

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DEL PERÚ**

Escuela de Posgrado



**Desarrollo de un dispositivo de ensayo de flujo lateral
basado en nanotriángulos de oro y aptámero-horquilla
para la detección de CEA por métodos ópticos**

Trabajo de investigación para obtener el grado académico de
Maestra en Química que presenta:

Mary Carmen Licuona Puma

Asesor(a):

Dra. Yulán Hernández García

Lima, 2024

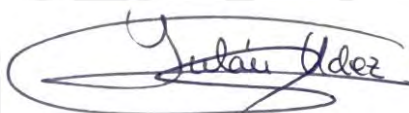
Informe de Similitud

Yo, Yulçan Hernández García, docente de la Escuela de Posgrado de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesor(a) del trabajo de investigación titulada(o) "Desarrollo de un dispositivo de ensayo de flujo lateral basado en nanotriángulos de oro y aptámero-horquilla para la detección de CEA por métodos ópticos", de la autora Mary Carmen Licuona Puma, dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 18%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 13/12/2023.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis o Trabajo de investigación, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha:

Lima, 7 de Marzo de 2024.

Apellidos y nombres del asesor / de la asesora: <u>Hernández García, Yulán</u>	
DNI: 001222740 (CE)	Firma
ORCID: 0000-0003-1276-5927	

Resumen

El cáncer es una enfermedad mortal que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera la segunda causa de muerte en el mundo. Se recomienda enfocarse en la detección temprana y el tratamiento para reducir la mortalidad por cáncer. Por lo tanto, es crucial explorar nuevas tecnologías basadas en marcadores tumorales que puedan implementarse en pruebas de detección temprana para el diagnóstico de la enfermedad. Uno de estos biomarcadores tumorales de proteínas es el antígeno carcinoembrionario (CEA), una glicoproteína cuya concentración es un signo bien establecido de cáncer colorrectal, entre otros, y de metástasis. Los métodos convencionales para la detección de CEA son los inmunoensayos.

Los inmunoensayos, basados en el uso de anticuerpos, son fundamentales en ensayos clínicos no invasivos. Entre ellos, destaca el ensayo de flujo lateral (LFA), que utiliza una membrana de nitrocelulosa con anticuerpos específicos para el análisis de muestras. Aunque son económicos y eficaces, los inmunoensayos tienen limitaciones, como la sensibilidad de los anticuerpos a cambios de pH y temperatura. Los aptámeros, oligonucleótidos selectivos, al ser más estables y económicos, han surgido como alternativa para detectar antígenos, ofreciendo mayor versatilidad y menor costo. Entre ellos, por aptámeros horquilla destacan por su cambio conformacional al entrar en contacto con el antígeno, siendo una opción prometedora para el reconocimiento molecular.

En este trabajo se desarrolló un nanoaptasensor basado en nanotriángulos de oro (AuNTs) con un λ_{\max} de 785 nm, los cuales fueron modificados con un aptámero-horquilla selectivo para CEA. Se estudió el pretratamiento del aptámero previo a la funcionalización, y se estabilizó el nanoaptasensor utilizando distintos agentes de relleno, como 2'-deoxiadenosin-5'-trifosfato disódico (dATP), el ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) y cadenas de polietilenglicol tiolado con dos grupos funcionales diferentes (HS-PEG(7)-OMe y HS-PEG(8)-COOH).

En los ensayos preliminares de detección de CEA en solución (0, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$), se evaluaron los nanoaptasensores preparados. Posteriormente, se llevó a cabo la optimización de las tiras de flujo lateral utilizando nanotriángulos con un λ_{\max} de 1100 nm. Se consideraron parámetros como el pretratamiento de la almohadilla de conjugado, el medio del nanoaptasensor, el *running buffer* y el tipo de nitrocelulosa.

Después de la optimización, se evaluó el desempeño del nanoaptasensor basado en los AuNTs con una λ_{\max} de 785 nm, modificados con el aptámero-horquilla y dATP, el cual mostró los mejores resultados en los ensayos preliminares en solución. La detección de CEA se probó con distintas concentraciones del biomarcador (0,18, 45, 90, 180 y 1800 ng/mL) mediante la técnica LFA. Además, se estudiaron los ensayos LFA mediante colorimetría y SERS. Los resultados indicaron que el nanoaptasensor permitió discernir concentraciones de CEA en el rango de 90 ng/mL mediante colorimetría, y concentraciones de hasta 4.5 ng/mL por SERS.

Agradecimientos

A mi familia, por el apoyo constante desde que inicié la carrera, especialmente a mi mamá, por su comprensión, preocupación y presencia, haciendo lo posible por ofrecerme su apoyo incondicional en todo momento.

A la Dra. Yulán Hernández, agradezco enormemente su paciencia y dedicación durante el proceso de mi formación académica. Aprecio los conocimientos brindados desde pregrado, por motivarme a continuar mis estudios en el área de nanotecnología, por las oportunidades brindadas para expandir mis horizontes. También por su calidad profesional y humana al contar con su apoyo a nivel académico y personal.

A la Dra. Betty Galarreta, quien me guió en mis inicios paso a paso durante el pregrado, facilitó mi aprendizaje sobre el mundo de las nanopartículas, y me ofreció consejos y apoyo académico para crecer como profesional.

Al Dr. Yves Coello por su apoyo en el diseño y elaboración de la caja para la toma de fotografías de las tiras de flujo lateral.

Al Dr. Jesús Martínez y la Dra. Valeria Grazú por la oportunidad de trabajar en el grupo Bionanosurf.

Al Dr. Carlos Cuestas por el apoyo y las sugerencias durante el desarrollo de los experimentos. También, a mis compañeros del grupo Bionanosurf, Adrián, Natalia, Marta, Marina, Antonio y Manuel, les agradezco los conocimientos adquiridos y, sobre todo, la ayuda infinita que me brindaron durante mi estancia en Zaragoza, haciendo que mi estadía fuera más amena.

A la Escuela de Posgrado y al Dr. Maynard Kong por su apoyo en mi participación en el congreso ACS Fall 2023 en el que tuve la oportunidad de presentar los resultados de este trabajo.

A todos los que formaron parte de este proyecto, a Johan por su ayuda e ideas durante los experimentos iniciales, y a Santiago por la colaboración en las mediciones y análisis de datos, además de su amistad, y ánimos durante esta etapa final de la tesis.

A mis amigos del laboratorio, Angeline, Ricardo, Adelaide, Sarita y Andrés por los buenos momentos compartidos, las risas nunca faltaron.

A Elias por los momentos bonitos y por brindarme su apoyo durante su estadía, y por transformar los momentos de estrés en alegría con sus ocurrencias, incluso estando lejos.

A mis amigos, Hugo, Fátima y Sthefany, que, a pesar de la distancia, han estado presentes brindándome su apoyo.

A Javier por escucharme.

A Karina por su apoyo en los momentos difíciles.

A Gastón y Agustín por la compañía durante la redacción de la tesis.

A mis amigos de la universidad por las increíbles anécdotas.

Al Proyecto de Prociencia (Nº 071-2021) por el financiamiento otorgado en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Tabla de Contenido

Índice de Figuras	i
Índice de Tablas	iv
Abreviaturas	v
1. Introducción	1
2. Marco teórico	1
2.1 Biomarcadores tumorales	1
2.1.1 Biomarcador CEA	2
2.2 Técnicas analíticas convencionales de detección y cuantificación de CEA.....	2
2.3 Ensayo de flujo lateral para la detección de CEA	3
2.4 Elementos de reconocimiento: anticuerpos y aptámeros	4
2.4.1 Anticuerpos.....	4
2.4.2 Aptámeros	5
2.5 Elementos de detección.....	7
2.5.1 Nanopartículas de metales nobles	7
2.5.1.2 Bioconjugación de AuNPs	9
2.6 Métodos cualitativos y cuantitativos de detección por LFA	9
2.6.1 Colorimetría	9
2.6.2 Espectroscopía de Raman amplificada en superficie (SERS)	10
3. Objetivos.....	11
3.1 Objetivo principal:	11
3.2 Objetivos específicos:.....	11
4. Parte experimental.....	12
4.1 Reactivos, equipos y materiales	12
4.2 Metodología.....	15
4.2.1 Síntesis y caracterización de AuNTs con una λ_{\max} a 785 nm (AuNT785) ..	15
4.2.2 Síntesis y caracterización de AuNTs con una λ_{\max} a 1100 nm (AuNT1100)	16
.....	16
4.2.3 Pretratamiento del aptámero de CEA.....	16
4.2.4 Funcionalización con AuNT785 con el aptámero de CEA	17
4.2.4.1 Funcionalización del sensor AuNT785@PEG@Apt	17
4.2.4.3 Funcionalización del sensor AuNT785@Apt@PEG/MPA.....	17
4.2.4.4 Funcionalización del sensor AuNT785@Apt@dATP	18
4.2.5 Funcionalización con AuNTs con una λ_{\max} a 1100 nm (AuNT1100) con el	19
aptámero de CEA	19
4.2.5.1 Funcionalización de AuNT1100@GSH	19
4.2.5.2 Funcionalización del sensor AuNT1100@GHS@Apt@dATP y	20
AuNT1100@Apt@dATP	20

4.2.5.3	Funcionalización del sensor AuNT1100@GHS@Apt@PEG y AuNT1100@Apt@PEG	20
4.2.6	Preparación de tiras LFA	20
4.2.6.1	Tiras LFA preparadas en el laboratorio QNano+	21
4.2.6.2	Tiras LFA preparadas en el laboratorio Bionanosurf	22
4.2.6.3	Evaluación del nanoaptasensor en las tiras LFA.....	23
4.2.7	Detección de CEA.....	24
4.2.7.1	Espectroscopía UV-Vis-NIR en solución	24
4.2.7.2	Detección de CEA mediante pruebas de LFA	24
4.2.8	Análisis multivariable.....	25
5.	Resultados y discusión	26
5.1	Síntesis y caracterización de AuNTs.....	26
5.1.1	AuNTs de $\lambda_{\max} = 785$ nm (AuNT785)	26
5.1.2	AuNTs de $\lambda_{\max} = 1100$ nm (AuNT1100).....	27
5.2	Pretratamiento del aptámero	27
5.3	Funcionalización de AuNTs785 con el aptámero de CEA y distintos agentes de relleno	30
5.3.1	Funcionalización de AuNT785@PEG-COOH/PEG-OMe@Apt.....	30
5.3.1.1	Ensayo de estabilidad	31
5.3.1.2	Ensayos preliminares con CEA en solución.....	32
5.3.2	Funcionalización de AuNT785@Apt@PEG-OMe/MPA.....	33
5.3.2.1	Ensayos preliminares con CEA en solución.....	35
5.3.3	Funcionalización de AuNT785@Apt@dATP	36
5.3.3.1	Detección mediante espectroscopía UV-Vis-NIR.....	37
5.4	Optimización de la preparación de tiras LFA.....	38
5.4.1	Funcionalización de AuNTs1100 para la evaluación de las tiras LFA.....	39
5.4.2	Pretratamiento de la almohadilla de conjugado.....	40
5.4.3	Medio del sensor.....	41
5.4.4	<i>Running buffer</i>	42
5.4.5	Tipo de nitrocelulosa	43
5.4.5	Detección de CEA.....	44
5.5	Detección de CEA por LFA con AuNTs785.....	46
5.5.1	Detección colorimétrica	46
5.5.2	Detección por SERS y análisis multivariable.....	50
6.	Conclusiones y perspectivas.....	54
7.	Bibliografía.....	56

Índice de Figuras

Figura 1. Componentes de un de flujo lateral.....	3
Figura 2. Respuesta colorimétrica de un ensayo LFA.....	4
Figura 3. Estructura de un anticuerpo (Ab).....	4
Figura 4. Tipos de estructuras del aptámero.....	5
Figura 5. Esquema del procedimiento de síntesis del aptámero por el método SELEX.6	
Figura 6. a) Representación esquemática del fenómeno LSPR de las AuNPs. b) Esquema de las distintas morfologías de las AuNPs y el rango de la banda LSPR.....	8
Figura 7. Esquema de la variedad de moléculas que se pueden conjugar en la superficie de las AuNPs.....	9
Figura 8. Sistema de detección por colorimetría en un ensayo de flujo lateral.....	10
Figura 9. Sistema de detección por SERS en un ensayo de flujo lateral.....	10
Figura 10. a) Propuesta del diseño del nanoaptasensor y del dispositivo de flujo lateral b) Esquema del diseño experimental.....	11
Figura 11. Esquema resumen del desarrollo del nanoaptasensor.....	15
Figura 12. Esquema de síntesis de AuNTs con una λ_{\max} 785 nm.....	16
Figura 13. Esquema de síntesis y funcionalización de AuNTs con una λ_{\max} de 1100 nm con glutatión.	19
Figura 14. Dispensador de flujo lateral del laboratorio QNano+.....	22
Figura 15. Ensamblaje de la tira LFA.....	22
Figura 16. Dispensador automático de flujo lateral del laboratorio Bionanosurf.	23
Figura 17. Caja negra optimizada diseñada en el laboratorio QNano+.....	25
Figura 18. Espectro de extinción de UV-Vis-NIR de los AuNTs de λ_{\max} 786 nm e imagen TEM de los AuNTs785 sintetizados.....	26
Figura 19. Espectros UV-Vis-NIR de AuNTs de 1100 nm.....	27
Figura 20. Espectros UV-Vis-NIR de los AuNTs785 modificados con el aptámero de CEA bajo distintas condiciones.....	29
Figura 21. Espectros UV-Vis-NIR de los nanoaptasensores modificados con distintas cantidades de aptámero (0.5, 1 y 2 nmol) y dos tipos de PEG: PEG-OMe y PEG-COOH.....	31
Figura 22. Prueba de estabilidad de AuNT@PEG@Apt.....	32
Figura 23. Espectros UV-Vis-NIR del ensayo de detección de CEA a 0 y 10 $\mu\text{g/mL}$ con el nanoaptasensor (AuNT785 modificado con PEG-OMe y el aptámero de CEA).....	33
Figura 24. Espectros UV-Vis-NIR de AuNT, AuNT@Apt@MPA y AuNT@Apt@PEG-OMe/MPA.....	34
Figura 25. Espectros UV-Vis-NIR de AuNTs y la funcionalización con distintas cantidades de agente de relleno (PEG-OMe y MPA).....	35
Figura 26. Espectros UV-Vis-NIR del ensayo de detección de CEA con dos nanoaptasensores: (a) AuNT@Apt@PEG 20 nmol@MPA 25 nmol y (b) AuNT@Apt@PEG 20 nmol@MPA 50 nmol de MPA.....	36
Figura 27. Espectros UV-Vis-NIR de los nanoaptasensores de AuNT785 funcionalizados con distintas cantidades de aptámero, y dATP como agente de relleno.....	37
Figura 28. Ensayo óptico de detección de CEA a 820 nm del nanoaptasensor AuNT785@Apt 0.068 nmol@dATP con distintas concentraciones de CEA (0, 18, 45, 90, 180 y 1800 ng/mL).....	38

Figura 29. Espectros UV-Vis-NIR de AuNT@Apt 0.032 nmol@dATP y AuNT@Apt 0.068 nmol@dATP. b) Ensayo LFA en ausencia de CEA de los nanoaptasensores (AuNT@Apt@dATP y AuNT@GSH@dATP) funcionalizados con 0.034 nmol (a) y 0.068 nmol (b) de aptámero..	39
Figura 30. Fotografía del estudio del efecto del pretratamiento de la almohadilla de conjugado: (a) sin pretratar, (b) pretratado con buffer de ácido bórico (ácido bórico 50 mM pH 8, BSA 0.5% w/v, PVP 40 kDa 0.5% w/v y Tween-20 1% v/v), y (c) pretratado con buffer Tris (Tris 1 M pH 8, Triton X-100 5%, NaCl 0.15 M).....	40
Figura 31. Fotografías de los ensayos realizados para ver la comparación entre resuspender las nanopartículas en agua o en buffer HEPES.....	41
Figura 32. Fotografía de los ensayos realizados para ver la comparación entre resuspender las nanopartículas en buffer HEPES o en buffer Na ₃ PO ₄ 20 mM pH:7, BSA 5% w/v, sacarosa 10% w/v y Tween-20 0.25% v/v.....	42
Figura 33. Fotografías del estudio del efecto del running buffer en las tiras de flujo lateral: a) buffer PBS (PBS 10x pH 9 + BSA al 0.5% + Tween-20 al 1%), b) buffer SSC (SSC 5x + 5% BSA), y c) buffer Tris (Tris 50 mM pH 9 + NaCl 100 mM + MgCl ₂ 50 mM).	43
Figura 34. Fotografía de los ensayos realizados para ver la comparación entre las líneas de ensayo y control utilizando nitrocelulosa HP80 y HP120.	44
Figura 35. Fotografías de los resultados obtenidos con las tiras de flujo lateral al analizar AuNT@Apt@dATP tras ser incubados con distintas concentraciones de CEA (0, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 nM).	45
Figura 36. Análisis de las intensidades de píxeles de la línea de ensayo de diversos ensayos llevados a cabo utilizando AuNT1100@Apt 0.068 nmol@dATP, en presencia de diferentes concentraciones de CEA (0, 18, 45, 90 y 180 ng/mL).....	46
Figura 37. Tiras de flujo lateral (de izquierda a derecha) del ensayo del sensor con 0 µg/mL (1 y 4), 5 µg/mL (2 y 5) y 10 µg/mL (3 y 6) de CEA. Se usó el sensor AuNT@Apt@PEG@MPA (a) corresponde a 25 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe para las tiras 1-3 y AuNT@Apt@PEG@MPA (b) corresponde a 50 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe para las tiras 4-6.....	47
Figura 38. Análisis de las intensidades de píxeles de la línea de ensayo de la detección de CEA mediante LFA utilizando dos tipos de nanoaptasensores (AuNT785@Apt@20PEG+25MPA (a) corresponde a 25 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe y AuNT785@Apt@20PEG-OMe+50MPA (b) corresponde a 50 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe), en presencia de diferentes concentraciones de CEA (0, 5 y 10 µg/mL).	48
Figura 39. Tiras de flujo lateral 1-6 (de izquierda a derecha) del ensayo de detección de CEA (0,18, 45, 90, 180 y 1800 ng/mL) con el nanoaptasensor de AuNT@Apt 0.068 nmol@dATP.....	48
Figura 40. Análisis de las intensidades de píxeles de la línea de ensayo de diversos ensayos llevados a cabo utilizando distintos tipos de AuNT785@Apt 0.068 nmol@dATP, en presencia de diferentes concentraciones de CEA (0, 18, 45, 90, 180 y 1800 ng/mL)..	49
Figura 41. Espectros Raman obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de CEA (0, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.25 y 0.5 nM) utilizando el nanoaptasensor AuNT@Apt 0.068 nmol@dATP.....	51
Figura 42. Análisis PLS de los espectros Raman obtenidos utilizando distintos tipos de AuNT@Apt@dATP en presencia de distintas concentraciones de CEA..	52

Figura 43. Valores VIP de los espectros Raman de la detección de CEA con el nanoaptasensor AuNT@Apt 0.068 nmol@dATP analizados por PLS..... 53



Índice de Tablas

Tabla 1. Lista de biomarcadores de cáncer aprobados por la FDA.....	2
Tabla 2. Características de los anticuerpos y aptámeros.....	7
Tabla 3. Reactivos empleados para la síntesis de AuNTs, funcionalización y detección de CEA.....	12
Tabla 4. Proteínas utilizadas en los ensayos.....	13
Tabla 5. Cantidades de los reactivos para la funcionalización de AuNT785@Apt@MPA@PEG.....	18
Tabla 6. Cantidad de cada reactivo para la funcionalización.....	18
Tabla 7. Cantidad de cada reactivo para la funcionalización.....	20
Tabla 8. Condiciones evaluadas en la preparación de las tiras LFA.....	21
Tabla 9. Condiciones finales evaluadas para cada tipo de funcionalización con los AuNT785.....	38
Tabla 10. Condiciones finales evaluadas para la detección de CEA mediante LFA con los AuNTs785.....	50
Tabla 11. Concentraciones de CEA.....	51
Tabla 12. Valores de referencia de las variables analizadas por PLS.....	53



Abreviaturas

AuNPs	Nanopartículas de oro
AuNTs	Nanotriángulos de oro
Apt	Aptámero
AuNT@Apt	Nanotriángulo de oro funcionalizado con aptámero
AuNT@PEG@Apt	Nanotriángulo de oro funcionalizado con polietilenglicol y aptámero
AuNT@Apt@PEG@MPA	Nanotriángulo de oro funcionalizado con aptámero, polietilenglicol y MPA
AuNT@MPA	Nanotriángulo de oro funcionalizado con MPA
BSA	Albúmina de suero bovino
CEA	Antígeno carcinoembrionario
dATP	2'-Deoxiadenosin-5'-trifosfato disódico
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
LFA	Ensayo de flujo lateral (<i>Lateral Flow Assay</i>)
LSPR	Resonancia de plasmón de superficie localizada (<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>)
MPA	Ácido 3-mercaptopropiónico
NC	Nitrocelulosa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PLS	Regresión de mínimos cuadrados parciales (<i>Partial Least Squares</i>)
RT	Temperatura ambiente (room temperature)
R ²	Coefficiente de correlación
RMSECV	Error cuadrático medio de validación cruzada (<i>Root Mean Square Error of Cross-Validation</i>)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SERS	Espectroscopía Raman amplificada en superficie (<i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i>)
TCEP	Clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
VIP	Importancia de la variable en la proyección (<i>Variable Importance in Projection</i>)

w/v

Factor de concentración masa – volumen

v/v

Factor de concentración volumen – volumen



Desarrollo de un dispositivo de ensayo de flujo lateral basado en nanotriángulos de oro y aptámero-horquilla para la detección de CEA por métodos ópticos

1. Introducción

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo,¹ mientras que en el Perú, se estima que la incidencia de casos de cáncer fue de 66000 en el 2018.² Esta enfermedad se origina por el crecimiento descontrolado de células anormales en una parte del cuerpo, en un tejido o en algún órgano. Las células cancerosas tienden a acumularse y formar tumores. Estas células cancerosas tienden a separarse del tumor y extenderse por otras zonas del cuerpo, fase conocida como metástasis y que aumenta en gran medida la dificultad de su tratamiento.¹

Una manera de evitar que el cáncer evolucione a un estado avanzado es detectarlo en su fase inicial. Según la OMS, un diagnóstico temprano podría reducir en un 30 % los casos de muerte debido al cáncer.³ Es por ello, que se ha dedicado un gran esfuerzo a la exploración de nuevas tecnologías para detectar signos del cáncer en estados tempranos y, así poder implementar métodos de detección en sistemas de análisis rutinarios.³

La presencia en el organismo de algunas entidades bioquímicas en niveles diferentes a los habituales, está relacionado con distintos tipos de cáncer, motivo por el cual estos son denominados biomarcadores tumorales. Estos biomarcadores pueden tener distinta naturaleza y se han identificado desde ácidos nucleicos y metabolitos, hasta células tumorales y proteínas.⁴ Estas últimas son conocidas por ser biomoléculas vitales en el organismo con muy diversas funciones, pero una expresión anómala de algunas de ellas está asociada con el cáncer.⁴

2. Marco teórico

2.1 Biomarcadores tumorales

Unas de las causas de muerte de pacientes con cáncer son el diagnóstico y tratamiento tardío, ya que los síntomas de esta enfermedad se manifiestan en una etapa avanzada. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) un diagnóstico temprano podría salvar a millones de pacientes de una muerte prematura.² En muchos casos el problema de los métodos de diagnóstico es que son costosos, y por eso solo se utilizan cuando el paciente presenta síntomas más severos, además de ser invasivos, lo que los hace poco atractivos.⁵ En los últimos años, se han estudiado arduamente nuevos indicadores bioquímicos para su aplicación clínica y en análisis de rutina, entre los que se encuentran los biomarcadores que dan indicios del desarrollo del cáncer.⁶

Un biomarcador tumoral es una biomolécula producida por el organismo de manera anómala, bien sea por las células cancerosas o como respuesta del cuerpo hacia el cáncer. Este tipo de biomoléculas tienen una identidad única con características definidas, lo cual permite el desarrollo de métodos de detección para una medición

objetiva. Los biomarcadores tumorales pueden tener distinta naturaleza y pertenecer a diferentes grupos bioquímicos como proteínas, ácidos nucleicos (ADN, ARN o micro-ARN), péptidos, hormonas, antígenos oncofetales, citoqueratinas y carbohidratos. Estas moléculas pueden estar presentes en el sistema circulatorio (sangre completa, suero o plasma), en secreciones (heces, orina, esputo o secreción del pezón) y en otros fluidos biológicos humanos. Los biomarcadores más estudiados son las proteínas y en la Tabla 1⁷ se muestran los biomarcadores aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*), para la detección de algunos tipos de cáncer.⁴

Tabla 1. Lista de biomarcadores de cáncer aprobados por la FDA. Tomado de la referencia 7.

