron 16% para el AB₄₀ y 15% para el AB₄₂. Teniendo en cuenta el carácter inicial de la investigación, estos valores se consideraron adecuados para su aplicación clínica.

Para determinar el correcto funcionamiento de un inmunoensayo multiplexado también es necesario determinar que los anticuerpos usados no presenten reactividades cruzadas, generando señal inespecífica (falsos positivos). Con este objetivo se estudió la selectividad de los anticuerpos elegidos frente a ambos péptidos.

El estudio de selectividad del formato multiplexado se realizó imprimiendo los tres anticuerpos de captura seleccionados a una concentración de 5 mg/L: anti- β -Amiloide 1-40, anti- β -Amiloide 1-42 y anti-Tau; con tres réplicas para cada reactivo. Estas matrices fueron luego incubadas con diluciones del péptido AB₄₂ en el intervalo 0,01 pg/mL a 1 mg/L. La señal relativa de las matrices para cada concentración de AB₄₂ está representadas en la Figura 17.

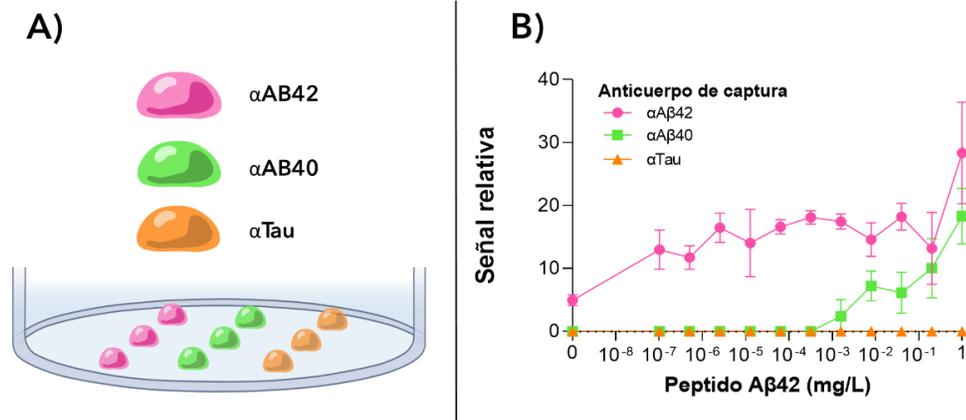


Figura 17. Formato multiplexado de ensayo para tres biomarcadores proteicos. A) Esquema de la micromatriz 3x3. B) Ensayo de selectividad de los anticuerpos anti- β -Amiloide 1-40, anti- β -Amiloide 1-42 y anti-Tau contra el péptido AB_{42} en el intervalo 0,01 pg/mL a 1 mg/L. Numero de réplicas: 3.

Este formato multiplexado presentó una buena selectividad a concentraciones menores de 0,01 mg/L del péptido, detectando de manera específica el péptido sólo cuando se empleaba el anticuerpo αAB_{42} . No obstante, a concentraciones mayores a 10^{-3} mg/L se observó señal inespecífica del anticuerpo αAB_{40} , llegando a solapar con la señal de αAB_{42} a concentraciones mayores de 0,01 mg/L. La reactividad cruzada no fue significativa en el intervalo de concentraciones de interés clínico, ya que la señal inespecífica fue menor al 5%. Por tanto, a las concentraciones de trabajo, los anticuerpos pueden ser empleados en formatos multiplexados de ensayo.

4.6. Determinación de biomarcadores en sueros humanos

El efecto matriz hace referencia a las posibles interferencias que se pueden producir en un inmunoensayo debido a la presencia de elementos biológicos, distintos del analito de interés, presentes en la muestra. El efecto matriz puede afectar la precisión o la exactitud de los resultados generados por el inmunosensor, por lo que se tomó como objetivo analizar este efecto en el formato de inmunoensayo *on-well* antes de pasar a usar muestras biológicas.

Por tanto, se realizó un ensayo de caracterización del efecto matriz del plasma sanguíneo en el formato *on-well*, usando plasma de pacientes sanos. Con este propósito se prepararon diluciones de plasma en tampón de incubación en el intervalo de 0 a 95% (v/v), y se añadió a todas ellas la misma concentración de péptido AB_{42} . Estas disoluciones dopadas con péptido amiloide se incubaron sobre una placa impresa con tres concentraciones de anticuerpo de captura αAB_{42} y tres replicas por concentración. Los resultados de este ensayo se observan en la Figura 18. La señal relativa de las matrices presenta una curva sigmoidea con un punto de inflexión entre 1 y 10% (v/v) de plasma. De manera que, a concentraciones menores de este punto la señal del inmunoensayo es detectable, y a concentraciones mayores la señal disminuye y no se detecta la interacción. Este comportamiento se puede explicar por la unión inespecífica de las proteínas del plasma sanguíneo, presentes en exceso, a los sitios de reconocimiento del analito. De manera que la concentración de plasma seleccionada para el

inmunoensayo *on-well* se corresponde al intervalo 1 y 10% (v/v), permitiendo un balance entre la señal del ensayo y el uso de la máxima concentración de muestra posible. A pesar de la dilución, dada la sensibilidad del método, éste resulta válido para medir los analitos en las muestras presentes en las concentraciones de interés.

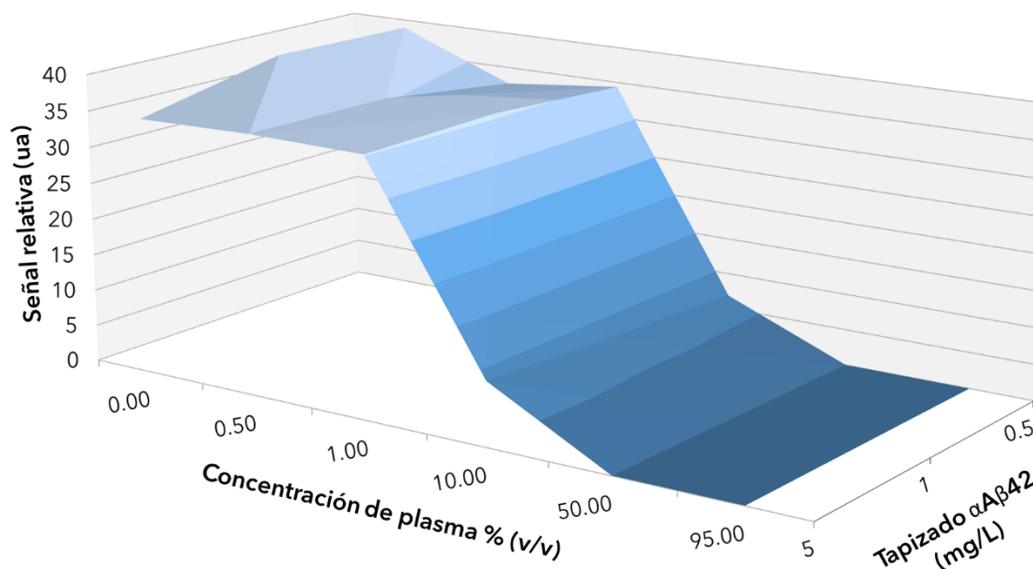


Figura 18. Estudio del efecto matriz del plasma sanguíneo para el péptido AB₄₂. Número de replicas: 3.

La siguiente etapa de verificación del método fue la realización de ensayos de recuperación aplicado a muestras reales. Estos ensayos son cruciales en el desarrollo de pruebas diagnóstica, ya que permite evaluar la eficiencia con la que se pueden medir de manera específica biomarcadores en la matriz biológica. El procedimiento implica dopar alícuotas de muestra con cantidades conocidas de los analitos y realizar el ensayo, estimando qué porcentaje del analito añadido pudo ser cuantificado.

Para ello, se seleccionaron 9 muestras de plasma de pacientes sanos recogidos en la Unidad de Desordenes Cognitivos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Se adicionaron cantidades entre 1 mg/L y 0,1 pg/mL de cada uno de los péptidos a alícuotas de dichas muestras, diluidas entre el 1 y 10% (v/v) en medio PBST.

Los resultados de estos experimentos no fueron satisfactorios porque no se obtuvieron respuestas reproducibles y/o detectables. La Figura 19 es un ejemplo de las imágenes registradas con las muestras estudiadas. Se observaba una correcta identificación cuando el patrón estaba en medio tampón, para un amplio intervalo de concentraciones, pero los registros no eran adecuados cuando el patrón estaba mezclado con el plasma de los pacientes. Se realizaron ciertas variaciones en el método, tales como modificaciones en las concentraciones de analito usadas y el porcentaje de plasma incluido. Cuando los porcentajes de plasma eran bajos y las concentraciones de péptido altas, la respuesta era reproducible. Sin embargo, no se logró obtener resultados favorables, para la determinación

de los marcadores en los niveles clínicos porque no se alcanzó la sensibilidad y reproducibilidad requerida.

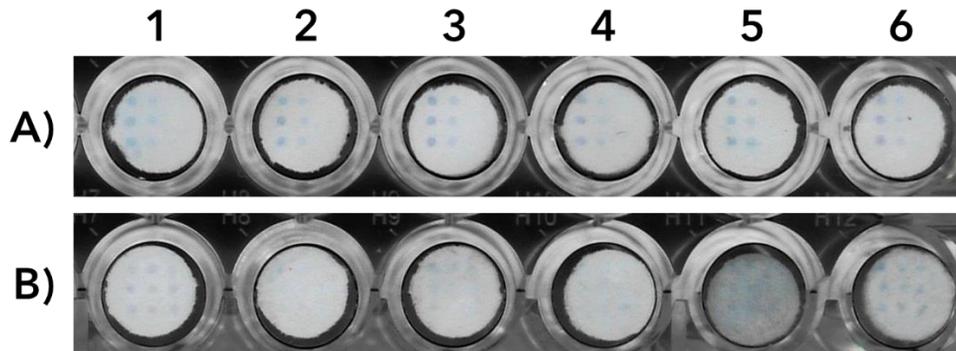


Figura 19. Imágenes obtenidas para disoluciones del péptido AB₄₂ en el intervalo 0,1 µg/mL, a. A) Dilución en PBST. B) Dilución en 5% (v/v) de plasma. 1: 1000 µg/L, 2: 100 µg/L, 3: 10 µg/L, 4: 1 µg/L, 5: 0,1 µg/L, 6: 0,01 µg/L.