Biomarcador	Tipo de cáncer	Fuente
α-fetoproteína	Testicular	Suero
Gonadotropina coriónica humana-β		Suero
Tiroglobulina	Tiroides	Suero
Antígeno de carbohidratos 125	Ovario	Suero
Proteína 4 del epidídimo humano		Suero
Antígeno carcinoembrionario	Colorrectal	Suero
Receptor del factor de crecimiento epidérmico		Tejido
Antígeno de carbohidratos 15.3	Mama	Suero
Antígeno de carbohidratos 27.29		Suero
Receptor de estrógeno		Tejido
Receptor de progesterona		Tejido

2.1.1 Biomarcador CEA

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína de masa molecular aproximada 180 kDa, producida por las membranas mucosas intestinales embrionarias antes del nacimiento, y cuya concentración habitual en el suero es de 2 ng/mL y en fumadores puede llegar a 5 ng/mL.^{8,9} Cuando la concentración de CEA es superior a los 5 ng/mL es una señal de la presencia de cáncer colorrectal.⁹ Por esta razón, el desarrollo de sensores sensibles y selectivos a este biomarcador, pueden ser la clave para lograr el desarrollo de sistemas de detección rutinarios que permitan lograr un diagnóstico temprano de la enfermedad.⁸⁻¹⁰

2.2 Técnicas analíticas convencionales de detección y cuantificación de CEA

Los métodos convencionales que se emplean en ensayos clínicos para la detección de CEA son los inmunoensayos.¹¹ Los inmunoensayos están basados en el uso de anticuerpos como agentes de reconocimiento, los cuales poseen una elevada selectividad, pero son muy sensibles a variaciones en las condiciones de trabajo (cambios de pH o temperatura).¹¹ En contraste, los oligonucleótidos conformados por una hebra de ADN o ARN, conocidos como aptámeros, son una buena alternativa como elementos de reconocimiento en la detección de CEA. Estos destacan por su estabilidad, gran afinidad y selectividad.¹²

2.3 Ensayo de flujo lateral para la detección de CEA

El ensayo de flujo lateral (LFA) es un biosensor *in situ* utilizado como herramienta de diagnóstico de un punto de atención (*Point-of-care*, POC) y está basado en una plataforma de papel. Los dispositivos de LFA están compuestos por cuatro componentes: una sección de muestra, una sección del conjugado, una membrana de nitrocelulosa (NC) y una sección absorbente (Figura 1).¹³

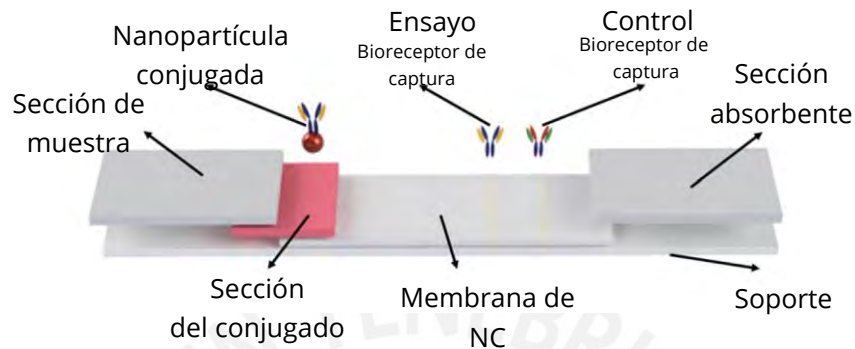


Figura 1. Componentes de un de flujo lateral. Adaptado de la referencia 12.

El bajo costo y la facilidad de producción de los dispositivos de LFA ha dado como resultado la expansión de sus aplicaciones a múltiples campos en los que se requieren pruebas rápidas. El sector industrial utiliza dispositivos de LFA para el control de calidad de alimentos y el monitoreo de parámetros ambientales. El campo principal del uso de dispositivos de LFA es el sector salud para la detección cualitativa y, en algunos casos, cuantitativa de antígenos específicos. Entre las aplicaciones más conocidas están las pruebas de embarazo y las pruebas rápidas para la detección de COVID-19. Se pueden analizar diversos tipos de muestras biológicas utilizando LFA, por ejemplo, orina, saliva, sudor, suero, plasma, sangre y otros líquidos.¹⁴⁻¹⁶

El principio de este ensayo se basa en el flujo de la muestra por capilaridad a través de la secuencia de secciones o bandas del dispositivo de LFA. La muestra se aplica en un extremo del dispositivo, en la sección de muestra, que está impregnada con buffer y tensioactivos que permiten que la muestra interaccione con el sistema de manera más efectiva. La sección de la muestra asegura que el analito presente en la muestra sea capaz de unirse a los elementos de captura de la sección de conjugado y en la membrana de nitrocelulosa (sección de detección). La muestra tratada migra a través de la sección de conjugado, que contiene los elementos de reconocimiento que son específicos del analito objetivo. La muestra junto con el elemento de reconocimiento unido al analito migra a lo largo del dispositivo hacia la sección de detección. Esta sección contiene los elementos de detección y su función es conjugarse con el analito unido al elemento de reconocimiento. El reconocimiento del analito de la muestra da como resultado una respuesta adecuada en la línea de ensayo, mientras que una respuesta en la línea de control indica que el flujo del líquido es adecuado a través del dispositivo (Figura 2). La lectura representada por las líneas que aparecen con diferentes intensidades se puede evaluar visualmente o con un lector colorimétrico.^{13,17}

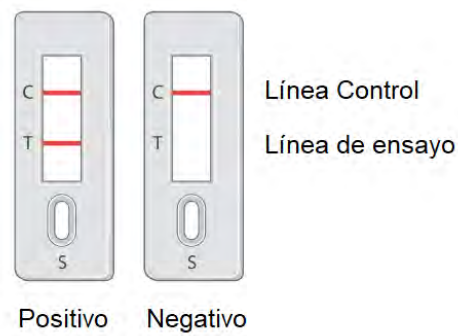


Figura 2. Respuesta colorimétrica de un ensayo LFA.

2.4 Elementos de reconocimiento: anticuerpos y aptámeros

2.4.1 Anticuerpos

Los anticuerpos (Ab) son proteínas globulares pertenecientes al grupo de gammaglobulinas y su estructura tiene forma de “Y” (Figura 3).¹⁸ Se caracterizan por ser capaces de unirse con una alta especificidad a concentraciones bajas de su antígeno o analito asociado.¹⁹ Estos pueden ser de diferentes tipos: anticuerpo monoclonal, policlonal o recombinante, los cuales son seleccionados a partir de diversas técnicas como la inmunización, la cual obtiene la información genética de las células B, productoras de anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales son bastante específicos y se unen a un único epítipo del antígeno objetivo. Los anticuerpos policlonales son capaces de unirse a epítopos diferentes y se utilizan con frecuencia para la detección de patógenos. Los anticuerpos recombinantes se producen mediante manipulación genética de genes de anticuerpos y pueden diseñarse para el autoensamblaje en una orientación específica.^{18, 19}

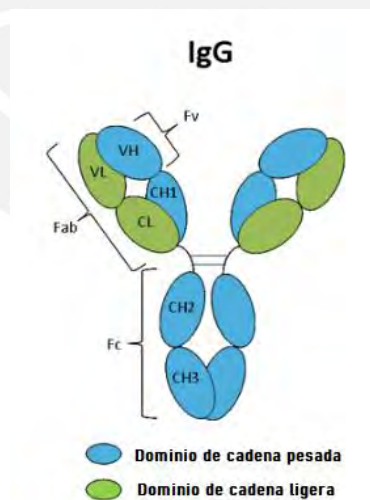


Figura 3. Estructura de un anticuerpo (Ab). Los elipsoides verdes corresponden a la cadena ligera mientras que los azules representan la cadena pesada. Los enlaces disulfuro se indican con líneas negras. Las regiones indicadas con Fab, Fv y Fc representan la región de unión del antígeno del fragmento, la región variable del fragmento y la región cristalizante del fragmento, respectivamente. Tomado de la referencia 18.

2.4.2 Aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios conformados por una hebra de ADN o ARN que se unen de manera específica a un analito. El diseño de la estructura del aptámero puede adoptar conformaciones tridimensionales según la secuencia de nucleótidos, en la Figura 4 se muestra la variedad de estructuras de los aptámeros.²⁰ Estas biomoléculas de reconocimiento son capaces de cambiar su conformación en presencia del analito en estudio. Existen aptámeros selectivos a una gran cantidad de analitos de una diversa variedad de tamaños, desde iones metálicos, y moléculas orgánicas pequeñas (aminoácidos, ATP, vitaminas, toxinas) hasta moléculas de mayor tamaño como péptidos, proteínas, e incluso células y bacterias.^{18,20}

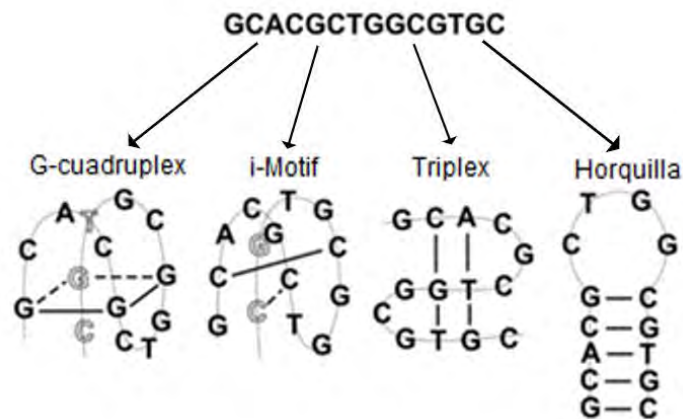


Figura 4. Tipos de estructuras del aptámero. Tomado de la referencia 20.

El método de preparación está basado en el proceso SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichments*). El mecanismo de selección consiste en cuatro pasos principales: 1) incubación, 2) selección, 3) elución y 4) amplificación (Figura 5). La incubación del analito objetivo se lleva a cabo con una amplia librería de ácidos nucleicos aleatorios (10^{15} - 10^{16}) para formar el complejo aptámero-analito en función de su afinidad. La siguiente etapa es la selección de los ácidos nucleicos unidos al analito de interés que se separan de las secuencias no afines mediante un proceso de lavado. Luego, las cadenas de ácidos nucleicos son eluidos para separarlos del analito. El último paso es la amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de la secuencia del oligonucleótido para enriquecer la librería de ácidos nucleicos y volver a comenzar el ciclo de selección. Los estudios muestran que los aptámeros son capaces de establecer los mismos tipos de interacciones que los anticuerpos, (ej. enlace de puente de hidrógeno, interacción electrostática, contacto hidrofóbico, impedimento estérico) los cuales brindan una alta selectividad y afinidad.²¹

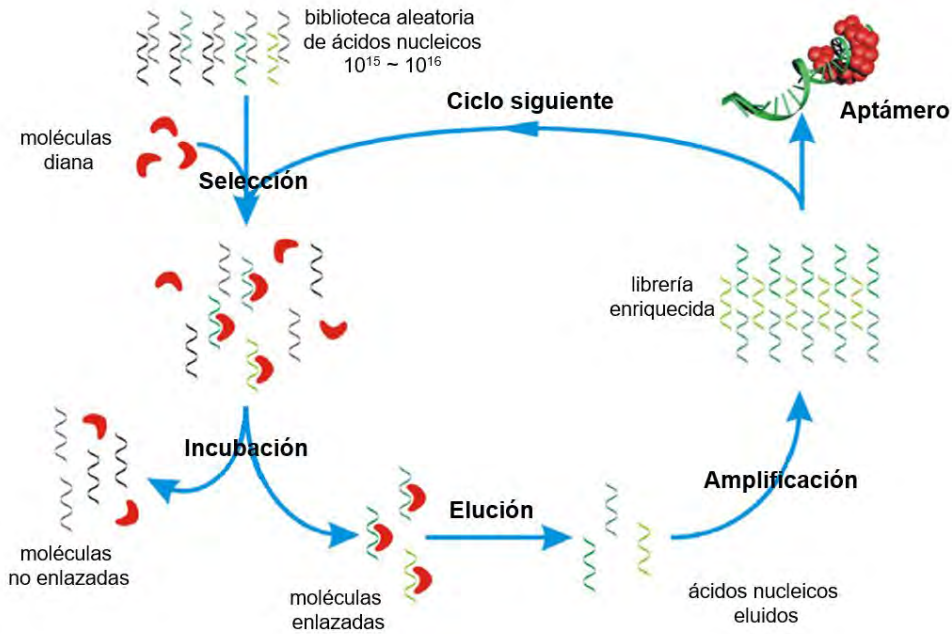


Figura 5. Esquema del procedimiento de síntesis del aptámero por el método SELEX. Tomado de la referencia 21.

El uso de aptámeros posee varias ventajas, como su síntesis química en pocos minutos, su estabilidad bajo una amplia variedad de condiciones, su resistencia a la desnaturalización física o química con poca o ninguna pérdida de actividad, y su fácil modificación con otras moléculas. Además, los aptámeros tienen la característica de ser selectivos al cambiar su conformación cuando interactúan con el analito y que estos cambios se puedan monitorear. En especial, los aptámeros-horquilla exhiben un cambio conformacional notable al abrirse cuando capturan al analito, dejando un extremo de la hebra expuesto tras la abertura de la horquilla.¹⁸ Esta característica permite la modificación con una molécula terminal, como la molécula de biotina, para aprovechar la interacción biotina-estreptavidina.²² Otra ventaja es la posibilidad de aprovechar e integrar el uso de nanopartículas mediante la modificación del aptámero-horquilla con un grupo tiol para la funcionalización, y así monitorear estos cambios en el aptámero.²³

En la Tabla 2 se muestran las principales características de los anticuerpos y los aptámeros.^{18,24}

Tabla 2. Características de los anticuerpos y aptámeros. Tomado de la referencia 18 y 24.

Característica	Anticuerpo	Aptámero
Tamaño	Gran tamaño	Pequeño
Sensibilidad a la temperatura	Sensible a la temperatura, tiempo de almacenamiento corto	Almacenado y transportado a temperatura ambiente
Estabilidad	La desnaturalización inducida por la temperatura es irreversible	La desnaturalización inducida por la temperatura es reversible
Costo	Largo tiempo de preparación con alto costo	Corto tiempo de preparación con bajo costo
Analito objetivo	Limitado	Amplia gama de sustancias
Modificación	Pierde afinidad con el objetivo con etiquetas	Mantiene la actividad biológica original con etiquetas
Reactividad cruzada	No se pueden separar sustancias con reactividad cruzada	Puede separar sustancias análogas estructurales o con reactividad cruzada

2.5 Elementos de detección

Los dispositivos de LFA tienen, como mínimo, un elemento de reconocimiento y un elemento de detección. Los elementos de reconocimiento en este tipo de ensayos suelen ser anticuerpos, aunque en los últimos años se han comenzado a reemplazar por aptámeros. Por otro lado, los elementos de detección se encargan de inducir los cambios fisicoquímicos que tienen lugar en presencia del analito. La lectura de la señal producida en la superficie del dispositivo puede ser cualitativa o cuantitativa. La lectura cualitativa se puede realizar a simple vista gracias a los cambios de color que se producen, pero este método solo indica la presencia o ausencia del analito objetivo. Para un análisis cuantitativo de la concentración del analito, se puede medir la intensidad del color en la línea de ensayo o emplear otras técnicas complementarias como la espectroscopía Raman amplificada en superficie (SERS) o hipertermia.^{17,25,26}

Los elementos de detección son transductores que se encargan de producir una señal medible en la sección de detección. Los dispositivos tradicionales de LFA emplean partículas de látex coloreadas o una solución coloidal de oro (nanopartículas esféricas), las cuales han sido previamente conjugadas con anticuerpos o aptámeros para la captura del analito. La elección del material del elemento de detección es importante, porque de ello dependerá la eficacia, el tipo de estrategia de medición y el acoplamiento con el elemento de reconocimiento.¹⁷ En los últimos años, se han centrado muchos esfuerzos en el estudio de gran variedad de nanomateriales para el desarrollo de sistemas LFA, ya que las novedosas propiedades que estos presentan, pueden aportar muchas ventajas a la técnica.¹³

2.5.1 Nanopartículas de metales nobles

Las nanopartículas de metales nobles son un tipo de materiales con, al menos, una dimensión en el rango de 1-100 nm, compuestos, principalmente, de oro, plata o platino.²⁷ En particular, las nanopartículas de oro (AuNPs) son las más usadas en el

desarrollo de biosensores de LFA.¹⁷ Estas sobresalen por cinco razones como i) la variedad de métodos de síntesis para producir AuNPs de diferentes tamaños y formas, ii) su baja toxicidad, iii) su relativamente alta estabilidad, iv) su mayor resistencia a la oxidación que las nanopartículas de plata, y v) su facilidad de funcionalización con una gran variedad de moléculas.¹³

2.5.1.1 Propiedades ópticas de las AuNPs

Una de las propiedades más importantes de las AuNPs es que, al igual que el resto de nanopartículas de metales nobles, presentan un fenómeno denominado resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR). Este fenómeno está asociado a la oscilación coherente de los electrones libres del metal en la interfase entre la nanopartícula y el entorno cuando se hace incidir luz con una determinada frecuencia (frecuencia de resonancia) sobre la superficie de las nanoestructuras (Figura 6.a). La frecuencia de resonancia depende de factores como la forma, el tamaño, el material y el entorno químico, y puede ser monitoreada por espectroscopía UV-Vis-NIR. De acuerdo a la morfología de las AuNPs, el comportamiento plasmónico puede cambiar (Figura 6.b).²⁸ Así, por ejemplo, las nanopartículas isotrópicas, como las nanoesferas, presentan el mismo comportamiento LSPR en todas las direcciones del espacio. En cambio, las nanopartículas anisotrópicas, como los nanocubos, las nanovarillas y los nanotriángulos, entre otros, presentan un comportamiento diferenciado y zonas de concentración del campo eléctrico conocidas como “hot-spots”.²⁹

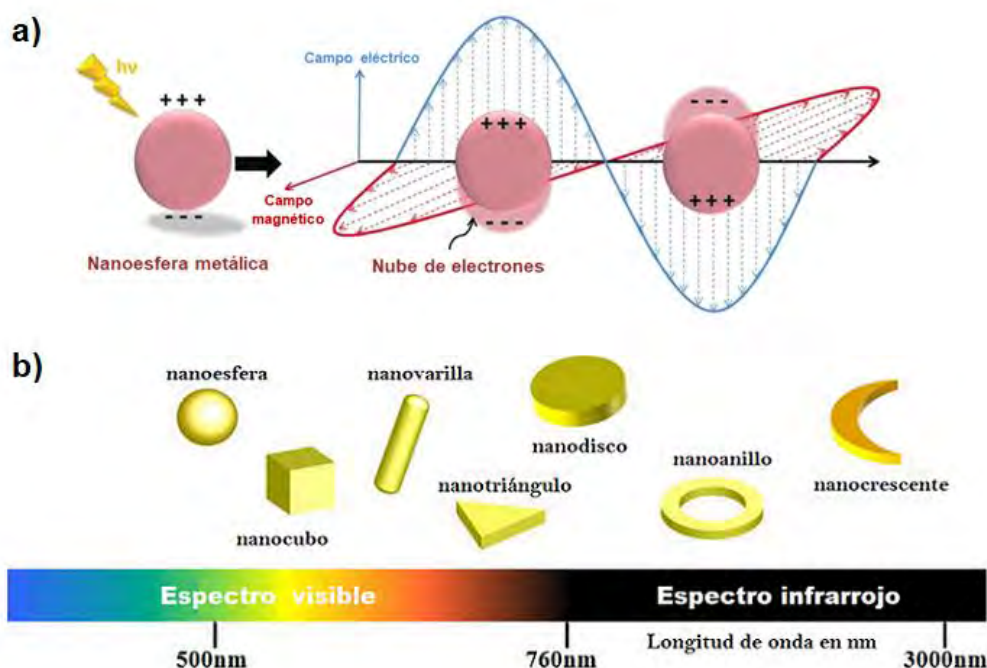


Figura 6. a) Representación esquemática del fenómeno LSPR de las AuNPs. Tomado de la referencia 28. b) Esquema de las distintas morfologías de las AuNPs y el rango de la banda LSPR. Tomado de la referencia 29.

2.5.1.2 Bioconjugación de AuNPs

Una característica esencial de las AuNPs es la alta relación superficie/volumen, la cual facilita la bioconjugación de los elementos de reconocimiento en la superficie de los elementos de detección (Figura 7). La interacción entre las biomoléculas y la superficie de las AuNPs dependerá de diversos factores, como la densidad de grupos reactivos, la forma, la estabilidad, la superficie, la carga neta, etc. Algunos de los métodos empleados para la unión de las biomoléculas en la superficie de las AuNPs están basados en la interacción electrostática, el enlace covalente, y la quimisorción, entre otros.³⁰ La interacción electrostática se produce entre especies cargadas, siendo sensible al cambio de pH y a la fuerza iónica del medio. Por otra parte, la unión por enlace covalente se da por el acoplamiento químico entre grupos funcionales, y la quimisorción consiste en la unión directa de la biomolécula con la nanopartícula mediante enlaces quasi-covalentes.^{30, 31} Estos métodos de bioconjugación permiten la modificación de la superficie de las AuNPs con una amplia variedad de moléculas, como moléculas fluorescentes, péptidos, polímeros, con anticuerpos y aptámeros.³² Como se ha mencionado anteriormente, aunque los anticuerpos son los elementos de reconocimiento más usados en los dispositivos de LFA, los aptámeros presentan una serie de ventajas que los convierten en una muy buena alternativa. Entre otras ventajas, el hecho de que los aptámeros se puedan modificar fácilmente con grupos tiol, hace que se puedan conjugar directamente con la superficie de nanopartículas de oro.²⁷

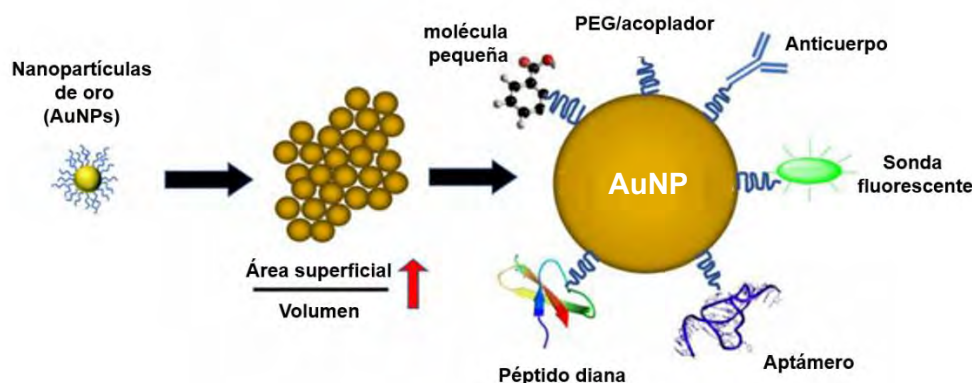


Figura 7. Esquema de la variedad de moléculas que se pueden conjugar en la superficie de las AuNPs. Adaptado de la referencia 32.

2.6 Métodos cualitativos y cuantitativos de detección por LFA

Los dispositivos de LFA se pueden usar para detección visual directa o en combinación con el uso de otras técnicas para obtener resultados más confiables y mejorar la sensibilidad. Además, se pueden llegar a obtener resultados cuantitativos del analito.

2.6.1 Colorimetría

Este método aprovecha las propiedades ópticas de las AuNPs, ya que su banda plasmónica, ubicada en el rango UV-Vis-NIR, le da la cualidad de presentar colores intensos, lo cual permite la detección visual. Por otro lado, también se puede implementar un sistema de detección cuantitativo, en el cual se mide la intensidad del color correlacionado con la concentración del analito. En el trabajo desarrollado por Ruppert *et al.*,³³ se empleó el ensayo de flujo lateral para la detección de digoxigenina y se elaboró un sistema para la cuantificación mediante la medición de píxeles de la fotografía del ensayo con un celular (Figura 8).

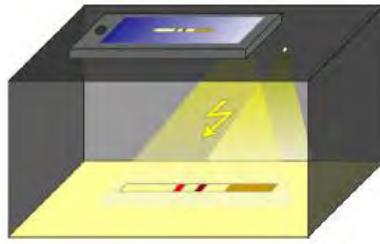


Figura 8. Sistema de detección por colorimetría en un ensayo de flujo lateral. Tomado de la referencia 33.

2.6.2 Espectroscopía de Raman amplificada en superficie (SERS)

La espectroscopía Raman amplificada en superficie combina la espectroscopía Raman convencional con el uso nanopartículas. La ventaja de las AuNPs es que son capaces de actuar como antena, lo que da como resultado la intensificación de las señales vibracionales en varios órdenes de magnitud.²⁶ El uso de SERS en combinación con LFA (Figura 9) podría convertirse en una prometedora combinación para un análisis confiable y preciso, que sea rápido y permita un gran número de ensayos simultáneos. Los sensores SERS permiten obtener señales $10^6 - 10^9$ más intensas que las obtenidas por la técnica convencional de espectroscopía Raman.²⁶

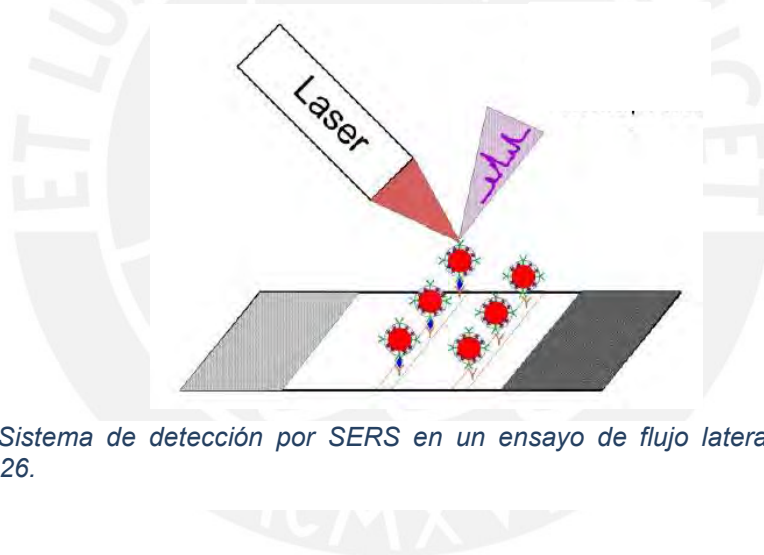


Figura 9. Sistema de detección por SERS en un ensayo de flujo lateral. Tomado de la referencia 26.