Esta falta de reconocimiento cuando se utiliza plasma en lugar de medio tamponado se interpretó por la presencia de:

- ⦿ Posible interacción de los péptidos β A con proteínas del plasma debido a interacciones hidrofóbicas (Brazaca et al., 2020), compitiendo con los sitios de unión de los anticuerpos del inmunoensayo.
- ⦿ Posible formación de agregados de los péptidos amiloides también en condiciones *in vitro*, lo que reduce el número de sitio disponibles para la interacción o debido a variaciones en la conformación del epítipo.

Para solucionar este problema, se proponen ciertos experimentos. Una aproximación consiste en añadir reactivos o modificaciones de las condiciones (pH, la temperatura y el tiempo de incubación) que favorezcan la ruptura de los posibles agregados entre los péptidos y/o con proteínas del plasma. Otra acción sería reducir la complejidad de la matriz biológica mediante tratamientos térmicos, diálisis o precipitación.

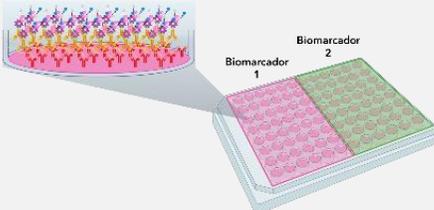
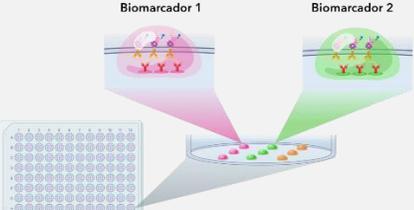
En conclusión, se requiere un estudio más detallado de las variables de este ensayo utilizando muestras de plasma para lograr un ensayo cuantitativo, es decir, que la respuesta sea proporcional a la concentración presente. No obstante, los resultados también han demostrado que con las condiciones actuales de trabajo es posible el reconocimiento y cuantificación de los biomarcadores en medio tampón. Esto es interesante como herramienta aplicada a estudios de investigación de marcadores en la EA.

4.7. Análisis comparativo de tecnologías

El ensayo ha demostrado ser capaz de detectar de forma individual y conjunta los biomarcadores AB₄₀ y AB₄₂, cuando están presentes en medio tampón. A pesar de que no se ha logrado la aplicación a muestras de plasma, se han identificado vías de mejora para lograrlo. Por lo tanto, la siguiente actividad del presente TFG fue establecer el potencial de este nuevo método, con fines diagnósticos, comparando las prestaciones estimadas para este método frente las pruebas de diagnóstico o de cribado o riesgo de la EA que usan biomarcadores sanguíneos descritas en la bibliografía o potencialmente disponibles.

En primer lugar, se comparó el formato convencional de ELISA dada su elevada relevancia en la práctica clínica de biomarcadores proteicos (Tabla 4). Ambos métodos presentan operaciones similares para el usuario final. La gran ventaja del nuevo método es su alta capacidad de trabajo y miniaturización, ya que, permite realizar más ensayos por unidad de superficie y un consumo menor de reactivos y muestra. La principal desventaja es el proceso de fabricación de las placas, que a diferencia del formato convencional requieren disponer de un equipo de microdispensación. Pero esta limitación es mínima cuando se consideran las técnicas de fabricación masivas actuales.

Tabla 4. Comparativa de las prestaciones de los métodos ensayados en el TFG aplicados al diagnóstico de EA en muestras de plasma sanguíneo.

	ELISA	ON-WELL MICROARRAY
Esquema del ensayo		
Numero de ensayos	96 por placa	864 (96x9) por placa
Reactivos por pocillo	1 (x1 replica)	3 (x3 réplicas)
Volumen de anticuerpo	50 µL por pocillo	0.04 µL por spot
Volumen de muestra	50 µL por pocillo	25 µL por pocillo

En la Tabla 5, se recogen otras pruebas diagnósticas, comparando sus prestaciones, así como las bases de sus métodos de detección. Destacan las técnicas de espectrometría de masas o inmunoensayos de alta sensibilidad para la determinación de los péptidos AB₄₀ y AB₄₂. En particular, la prueba PrecivityAD (C2N Diagnostics) basada en espectrometría de masas obtuvo la denominación de *breakthrough device designation* por la FDA y aprobación por parte de la *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA).