3. Objetivos

3.1 Objetivo principal:

Implementar un método de detección de CEA mediante un dispositivo de flujo lateral basado en nanotriángulos de oro y aptámeros (en la figura 10.a se muestra el diseño del nanoaptasensor y del dispositivo).

3.2 Objetivos específicos:

- Optimizar las condiciones necesarias como el pH, la concentración del aptámero y de las moléculas de relleno para la modificación de los nanotriángulos de oro con el aptámero horquilla selectivo de CEA.
- Estudiar el efecto del tiempo de incubación de CEA con los nanotriángulos modificados con el aptámero selectivo óptimo para la formación del complejo aptámero-CEA.
- Evaluar el acoplamiento selectivo de los nanotriángulos de oro funcionalizados con el aptámero biotinilado en la línea control y en la línea de ensayo de la superficie del dispositivo de flujo lateral en presencia de CEA.
- Analizar la respuesta de detección de CEA en la línea de ensayo y el adecuado funcionamiento del sensor en la línea control (figura 10.b) mediante diversos métodos ópticos.
- Analizar los resultados obtenidos de la detección por SERS.
- Determinar el límite de detección de CEA mediante los distintos métodos empleados.

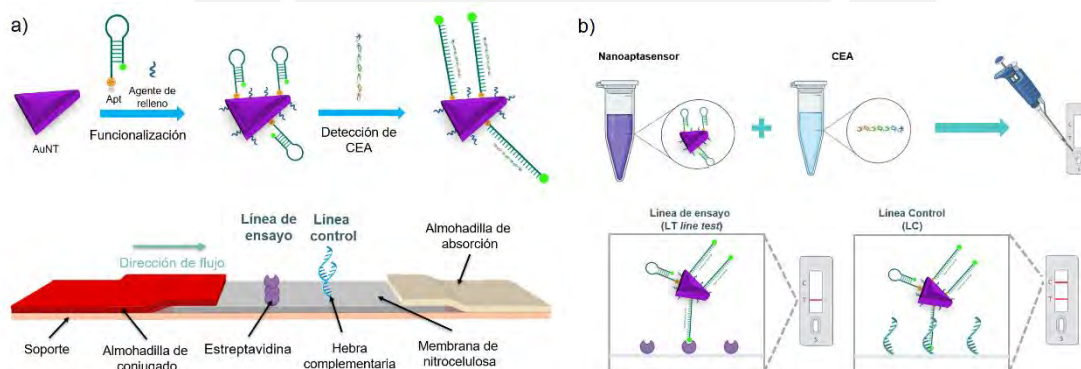


Figura 10. a) Propuesta del diseño del nanoaptasensor y del dispositivo de flujo lateral b) Esquema del diseño experimental.

4. Parte experimental

4.1 Reactivos, equipos y materiales

A continuación, se mencionan la lista de reactivos, materiales y equipos empleados en los experimentos. Cabe indicar que los experimentos realizados se trabajaron en dos laboratorios, el laboratorio QNano+ y el laboratorio Bionanosurf, por lo que se usaron distintos equipos.

Tabla 3. Reactivos empleados para la síntesis de AuNTs, funcionalización y detección de CEA.

Reactivo	Fórmula	Masa molar (g/mol)	Marca
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	61.83	Merck
Ácido tetracloroáurico trihidratado	HAuCl ₄ .3H ₂ O	393.83	Sigma - Aldrich
Ácido 3-mercaptopropiónico (MPA)	C ₃ H ₆ O ₂ S	106.14	Sigma - Aldrich
Agua Fisher	H ₂ O	18.015	Sigma - Aldrich
Dodecilsulfato sódico	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	288.38	Sigma - Aldrich
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	136.09	Sigma - Aldrich
Fosfato de potasio dibásico	K ₂ HPO ₄	174.18	Sigma - Aldrich
Cloruro de sodio	NaCl	58.44	JT Baker
Cloruro de magnesio	MgCl ₂	95.21	Sigma - Aldrich
Clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP)	C ₉ H ₁₅ O ₆ P.HCl	286.65	Sigma - Aldrich
L-glutati3n (reducido)	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	307.33	Sigma - Aldrich
Hidróxido de sodio	NaOH	40.00	JT Baker
Polivinilpirrolidona (PVP)	(C ₆ H ₉ NO) _n	40000	Merck
Sal disódica de 2'-deoxyadenosin-5'-trifosfato	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ Na ₂ O ₁₂ P ₃	535.146	Alfa Aesar
Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30	Sigma - Aldrich
Tiosulfato de sodio pentahidratado	Na ₂ O ₃ S ₂ .5H ₂ O	248.18	Sigma - Aldrich
Tween-20	C ₁₈ H ₃₄ O ₆ (C ₂ H ₄ O) _N	1227.54	Bio Basic
Tris(hidroximetil)amino metano	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121.14	Merck
Trit3n X-100			Sigma - Aldrich
alfa-metoxi-omega-mercaptop hepta(etilenglicol)	HS-PEG(7)-OMe	356.48	Iris Biotech
alfa-tio-omega-(ácido propiónico) octa(etilenglicol)	HS-PEG(8)-COOH	458.57	Iris Biotech

Se usaron las siguientes secuencias de aptámeros adquiridos de Eugentec:

Aptámero de CEA: 5' Tiol-C6 - CCA CGA TAC CAG CTT ATT CAA TTC GTG G – Biotina C3 - 3'

Aptámero complementario: 5' Biotina C6 - CCA CGA ATT GAA TAA GCT GGT ATC GTG G - 3'.

Tabla 4. Proteínas utilizadas en los ensayos.

Proteína	Masa molecular (kDa)	Marca
Antígeno carcinoembrionario (CEA)	180	Abcam
Albúmina de suero bovino (BSA)	66.5	Sigma - Aldrich
Estreptavidina	60	Anaspec

Los materiales empleados para las tiras de flujo lateral fueron:

- Almohadilla de conjugado, se usó fibra de vidrio 8964 marca ClaremontBio cuyas dimensiones son 22x250 mm
- Nitrocelulosa HP80 y HP120 marca ClaremontBio con dimensiones 21x297 mm.
- Almohadilla de absorción, se usó fibra de algodón marca ClaremontBio con dimensiones 0,48x22x300 mm

A continuación, se mencionan los equipos empleados en la caracterización de la síntesis y funcionalización de AuNTs, y los ensayos de flujo lateral utilizados en cada laboratorio.

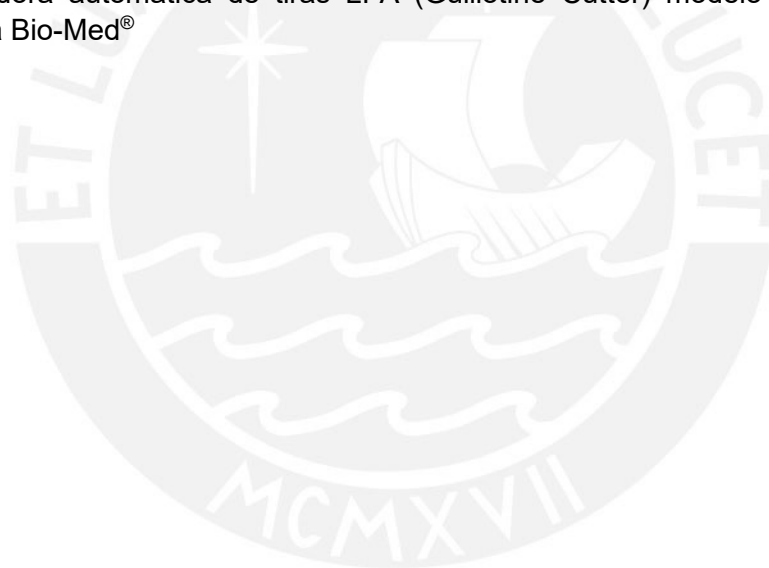
Equipos del laboratorio QNano+:

- Espectrofotómetro UV-VIS modelo Genesys 10S de Thermo Scientific™. El análisis se realizó empleando una celda de cuarzo semi-micro con un paso óptico de 10 mm y 1 mL de volumen de Agilent®. La adquisición de espectros se realizó en un rango de 200 nm a 1100 nm y mediante el uso del software VISIONlite™ versión 5.2
- Espectrofotómetro i-Raman plus 785H de BWTek® con láser de diodos centrado a 785 nm y una potencia continua < 300 mW con conectores de fibra óptica FC/PC. Este equipo permite la detección en el rango de 175-2700 cm⁻¹ con una resolución de 3.5 cm⁻¹ a 912 nm y con un rango dinámico de 50000:1. El sistema estuvo acoplado a una cámara con un objetivo de microscopio 40x y se utilizó el software BWSpec versión 4.10.
- Lectora de microplacas Multiskan de Thermo Scientific™, equipada con 6 filtros: 405 nm, 450 nm, 521 nm, 595 nm, 620 nm, 739 nm. El instrumento se controló mediante el software SkanIt™ versión 5.0
- Agitador digital Thermo Scientific™ con calefacción Cimarec™
- Agitador con incubadora Heidolph. Termómetro digital Traceable®
- Centrífuga Eppendorf® modelo 5430R. Velocidad máxima del rotor: 30130 x G (17 500 rpm)
- Agitador Vortex MVOR 03 de SBS®
- Mini incubadora digital Benchmark Scientific®
- pH-metro Metrohm® 913 con electrodo de Pt en KCl 3M
- Sonicador VWR® modelo 97043-930
- Termobloque modelo My Block™ Mini Dry Bath de Benchmark®

- Microscopio electrónico LVEM5, Delong Instruments®-República Checa. Se usó unas rejillas de cobre recubiertas de carbono con agujeros, Ted Pella® código 01843-F
- Bomba de jeringa Chemyx® modelo Fusion 400
- Dispensador de flujo lateral (ALFRD) de la marca ClaremontBio®. La fuente de energía es de la marca HYELEC® modelo PS-28A.
- Jeringa BD plastic de 1 mL

Equipos del laboratorio Bionanosurf:

- Espectrofotómetro UV-Vis modelo V-670 de Jasco®
- Celda de cuarzo de 0.3 cm de Agilent®
- Pipeta automática modelo 20E72548 de Accu-jet® pro
- Centrífuga modelo 5427 R de Eppendorf®. Velocidad máxima del rotor 5500 rpm
- Termobloque de Eppendorf ThermoMixer® C
- Agitador mecánico modelo MM1500 de IBX Instruments®
- Incubadora de Memmert®
- Bomba peristáltica modelo 7555-00 de Masterflex®
- Bomba de jeringa de infusión modelo NE-300 de Divers Dutscher®
- Dispensador de flujo lateral modelo HM3030 de Kinbio®
- Cortadora automática de tiras LFA (Guillotine Cutter) modelo LFST0001 de Ballya Bio-Med®



4.2 Metodología

El desarrollo de los nanoaptasensores preparados se basaron en el uso de dos tipos de AuNTs, uno con una λ_{\max} a 785 nm (AuNT785) y otro con una λ_{\max} a 1100 nm (AuNT1100). Para ambas nanoestructuras se modificaron con un aptámero selectivo de CEA y con distintos agentes de relleno. En la Figura 11 se muestra el esquema resumen de las condiciones evaluadas que están descritos en los siguientes subapartados.

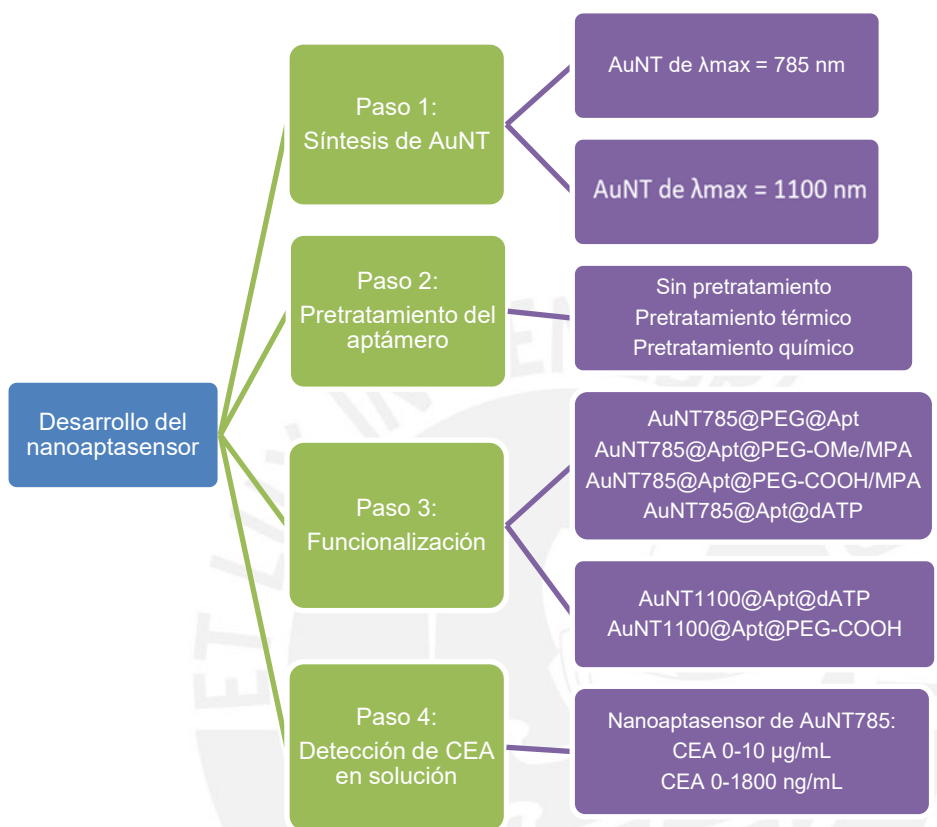


Figura 11. Esquema resumen del desarrollo del nanoaptasensor.

4.2.1 Síntesis y caracterización de AuNTs con una λ_{\max} a 785 nm (AuNT785)

Los materiales de vidrio se lavaron previamente con *Alconox*®, y se enjuagaron con agua desionizada y, finalmente, con agua ultrapura. Los nanotriángulos de oro fueron sintetizados usando el protocolo desarrollado por Pelaz *et al.*³⁴ y adaptado por Hernández *et al.*³⁵ El proceso de síntesis se llevó a cabo en una incubadora a 18-19 °C. Primero se colocaron 5 mL de H_{Au}Cl₄ 2 mM en unos viales de vidrio, luego se inyectaron 9 mL de Na₂S₂O₃ 0.5 mM a un flujo de 9 mL/min con una bomba de jeringa bajo agitación mecánica constante. Después de 9 minutos, se hizo una segunda adición, gota a gota, de 1 mL de Na₂S₂O₃ 0.5 mM y se dejó agitando durante 2 horas. En la Figura 12 se resumen los pasos realizados para la síntesis de nanotriángulos de oro.

La caracterización de los nanotriángulos de oro se realizó por espectroscopía UV-Vis-NIR. Para ello, se preparó una dilución 1:10 v/v de la solución de AuNTs785 para colocarlo en una celda de cuarzo, y así medir los espectros de extinción. Adicionalmente, los AuNTs785 se midieron por TEM en el laboratorio QNano+.

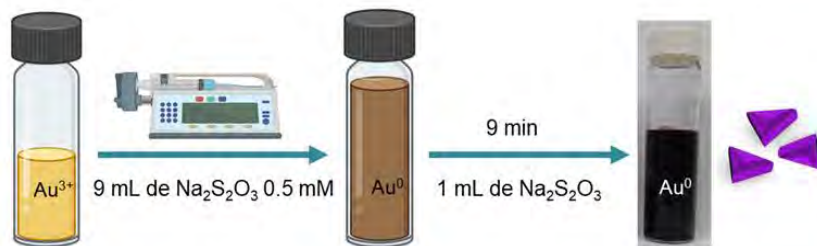


Figura 12. Esquema de síntesis de AuNTs con una λ_{max} 785 nm.

4.2.2 Síntesis y caracterización de AuNTs con una λ_{max} a 1100 nm (AuNT1100)

Se prepararon nanotriángulos de λ_{max} 1100 nm con el protocolo del grupo Bionanosurf.³⁶ Los materiales de vidrio fueron lavados previamente con agua regia y agua ultrapura. Todas las soluciones se prepararon con agua Fisher y se atemperaron a 19 °C en una incubadora durante 1 hora. Se preparó una solución de 200 mL de $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM en una botella de 1 L, tapada con papel aluminio y se colocó en una incubadora con un adaptador a una bomba peristáltica. También se prepararon 400 mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.58 mM, del cual se separaron 100 mL en un vaso de precipitados y al resto de volumen se añadieron 21.4 μL de KI 0.1 M.

Se colocaron 140 mL de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ con KI en un vaso de precipitados para comenzar con la primera adición con ayuda de la bomba peristáltica a la botella de la solución de oro que se encontraba en la incubadora. El tiempo de adición fue 30 s y luego se esperó 4 min hasta la siguiente adición. La segunda adición fueron 140 mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ con KI bajo las mismas condiciones que la primera adición. Después de los 4 min de espera, la última adición fueron 60 mL de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.58 mM, la cual se añadió en 30 s. Finalmente, se dejó reposar la mezcla durante 1 h a 19 °C, y la botella se recubrió con papel aluminio. Al terminar la reacción, los nanotriángulos se cuantificaron mediante espectroscopía UV-Vis-NIR, para luego modificarlos con glutatión (GSH) con el fin de separar los subproductos de la síntesis (nanoesferas).

Se midió el espectro UV-Vis-NIR de los AuNTs1100 a una dilución 1:2 en una celda de 0.3 cm. El coeficiente de extinción es $\epsilon = 29 \text{ (mg/(mL} \cdot \text{cm))}^{-1}$ y se anotó la absorbancia a 1050 nm para calcular la cantidad de AuNTs1100 en mg. Se determinó la concentración de AuNTs1100 en mg/mL con la ecuación 1.

$$\frac{(\text{Abs}_{1050} \cdot \text{Factor de dilución})}{(29 \cdot 0.3 \text{ cm})} = \text{AuNTs1100} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \quad \text{Ecuación (1)}$$

Luego se determinó la cantidad de AuNTs1100 en mg con la ecuación 2 y así calcular la cantidad necesaria de GSH para la funcionalización.

$$\frac{(\text{Abs}_{1050} \cdot \text{Volumen total de la síntesis})}{(29 \cdot 0.3 \text{ cm})} = \text{AuNTs1100 (mg)} \quad \text{Ecuación (2)}$$

4.2.3 Pretratamiento del aptámero de CEA

El aptámero de CEA fue pretratado térmica y químicamente, se probaron distintas condiciones para optimizar el pretratamiento del aptámero. En el caso del pretratamiento químico se utilizó el reactivo clorhidrato de tris(2-carboxietil) TCEP, y para encontrar la cantidad óptima, se estudiaron distintas proporciones de aptámero:TCEP. Mientras para el pretratamiento térmico el aptámero se llevó a 95 °C durante 10 minutos.

Para el pretratamiento térmico, se mezclaron 25 μL del aptámero CEA 200 μM , 376 μL buffer Tris a pH 7.4 que incluya iones Mg^{2+} y Na^+ (Tris 40 mM, NaCl 200 mM y MgCl_2 10 mM). Por último, se completó con agua ultrapura hasta los 1000 μL . En el caso del tratamiento químico, se probó distintas cantidades de TCEP 10 mM con las siguiente

proporciones Apt:TCEP: 1:2, 3:10 y 1:50. Se agitó la mezcla durante 1 hora y luego se pretrató térmicamente según lo descrito antes.

4.2.4 Funcionalización con AuNT785 con el aptámero de CEA

Una vez sintetizados los AuNTs785, estos se funcionalizaron con el aptámero seleccionado. Para llevar a cabo este procedimiento, se probaron varias condiciones de funcionalización, con el fin de optimizar la estabilidad y la sensibilidad del sensor. Una de las condiciones evaluadas fue el orden de modificación de los nanotriángulos con el aptámero seleccionado y la unión de las moléculas de relleno. Por otro lado, también se probaron distintos tipos de agentes de relleno como el 2'-deoxiadenosin-5'-trifosfato disódico (dATP), el ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) y cadenas de polietilenglicol tiolado (PEG-SH) a la superficie. Además, se probaron distintas cantidades de aptámero para favorecer la interacción entre el aptámero y el biomarcador CEA.

4.2.4.1 Funcionalización del sensor AuNT785@PEG@Apt

- **Funcionalización de AuNT785@PEG**

Los AuNTs se funcionalizaron con PEG-SH (HS-PEG(8)-COOH o HS-PEG(7)-OMe) preparando 6 réplicas en simultáneo. Cada réplica se preparó en un microtubo de 2 mL y para ello se añadieron 500 μ L de AuNTs785, 469 μ L de agua ultrapura, 2.5 μ L de SDS al 10% w/v , y 13.8 μ L de PEG-SH 0,1 g/L. Luego de 10 minutos en agitación, se añadieron 15 μ L de NaOH 1 M a la mezcla y se dejó agitando toda la noche. A la mañana siguiente, se procedió con el proceso de lavado, para lo cual se centrifugó la muestra a 6000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Este proceso se repitió 3 veces, se retiró 800 μ L de sobrenadante y se añadió el mismo volumen de agua ultrapura para resuspender los AuNTs785 en el mismo volumen inicial. Al final de la tercera centrifugación, solo se retiró el sobrenadante y se mezclaron los AuNT785@PEG-SH de todas las réplicas preparadas.

- **Funcionalización de AuNT785@PEG@Apt**

Se adicionaron las siguientes soluciones en microtubos en el siguiente orden: 295 μ L de agua ultrapura, 2.5 μ L de SDS 10% w/v , 500 μ L de AuNT785@PEG, 100 μ L de buffer de fosfato (KP) 0.1 M pH 8, 200 μ L de aptámero pretratado y 100 μ L de NaCl 0.1 M. La sal de NaCl se añadió en 4 tandas de 25 μ L en 2 días, después de la primera adición pasaron 4 horas para añadir la segunda, el segundo día también se añadieron adiciones de NaCl cada 4 horas. Luego de cada adición de sal, los microtubos se sonicaron durante 10 s aproximadamente y se colocaron en el agitador. Al día siguiente, los nanoaptasensores se centrifugaron 3 veces, se retiró 800 μ L de sobrenadante y se añadió el mismo volumen de agua ultrapura para resuspenderlos en el mismo volumen inicial. Finalmente, se preparó una dilución 1:5 v/v de los AuNTs785 funcionalizados y se caracterizaron por espectroscopía UV-Vis-NIR.

4.2.4.3 Funcionalización del sensor AuNT785@Apt@PEG/MPA

El procedimiento de la funcionalización del sensor AuNT785@Apt@MPA/PEG fue similar al anterior con la diferencia de que se funcionalizó primero con el aptámero y se añadieron dos agentes de relleno de manera simultánea, los cuales son MPA y PEG tiolado, este último con dos distintos grupos terminales (PEG-COOH y PEG-OMe). Al finalizar la funcionalización, los nanoaptasensores fueron centrifugados como el nanoaptasensor AuNT785@PEG@Apt. En la Tabla 5 se muestran las cantidades de los reactivos para la modificación de los AuNTs.

Tabla 5. Cantidades de los reactivos para la funcionalización de AuNT785@Apt@MPA@PEG.

Reactivos	0.5 nmol de aptámero	1 nmol de aptámero	2 nmol de aptámero
AuNT785 (μL)	500	500	500
SDS 10% w/v (μL)	2.5	2,5	2.5
Agua ultrapura (μL)	304.7	254.7	154.7
Buffer KP 0.2 M pH 8 (μL)	50	50	50
Aptámero pretratado (μL)	50	100	200
NaCl 1M (μL) *	25	25	25
MPA 11.5 mM (μL)	4	4	4
PEG-COOH o PEG-OMe 1mg/mL (μL)	13.8	13.8	13.8
Vol. Total (μL)	1000	1000	1000

*Este volumen de NaCl 1 M es el que corresponde a cada una de las adiciones mencionadas en el documento

4.2.4.4 Funcionalización del sensor AuNT785@Apt@dATP

En un microtubo, se mezclaron 500 μL AuNT785, 2.5 μL SDS al 10 % w/v, 50 μL de buffer KP 0.2 M y 50 μL de aptámero pretratado para agitarlos a temperatura ambiente. Luego de 1 hora se agregaron 60 μL dATP 14.1 μM, se agitó por 30 min y después se incubó toda la noche a 10 °C en la incubadora. Al día siguiente se centrifugó 3 veces a 6000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspendió en agua ultrapura.

- **Optimización de la funcionalización de AuNT785@Apt@dATP**

Se mezclaron AuNTs, aptámero pretratado de CEA, SDS y buffer KP durante 30 minutos bajo agitación constante a temperatura ambiente. Luego se añadió dATP y se dejó agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente, después se dejó en agitación constante a 10°C durante toda la noche. En la Tabla 6 se muestran las cantidades empleadas para la funcionalización.

Tabla 6. Cantidad de cada reactivo para la funcionalización.

Condición	A	B	C	D
#Aptámero (nmol)	0.017 nmol	0.034 nmol	0.068 nmol	0.136 nmol
AuNTs1100 (μL)	500	500	500	500
Agua ultrapura (μL)	409	406	399	385
Aptámero pretratado (μL)	3.4	6.8	13.6	27.2
SDS 10 % w/v (μL)	2.5	2.5	2.5	2.5
KP 0.2 M (μL)	25	25	25	25
Agitación por 30 min a RT				
dATP 14.1 μM (μL)	60	60	60	60

Al día siguiente se centrifugaron las muestras 2 veces a 4500 rpm durante 25 minutos a temperatura ambiente. En la última centrifugación se retiraron 900 μL del sobrenadante y se resuspendió en 100 μL del buffer Na_3PO_4 20 mM pH 7, BSA 5% w/v , sacarosa 10% w/v y Tween-20 0.25% v/v .

4.2.5 Funcionalización con AuNTs con una λ_{max} a 1100 nm (AuNT1100) con el aptámero de CEA

Luego de sintetizar los AuNTs1100, estos se funcionalizaron con el aptámero seleccionado y se probaron varias condiciones de funcionalización, así como con los AuNTs785. Una de las condiciones evaluadas fue la modificación con GSH para la purificación de los AuNTs1100 de los subproductos formados. Se evaluó la funcionalización con los AuNTs1100 sin/con purificación con los agentes de relleno disponibles en el laboratorio como dATP y un tipo de cadena de polietilenglicol tiolado (HS-PEG(8)-COOH). Cabe mencionar que el protocolo de funcionalización con dATP se llevó a cabo a diferentes condiciones comparadas a los AuNTs785.

4.2.5.1 Funcionalización de AuNT1100@GSH

Se pesó glutatión en una proporción de masa a 1:5 AuNTs:Glutatión y se disolvió en buffer borato de 10 mM a pH 8. Se añadió lentamente al recipiente de 1 mL en 1 mL hasta lograr una disolución completa. A continuación, se añadieron 60 mL de buffer borato de 100 mM a pH 8 a la botella que contenía los AuNTs. La concentración final del buffer borato en la botella de la solución de AuNTs fue 10 mM. Se ajustó el pH a 8 usando NaOH 2.5 M (añadido gota a gota). Después de ajustar el pH, se añadió gradualmente el glutatión disuelto a los AuNTs. Nuevamente, se ajustó el pH a 12 usando NaOH 2.5 M. Por último, se dejó la botella en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche, tapado y protegido de la luz.

Al día siguiente, se retiró el sobrenadante con ayuda de una pipeta automática y se dejó el menor volumen posible. Después se añadieron 540 mL de agua ultrapura y se homogenizó. En la Figura 13 se muestra el esquema de la síntesis de los AuNTs.

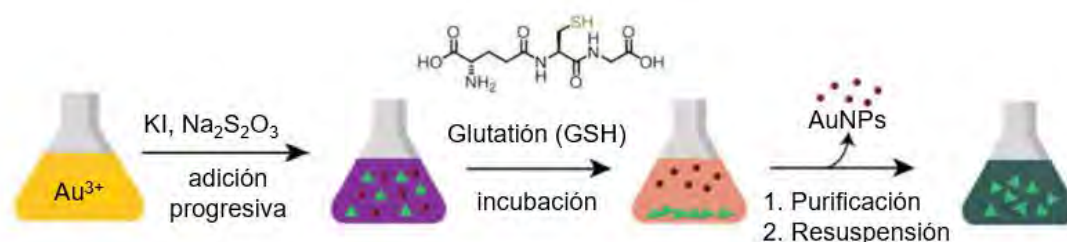


Figura 13. Esquema de síntesis y funcionalización de AuNTs con una λ_{max} de 1100 nm con glutatión. Adaptado de la referencia 36.

El siguiente paso fue medir el espectro UV-Vis-NIR de AuNT1100@GSH con una celda de paso óptico 0.3 cm. Se preparó una dilución 1:50 de los AuNT1100@GSH con un volumen total de 300 μL . El coeficiente de extinción es $\epsilon = 29 \text{ mg}/(\text{mL} \times \text{cm})^{-1}$. Se anotó la absorbancia a 1050 nm para calcular la cantidad de AuNT1100@GSH en mg con la ecuación 3.

$$\frac{(\text{Abs}_{1050} \times \text{Factor de dilución})}{(29 \times 0.3 \text{ cm} \times 540 \text{ mL})} = \text{AuNT1100@GSH (mg)} \quad \text{Ecuación (3)}$$

4.2.5.2 Funcionalización del sensor AuNT1100@GHS@Apt@dATP y AuNT1100@Apt@dATP

Se usaron 250 μL de AuNT1100@GHS y AuNT1100 a 1 mg/mL y se añadieron distintas cantidades de aptámero pretratado 0.034 nmol y 0.068 nmol. La mezcla se dejó agitando a 25°C durante 30 minutos. Después, se añadieron 60 μL de dATP 14.1 μM y se dejó agitando a 4°C durante toda la noche (Tabla 7). Al día siguiente, se centrifugaron las muestras 2 veces a 2200 rpm por 15 minutos y se retiró la mayor cantidad de volumen como sobrenadante para resuspender en 100 μL del buffer Na_3PO_4 20 mM pH 7, BSA 5% w/v, sacarosa 10% w/v y Tween-20 0.25% v/v. Por último, se midió por espectroscopía UV-Vis-NIR para cuantificar la concentración del sensor y reajustar a 0.5 mg/mL.

Tabla 7. Cantidad de cada reactivo para la funcionalización.

Condición	a	b
#Aptámero (nmol)	0.034 nmol	0.068 nmol
AuNTs1100 (μL)	250	250
Agua ultrapura (μL)	406	399
Aptámero pretratado (μL)	6.8	13.6
dATP 14.1 μM	60	60

La concentración del nanoaptasensor final debe ser 0.5 mg/mL para que haya 10 μg del nanoaptasensor por tira.

4.2.5.3 Funcionalización del sensor AuNT1100@GHS@Apt@PEG y AuNT1100@Apt@PEG

Se mezclaron 250 μL de AuNTs1100 y 250 μL de aptámero de CEA (0.068 nmol y 0.034 nmol) y se dejó agitando a RT (*room temperature*) durante 30 minutos. Luego se añadieron 500 μL de PEG-COOH al 5% w/v y se dejó la mezcla agitando a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras 2 veces a 2200 rpm por 15 minutos y se retiró la mayor cantidad de volumen como sobrenadante para resuspender en 100 μL del buffer Na_3PO_4 20 mM pH 7, BSA 5% w/v, sacarosa 10% w/v y Tween-20 0.25% v/v.

4.2.6 Preparación de tiras LFA

Para los primeros ensayos preliminares de detección de CEA mediante LFA, se prepararon las tiras LFA en el laboratorio QNano+ con los equipos disponibles. Adicionalmente, se preparó otro lote de tiras LFA en el laboratorio Bionanosurf (INMA - Zaragoza) con los cuales se optimizaron las condiciones del ensayo, y se realizaron las pruebas finales de detección de CEA. A continuación, se describirán los parámetros tomados en cuenta para la preparación de tiras, así como las condiciones evaluadas en cada caso (Tabla 8).

Tabla 8. Condiciones evaluadas en la preparación de las tiras LFA. Los recuadros sombreados en verde corresponden a los nanoaptasensores de AuNT785 y los sombreados en celeste a AuNT1100.

AuNT funcionalizado	Pretratamiento de la almohadilla de conjugado	Medio del ensayo	Running buffer	Tipo de NC	[CEA]
AuNT785@Apt @20PEG+ 25MPA	ácido bórico 50 mM pH 8, BSA 0.5 % w/v, PVP (PM: 40 kDa) 0,5 % w/v y Tween-20 1% v/v	PBS 1x + BSA 0.01% w/v	PBS 1x, Tween-20 0.25% v/v, sacarosa 10% w/v y BSA 0,1% w/v	80HP	0-10 µg/mL
AuNT785@Apt @20PEG+ 50MPA					
AuNT785@Apt @dATP	Buffer 1x diluido del buffer 20x (Tris 1M pH 8, Triton X-100 5%, NaCl 0.15M)	- Na ₃ PO ₄ 20 mM pH:7, BSA al 5% w/v, sacarosa al 10% w/v y Tween-20 al 0.25% v/v	Tris-HCl 50 mM pH 9, NaCl 100 mM y MgCl ₂ 50 mM	120HP	0-1800 ng/mL
AuNT1100@Apt @dATP	- Ácido bórico 50 mM pH 8, BSA 0,5% w/v, PVP (PM: 40 000) 0,5% w/v y Tween-20 1% v/v - Buffer 1x diluido del buffer 20x (Tris 1M pH 8, Triton X-100 5%, NaCl 0.15M)	- Agua ultrapura - HEPES 10 mM pH: 7.4, BSA al 0.1 % w/v y Tween-20 al 0.1% v/v - Na ₃ PO ₄ 20 mM pH:7, BSA al 5% w/v, sacarosa al 10% w/v y Tween-20 al 0.25% v/v	- Tris-HCl 50 mM pH 9, NaCl 100 mM y MgCl ₂ 50 mM - PBS 10 X (pH 7), BSA 0.5% w/v y Tween-20 1% v/v	80HP y 120HP	0-1800 ng/mL
AuNT1100@Apt @PEG-COOH					

4.2.6.1 Tiras LFA preparadas en el laboratorio QNano+

- Preparación de los elementos de reconocimiento

Para la línea de ensayo, se mezclaron 150 µL de estreptavidina 1 mg/mL con 150 µL de PBS 1x, esta mezcla se colocó en una jeringa de plástico de 1 mL con un diámetro de 4.78 mm. Mientras que para la línea control se añadieron en un microtubo 150 µL de estreptavidina 1 mg/mL, 7.5 µL del aptámero complementario 200 µM, 30 µL de buffer PBS 10x y 107.5 µL de agua ultrapura, y esta mezcla se incubó bajo agitación a temperatura ambiente durante 1 hora.

- Configuración de los parámetros del equipo del dispensador de flujo lateral

Se consideró el volumen muerto para preparar la cantidad necesaria para depositar las soluciones en la línea de ensayo y en la línea control. El valor del flujo para depositar fue 0.263 mL/min y el voltaje empleado fue 6.0 V. También se seleccionó el tipo de jeringa BD plastic 1 mL. En la Figura 14 se observa el quipo empleado para depositar los elementos de reconocimiento de la tira.

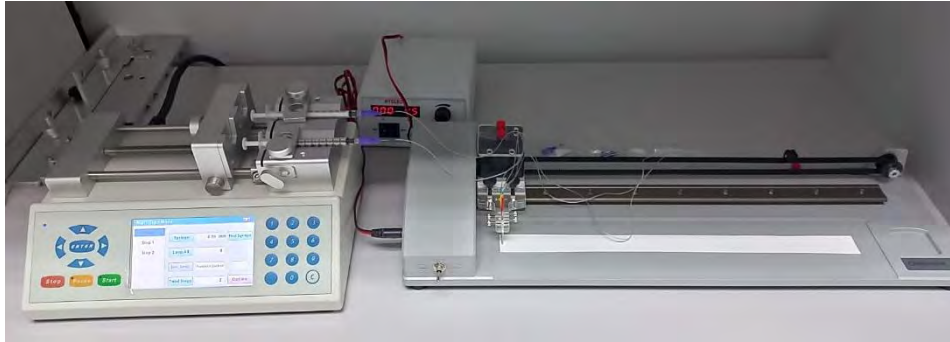


Figura 14. Dispensador de flujo lateral del laboratorio QNano+.

- **Pretratamiento de la almohadilla del conjugado**

La almohadilla del conjugado se pretrató en ácido bórico 50 mM pH 8, BSA 0.5 % w/v, PVP (PM: 40 kDa) 0,5 % w/v y Tween-20 1% v/v. Se colocó la almohadilla en el buffer mencionado durante 15 min y luego se retiró para secarlo a 37 °C durante toda una noche.

- **Ensamblaje de tiras LFA**

En la lámina de soporte, se colocó la tira de NC en la posición que se muestra en la Figura 15, luego se retiró el sticker de la parte inferior para colocar la almohadilla del conjugado. La almohadilla del conjugado debe estar por encima de 2 mm de la tira de NC. El mismo procedimiento se realiza para la almohadilla absorbente. Finalmente, se cortan las tiras con un ancho de 4 mm con una cortadora de papel.

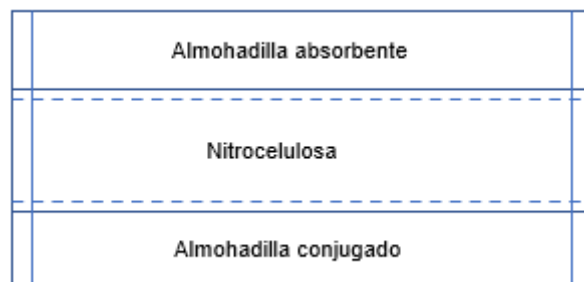


Figura 15. Ensamblaje de la tira LFA

4.2.6.2 Tiras LFA preparadas en el laboratorio Bionanosurf

Se evaluaron distintas condiciones con las tiras preparadas en el laboratorio Bionanosurf con el fin de optimizar el ensayo LFA.

4.2.6.2.1 Evaluación de parámetros para la preparación de tiras

- **Concentración de la línea control: aptámero complementario - estreptavidina**

Preparación de la línea control: se mezcló estreptavidina 1 mg/mL, hebra complementaria del aptámero 200 μ M y buffer PBS 1x.

- **Determinación de la concentración de estreptavidina y AptC + estreptavidina**

Se tomaron 2 μ L de la muestra y se colocaron en la microplaca con la lectora de 820 nm y de camino óptico 0,052 cm.

Blanco: PBS 1x pH 7,4

Muestra: estreptavidina y estreptavidina + hebra complementaria del aptámero

Se determinó con el valor de la absorbancia a 280 nm.

- **Pretratamiento de la almohadilla de conjugado**

La almohadilla de conjugado se sumergió en el buffer seleccionado durante 15 minutos y luego se dejó secando a 37 °C por 1 hora.

Lista de buffers utilizados:

_ Ácido bórico 50 mM pH 8, BSA 0,5% w/v, PVP (PM: 40 000) 0,5% w/v y Tween-20 1% v/v

_ Buffer 1x diluido del buffer 20x (Tris 1M pH 8, Triton X-100 5%, NaCl 0.15M)

- **Tipo de nitrocelulosa**

Se probaron dos tipos de nitrocelulosa: HP80 y HP120.

- **Ensamblaje de las tiras LFA**

Se ensamblaron todos los componentes de las tiras como se explicó anteriormente. En la Figura 16 se muestra el dispensador de flujo lateral empleado para la preparación de las tiras LFA. Después, se usó una cortadora automática para obtener tiras con la misma medida.

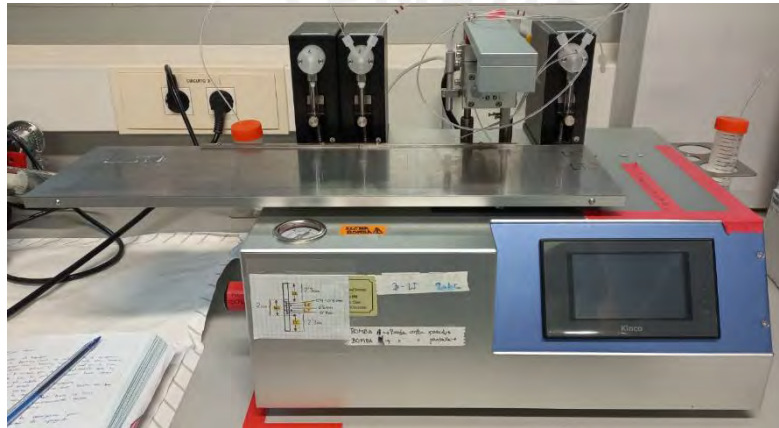


Figura 16. Dispensador automático de flujo lateral del laboratorio Bionanosurf.

4.2.6.3 Evaluación del nanoaptasensor en las tiras LFA

- **Medio del sensor**

Tras la funcionalización de los nanotriángulos con el aptámero y los agentes de relleno, se probó a resuspender estos nanoaptasensores en distintos medios y analizar su influencia al interactuar con las tiras de flujo lateral:

- Agua ultrapura

- HEPES 10 mM pH: 7.4, BSA al 0.1 % w/v y Tween-20 al 0.1% v/v

- Na₃PO₄ 20 mM pH:7, BSA al 5% w/v, sacarosa al 10% w/v y Tween-20 al 0.25% v/v

- **Buffer de corrida (*running buffer*)**

Se analizaron diversos *running buffer* buscando una mejor eficiencia de la retención de las nanopartículas sobre la membrana:

- Tris-HCl 50 mM pH 9, NaCl 100 mM y MgCl₂ 50 mM

- PBS 10 X (pH 7), BSA 0.5% w/v y Tween-20 1% v/v

4.2.7 Detección de CEA

La detección de CEA se evaluó por espectroscopía UV-Vis-NIR, y posteriormente se evaluó mediante LFA. Esta última técnica se estudió por colorimetría y SERS. Primero, se evaluaron concentraciones altas de CEA en el rango de $\mu\text{g/mL}$ y luego se disminuyó para llegar al rango de interés a ng/mL .

4.2.7.1 Espectroscopía UV-Vis-NIR en solución

Primero se estudió la estabilidad del nanoaptasensor de AuNT785@PEG@Apt, consistió en mezclar 150 μL del nanoaptasensor y 150 μL del medio a evaluar para incubarlos a 37 °C durante 1 h. Los medios del ensayo evaluados fueron buffer Tris 1x, buffer PBS 1x, buffer PBS 1x + BSA 0.01% w/v y PBS 1x + BSA 0.1% w/v . Los espectros fueron adquiridos mediante espectroscopía UV-Vis-NIR.

Para las pruebas iniciales de detección de CEA con los nanoaptasensores AuNT785@PEG@Apt y AuNT785@Apt@PEG/MPA, se consideró el medio del ensayo de acuerdo al resultado de la prueba de estabilidad de AuNT785@PEG@Apt. Se mezclaron 200 μL del sensor y 200 μL de CEA (solución de CEA preparada en PBS 1x + BSA 0.01%). La mezcla del ensayo se dejó incubando a 37 °C por 1 hora. Luego de la incubación se midió el espectro de extinción de los 400 μL de la mezcla sin diluir por espectroscopía UV-Vis-NIR. Las concentraciones probadas en los ensayos fueron 0 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$.

En el caso de las pruebas con el nanoaptasensor AuNT785@Apt@dATP, se mezclaron 20 μL del nanoaptasensor resuspendido en el buffer Na_3PO_4 20 mM pH 7, BSA 5% w/v , sacarosa 10% w/v y Tween-20 0.25% v/v y 80 μL de CEA preparadas en Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 100 mM y MgCl_2 5 mM. Se incubó la mezcla durante 30 minutos y luego midió en la lectora de microplacas. Las concentraciones evaluadas fueron 0, 18, 45, 90, 180 y 1800 ng/mL .

4.2.7.2 Detección de CEA mediante pruebas de LFA

4.2.7.2.1 Colorimétrica

- Pruebas preliminares

La medición del ensayo por flujo lateral consistió en combinar 100 μL de la mezcla del ensayo mencionado en el subapartado anterior y 100 μL del *running buffer*. El *running buffer* contiene PBS 1x, Tween-20 0.25% v/v , sacarosa 10% w/v y BSA 0,1% w/v . La mezcla se midió por espectroscopía UV-Vis-NIR antes de correr la cromatografía por las tiras LFA. Después, la tira LFA se colocó en el microtubo que contiene la mezcla del ensayo y el *running buffer*, se esperó 10-15 minutos para retirar la tira y observar el resultado.

- Prueba optimizada

Las diluciones de CEA se prepararon con el *running buffer* Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 100 mM y MgCl_2 5 mM. Se tomaron 20 μL del sensor resuspendidos en el buffer del medio (Na_3PO_4 20 mM pH 7, BSA 5% w/v , sacarosa 10% w/v y Tween-20 0.25% v/v) y 80 μL de CEA a distintas concentraciones. Con ayuda de la micropipeta se homogenizó la mezcla en una microplaca y se dejó incubando durante 30 min a 25 °C bajo agitación constante. Una vez culminada la incubación, se midió en una lectora de microplacas para registrar las absorbancias a distintas longitudes de onda. Por último, se colocaron las tiras LFA en cada pocillo y se esperó 10 min para terminar la corrida. Se retiraron las almohadillas del conjugado y se procedió a tomar una fotografía de cada tira en una caja negra (Figura 17). Una vez finalizada la toma fotográfica, se procedió a analizar las fotos

por ImageJ para cuantificar la cantidad de píxeles en la línea de ensayo. Para el análisis por ImageJ se midió el área la zona de la línea de ensayo.



Figura 17. Caja negra optimizada diseñada en el laboratorio QNano+.

4.2.7.2.2 SERS

La detección por espectroscopía Raman se realizó luego del ensayo LFA. Se esperó a que las tiras estuvieran completamente secas para proceder con las mediciones. Se colocaron las tiras en el soporte del microscopio acoplado al láser, y luego se irradió en 3 regiones de la línea de ensayo. Se midieron Los espectros fueron adquiridos a 50 s de irradiación, 5 acumulaciones, y 30 mW de potencia del láser.

4.2.8 Análisis multivariable

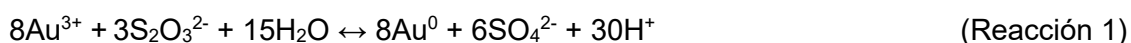
Los espectros Raman fueron analizados por PLS se utilizó el software SOLO (Eigenvector Research, Inc.) con un preprocesamiento de sustracción de línea base por mínimos cuadrados ponderados (orden 2), suavizado (Savitzky-Golay, 2º orden, 15 puntos), y normalizados utilizando la corrección de dispersión multiplicativa (basada en la media) y tratado con ponderación de mínimos cuadrados generalizados (GLSW $\alpha=0.02$).

5. Resultados y discusión

5.1 Síntesis y caracterización de AuNTs

5.1.1 AuNTs de $\lambda_{\max} = 785$ nm (AuNT785)

La síntesis de AuNT785 se basa en la reducción de la sal de oro mediante el agente reductor tiosulfato de sodio, que a su vez actúa como estabilizante. De acuerdo a lo reportado por Pelaz *et al.*³⁸, el crecimiento de las AuNTs785 sigue la reacción 1.



En la Figura 18 se muestra la caracterización de los AuNTs785 por espectroscopía UV-Vis-NIR, en la cual se observan las bandas plasmónicas a $\lambda_{\max} = 540 \pm 5$ nm y $\lambda_{\max} = 785 \pm 30$ nm, que corresponden a las nanopartículas esféricas que se forman como subproductos, y las nanopartículas triangulares, respectivamente. La micrografía TEM de la Figura 17 corrobora la geometría de los AuNTs785. De acuerdo al protocolo adaptado por Hernández *et al.*³⁹ en el laboratorio, la banda plasmónica de los AuNTs785 se centra en $\lambda_{\max} = 785$ nm \pm 30 nm. También se determinó la proporción adecuada de la extinción correspondiente a los nanotriángulos respecto a las nanoesferas, la cual fue 1.5 veces mayor, $A_{790 \text{ nm}}/A_{540 \text{ nm}} > 1.5$, esto indica que la presencia del producto secundario de nanoesferas estaba en baja proporción.

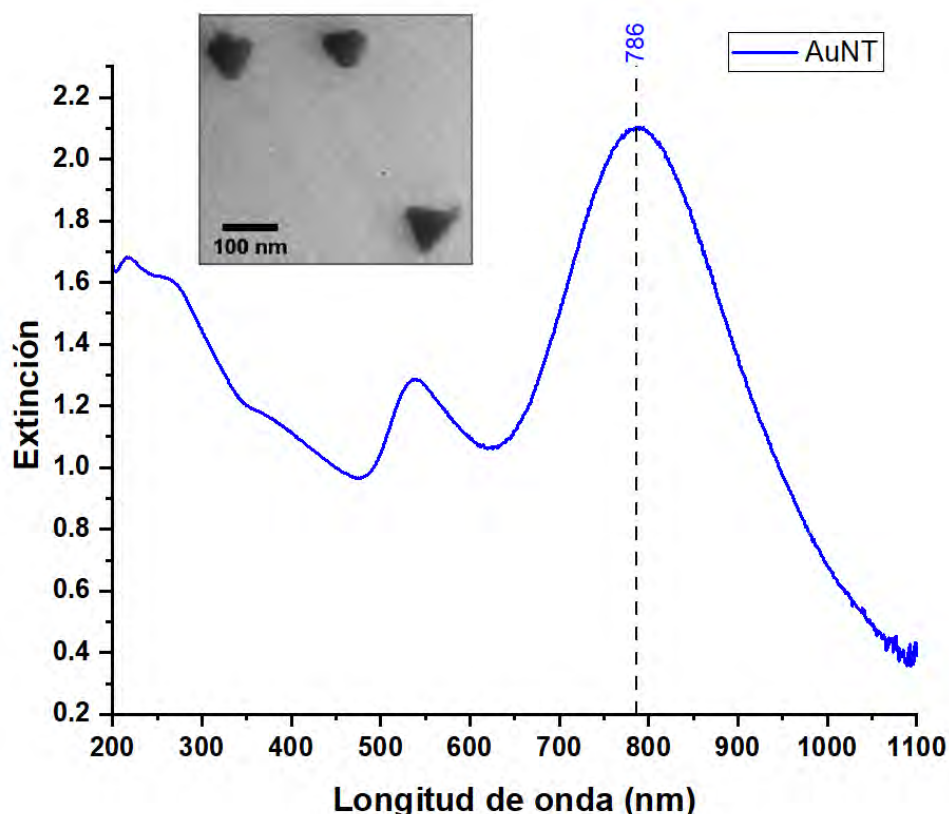


Figura 18. Espectro de extinción de UV-Vis-NIR de los AuNTs de $\lambda_{\max} 786$ nm e imagen TEM de los AuNTs785 sintetizados.