Tabla 5. Comparativa de pruebas diagnósticas recientes para la detección de marcadores sanguíneos en la enfermedad de Alzheimer

PRUEBA	MARCADOR	MÉTODO DE DETECCIÓN	VENTAJAS	LIMITACIONES	ESTADO DE APROBACIÓN	REF
ALZpath	pTau217	Inmunoensayo SIMOA	Alta correlación con patologías tau y β A	Requiere validación adicional	Pendiente por la FDA y EMA	(Ashton et al., 2024)
AlzTau	Proteína tau oligomerizada en plaquetas	Inmunoensayo	-Alta sensibilidad y selectividad -Permite el diagnóstico temprano	-Disponibilidad limitada -Estudiado sólo en población chilena y caucásica	Pendiente por la FDA y EMA (comerciado en Chile)	(González et al., 2022; Guzmán-Martínez et al., 2019)
Complutense de Madrid	Auto-anticuerpos	Péptidos Halo-Tag en beads magnéticas	Resultados en 2 horas	-Requiere validación adicional -problemas con la estabilidad de las proteínas	Pendiente por la EMA	(Valverde et al., 2021)
AD-Detect (Diagnostiq Quest)	AB ₄₂ /AB ₄₀	Espectrometría de masas	-Alta sensibilidad en la detección de los marcadores	-Requiere equipación de espectrometría de masas -No se considera como una prueba diagnóstica -Venta exclusiva a personal médico	No aprobado por la FDA	Questdiagnostics.com
PrecivityAD (C2N Diagnostics)	AB ₄₂ /AB ₄₀ y tau	Espectrometría de masas	- Alta correlación con amiloidosis -Usado a nivel clínico	-Elevado coste -Requiere validación adicional	Pendiente por la FDA Aprobado por la CLIA	(Kirmess et al., 2021)
TOHOKU research intitute	AB ₄₂ /AB ₄₀	Inmunoensayo de alta sensibilidad automatizado	- Alta correlación con amiloidosis -Ensayo automatizado -Equipación disponible en ámbito clínico	Requiere de equipación específica (Sysmex HISCL-500)	No aprobado	(Bun et al., 2023)
PlasmarkAD	21 marcadores proteicos propios	Proximity extension assay (PEA)	-Alta correlación con la EA -Permite el diagnóstico temprano	En proceso de validación	Pendiente por la FDA, EMA y NMPA	(Jiang et al., 2024)

La tecnología SIMOA (array ultrasensible de molécula única) presenta gran interés. Esta técnica realiza inmunoensayos mediante el uso de *beads* magnéticas recubiertas de anticuerpos en una plataforma de matrices de nanopocillos. Ha permitido la detección de la amiloidosis cerebral mediante la cuantificación de los péptidos en plasma sanguíneo (De Meyer et al., 2020; Marcucci & Kleiman, 2021). Asimismo, otros autores reportan la detección específica de p-tau181 elevado en plasma, medido por SIMOA con una alta precisión para detectar la EA y diferenciarla de otras patologías (Teunissen et al., 2022). En particular destaca la prueba ALZpath por su alto valor predictivo (Ashton et al., 2024).

No obstante, ninguna de estas pruebas ha recibido la aprobación oficial por parte de los organismos de regulación de productos médicos usados como referencia, la FDA y la EMA. Además, presentan todavía una disponibilidad limitada, requieren de personal especializado y validación adicional o presentan costes elevados, en especial las basades en espectrometría

o SIMOA. Estos son los aspectos en los que el nuevo método *on-well microarray* presenta ventajas competitivas.

En cualquier caso, queda de manifiesto que el desarrollo y aprobación de pruebas diagnósticas sencillas para la EA usando muestras sanguíneas se encuentra aún en fase de investigación. Algunos autores prevén que la aplicación clínica masiva utilizando dispositivos tipo POC, como el del presente TFG, es compatible con la rutina de trabajo en clínicas especializadas y centros de atención primaria (Teunissen et al., 2022). El modelo de diagnóstico basado en un cribado poblacional utilizando marcadores sanguíneos permitiría descartar pacientes con bajo riesgo para la EA, reduciendo los costes asociados a las pruebas de punción lumbar y tipo PET. Además, posiblemente, evitaría el diagnóstico tardío de la enfermedad al realizarse de forma más frecuente.

5. CONCLUSIONES

Este trabajo fin de grado ha contribuido en el desarrollo de una tecnología de biosensado que permite obtener datos sobre los péptidos β -amiloides AB_{40} y AB_{42} que son reconocidos biomarcadores asociados a la enfermedad de Alzheimer y relacionarlos con el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad a partir de muestras de plasma sanguíneo.

Respecto a la consecución de los objetivos parciales, se han llegado a las siguientes conclusiones:

- Se eligió la ratio AB_{42}/AB_{40} como biomarcador temprano de la EA en plasma sanguíneo.
- Se desarrollaron dos inmunoensayos para la detección de ambos péptidos, en un formato de micromatriz *on-well* en placas de 96 pocillos con transducción óptica mediante observación directa o con cámaras digitales.
- Se estableció la correcta adsorción de los anticuerpos de captura y de los procesos de reconocimiento biomolecular. Se confirmó que el ensayo es selectivo, reproducible y proporcional para un amplio intervalo de concentraciones. Sin embargo, se requiere mayor experimentación para su aplicación a muestras de plasma sanguíneo y discriminación entre pacientes de EA e individuos con otras neuropatologías o sanos.
- Se ha estudiado el potencial de este nuevo método basado en inmunoensayos integrados para su implementación en el sistema sanitario, demostrando sus prestaciones competitivas frente a otras tecnologías actuales.

Todo este trabajo fue llevado al XVII *Workshop on Sensors and Molecular Recognition*, Valencia junio 2024, en una comunicación con formato póster (ANEXO I).