5.1.2 AuNTs de $\lambda_{\max} = 1100$ nm (AuNT1100)

Los AuNTs1100 desarrollados por el método del laboratorio del grupo Bionanosurf, se utilizaron para la optimización de condiciones de la preparación de tiras LFA, cuyos resultados se mostrarán posteriormente. Estas nanoestructuras mostraron tener bandas plasmónicas centradas entre 1050 y 1200 nm. De manera similar a la síntesis de AuNTs de λ_{\max} 785 nm, también se obtienen nanoesferas como subproductos del proceso. La separación de los subproductos se llevó a cabo mediante un procedimiento desarrollado en el grupo Bionanosurf con la modificación con glutatión (GSH), antes de la funcionalización con el aptámero. Tal como se observa en la Figura 19, luego de la purificación la banda plasmónica de las nanoesferas desaparece, mientras que la banda plasmónica de los nanotriángulos se desplaza hacia longitudes de onda más bajas y el valor de la extinción disminuye, lo cual indica la disminución de nanotriángulos más grandes y el cambio en el entorno por la modificación con GSH.

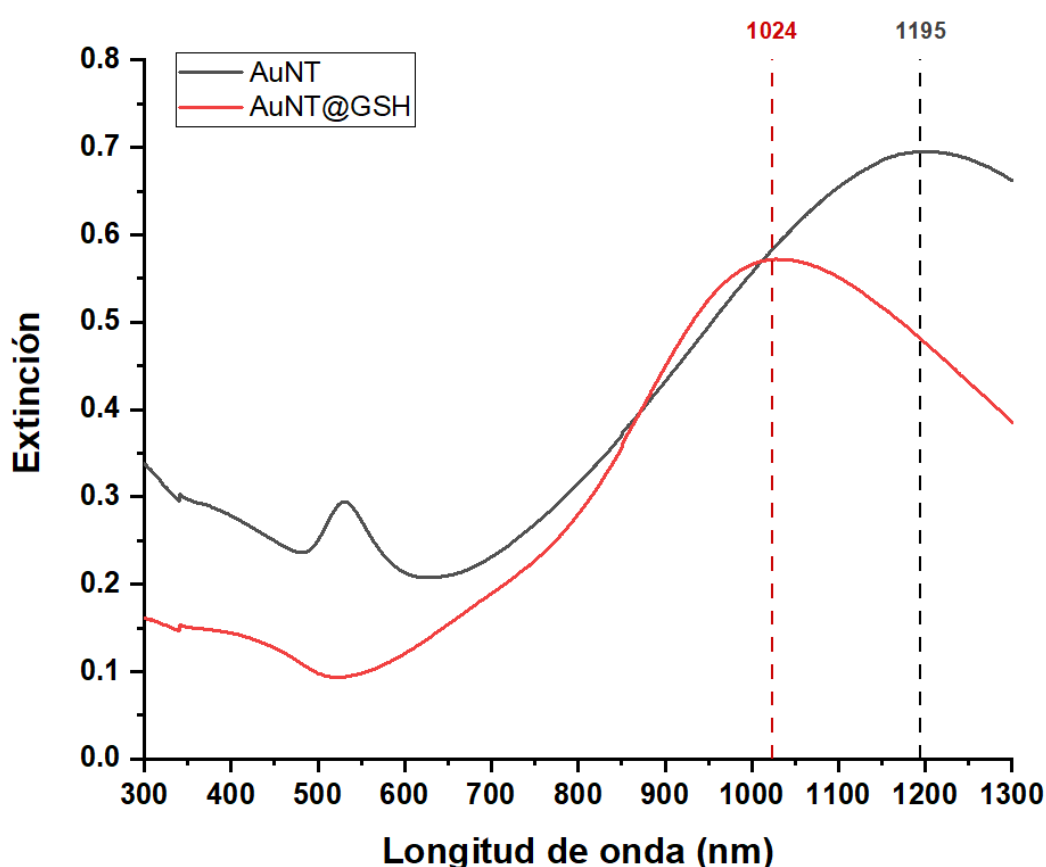


Figura 19. Espectros UV-Vis-NIR de AuNTs de 1100 nm preparados con el método del grupo Bionanosurf (entidad asociada INMA, Zaragoza, España), antes (línea negra) y después (línea roja) de la funcionalización con glutatión (GSH).

5.2 Pretratamiento del aptámero

El aptámero horquilla seleccionado en el desarrollo del nanoaptasensor contiene un grupo tiol en el extremo 5' de la hebra. Una de las estrategias de funcionalización es aprovechar la fuerte interacción que se establece entre el oro y el azufre.³⁷ Con el fin de optimizar la funcionalización de los AuNTs785 con el aptámero selectivo de CEA, se estudiaron diferentes parámetros para mejorar la formación del complejo

AuNT785@Apt. Cabe mencionar que se utilizó el medio del buffer empleado del aptámero-horquilla del trabajo reportado por Wen *et al.*²³

Primero se estudió el efecto del pretratamiento del aptámero, tanto térmico como químico. El pretratamiento térmico ayuda a abrir la estructura del aptámero horquilla a 95°C y así, al bajar la temperatura, la estructura se vuelve a formar de manera ordenada. Por otro lado, el pretratamiento químico con el reactivo clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP) sirve para romper los posibles puentes disulfuros (R-S-S-R) formados entre las hebras del aptámero.^{38,39,23} En la Figura 20.a se muestran los resultados de la funcionalización de los AuNTs785 con el aptámero bajo distintos pretratamientos (el agente de relleno utilizado en este caso fue HS-PEG(8)-COOH). La estabilidad del nanoaptasensor se ve afectada por el pretratamiento del aptámero, ya que, al no pretratar el aptámero (ni térmica ni químicamente), la relación de los nanotriángulos y nanoesferas decrece. El pretratamiento térmico ayuda a mejorar la estabilidad del nanoaptasensor, resultado que mejora al combinarlo con el pretratamiento químico.

Además, se estudió el efecto de la proporción Apt:TCEP para mejorar el pretratamiento químico (Figura 20.b), y la cantidad óptima de acuerdo a los resultados fue 1:50. Asimismo, se analizó el efecto de la cantidad de aptámero empleado. En la Figura 20.c se puede observar que hay una disminución de la extinción de los nanotriángulos al utilizar con una mayor cantidad de aptámero (2 nmol). Este resultado se puede explicar porque la cantidad de aptámero añadido es proporcional a la cantidad de TCEP y sales utilizadas en el pretratamiento, lo cual incrementa la fuerza iónica del medio del nanoaptasensor dando como resultado la disminución de AuNTs785. Por otro lado, se realizó una prueba adicional en la que no varió la fuerza iónica y solo cambió la concentración del aptámero respecto al de mayor proporción (2 nmol de aptámero) para la funcionalización de 0.5 y 1 nmol. Tal como se observa en la Figura 20.e, al hacer el ajuste de la cantidad de sales del buffer, los nanoaptasensores agregan por el incremento de la fuerza iónica en el medio.

Una menor cantidad de aptámero pretratado no solo permite menor fuerza iónica, sino que también puede favorecer que todo se una y no haya competencia por la superficie. Además, la funcionalización con una menor cantidad podría favorecer posteriormente la interacción entre el CEA y el aptámero, ya que el aptámero tendría mayor espacio para el cambio de su conformación y habría menos repulsiones.

Al observar que el nanoaptasensor pierde estabilidad con una mayor cantidad de aptámero, se evaluó la influencia de la concentración del buffer Tris más las sales de Mg^{+2} y Na^{+1} con los nanoaptasensores modificados con 0.5 y 1 nmol de aptámero. Según los resultados obtenidos (Figura 20.d) al comparar el efecto de la concentración a 0.75x y 1 x del buffer mencionado, se obtuvo que la mejor condición fue con 0.75x del buffer. Esto se debe a la disminución de la fuerza iónica del medio, la cual reduce la agregación de los nanoaptasensores.

Las condiciones seleccionadas para los siguientes pruebas de funcionalización fueron pretratar el aptámero química y térmicamente, utilizar la proporción Apt:TCEP 1:50, y emplear 0.5, 1 y 2 nmol de aptámero con 0.75x del buffer correspondiente.

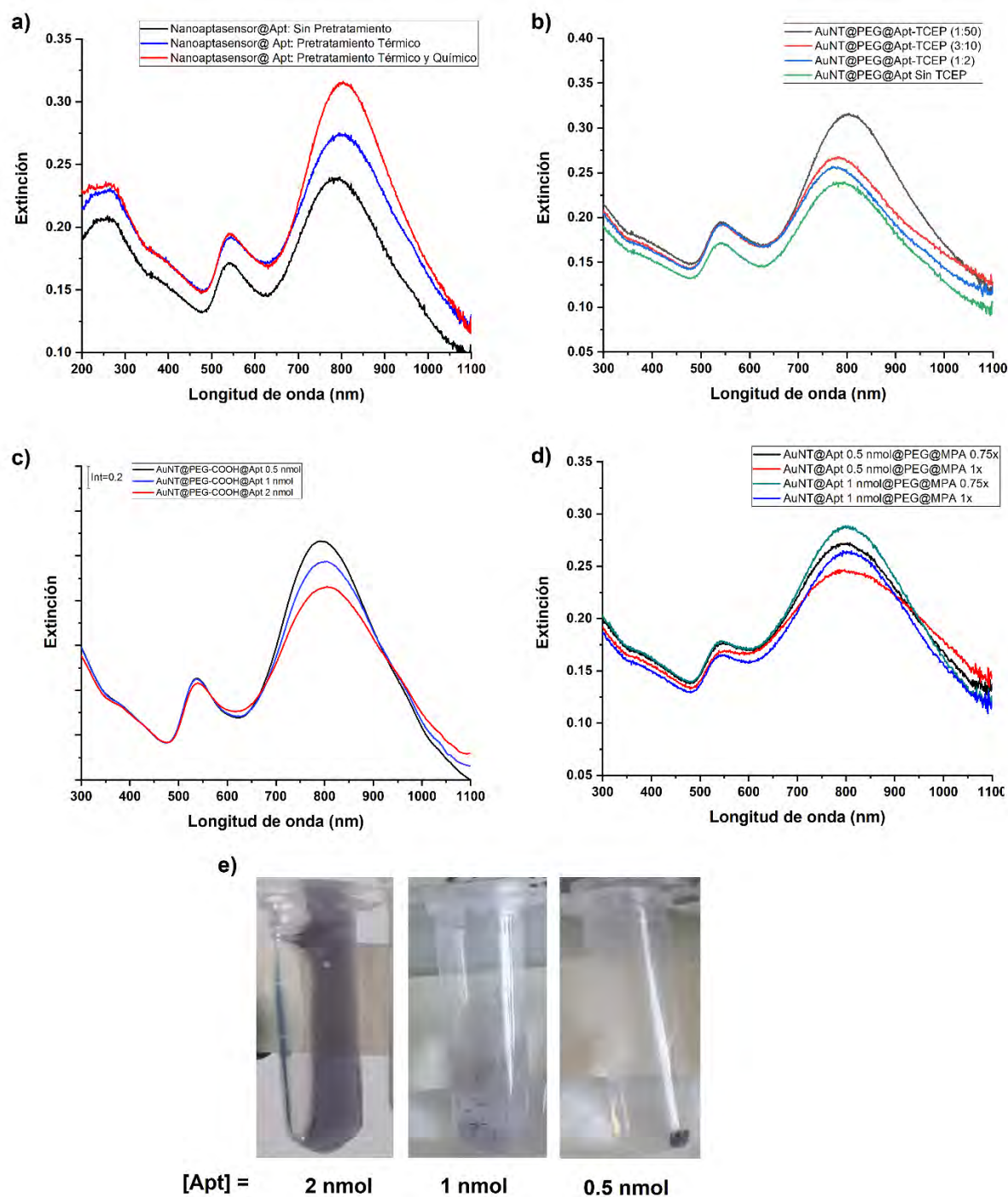


Figura 20. Espectros UV-Vis-NIR de los AuNTs785 modificados con el aptámero de CEA bajo distintas condiciones. a) Pretratamiento de aptámero b) Pretratamiento químico variando la relación Apt:TCEP c) Cantidad de aptámero d) Influencia de la concentración de buffer e) Fotografías de los nanoaptasensores funcionalizados con 2, 1 y 0.5 nmol de aptámero con la misma cantidad de buffer respecto a la funcionalización con 2 nmol. Los agentes de relleno son PEG-OMe y MPA.

5.3 Funcionalización de AuNTs785 con el aptámero de CEA y distintos agentes de relleno

Una vez seleccionados los parámetros para el pretratamiento del aptámero, se estudiaron distintas estrategias de funcionalización con el fin de obtener un nanoaptasensor estable y que permita la detección de CEA en el rango de ng/mL. Se probaron distintos agentes de relleno, algunos con grupos tiol como polietilenglicol (PEG) tiolado con dos grupos funcionales terminales diferentes (HS-PEG(8)-COOH y HS-PEG(7)-OMe) y ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) para aprovechar la interacción oro-azufre. También se probó dATP como agente de relleno, el cual exhibe una adsorción fuerte hacia la superficie de las nanopartículas de oro, y actúa como un buen agente estabilizante. Además, el dATP logra una funcionalización más rápida que las estrategias convencionales,^{40,41} siendo una buena alternativa como agente de bloqueo. El tiempo y la estabilidad en la funcionalización fue distinto para cada tipo de funcionalización. A continuación, se describen cada una de las estrategias empleadas.

5.3.1 Funcionalización de AuNT785@PEG-COOH/PEG-OMe@Apt

En primer lugar, la funcionalización de AuNT785@PEG@Apt se desarrolló funcionalizando primero con el agente de relleno (30 nmol) y luego con el aptámero (0.5, 1 y 2 nmol). En este ensayo se probaron dos tipos de PEG como se mencionó anteriormente, uno con un grupo carboxilo terminal (PEG-COOH) y otro con un grupo metoxi (PEG-OMe). Al comparar los dos tipos de PEG (Figura 21), se observó que al utilizar el PEG-COOH parte de las nanopartículas quedaban adheridas a la pared del microtubo durante el proceso de funcionalización. Esto se debe a que el grupo carboxilo se encuentra cargado negativamente (PEG-COO⁻) por el pH mayor a 7 del medio de la funcionalización, lo cual genera que haya interacciones electrostáticas con las paredes de los microtubos. En cambio, al emplear PEG-OMe, no había nanopartículas adheridas en el microtubo porque el grupo terminal no exhibe una carga. Así, al modificar con PEG-OMe, se evitó la pérdida de nanotriángulos manteniéndose una mayor proporción de nanotriángulos respecto a las nanoesferas. Además, al analizar la banda plasmónica de los AuNTs785, se vio un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores de 785 nm, lo que indica un cambio en el entorno de las nanoestructuras, indicativo de una buena funcionalización.

Además, se evaluó la funcionalización con distintas cantidades de aptámero (0.5, 1 y 2 nmol) para comparar los resultados con los dos tipos de PEG. En todos los casos, los nanoaptasensores exhiben una mayor estabilidad con el PEG-OMe, lo cual va acorde a lo observado en el proceso de funcionalización, ya que no se observan que las nanoestructuras estén adheridas a la superficie del microtubo. Por los resultados obtenidos, se eligió el HS-PEG-OMe como agente de relleno por su mayor estabilidad.

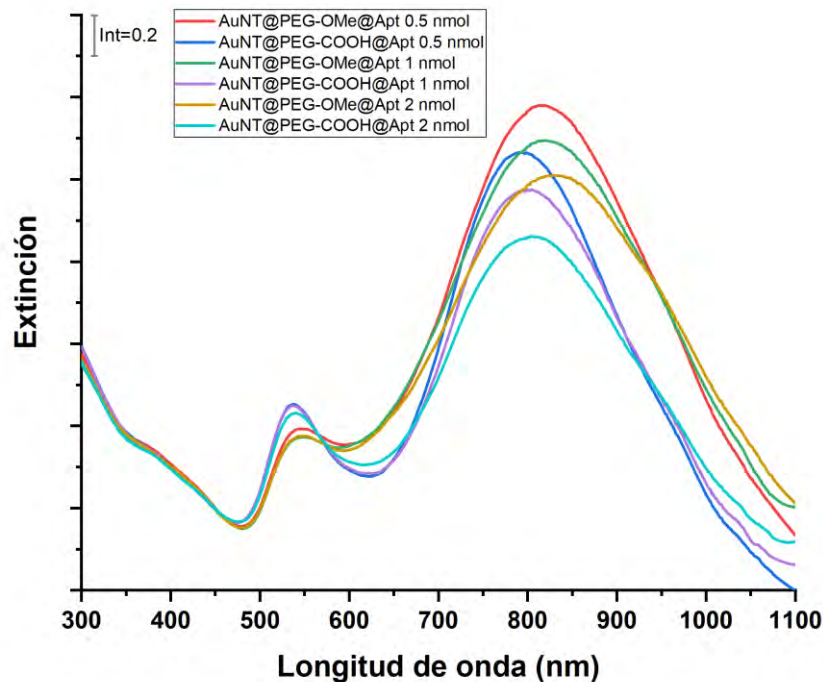


Figura 21. Espectros UV-Vis-NIR de los nanoaptasensores modificados con distintas cantidades de aptámero (0.5, 1 y 2 nmol) y dos tipos de PEG: PEG-OMe y PEG-COOH. Los nanotriángulos empleados corresponden a los AuNTs785.

5.3.1.1 Ensayo de estabilidad

Se evaluó la estabilidad del sensor en distintos medios para seleccionar el medio para los ensayos de detección de CEA. Los medios evaluados fueron:

- Buffer Tris 1x más sales de Mg^{2+} y Na^+
- Buffer PBS 1x
- Buffer PBS 1x + BSA 0,01% w/v
- Buffer PBS 1x + BSA 0.1% w/v.

En la Figura 20 se muestran los espectros de extinción de los AuNTs785 recién sintetizados, los nanoaptasensores de AuNT785@PEG@Apt medidos en agua ultrapura (curva negra, Figura 22) y en distintos buffers. El nanoaptasensor empleado para la evaluación de estabilidad fue AuNT785@Apt 1 nmol@PEG-COOH con aptámero pretratado térmicamente sin TCEP. Este nanoaptasensor agregó más en el medio de Tris 1x y PBS 1x, ya que la banda plasmónica de los AuNTs se observa muy ancha y la extinción disminuye a comparación del nanoaptasensor en agua ultrapura (curva negra, Figura 22). En cambio, los nanoaptasensores en el medio de PBS 1x y BSA 0.01% w/v, y PBS 1x y BSA 0.1% w/v se mantuvieron estables y se observaron menos agregados.

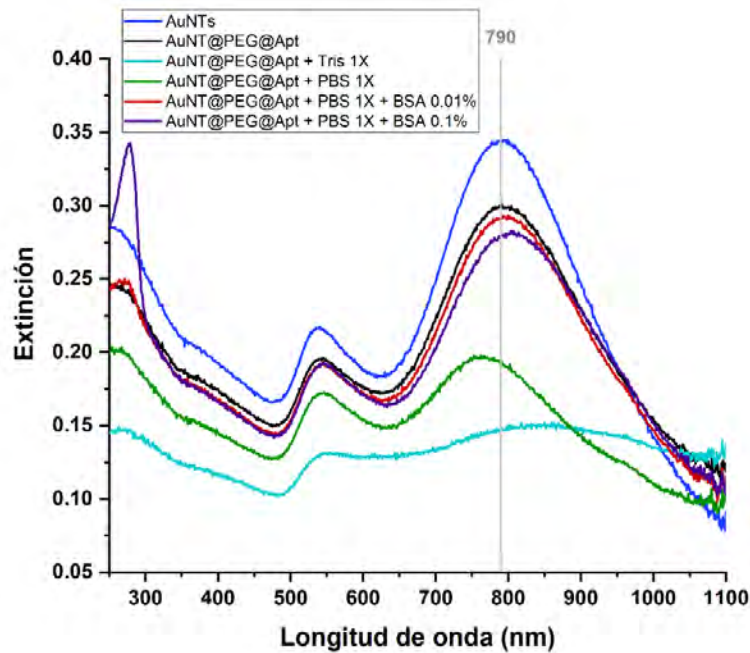


Figura 22. Prueba de estabilidad de AuNT@PEG@Apt. Espectros UV-Vis-NIR del nanoaptasensor (AuNT785 modificado con 30 nmol de PEG-OMe y 1 nmol de aptámero) en distintos medios.

Se obtuvieron nanoaptasensores de AuNT785@PEG@Apt estables en el medio de PBS 1x y BSA 0.01%, por lo que se continuó con algunos ensayos preliminares de CEA para poder evaluar la idoneidad del sensor.

5.3.1.2 Ensayos preliminares con CEA en solución

En este ensayo se usó el nanoaptasensor AuNT785@PEG@Apt resuspendido en agua ultrapura y el ensayo de detección de CEA se llevó a cabo en el buffer PBS 1x y BSA 0.01% el mismo medio en el que se prepararon las soluciones de CEA. Se evaluó la detección de CEA a 10 µg/mL con los nanoaptasensores funcionalizados con 0.5 y 1 nmol de aptámero (Figura 23). De acuerdo a la gráfica, se puede observar que no hay diferencias en la extinción con el nanoaptasensor funcionalizado con 0.5 nmol. En cambio, con el nanoaptasensor modificado con 1 nmol de aptámero se pueden observar ligeras diferencias entre la presencia y ausencia de CEA. A partir de esta información, se decidió cambiar el orden de funcionalización, pasando a añadir primero el aptámero y luego el agente de relleno. De esta forma se buscó aumentar la eficiencia de funcionalización con el aptámero para maximizar las diferencias.

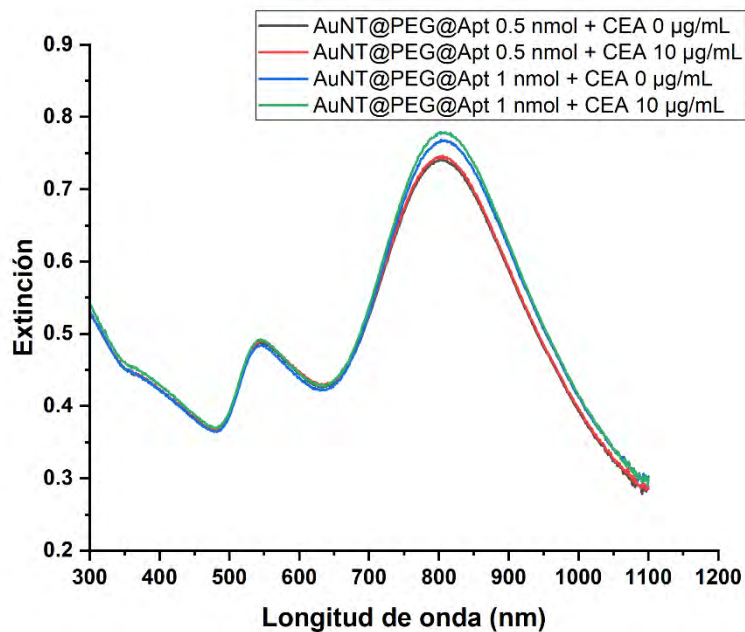


Figura 23. Espectros UV-Vis-NIR del ensayo de detección de CEA a 0 y 10 $\mu\text{g/mL}$ con el nanoaptasensor (AuNT785 modificado con PEG-OMe y el aptámero de CEA).

5.3.2 Funcionalización de AuNT785@Apt@PEG-OMe/MPA

En esta estrategia se probó a funcionalizar, primero, con el aptámero seleccionado, de tal forma que se asegure la completa interacción del aptámero empleado en la bioconjugación, y luego con dos agentes de relleno en simultáneo. Se seleccionó trabajar la funcionalización con PEG-OMe como uno de los agentes de relleno por la estabilidad que mostró en la bioconjugación respecto al PEG-COOH en los resultados anteriores. También, a la vez, se usó MPA, el cual ayuda a la estabilización de los AuNTs785, y al ser una molécula pequeña, puede resultar beneficioso para la detección porque permite que el aptámero horquilla cambie su conformación sin impedimento estérico. En la Figura 24 se puede observar los espectros de extinción de AuNT785@Apt@PEG-OMe/MPA. Al igual que el nanoaptasensor de AuNT785@PEG@Apt, hay un desplazamiento de la banda plasmónica de los AuNTs785 hacia longitudes de onda mayores de 785 nm, lo cual confirma la correcta modificación. Al comparar este resultado con el obtenido utilizando únicamente MPA como agente de relleno, se puede observar que hubo una pérdida de la cantidad de nanotriángulos y la agregación de estos. Este resultado no es favorable para los ensayos de detección, porque se busca un nanoaptasensor estable, y monitorear la banda plasmónica de los AuNTs785 mediante espectroscopía UV-Vis-NIR, además de asegurar la corrida del nanoaptasensor durante el ensayo de detección al usar las tiras de flujo lateral.

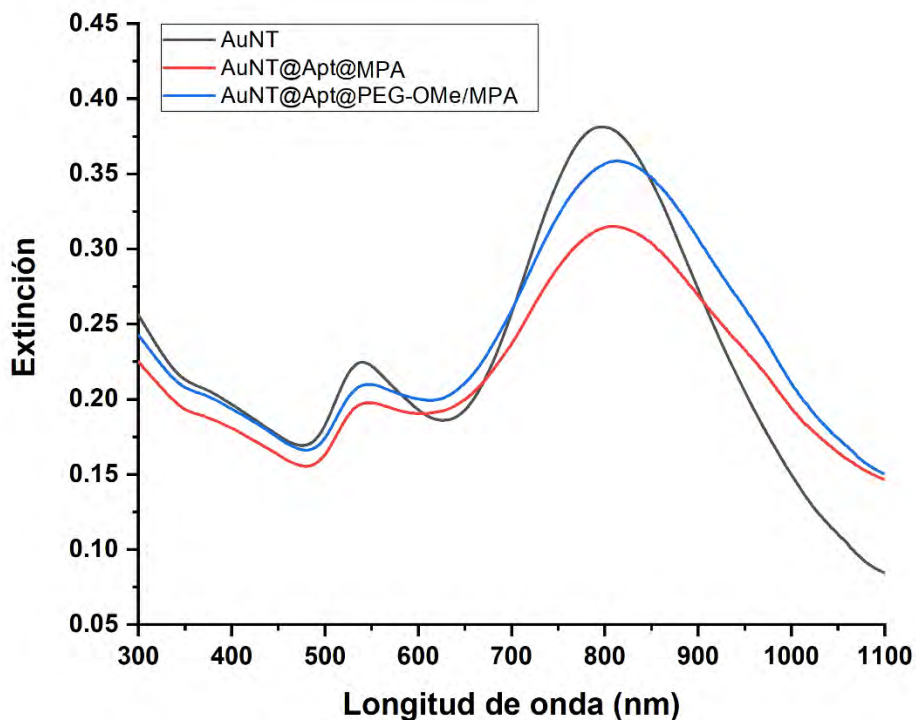


Figura 24. Espectros UV-Vis-NIR de AuNT, AuNT@Apt@MPA y AuNT@Apt@PEG-OMe/MPA. Las nanoestructuras corresponden a AuNT785.