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez-Sánchez, L., Peña-Bautista, C., Ferré-González, L., Cubas, L., Balaguer, A., Casanova-Estruch, B., Baquero, M., & Cháfer-Pericás, C. (2023). Early Alzheimer's Disease Screening Approach Using Plasma Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18). <https://doi.org/10.3390/ijms241814151>
2. Ashton, N. J., Brum, W. S., Molfetta, G. Di, Benedet, A. L., Arslan, B., Jonaitis, E., Langhough, R. E., Cody, K., Wilson, R., Carlsson, C. M., Vanmechelen, E., Montoliu-Gaya, L., Lantero-Rodriguez, J., Rahmouni, N., Tissot, C., Stevenson, J., Servaes, S., Therriault, J., Pascoal, T., ... Zetterberg, H. (2024). Diagnostic Accuracy of a Plasma Phosphorylated Tau 217 Immunoassay for Alzheimer Disease Pathology. *JAMA Neurology*, 81(3), 255-263. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.5319>
3. Behl, C. (2023). *Alzheimer's Disease Research*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-31570-1>
4. Berrade, L., Garcia, A. E., & Camarero, J. A. (2011). Protein microarrays: Novel developments and applications. En *Pharmaceutical Research* (Vol. 28, Número 7, pp. 1480-1499). <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0325-1>
5. Brazaca, L. C., Sampaio, I., Zucolotto, V., & Janegitz, B. C. (2020). Applications of biosensors in Alzheimer's disease diagnosis. En *Talanta* (Vol. 210). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120644>
6. Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. En *Molecules* (Vol. 25, Número 24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245789>
7. Bun, S., Ito, D., Tezuka, T., Kubota, M., Ueda, R., Takahata, K., Moriguchi, S., Kurose, S., Momota, Y., Suzuki, N., Morimoto, A., Hoshino, Y., Seki, M., Mimura, Y., Shikimoto, R., Yamamoto, Y., Hoshino, T., Sato, Y., Tabuchi, H., & Mimura, M. (2023). Performance of plasma A β 42/40, measured using a fully automated immunoassay, across a broad patient population in identifying amyloid status. *Alzheimer's Research and Therapy*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01296-5>
8. Colvin, M. T., Silvers, R., Ni, Q. Z., Can, T. V., Sergeev, I., Rosay, M., Donovan, K. J., Michael, B., Wall, J., Linse, S., & Griffin, R. G. (2016). Atomic Resolution Structure of Monomorphic A β 42 Amyloid Fibrils. *Journal of the American Chemical Society*, 138(30), 9663-9674. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b05129>
9. De Meyer, S., Schaevebeke, J. M., Verberk, I. M. W., Gille, B., De Schaepdryver, M., Luckett, E. S., Gabel, S., Bruffaerts, R., Mauroo, K., Thijssen, E. H., Stoops, E., Vanderstichele, H. M., Teunissen, C. E., Vandenberghe, R., & Poesen, K. (2020). Comparison of ELISA- and SIMOA-based quantification of plasma A β ratios for early detection of cerebral amyloidosis. *Alzheimer's Research and Therapy*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00728-w>
10. Dubois, B., Villain, N., Frisoni, G. B., Rabinovici, G. D., Sabbagh, M., Cappa, S., Bejanin, A., Bombois, S., Epelbaum, S., Teichmann, M., Habert, M. O., Nordberg, A., Blennow, K., Galasko, D., Stern, Y., Rowe, C. C., Salloway, S., Schneider, L. S., Cummings, J. L., & Feldman, H. H. (2021). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the

- International Working Group. En *The Lancet Neurology* (Vol. 20, Número 6, pp. 484-496). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00066-1)
11. Ellison, D., Love, S., Chimelli, L., N. Harding, B., S. Lowe, J., & V. Vinters, H. (2013). *Neuropathology A reference text of CNS pathology*.
 12. Forte, A., Lara, S., Peña-Bautista, C., Baquero, M., & Cháfer-Pericás, C. (2024). New approach for early and specific Alzheimer disease diagnosis from different plasma biomarkers. *Clinica Chimica Acta*, 556. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.117842>
 13. García-Morales, V., González-Acedo, A., Melguizo-Rodríguez, L., Pardo-Moreno, T., Costela-Ruiz, V. J., Montiel-Troya, M., & Ramos-Rodríguez, J. J. (2021a). Current understanding of the physiopathology, diagnosis and therapeutic approach to alzheimer's disease. En *Biomedicines* (Vol. 9, Número 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121910>
 14. García-Morales, V., González-Acedo, A., Melguizo-Rodríguez, L., Pardo-Moreno, T., Costela-Ruiz, V. J., Montiel-Troya, M., & Ramos-Rodríguez, J. J. (2021b). Current understanding of the physiopathology, diagnosis and therapeutic approach to alzheimer's disease. En *Biomedicines* (Vol. 9, Número 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121910>
 15. González, A., Guzmán - Martínez, L., & Maccioni, R. B. (2022). Novel AD biomarker based on platelets tau: Expanding to plasma detection. *Alzheimer's & Dementia*, 18(S5). <https://doi.org/10.1002/alz.063854>
 16. Grupo de Neurología Cognitiva de la Sociedad Valenciana de Neurología. (2017). *Guía de manejo práctico de la enfermedad de Alzheimer*.
 17. Guzmán-Martínez, L., Tapia, J. P., Farías, G. A., González, A., Estrella, M., & MacCioni, R. B. (2019). The Alz-tau Biomarker for Alzheimer's Disease: Study in a Caucasian Population. *Journal of Alzheimer's Disease*, 67(4), 1181-1186. <https://doi.org/10.3233/JAD-180637>
 18. Herrup, K. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature Neuroscience*, 18(6), 794-799. <https://doi.org/10.1038/nn.4017>
 19. Jain, A. P., & Sathe, G. (2021). Proteomics landscape of alzheimer's disease. En *Proteomes* (Vol. 9, Número 1, pp. 1-18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/proteomes9010013>
 20. Jiang, Y., Uhm, H., Ip, F. C., Ouyang, L., Lo, R. M. N., Cheng, E. Y. L., Cao, X., Tan, C. M. C., Law, B. C. H., Ortiz-Romero, P., Puig-Pijoan, A., Fernández-Lebrero, A., Contador, J., Mok, K. Y., Hardy, J., Kwok, T. C. Y., Mok, V. C. T., Suárez-Calvet, M., Zetterberg, H., ... Ip, N. Y. (2024). A blood-based multi-pathway biomarker assay for early detection and staging of Alzheimer's disease across ethnic groups. *Alzheimer's and Dementia*, 20(3), 2000-2015. <https://doi.org/10.1002/alz.13676>
 21. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
 22. Kim, H. J., Kim, H., Park, D., Yoon, D. S., San Lee, J., & Hwang, K. S. (2023). Plasma-based diagnostic and screening platform using a combination of biosensing signals in Alzheimer's disease. *Biosensors and Bioelectronics*, 230. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115246>

23. Kim, K., Kim, M. J., Kim, D. W., Kim, S. Y., Park, S., & Park, C. B. (2020). Clinically accurate diagnosis of Alzheimer's disease via multiplexed sensing of core biomarkers in human plasma. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13901-z>
24. Kim, M. Y., Kim, K. N., Cho, H. M., Lee, D. J., & Cho, D. Y. (2016). Reference intervals for plasma Amyloid β in Korean adults without cognitive impairment. En *Annals of Laboratory Medicine* (Vol. 36, Número 6, pp. 595-598). Seoul National University, Institute for Cognitive Science. <https://doi.org/10.3343/alm.2016.36.6.595>
25. Kirmess, K. M., Meyer, M. R., Holubasch, M. S., Knapik, S. S., Hu, Y., Jackson, E. N., Harpstrite, S. E., Verghese, P. B., West, T., Fogelman, I., Braunstein, J. B., Yarasheski, K. E., & Contois, J. H. (2021). The PrecivityADTM test: Accurate and reliable LC-MS/MS assays for quantifying plasma amyloid beta 40 and 42 and apolipoprotein E proteotype for the assessment of brain amyloidosis. *Clinica Chimica Acta*, 519, 267-275. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.05.011>
26. Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Chételat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., Nixon, R. A., & Jones, D. T. (2021). Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>
27. Lattanzi, V., Andr, I., Gasser, U., Dubackic, M., Olsson, U., & Linse, S. (2021). Amyloid β 42 fibril structure based on small-angle scattering. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112783118/-/DCSupplemental>
28. Lei, P., Ayton, S., & Bush, A. I. (2021). The essential elements of Alzheimer's disease. En *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 296). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.008207>
29. Li, P., Lee, G. H., Kim, S. Y., Kwon, S. Y., Kim, H. R., & Park, S. (2021). From Diagnosis to Treatment: Recent Advances in Patient-Friendly Biosensors and Implantable Devices. En *ACS Nano* (Vol. 15, Número 2, pp. 1960-2004). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c06688>
30. Mahaman, Y. A. R., Embaye, K. S., Huang, F., Li, L., Zhu, F., Wang, J. Z., Liu, R., Feng, J., & Wang, X. (2022). Biomarkers used in Alzheimer's disease diagnosis, treatment, and prevention. En *Ageing Research Reviews* (Vol. 74). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101544>
31. Marcucci, V., & Kleiman, J. (2021). Biomarkers and Their Implications in Alzheimer's Disease: A Literature Review. *Exploratory Research and Hypothesis in Medicine*, 000(000), 000-000. <https://doi.org/10.14218/erhm.2021.00016>
32. Musiek, E. S., & Holtzman, D. M. (2015). Three dimensions of the amyloid hypothesis: Time, space and «wingmen». En *Nature Neuroscience* (Vol. 18, Número 6, pp. 800-806). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nn.4018>
33. Pais, M. V., Forlenza, O. V., & Diniz, B. S. (2023). Plasma Biomarkers of Alzheimer's Disease: A Review of Available Assays, Recent Developments, and Implications for Clinical Practice. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 7(1), 355-380. <https://doi.org/10.3233/adr-230029>
34. Petryayeva, E., & Algar, W. R. (2015). Toward point-of-care diagnostics with consumer electronic devices: The expanding role of nanoparticles. En *RSC Advances* (Vol. 5, Número 28, pp. 22256-22282). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c4ra15036h>