Se estudió el efecto de la cantidad de cada agente de relleno para evaluar cuál de los nanoaptasensores era más efectivo para la detección de CEA. Las cantidades que se probaron fueron:

- AuNT785@Apt@20PEG-OMe+25MPA (a) con 20 nmol de PEG-OMe y 25 nmol de MPA
- AuNT785@Apt@20PEG-OMe+50MPA (b) con 20 nmol de PEG-OMe y 50 nmol de MPA.

En la Figura 25 se muestran los espectros UV-Vis-NIR de ambos tipos de nanoaptasensores. El resultado fue que el aumento de la cantidad de MPA redujo la estabilidad como se observa por la disminución de la extinción de la longitud de onda máxima y una diferencia de la λ_{\max} de los AuNTs785 modificados. Esto podría ocurrir porque al ser el MPA una molécula pequeña que no estabiliza tan bien la superficie, ello llevaría a una desestabilización si se desplaza al PEG-OMe en la bioconjugación.

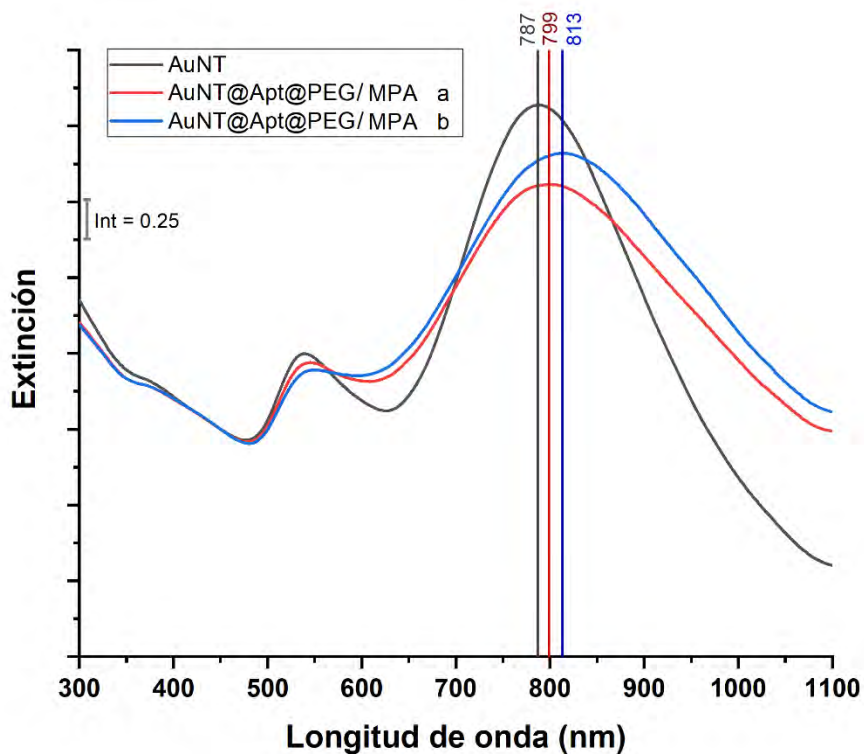


Figura 25. Espectros UV-Vis-NIR de AuNTs y la funcionalización con distintas cantidades de agente de relleno (PEG-OMe y MPA). AuNT@Apt@PEG/MPA (a) corresponde a 25 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe y AuNT@Apt@PEG/MPA (b) corresponde a 50 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe. Las nanoestructuras corresponden a AuNTs785.

5.3.2.1 Ensayos preliminares con CEA en solución

Los nanoaptasensores preparados fueron resuspendidos en agua ultrapura y las soluciones de CEA se prepararon con buffer PBS 1x + BSA 0.01% al igual que los ensayos preliminares con el nanoaptasensor de AuNT785@PEG@Apt. En la Figura 26 se muestran los espectros UV-Vis-NIR de los ensayos de detección con los nanoaptasensores (a) y (b) descritos en el subapartado anterior en presencia y ausencia de CEA. Si bien la estabilidad del AuNT785@Apt@20PEG+25MPA (a) es menor que el AuNT785@Apt@20PEG-OMe+50MPA (b) por la cantidad de agente de relleno, los resultados del ensayo de detección de CEA indican que en ambos hay una ligera diferencia en la extinción entre la presencia y ausencia de CEA a distintas concentraciones en el rango de $\mu\text{g/mL}$. Al no encontrar diferencias significativas, ambos tipos de sistemas fueron posteriormente evaluados en las pruebas de detección de CEA mediante LFA.

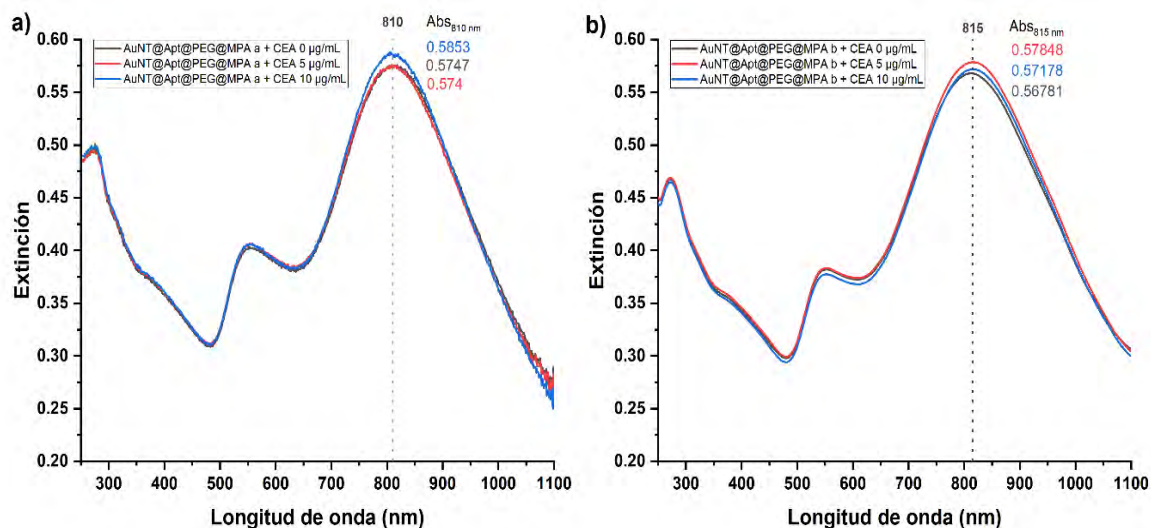


Figura 26. Espectros UV-Vis-NIR del ensayo de detección de CEA con dos nanoaptasensores: (a) AuNT@Apt@PEG 20 nmol@MPA 25 nmol y (b) AuNT@Apt@PEG 20 nmol@MPA 50 nmol de MPA. Las nanopartículas corresponden a AuNT785.

5.3.3 Funcionalización de AuNT785@Apt@dATP

Se ha reportado que el uso del dATP en la funcionalización de nanopartículas ayuda a mantener la estructura horquilla del aptámero, haciendo que la biotina esté más cercana a la superficie de las nanopartículas.⁴⁰ En este caso, se siguió un protocolo descrito en la bibliografía que disminuía el tiempo de preparación con respecto a las pruebas anteriores.⁴⁰ Se decidió probar la funcionalización con una menor cantidad de aptámero (Figura 27) con el fin de mejorar la interacción con el biomarcador de CEA, y así reducir el rango de detección de µg/mL a ng/mL. El dATP demostró ser un buen agente de relleno ya que, a pesar de probar cantidades más bajas de aptámero, el nanoaptasensor resultó ser estable en el medio recomendado (Na₃PO₄ 20 mM pH 7, BSA 5% w/v, sacarosa 10% w/v y Tween-20 0.25% v/v).

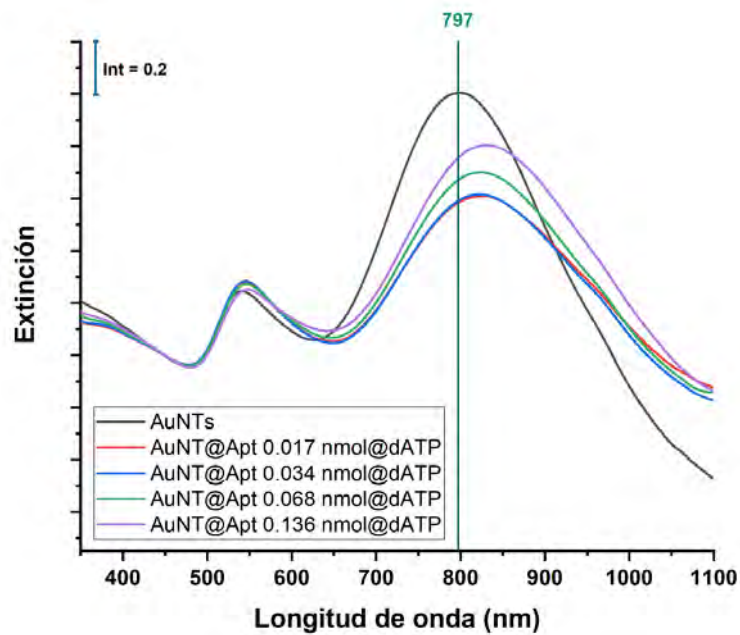


Figura 27. Espectros UV-Vis-NIR de los nanoaptasensores de AuNT785 funcionalizados con distintas cantidades de aptámero, y dATP como agente de relleno. Los espectros fueron normalizados a $\lambda = 450$ nm.

5.3.3.1 Detección mediante espectroscopía UV-Vis-NIR

Se usó el nanoaptasensor AuNT785@Apt@dATP modificado con 0.068 nmol de aptámero resuspendido en Na_3PO_4 20 mM pH 7, BSA 5% w/v , sacarosa 10% w/v y Tween-20 al 0.25% v/v . Para el ensayo de detección de CEA, las diluciones de CEA se prepararon en un nuevo medio, se usó un nuevo buffer de Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 100 mM y MgCl_2 5 mM recomendado en la literatura.⁴² Se incubó el nanoaptasensor con las diluciones de CEA durante 30 min bajo agitación mecánica. Dado el volumen total de la mezcla incubada (100 μL), se optó por medir en microplacas para monitorear los cambios en la absorbancia. Además, este mismo ensayo se empleó posteriormente para las pruebas LFA. En la Figura 28 se muestran los valores de absorbancia de número de ensayo evaluado con distintos lotes de nanotriángulos preparados en diferentes fechas. Si bien las diferencias de la extinción a 820 nm no son tan significativas, en todos los ensayos se puede observar un aumento de la señal en presencia de CEA por encima de 45 ng/mL.

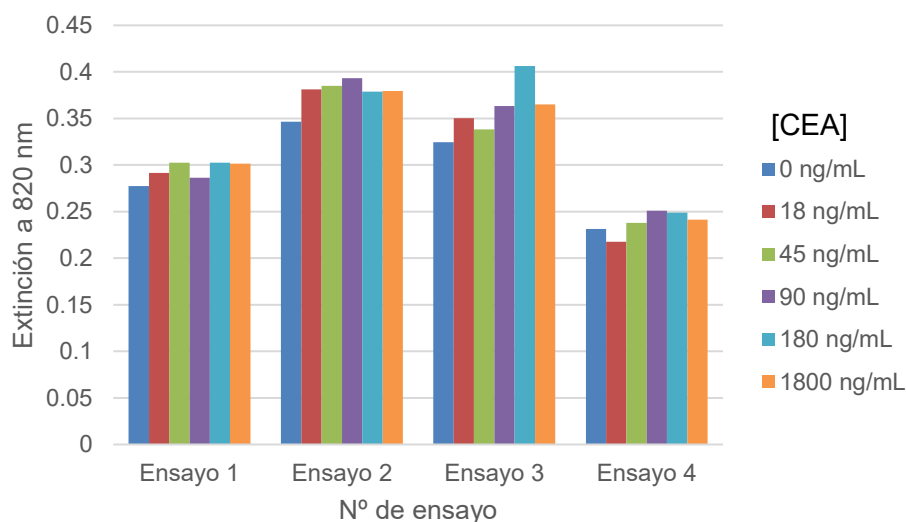


Figura 28. Ensayo óptico de detección de CEA a 820 nm del nanoaptasensor AuNT785@Apt 0.068 nmol@dATP con distintas concentraciones de CEA (0, 18, 45, 90, 180 y 1800 ng/mL). Cada número de ensayo se realizó con distintos lotes de nanotriángulos en diferentes fechas.

En la Tabla 9 se resume las condiciones finales evaluadas para cada tipo de nanoaptasensor en las pruebas de detección de CEA en solución. Al cambiar los agentes de relleno tiolados por el dATP, fue posible reducir la cantidad de aptámero en la funcionalización. El rango de detección de CEA 0-10 $\mu\text{g/mL}$ fue evaluado con AuNT785@PEG-OMe@Apt, AuNT785@Apt@20PEG-OMe+25MPA y AuNT785@Apt@20PEG-OMe+50MPA, de los cuales solo los dos últimos mostraron ligeras diferencias entre la presencia y ausencia de CEA. En cambio, con el nanoaptasensor AuNT785@Apt@dATP fue posible reducir el rango de detección de CEA, por lo que se evaluaron concentraciones en el rango 0-1800 ng/mL.

Tabla 9. Condiciones finales evaluadas para cada tipo de funcionalización con los AuNT785

AuNT785 funcionalizado	[Apt] nmol	Medio del sensor	[CEA]
AuNT785@PEG-OMe@Apt	0.5 y 1	PBS 1x + BSA 0.01% w/v	0-10 $\mu\text{g/mL}$
AuNT785@Apt@20PEG-OMe+25MPA	0.5 y 1		
AuNT785@Apt@20PEG-OMe+50MPA	0.5		
AuNT785@Apt@dATP	0.068	Na ₃ PO ₄ 20 mM pH:7, BSA al 5% w/v, sacarosa al 10% w/v y Tween-20 al 0.25% v/v	0-1800 ng/mL

5.4 Optimización de la preparación de tiras LFA

A continuación, se describirán las pruebas que corresponden al trabajo realizado en el grupo Bionanosurf (entidad asociada al Instituto de Nanomateriales de Aragón, Zaragoza, España). Se eligió trabajar con nanotriángulos de λ_{max} 1100 nm debido a la experiencia del grupo en el desarrollo de dispositivos LFA con ese tamaño de nanopartículas.

5.4.1 Funcionalización de AuNTs1100 para la evaluación de las tiras LFA

Los AuNTs de $\lambda_{\max} = 1100$ nm fueron funcionalizados con aptámero y dATP, tal y como se optimizó con los AuNT de $\lambda_{\max} 785$ nm, estos se resuspendieron en el buffer Na_3PO_4 20 mM pH 7, BSA 5% w/v, sacarosa 10% w/v y Tween-20 0.25% v/v. También se caracterizaron mediante espectroscopía UV-Vis-NIR (Figura 29.a) y se comprobó su funcionalización por el desplazamiento de la longitud de onda. Además, se realizó una prueba preliminar de LFA (Figura 29.b) de estas nanopartículas modificadas con el aptámero-horquilla en ausencia de CEA, se observó que al usar las nanoestructuras con GSH, que tanto la línea de ensayo como la línea de control no se marcaron. Esto podría deberse a que al estar los AuNTs1100 recubiertos con GSH, no se haya logrado la modificación con el aptámero por no haber superficie disponible para la formación de enlace oro-azufre. Por ello, se continuó las pruebas posteriores con nanoaptasensores sin GSH.

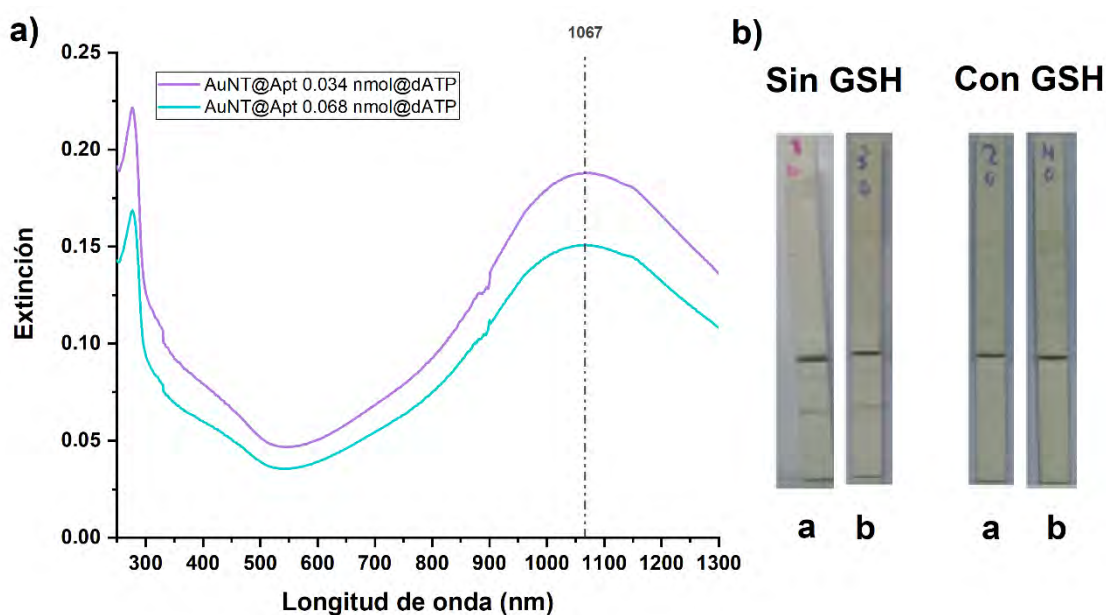


Figura 29. Espectros UV-Vis-NIR de AuNT@Apt 0.032 nmol@dATP y AuNT@Apt 0.068 nmol@dATP. b) Ensayo LFA en ausencia de CEA de los nanoaptasensores (AuNT@Apt@dATP y AuNT@GSH@dATP) funcionalizados con 0.034 nmol (a) y 0.068 nmol (b) de aptámero. Las nanopartículas corresponden a AuNT1100. Se utilizaron membranas HP120 con una almohadilla de conjugado pretratado con buffer Tris (Tris 1 M pH 8, Triton X-100 5%, NaCl 0.15 M). LC: AptC+ Strept 1 mg/mL; LT: Strept 1,25 mg/mL y running buffer Tris 50 mM pH 9 + NaCl 100 mM + MgCl_2 50 mM.

Las pruebas para la optimización de la preparación del dispositivo LFA se llevaron a cabo utilizando los AuNTs de $\lambda_{\max} 1100$ nm funcionalizados con el aptámero seleccionado. Se probaron algunos agentes de relleno anteriores como dATP y HS-PEG(8)-COOH. En este contexto, las pruebas preliminares de optimización se llevaron a cabo en ausencia de CEA con el objetivo de determinar las condiciones adecuadas en las que la señal de la línea de ensayo fuera menos pronunciada. Esto se debe a que, como se mostrará en las siguientes gráficas, se observó que la línea de ensayo se marca en ausencia de CEA, posiblemente debido a la apertura del aptámero-horquilla, exponiendo la biotina que se une a la estreptavidina en la línea de ensayo. Además, se controlaron algunos parámetros, como una corrida limpia para evitar que el nanoaptasensor quede agregado en la almohadilla de conjugado. También se aseguró que tanto la línea de ensayo como la de control mostraran líneas definidas, sin dispersión, para así asegurar un mejor análisis de detección del biomarcador. A

continuación, se muestran los resultados más influyentes en la optimización llevada a cabo.

5.4.2 Pretratamiento de la almohadilla de conjugado

Una de las funciones principales de la almohadilla de conjugado es proporcionar la adecuada interacción entre el nanoaptasensor y el antígeno. Se debe procurar que el nanoaptasensor no quede retenido en esta sección, ya que el flujo debe continuar hasta la almohadilla absorbente.¹³ De acuerdo a la literatura,⁴³ se recomienda el uso de ciertos tipos de buffer para el pretratamiento de la almohadilla de conjugado. Para analizar la influencia del pretratamiento, se probaron distintas opciones, tales como:

- No pretratar la almohadilla
- Pretratamiento con buffer de ácido bórico (ácido bórico 50 mM pH 8, BSA 0,5%, PVP 40 kDa 0,5% y Tween-20 1%)
- Pretratamiento con buffer Tris (Tris 1 M pH 8, Triton X-100 5% y NaCl 0.15 M).

Dado los resultados (Figura 30), se puede decir que el pretratamiento influye en el flujo de la corrida del ensayo. La selección del buffer de pretratamiento es importante para asegurar la estabilidad del nanoaptasensor durante los ensayos. Tal y como se muestra en la Figura 30, al no pretratar la almohadilla de conjugado, las líneas se marcaron de forma más tenue, y se observó una mayor agregación de las nanoestructuras y una mancha esparcida en la tira de nitrocelulosa. Entre los dos buffers seleccionados, el buffer de Tris mostró ligeras mejoras con respecto al buffer de ácido bórico (líneas más definidas), por lo que fue el seleccionado como óptimo.

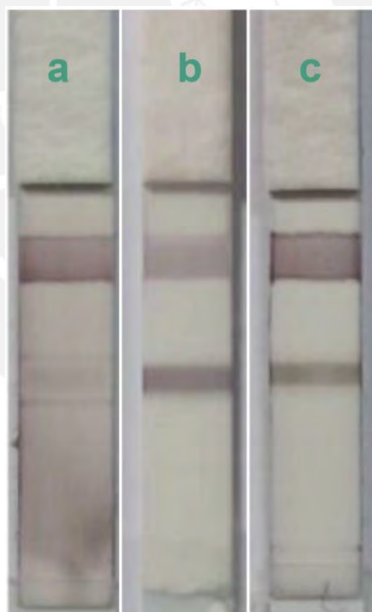


Figura 30. Fotografía del estudio del efecto del pretratamiento de la almohadilla de conjugado: (a) sin pretratar, (b) pretratado con buffer de ácido bórico (ácido bórico 50 mM pH 8, BSA 0.5% w/v, PVP 40 kDa 0.5% w/v y Tween-20 1% v/v), y (c) pretratado con buffer Tris (Tris 1 M pH 8, Triton X-100 5%, NaCl 0.15 M). Se utilizaron membranas HP80, LC: AptC+ Strept 1 mg/mL; LT: Strept 1,25 mg/mL y nanopartículas AuNT@Apt@dATP, y running buffer Tris 50 mM pH 9 + NaCl 100 mM + MgCl₂ 50 mM.

5.4.3 Medio del sensor

El medio del sensor determina el pH y la fuerza iónica adecuada para el nanoaptasensor, ya que esto influye en su estabilidad, y la interacción entre el aptámero y el biomarcador objetivo.¹³ Por ello, se exploró la influencia de este factor tras la funcionalización de las nanopartículas con el aptámero y los agentes de relleno. Se probó a resuspender estos nanoaptasensores en distintos medios y analizar su influencia al interaccionar con las tiras de flujo lateral:

- Agua ultrapura
- HEPES 10 mM pH: 7.4, BSA al 0.1 % w/v y Tween-20 al 0.1% v/v
- Na₃PO₄ 20 mM pH:7, BSA al 5% w/v, sacarosa al 10% w/v y Tween-20 al 0.25% v/v

Se evaluaron los nanoaptasensores de AuNT1100@Apt@PEG funcionalizados con dos cantidades de aptámero 0.17 (Figura 31, tiras 1, 3, 5 y 7) y 1 nmol (Figura 31, tiras 2, 4, 6 y 8). Los nanoaptasensores resuspendidos en agua de las tiras 1-4 mostraron señales menos intensas a diferencia de los sensores resuspendidos en buffer (HEPES + BSA + Tween-20) independientemente de la cantidad de aptámero presente en su superficie, lo que implica una menor estabilidad debido al medio.