35. Porsteinsson, A. P., Isaacson, R. S., Knox, S., Sabbagh, M. N., & Rubino, I. (2021). Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. En *Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* (Vol. 8, Número 3, pp. 371-386). Serdi-Editions. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.23>
36. Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021a). Alzheimer's disease. En *The Lancet* (Vol. 397, Número 10284, pp. 1577-1590). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
37. Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021b). Alzheimer's disease. En *The Lancet* (Vol. 397, Número 10284, pp. 1577-1590). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
38. Sims, R., Hill, M., & Williams, J. (2020). The multiplex model of the genetics of Alzheimer's disease. En *Nature Neuroscience* (Vol. 23, Número 3, pp. 311-322). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0599-5>
39. Stevenson-Hoare, J., Heslegrave, A., Leonenko, G., Fathalla, D., Bellou, E., Luckcuck, L., Marshall, R., Sims, R., Morgan, B. P., Hardy, J., De Strooper, B., Williams, J., Zetterberg, H., & Escott-Price, V. (2023). Plasma biomarkers and genetics in the diagnosis and prediction of Alzheimer's disease. *Brain*, 146(2), 690-699. <https://doi.org/10.1093/brain/awac128>
40. Teunissen, C. E., Verberk, I. M. W., Thijssen, E. H., Vermunt, L., Hansson, O., Zetterberg, H., van der Flier, W. M., Mielke, M. M., & del Campo, M. (2022). Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation. En *The Lancet Neurology* (Vol. 21, Número 1, pp. 66-77). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00361-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00361-6)
41. Valverde, A., Montero-Calle, A., Arévalo, B., San Segundo-Acosta, P., Serafín, V., Alonso-Navarro, M., Solís-Fernández, G., Pingarrón, J. M., Campuzano, S., & Barderas, R. (2021). Phage-Derived and Aberrant HaloTag Peptides Immobilized on Magnetic Microbeads for Amperometric Biosensing of Serum Autoantibodies and Alzheimer's Disease Diagnosis. *Analysis and Sensing*, 1(4), 161-165. <https://doi.org/10.1002/anse.202100024>
42. Wingren, C., & Borrebaeck, C. A. K. (2009). Antibody-based microarrays. En *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 509, pp. 57-84). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-372-1_5
43. Zarei, M. (2017). Portable biosensing devices for point-of-care diagnostics: Recent developments and applications. En *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 91, pp. 26-41). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.04.001>
44. Zecca, C., Tortelli, R., Panza, F., Arcuti, S., Piccininni, M., Capozzo, R., Barulli, M. R., Barone, R., Cardinali, R., Abbrescia, D., Seripa, D., Brescia, V., & Logroscino, G. (2018). Plasma β -amyloid 1-42 reference values in cognitively normal subjects. *Journal of the Neurological Sciences*, 391, 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.06.006>

ANEXO 1.



On-Well array immunoassay: an alternative to 96-well ELISA for biomarker quantification in biofluids



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Iker Plazas-Gómez,^a Miguel Ángel González-Martínez,^{b,c} Ángel Maquieira,^{b,c,d} Luis Antonio Tortajada-Genaro^{b,c,d}

^a Grada en Biotecnología, ETSIAMN, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46102 Valencia, Spain, iplagom@etsiamn.upv.es

^b Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València, Camino de Vera s/n, 46102 Valencia, Spain

^c Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46102 Valencia, Spain

^d Unidad Mixta U+V+L+e, Nanomedicine and Sensors, Valencia, Spain

Introduction

It is estimated that worldwide, more than 50 million people are currently living with Alzheimer's Disease (AD) or related disorders, and there is forecast a doubling of this number every 20 years as the population ages. Early diagnosis is critical for the detection of pre-symptomatic stages of the disease. It enhances its accurate monitoring and prediction, paving the road for developing new therapeutic and preventive approaches. Molecular diagnosis using blood biomarkers is less invasive than traditional imaging methods or cerebrospinal fluid tests. It also provides an opportunity for routine and widespread screening at a lower price than current methodologies.

This research aims to develop an enhanced format for monitoring biomarkers from noninvasive samples, such as blood plasma, based on 96-well plate On-Well microarrays. Thus, we aim to reduce sample volumes, reagent consumption, and assay times while enhancing scalability.

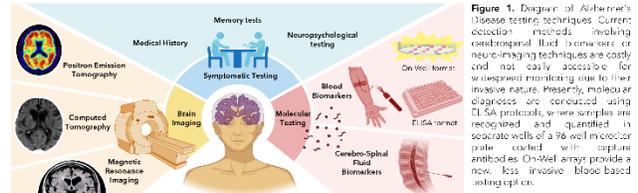


Figure 1. Diagram of Alzheimer's Disease testing techniques. Current detection methods involving cerebrospinal fluid to enzymes or neuro-imaging techniques are costly and not easily accessible for widespread monitoring due to their invasive nature. Presently, molecular diagnoses are conducted using ELISA protocols, where samples are recognized and quantified in separate wells of a 96-well microarray plate coated with capture antibodies. On-Well arrays provide a new, less invasive, blood-based testing option.

Assay Formats

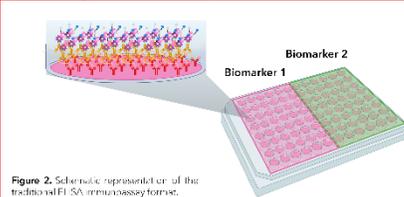


Figure 2. Schematic representation of the traditional ELISA immunoassay format.

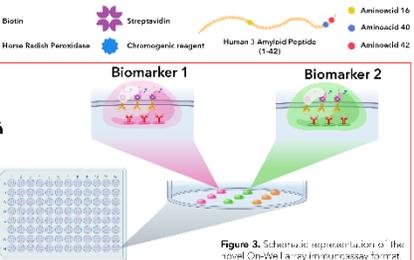
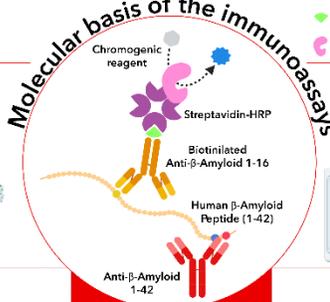


Figure 3. Schematic representation of the novel On-Well array immunoassay format.

Traditional ELISA	On-Well Immunoarray
96 per plate	864 (96 x 9) per plate
1 (x 1 replicate)	3 (x3 replicates)
50 μL antibody / 50 μL sample	0.04 μL antibody / 25 μL sample

Results

Single-biomarker approach

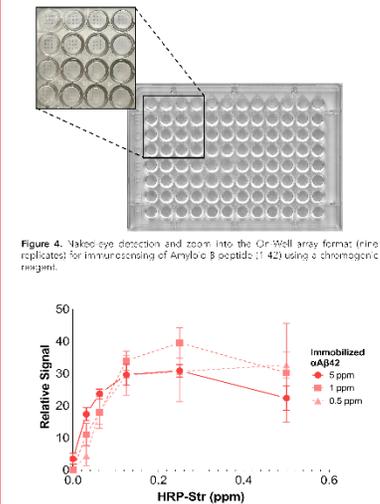


Figure 4. Naked eye detection and zoom into the On-Well array format for immunosensing of Amyloid β peptide (1-42) using a chromogenic reagent.

Figure 5. Optimization study for the Horseradish Peroxidase-Streptavidin conjugate (HRP-Str) at three different concentrations of immobilized antibody for the On-Well format.

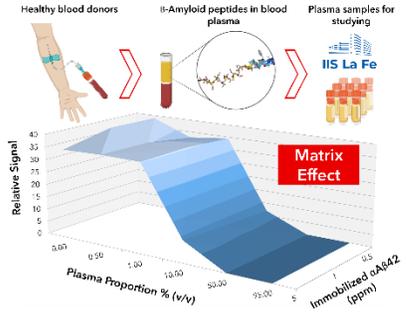


Figure 6. (Top) Schematic representation of serum samples from healthy donors at IIS La Fe. (Bottom) Matrix effect study of blood plasma for the detection of Amyloidβ peptide (1-42) using the On-Well format at three different concentrations (1%, 5%, and 10% v/v) of plasma. A serum concentration of 1% (v/v) shows similar detection efficiency as a plasma-free sample. The optimal serum proportion for the On-Well array might be between 1 and 10% (v/v) of plasma.

Multiplexed approach

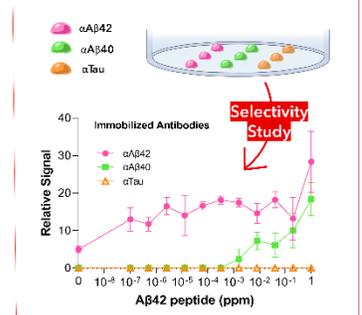


Figure 7. (Top) Schematic of the On-Well assay format for parallel testing of three different analytes using anti-Amyloidβ peptide (1-42) and anti-tau protein antibodies (αAβ40 and αAβ42, respectively), and an anti-tau protein antibody (αTau). (Bottom) Selectivity study of the multiplex assay format against Amyloidβ peptide (1-42) for the chosen antibodies, each at a concentration of 5 ppm. The On-Well multiplexed format showed good selectivity, especially at low peptide concentrations.

Conclusions

- The preliminary results indicated a high antibody immobilization density, adequate sensitivity, and detection ability, which allows the use of minute-volume samples.
- The On-Well microarray biosensing format can simultaneously detect up to three biomarkers in a single assay, showing good selectivity at low analyte concentrations. Thus, this format offers a convenient approach to analyzing AD biomarker profiles.
- This approach further allows testing minimal-invasivity samples, such as blood plasma, reducing costs and patient discomfort associated with traditional testing methodologies.
- The On-Well format allows for cost-effective scalability, promoting its translation into the healthcare system and aiding the development of new preventive and therapeutic approaches.



References

[1] Álvarez-Sánchez, L., et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(2), 1226.
[2] Walban, E., et al. *Immuno. Meth.* 2020, 481, 482, 112789.

Acknowledgments

Financial support received from project WEAROPSENS PID2022-140653GB-I00 funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 and by "ERDF/ELI" UPV IS La Fe (NB O AP2023.9 project) is also gratefully acknowledged.