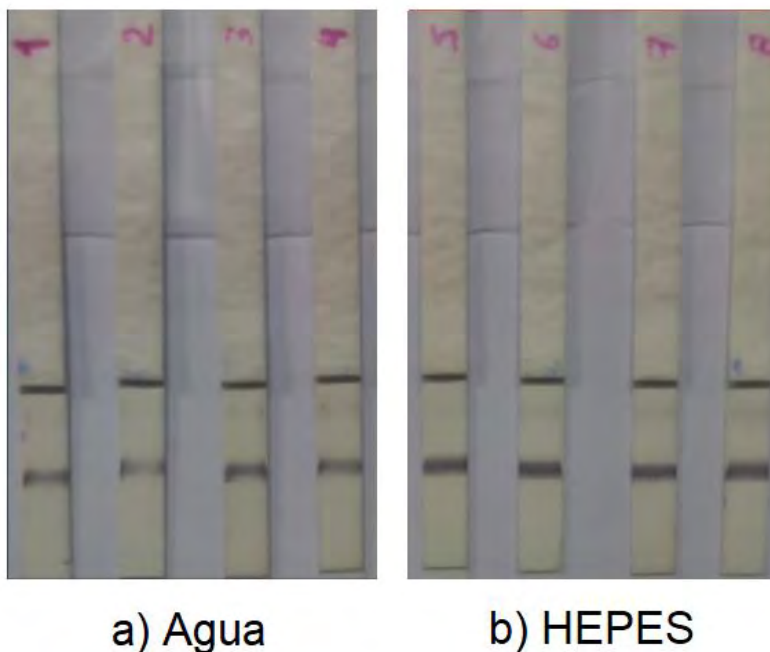


Figura 31. Fotografías de los ensayos realizados para ver la comparación entre resuspender las nanopartículas en agua o en buffer HEPES. Las pruebas fueron realizadas con AuNT1100@Apt@PEG-COOH (tiras 1, 3, 5 y 7 con nanopartículas funcionalizadas con 0.17 nmol de aptámero, y las tiras 2, 4, 6 y 8 con nanopartículas funcionalizadas con 1 nmol de aptámero). Se utilizaron membranas HP80, LC: AptC+ Strept 0.5 mg/mL; LT: Strept 0.5 mg/mL; Tratamiento de la almohadilla de conjugado: PVP + BSA + Tween-20. Running buffer: 50 uL Tris 50 mM (pH 9), NaCl 150 mM y MgCl₂ 300 mM.

Con los resultados mostrados en los ensayos LFA anteriores, se descartó resuspender el nanoaptasensor en agua porque las nanopartículas agregaban durante el ensayo y parte de ellas se quedaban en la almohadilla de conjugado luego de la cromatografía. Sin embargo, al seguir haciendo pruebas de la estabilidad de las nanopartículas, se vio que aquellas en las que el agente de relleno utilizado era dATP como el nanoaptasensor de AuNT1100@Apt 0.0425 nmol@dATP, también experimentaban algunos problemas de estabilidad en el buffer HEPES. Por ello, se decidió comparar con otro medio de

resuspensión recomendado en la literatura,⁴⁴ el buffer Na_3PO_4 20 mM pH 7, BSA al 5% w/v, sacarosa al 10% w/v y Tween-20 al 0.25% v/v. Al comparar los resultados obtenidos con este buffer y el HEPES previamente utilizado, se vieron mejores señales con el buffer de fosfato (Figura 32).



HEPES Na_3PO_4

Figura 32. Fotografía de los ensayos realizados para ver la comparación entre resuspender las nanopartículas en buffer HEPES o en buffer Na_3PO_4 20 mM pH:7, BSA 5% w/v, sacarosa 10% w/v y Tween-20 0.25% v/v. Se utilizaron membranas HP80, LC: AptC+ Strept 1 mg/mL; LT: Strept 1.25 mg/mL y nanopartículas AuNT@Apt 0.0425 nmol@dATP. Almohadilla de conjugado sin pretratar. Running buffer: 50 uL Tris 50 mM (pH 9), NaCl 100 mM y MgCl_2 50 mM.

Con estos resultados, se decidió escoger el buffer Na_3PO_4 20 mM, BSA al 5% w/v, sacarosa al 10% w/v y Tween-20 al 0.25% v/v para los ensayos finales, al observarse un mejor marcaje de las línea control y menor presencia de agregados en la corrida para todos los tipos de nanopartículas explorados. Además, se observa que al usar un nanoaptasensor modificado con menor cantidad de aptámero, se logra disminuir la marca de la línea de ensayo en la prueba en ausencia de CEA.

5.4.4 Running buffer

Otro de los factores importantes en el desarrollo de tiras de flujo lateral es el *running buffer* o buffer de corrida, que es el encargado de favorecer el avance de las muestras (la mezcla del nanoaptasensor en presencia o ausencia del biomarcador) por la membrana. Este buffer afecta no sólo el flujo del nanoaptasensor, sino a la interacción de las nanoestructuras con las especies depositadas en la línea de ensayo y la línea de control, lo cual impacta directamente, tanto en la selectividad como en la sensibilidad del ensayo. Por este motivo, se probaron diversos *running buffer*. En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos al utilizar AuNT1100@Apt@PEG-COOH con distintas cantidades de aptámero (0.085, 0.0017, 0.0425 y 0.0213 nmol respectivamente). Como se puede apreciar en la Figura 33, el buffer de PBS (PBS 10x pH 9 + BSA al 0.5% + Tween-20 al 1%) no favoreció la interacción de las nanoestructuras con las membranas por lo que se descartó, debido a que tanto la línea de ensayo como la de control no se marcaron. Al comparar los resultados obtenidos al

utilizar buffer citrato salino-sódico (SSC) (SSC 5x + 5% BSA), se observó que las líneas de control no se marcaron al probar nanoaptasensores modificados con poca cantidad de aptámero, solo en la tira 8 (AuNT@Apt 0.085 nmol@PEG-COOH) se vio la marca en la línea de ensayo y control. Otro punto que se debe mencionar es que la almohadilla de absorción muestra que los nanoaptasensores podrían haber agregado, ya que se ve una mancha oscura en esta última sección de la tira. Por último, se probó el buffer Tris (Tris 50 mM pH 9 + NaCl 100 mM + MgCl₂ 50 mM), y fue en este caso en el que se consiguió que se marcara la línea de control en todas las membranas, aún con bajas cantidades de aptámero, obteniéndose una muy baja señal en la línea de ensayo. Por este motivo, se decidió mantener el buffer de Tris como *running buffer*.

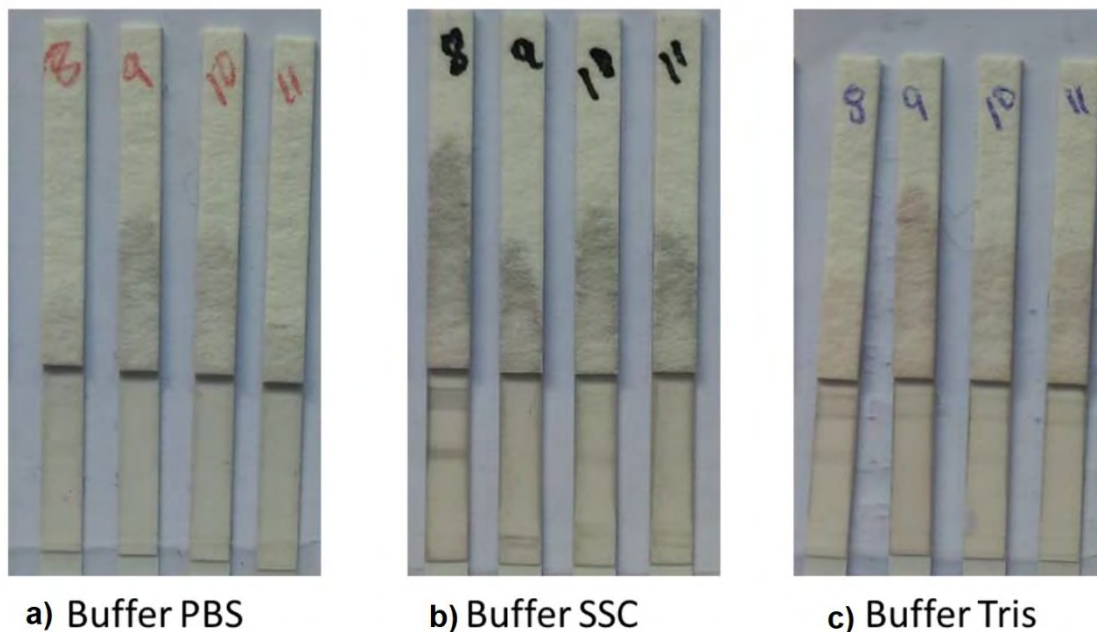


Figura 33. Fotografías del estudio del efecto del *running buffer* en las tiras de flujo lateral: a) buffer PBS (PBS 10x pH 9 + BSA al 0.5% + Tween-20 al 1%), b) buffer SSC (SSC 5x + 5% BSA), y c) buffer Tris (Tris 50 mM pH 9 + NaCl 100 mM + MgCl₂ 50 mM). Se utilizaron membranas HP80, LC: AptC+ Strept 2 mg/mL; LT: Strept 1,25 mg/mL y el nanoaptasensor AuNT@Apt@PEG-COOH (8: 0,085 nmol Apt; 9: 0,0017 nmol apt; 10: 0,0425 nmol; 11: 0,0213 nmol Apt). Tratamiento de almohadilla de conjugado: ácido bórico 50 mM pH 8, BSA al 0,5%, PVP 40 kDa al 0,5% y Tween-20 al 1%.

5.4.5 Tipo de nitrocelulosa

Se usaron dos tipos de nitrocelulosa (NC): HP80 y HP120, cuya diferencia es el tamaño de poro. La nitrocelulosa HP120 tiene un menor tamaño de poro, lo que hace que el flujo sea menor y el tiempo de contacto entre los nanoaptasensores y la membrana NC aumente. Este mayor tiempo de contacto favorece una mejor interacción entre el nanoaptasensor y la línea de ensayo/línea de control. En la Figura 34 se puede observar cómo en los ensayos realizados con la nitrocelulosa HP80 las líneas detectadas son más anchas que en los ensayos realizados con la nitrocelulosa HP120, con la que se obtienen líneas más definidas y una mejor resolución. El nanoaptasensor utilizado fue AuNT@Apt 0.17 nmol@PEG-COOH, una muestra resuspendida en agua y otra en HEPES, en ambos casos se observa que el mejor resultado es con la nitrocelulosa HP120. Por ello, se seleccionó realizar las pruebas de detección de CEA con la NC que dio mejor resultado.

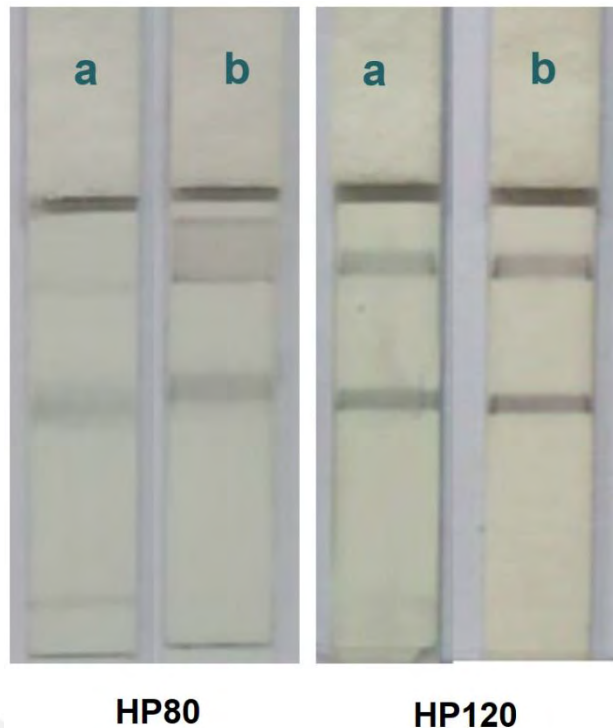


Figura 34. Fotografía de los ensayos realizados para ver la comparación entre las líneas de ensayo y control utilizando nitrocelulosa HP80 y HP120. LC: AptC+ Strept 0.5 mg/mL; LT: Strept 0.5 mg/mL; Tratamiento de almohadilla de conjugado: PVP + BSA + Tween-20. En ambos casos se utilizaron AuNT@Apt 0.17 nmol@PEG- COOH (nanoaptasensores resuspendidos en (a) agua o (b) buffer HEPES). Running buffer: 50 μ L de Tris 50 mM (pH 9), NaCl 150 mM y MgCl₂ 300 mM.

5.4.5 Detección de CEA

Una vez estudiados los parámetros descritos, las siguientes pruebas de detección de CEA se trabajaron con las siguientes condiciones:

- Pretratamiento de la almohadilla de conjugado en el buffer Tris (Tris 1 M pH 8, Triton X-100 5% v/v y NaCl 0.15 M).
- El medio de resuspensión del nanoaptasensor fue Na₃PO₄ 20 mM pH:7, BSA al 5% w/v, sacarosa al 10% w/v y Tween-20 al 0.25% v/v
- El *running buffer* seleccionado fue Tris 50 mM pH 9, NaCl 100 mM y MgCl₂ 50 mM
- La nitrocelulosa seleccionada fue HP120

Tras la optimización de los parámetros anteriores, se realizaron pruebas preliminares de la detección de CEA para analizar el efecto de este diseño de las tiras LFA en la interacción con el biomarcador. Se probó trabajar con el nanoaptasensor modificado con 0.068 nmol de aptámero y el agente de relleno de dATP, por su tiempo reducido durante la funcionalización. Las concentraciones evaluadas de CEA fueron 0, 18, 45, 90 y 180 ng/mL (Figura 35).



[Apt] = 0.068 nmol

Figura 35. Fotografías de los resultados obtenidos con las tiras de flujo lateral al analizar AuNT@Apt@dATP tras ser incubados con distintas concentraciones de CEA (0, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 nM). Se utilizaron membranas HP120 con una almohadilla de conjugado pretratado con buffer Tris (Tris 1 M pH 8, Triton X-100 5%, NaCl 0.15 M). LC: AptC+ Strept 1 mg/mL; LT: Strept 1,25 mg/mL y running buffer Tris 50 mM pH 9 + NaCl 100 mM + MgCl₂ 50 mM.

En vista de los resultados obtenidos, se procedió a repetir los experimentos descritos y a incluir un mayor número de réplicas de los distintos tipos de sensores utilizados. Para minimizar diferencias en las fotografías de las tiras por la distinta exposición a la luz de los sensores, enmarcado en el proyecto se diseñó una caja negra donde al introducir las tiras, la caja se pudiera acoplar con un celular de uso común a modo de detector. Cabe mencionar que, en esta etapa de la toma fotográfica, aún no se había realizado la optimización de la caja negra para la medición, por lo que pudo haber influido en la irreproducibilidad. Al hacer el análisis cuantitativo por ImageJ mediante la determinación de la intensidad de las líneas de ensayo, si bien no se obtuvieron resultados lineales, sí se pudieron observar diferencias en las señales al comparar los ensayos en ausencia y en presencia de CEA, aunque se ha visto la necesidad de trabajar en mejorar la reproducibilidad (Figura 36). En todas las réplicas se pueden distinguir concentraciones de CEA por encima de 18 ng/mL, valor que es aceptable dentro del rango que se quiere detectar.

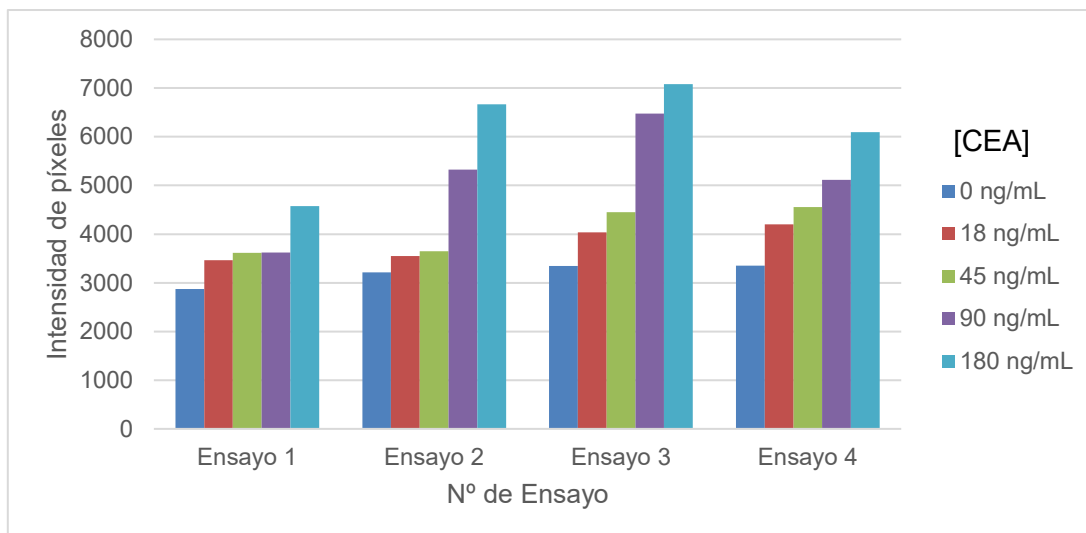


Figura 36. Análisis de las intensidades de píxeles de la línea de ensayo de diversos ensayos llevados a cabo utilizando AuNT1100@Apt 0.068 nmol@dATP, en presencia de diferentes concentraciones de CEA (0, 18, 45, 90 y 180 ng/mL). Cada número de ensayo se realizó con distintos lotes de nanotriángulos en diferentes fechas. En todos los casos se utilizaron membranas HP120, LC: AptC+Strept 1 mg/mL LT: Strept 1 mg/mL Tratamiento de la almohadilla de conjugado: Tris 0.02 M, Triton X-100 0.25%, NaCl 0.15M y running buffer Tris 20 mM pH: 7.4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM.

5.5 Detección de CEA por LFA con AuNTs785

A continuación, se muestran los ensayos de detección por LFA de CEA con los nanoaptasensores preparados en el laboratorio QNano+, en el cual se usaron AuNTs de λ_{\max} 785 nm. La detección de CEA mediante LFA se estudió por colorimetría y por SERS.

5.5.1 Detección colorimétrica

Uno de los primeros ensayos de detección por LFA fue usando el nanoaptasensor de AuNT785@Apt@PEG@MPA modificados con 1 nmol de aptámero y dos distintas cantidades de agentes de relleno (AuNT785@Apt@PEG@MPA (a) corresponde a 25 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe para las tiras 1-3 y AuNT785@Apt@PEG@MPA (b) corresponde a 50 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe). Tal como se muestra en la Figura 37, los nanoaptasensores fueron evaluados con distintas concentraciones de CEA 0 $\mu\text{g/mL}$ (tira 1 y 4), 5 $\mu\text{g/mL}$ (tira 2 y 5) y 10 $\mu\text{g/mL}$ (tira 3 y 6), al observar las líneas de ensayo, tanto para el nanoaptasensor a y b, estas se ven marcadas. Sin embargo, en el caso del nanoaptasensor a, se puede observar una ligera tendencia, en el que la línea de ensayo se ve más coloreada al tener mayor concentración de CEA.

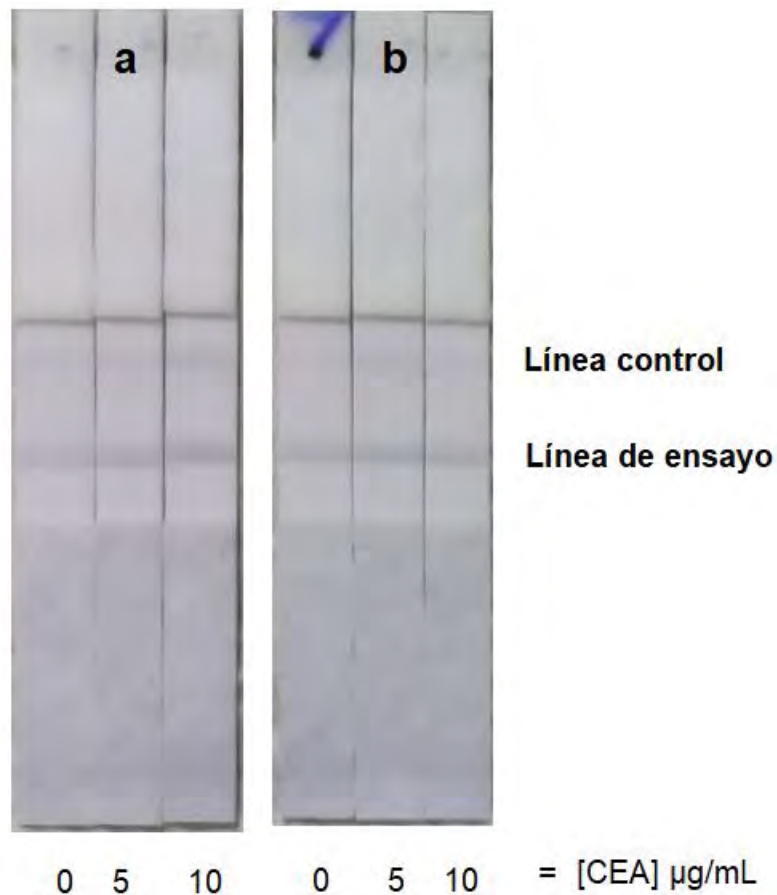


Figura 37. Tiras de flujo lateral (de izquierda a derecha) del ensayo del sensor con 0 $\mu\text{g/mL}$ (1 y 4), 5 $\mu\text{g/mL}$ (2 y 5) y 10 $\mu\text{g/mL}$ (3 y 6) de CEA. Se usó el sensor AuNT@Apt@PEG@MPA (a) corresponde a 25 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe para las tiras 1-3 y AuNT@Apt@PEG@MPA (b) corresponde a 50 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe para las tiras 4-6. En todos los casos se utilizaron membranas HP80, LC: AptC+Strept 0.5 mg/mL LT: Strept 0.5 mg/mL Tratamiento de la almohadilla de conjugado: PVP + BSA + Tween-20. Running buffer contiene: PBS 1x, Tween-20 0.25% v/v, sacarosa 10% w/v, y BSA 0.1% w/v.

Con el fin de comparar ambos nanoaptasensores, se realizaron al menos 4 réplicas de los ensayos mostrados anteriormente. Cada uno de los nanoaptasensores fueron preparados en distintas fechas con el fin de evaluar su reproducibilidad. Se procedió a analizar las líneas de ensayo de cada una de las tiras, para lo cual se realizó la toma de fotografías con la caja negra diseñada en el laboratorio. Después se midió la cantidad de píxeles de las líneas de ensayo (Figura 38), y se observó que el nanoaptasensor (a) sí logra distinguir la presencia de CEA a concentraciones mayores de 5 $\mu\text{g/mL}$. En cambio, el nanoaptasensor (b) no distingue la presencia del biomarcador. En todos los casos con los nanoaptasensores evaluados, los resultados no son reproducibles.

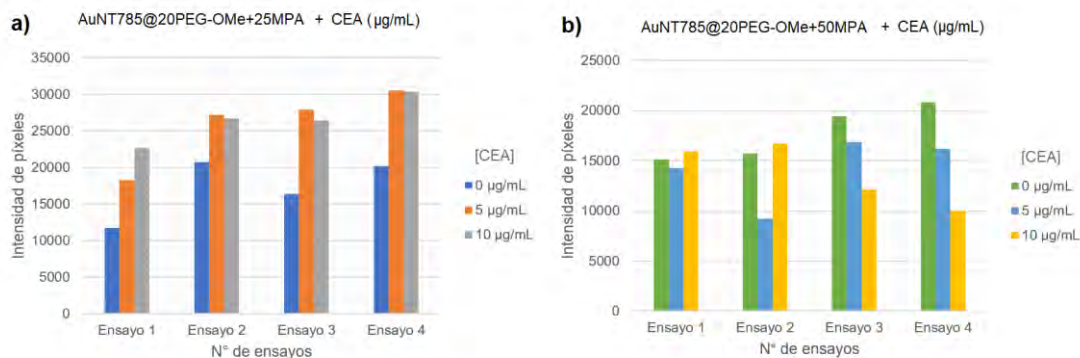


Figura 38. Análisis de las intensidades de píxeles de la línea de ensayo de la detección de CEA mediante LFA utilizando dos tipos de nanoaptasensores (AuNT785@Apt@20PEG+25MPA (a) corresponde a 25 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe y AuNT785@Apt@20PEG-OMe+50MPA (b) corresponde a 50 nmol de MPA y 20 nmol de PEG-OMe), en presencia de diferentes concentraciones de CEA (0, 5 y 10 µg/mL). Cada número de ensayo se realizó con distintos lotes de nanotriángulos en diferentes fechas. En todos los casos se utilizaron membranas HP80, LC: AptC+Strept 0.5 mg/mL, LT: Strept 0.5 mg/mL. Tratamiento de la almohadilla de conjugado: PVP + BSA + Tween-20. Running buffer contiene: PBS 1x, Tween-20 0.25% v/v, sacarosa 10% w/v y BSA 0.1% w/v.

Posteriormente, se evaluó mediante LFA el nanoaptasensor AuNT@Apt@dATP funcionalizado con 0.068 nmol de aptámero. En este caso, se redujo el rango de concentraciones de CEA de a µg/mL a ng/mL (0,18, 45, 90, 180 y 1800 ng/mL). Se trabajó con los parámetros optimizados de los resultados obtenidos durante la estancia en el grupo Bionanosurf que había dado buenos resultados para los AuNTs λ_{max} 1100 nm. En la Figura 39 se muestra el resultado del ensayo LFA, en el cual se observa que se logró disminuir el marcaje de la línea de ensayo (tira 1) en ausencia del biomarcador a comparación de la presencia de este (tiras 2-6).

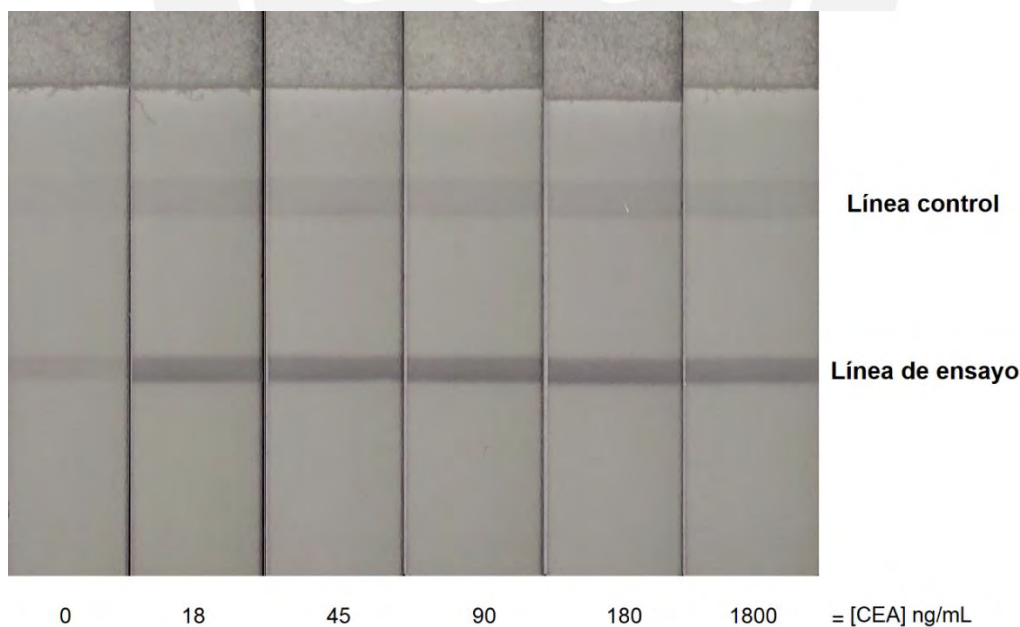


Figura 39. Tiras de flujo lateral 1-6 (de izquierda a derecha) del ensayo de detección de CEA (0,18, 45, 90, 180 y 1800 ng/mL) con el nanoaptasensor de AuNT@Apt 0.068 nmol@dATP. En todos los casos se utilizaron membranas HP120, LC: AptC+Strept 1 mg/mL, LT: Strept 1 mg/mL. Tratamiento de la almohadilla de conjugado: Tris 0.02 M, Triton X-100 0.25%, NaCl 0.15M y running buffer Tris 20 mM pH: 7.4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM.

Al observar que los resultados a simple vista distinguen la presencia de CEA, se realizaron al menos 4 réplicas para evaluar el rango de detección. Cada una de las tiras fue fotografiada dentro de la caja negra, cabe destacar que esta vez se optimizó el diseño de la caja en la cual se eliminó la interferencia de la luz externa. El análisis colorimétrico se llevó a cabo mediante el análisis de las fotografías tomadas utilizando el software ImageJ como en las pruebas anteriores. En todos los ensayos de detección (Figura 40), se observó que el nanoaptasensor puede distinguir las concentraciones de CEA superiores a 90 ng/mL, lo cual se encuentra en el rango adecuado. Sin embargo, en todas las réplicas se observa una disminución de la intensidad de píxeles para la concentración de 1800 ng/mL, esto podría deberse a la saturación en la formación del complejo aptámero-CEA que conlleva a que el flujo del nanoaptasensor no sea completa porque podría formarse aglomerados. Este método funciona adecuadamente para las pruebas de detección en las que se busca detectar la presencia de CEA en la muestra.

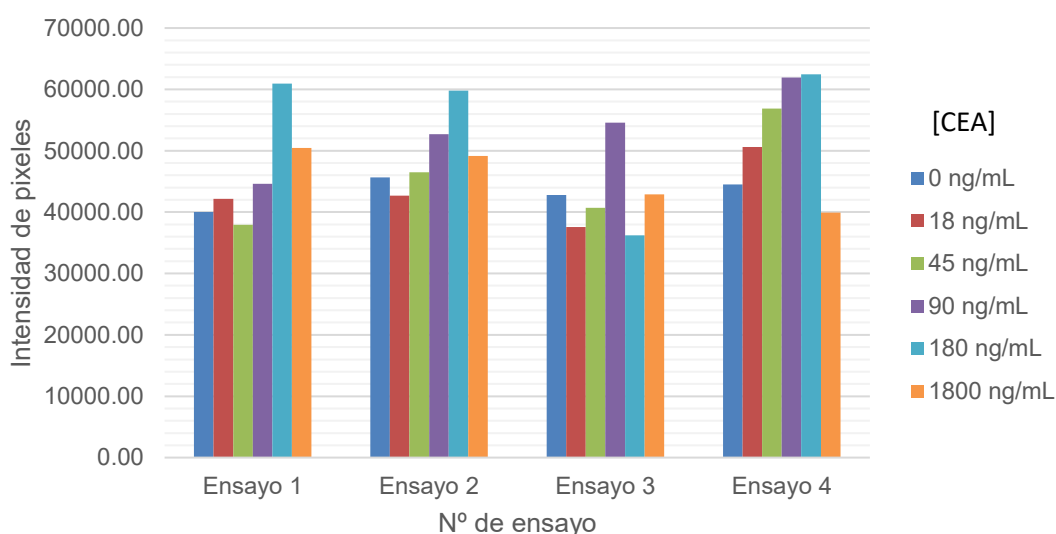


Figura 40. Análisis de las intensidades de píxeles de la línea de ensayo de diversos ensayos llevados a cabo utilizando distintos tipos de AuNT785@Apt 0.068 nmol@dATP, en presencia de diferentes concentraciones de CEA (0, 18, 45, 90, 180 y 1800 ng/mL). Cada número de ensayo se realizó con distintos lotes de nanotriángulos en diferentes fechas. En todos los casos se utilizaron membranas HP120, LC: AptC+Strept 1 mg/mL, LT: Strept 1 mg/mL. Tratamiento de la almohadilla de conjugado: Tris 0.02 M, Triton X-100 0.25%, NaCl 0.15M y running buffer Tris 20 mM pH: 7.4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM.

La Tabla 10 muestra las condiciones finales para la evaluación de los nanoaptasensores de AuNT785 para la detección de CEA mediante el ensayo LFA. Fue posible distinguir la presencia del biomarcador a 5 y 10 µg/mL con el nanoaptasensor de AuNT785@Apt@20PEG+ 25MPA comparado con AuNT785@Apt@20PEG+ 50MPA que no dio buenos resultados. Además, de manera similar que los resultados obtenidos en solución, el nanoaptasensor AuNT785@Apt@dATP distinguió concentraciones superiores a 90 ng/mL de CEA, por lo que se consiguió reducir el rango de detección.

Tabla 10. Condiciones finales evaluadas para la detección de CEA mediante LFA con los AuNTs785.

AuNT funcionalizado	Pretratamiento de la almohadilla de conjugado	Medio del ensayo	Running buffer	Tipo de NC	[CEA]
AuNT785@Apt @20PEG+ 25MPA	ácido bórico 50 mM pH 8, BSA 0.5 % w/v, PVP (PM: 40 kDa) 0,5 % w/v y Tween-20 1% v/v	PBS 1x + BSA 0.01% w/v	PBS 1x, Tween-20 0.25% v/v, sacarosa 10% w/v y BSA 0,1% w/v	80HP	0-10 µg/mL
AuNT785@Apt @20PEG+ 50MPA					
AuNT785@Apt @dATP	Buffer 1x diluido del buffer 20x (Tris 1M pH 8, Triton X-100 5%, NaCl 0.15M)	Na ₃ PO ₄ 20 mM pH:7, BSA al 5% w/v, sacarosa al 10% w/v y Tween-20 al 0.25% v/v	Tris-HCl 50 mM pH 9, NaCl 100 mM y MgCl ₂ 50 mM	120HP	0-1800 ng/mL

Si se comparan los resultados del análisis colorimétrico LFA obtenidos entre AuNT1100@Apt 0.068 nmol@dATP (Figura 36) y AuNT785@Apt 0.068 nmol@dATP (Figura 40), se puede observar que la detección es más reproducible con los nanoaptasensores de AuNT1100 que con los de AuNT785. Una de las razones por las que la detección de CEA es reproducible es porque en cada ensayo se ajustaba la concentración de AuNT1100@Apt 0.068 nmol@dATP, ya que era posible la cuantificación al trabajar con el coeficiente de extinción de los AuNTs1100. Además, podría ser que al emplear nanotriángulos más grandes favorezca el cambio de conformación del aptámero e interaccione con el analito. En cambio, con el nanoaptasensor de AuNT785, si bien se repetía el mismo procedimiento, no se ajustó la concentración, sino que se utilizó directamente después de la preparación. Cabe considerar que para ambos nanoaptasensores se usó la misma cantidad de aptámero, pero la interacción entre el aptámero y CEA podría variar al usar nanoestructuras de distinto tamaño.

5.5.2 Detección por SERS y análisis multivariable

La espectroscopía Raman es útil para la detección de compuestos por la identificación de las señales vibracionales. Sin embargo, esta técnica presenta una baja sensibilidad que puede ser superada si se emplea nanoestructuras como los nanotriángulos de oro.⁴⁵ Esta técnica conocida como SERS permite aprovechar las propiedades ópticas de las nanopartículas para mejorar el rango de detección, ya que el aumento del campo electromagnético en los alrededores de las nanoestructuras amplifica las señales obtenidas hasta en 10⁵-10⁸ veces.

Para estos experimentos se utilizaron las condiciones (AuNTs, membranas, running buffer, etc.) que mejores resultados habían dado en los análisis colorimétricos y se probaron concentraciones de CEA: 0, 4.5, 9, 18, 45 y 90 ng/mL. Para el análisis de las membranas, después de haber llevado a cabo el ensayo correspondiente y haber dejado secar la membrana, esta se puso en un microscopio conectado al equipo Raman portátil, utilizando la fuente mencionada anteriormente (tiempo de adquisición 50 s, 5 adquisiciones y 5-10% de potencia del láser). Además, para cada condición se analizaron 3 regiones diferentes de la membrana para aumentar la reproducibilidad. En

la figura 41 se puede observar cómo con todos los tipos de AuNTs analizados permitieron obtener espectros con gran cantidad de señales apreciables. Aunque aún no se ha identificado cada una de las señales para saber si corresponden a los aptámeros, a la proteína o al papel, al intentar relacionar la intensidad de algunas de ellas con la concentración de CEA presente en el ensayo, no se obtuvieron resultados consistentes (Figura 41). Es por ello que se decidió pasar a utilizar análisis multivariante (regresión de mínimos cuadrados parciales o PLS) y así poder utilizar en el análisis todas las señales de los espectros completos.

En la Tabla 11 se muestran las concentraciones equivalentes de CEA de ng/mL a nM.

Tabla 11. Concentraciones de CEA.

CEA (nM)	0	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5
CEA (ng/mL)	0	4.5	9	18	45	90

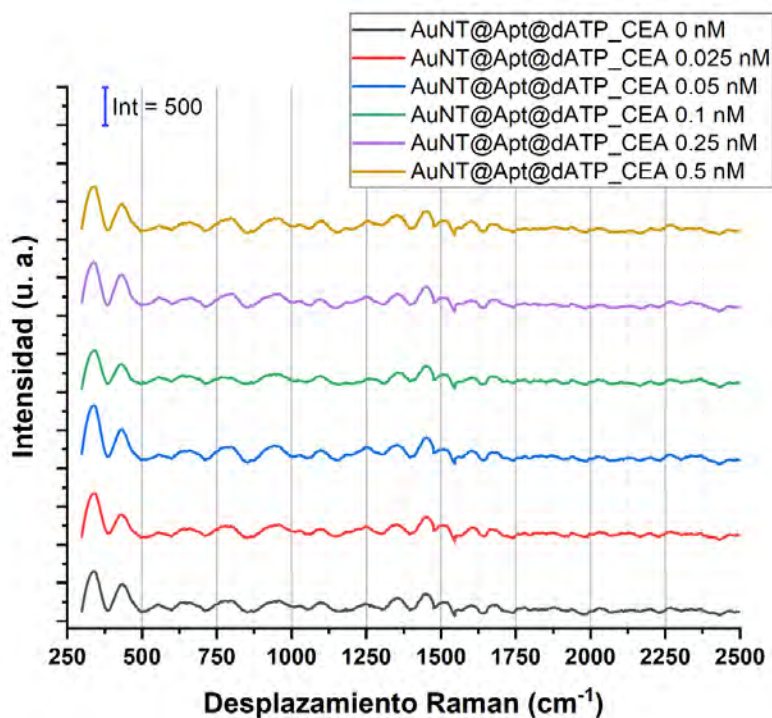


Figura 41. Espectros Raman obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de CEA (0, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.25 y 0.5 nM) utilizando el nanoaptasensor AuNT@Apt 0.068 nmol@dATP. En todos los casos se utilizaron membranas HP120, LC: AptC+Strept 1 mg/mL LT: Strept 1 mg/mL Tratamiento de la almohadilla de conjugado: Tris 0.02 M, Triton X-100 0.25%, NaCl 0.15M y running buffer Tris 20 mM pH: 7.4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM.

Tal y como se ha descrito arriba, al no poder relacionar la intensidad de una única señal con las concentraciones utilizadas de CEA, se pasó a hacer un análisis multivariante utilizando el método de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) en el software SOLO[®]. Al intentar cuantificar, los resultados no fueron los esperados tras el proceso de validación cruzada, y no se pudo establecer una tendencia lineal. Sin embargo, al relacionar la concentración de CEA presente en cada muestra con los scores en la variable latente 1 (Figura 42), sí se pudo ver una muy buena correlación. Esto indica que, si bien por el momento no es posible utilizar el método para cuantificar, sí es posible

distinguir entre la ausencia y presencia de diversas concentraciones del biomarcador de CEA en el rango de ng/mL. En la Figura 43 los valores VIP por encima de 1 representan las señales que más influyen en el modelo generado, lo que se relaciona con las variables que corresponden al desplazamiento Raman de los espectros, y permite explicar cuáles han sido las regiones de los datos tomados que aportaron en el modelo. En la Tabla 12 se muestran los valores de referencia de las variables analizadas por PLS que corresponden a cierto valor de desplazamiento Raman.

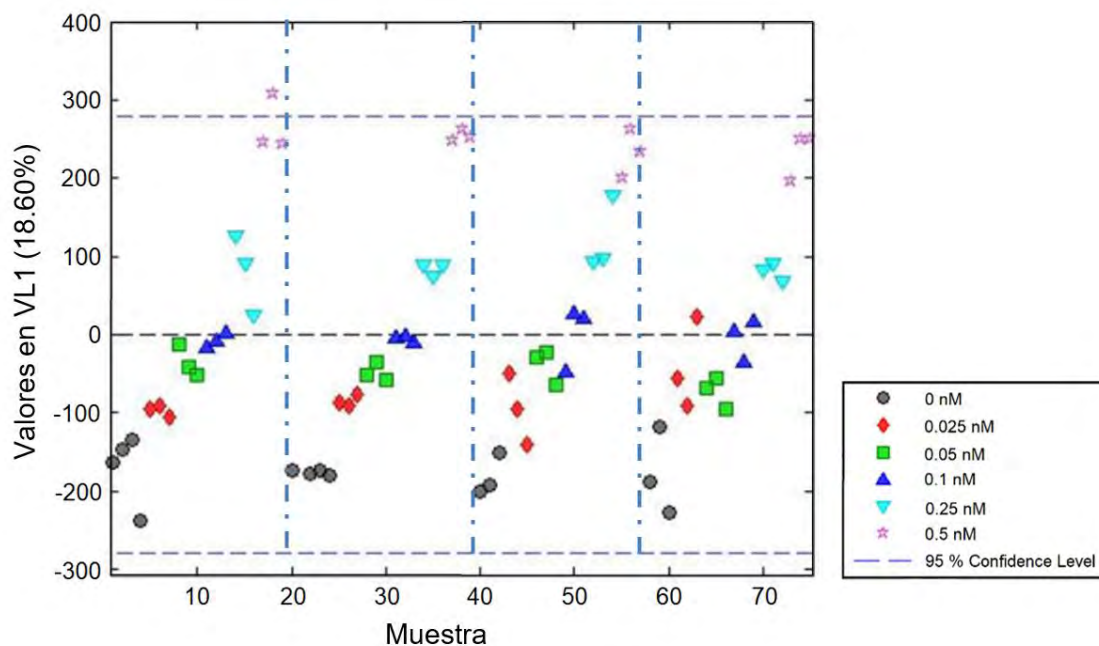


Figura 42. Análisis PLS de los espectros Raman obtenidos utilizando distintos tipos de AuNT@Apt@dATP en presencia de distintas concentraciones de CEA. En todos los casos se utilizaron membranas HP120, LC: AptC+Strept 1 mg/mL. Tratamiento de la almohadilla de conjugado: Tris 0.02 M, Triton X-100 0.25%, NaCl 0.15M y running buffer Tris 20 mM pH: 7.4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM. Para el análisis PLS se utilizó el software SOLO (Eigenvector Research, Inc.) con un preprocesamiento de sustracción de línea base por mínimos cuadrados ponderados (orden 2), suavizado (Savitzky-Golay, 2nd order, 15 pt), y normalizados utilizando la corrección de dispersión multiplicativa (basada en la media) y tratado con ponderación de mínimos cuadrados generalizados (GLSW $\alpha=0.02$).

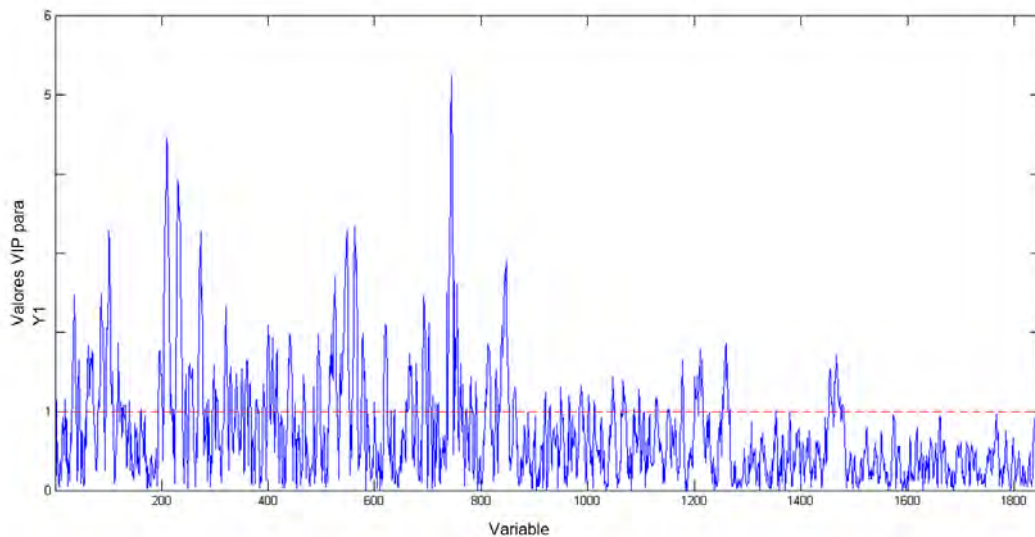


Figura 43. Valores VIP de los espectros Raman de la detección de CEA con el nanoaptasensor AuNT@Apt 0.068 nmol@dATP analizados por PLS.

Tabla 12. Valores de referencia de las variables analizadas por PLS

Variable	1	200	400	600	800	1000
Desplazamiento Raman (cm ⁻¹)	289.04	647.93	982.92	1294.26	1583.85	1853.37

De esta forma se puede ver cómo la técnica SERS combinado con el análisis multivariante permiten discernir concentraciones de hasta 9 ng/mL (0.05 nM) lo cual es ideal para la detección de CEA en casos de cáncer.

6. Conclusiones y perspectivas

Se sintetizaron nanotriángulos de oro con una banda plasmónica ubicada a $\lambda = 785$ nm siguiendo el protocolo del laboratorio. Estos fueron caracterizados por espectroscopía UV-Vis-NIR y TEM, la banda plasmónica se encontraba a $785 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$, y se confirmó la geometría de la nanoestructura con una longitud de 52 ± 16 nm. También se prepararon AuNTs con una banda plasmónica ubicada a $\lambda = 1100$ nm que se utilizaron por la optimización del sistema LFA.

Se estudió la influencia de ciertos parámetros para la funcionalización de las nanoestructuras con el aptámero-horquilla, tales como el pretratamiento térmico y químico, la relación Apt:TCEP, la cantidad de aptámero y la influencia de la concentración de buffer. Estas condiciones mostraron influir en la bioconjugación del aptámero.

Se evaluaron distintos agentes de relleno, como HS-PEG(8)-COOH, HS-PEG(7)-OMe, MPA y dATP. La estabilidad del nanoaptasensor es afectada por la cantidad de agente de relleno utilizado, y del orden en el que se sigue la funcionalización. Además, la utilización del agente de relleno dATP no solo contribuyó a reducir el tiempo de preparación, sino que también ayudó a minimizar la exposición de la biotina en ausencia del biomarcador.

Se encontraron varias consideraciones importantes en la detección de CEA, tanto en solución como en el ensayo LFA, relacionadas con la modificación del nanoaptasensor mediante diferentes agentes de relleno. En primer lugar, al modificar los AuNTs con el aptámero antes de añadir los agentes de relleno, se observaron mejoras significativas al detectar CEA en comparación con el AuNT modificado primero con los agentes de relleno y luego con el aptámero. Además, la reducción de la cantidad de aptámero en la funcionalización mostró mejoras en la interacción con el biomarcador, ya que se pudo mejorar la sensibilidad y trabajar en un rango de concentración más diluidas.

Se encontraron los parámetros óptimos para el diseño del ensayo LFA, el cual es influenciado por el tipo de NC, el pretratamiento de la almohadilla de conjugado, el *running buffer* y el medio de resuspensión del nanoaptasensor. Las condiciones óptimas encontradas permitieron reducir el marcaje de la línea de ensayo en ausencia del biomarcador.

La detección de CEA mediante el método LFA con los nanoaptasensores AuNT@Apt@PEG@MPA y AuNT@Apt@dATP permiten distinguir la presencia de CEA, tanto en el rango de 0 - 10 $\mu\text{g/mL}$ como 0 - 1800 ng/mL , a pesar de que la línea de ensayo se marque en la ausencia del biomarcador.

Se logró la detección de CEA en el rango de ng/mL con el nanoaptasensor de AuNT@Apt@dATP. Además, la detección colorimétrica en LFA de CEA dio resultados prometedores en el rango debajo de 90 ng/mL .

Al aplicar la técnica SERS en LFA, se logró detectar la presencia de CEA un orden de magnitud menos del rango de detección, permitiendo la identificación de concentraciones tan bajas como 9 ng/mL de CEA. El uso completo del conjunto de datos mediante un análisis estadístico permite obtener un modelo más preciso al aprovechar toda la información contenida en los espectros SERS de LFA.

Los estudios posteriores pueden ser la evaluación de selectividad del nanoaptasensor óptimo con distintas proteínas, además del análisis de CEA en una muestra que simule una muestra real.

El nanoaptasensor y el dispositivo LFA optimizados pueden ser empleados potencialmente para detección de CEA con la técnica hipertermia si se trabaja con nanotriángulos más grandes de $\lambda_{\text{max}} = 785 \text{ nm}$.



7. Bibliografía

- (1) World Health Organization. Cancer https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
- (2) World Health Organization. Cancer Today https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&gr.
- (3) Ilbawi, A. M.; Anderson, B. O. Cancer in Global Health: How Do Prevention and Early Detection Strategies Relate? *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7* (278), 1–6.
- (4) Wu, L.; Qu, X. Cancer Biomarker Detection: Recent Achievements and Challenges. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 2963–2997. <https://doi.org/10.1039/C4CS00370E>.
- (5) Ilbawi, A. M.; Anderson, B. O. Cancer in Global Health: How Do Prevention and Early Detection Strategies Relate? *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science March 11, 2015, pp 278cm1-278cm1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008853>.
- (6) Henry, N. L.; Hayes, D. F. Cancer Biomarkers. *Mol. Oncol.* **2012**, *6* (2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>.
- (7) Ye, F.; Zhao, Y.; El-Sayed, R.; Muhammed, M.; Hassan, M. Advances in Nanotechnology for Cancer Biomarkers. *Nano Today* **2018**, *18*, 103–123. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2017.12.008>.
- (8) Cao, Y.; Mo, G.; Feng, J.; He, X.; Tang, L.; Yu, C.; Deng, B. Based on ZnSe Quantum Dots Labeling and Single Particle Mode ICP-MS Coupled with Sandwich Magnetic Immunoassay for the Detection of Carcinoembryonic Antigen in Human Serum. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1028*, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.039>.
- (9) Hammarstrom, S. The Carcinoembryonic Antigen (CEA) Family: Structures, Suggested Functions and Expression in Normal and Malignant Tissues. *Cancer Biol.* **1995**, *9*, 67–81. <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-02073-1>.
- (10) Union for International Cancer Control. New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018 | UICC <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>.
- (11) Gao, Z.; Chen, Z.; Deng, J.; Li, X.; Qu, Y.; Xu, L.; Luo, Y.; Lu, Y.; Liu, T.; Zhao, W.; Lin, B. Measurement of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Serum Samples Using a Centrifugal Microfluidic Device. *Micromachines* **2018**, *9* (9). <https://doi.org/10.3390/mi9090470>.
- (12) Xiang, W.; Lv, Q.; Shi, H.; Xie, B.; Gao, L. Aptamer-Based Biosensor for Detecting Carcinoembryonic Antigen. *Talanta* **2020**, *214*, 120716. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120716>.
- (13) Parolo, C.; Sena-Torralla, A.; Bergua, J. F.; Calucho, E.; Fuentes-Chust, C.; Hu, L.; Rivas, L.; Álvarez-Diduk, R.; Nguyen, E. P.; Cinti, S.; Quesada-González, D.; Merkoçi, A. Tutorial: Design and Fabrication of Nanoparticle-Based Lateral-Flow Immunoassays. *Nat. Protoc.* **2020**, *15* (12), 3788–3816. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0357-x>.
- (14) Yadav, S.; Sadique, M. A.; Ranjan, P.; Kumar, N.; Singhal, A.; Srivastava, A. K.;

- Khan, R. Sers Based Lateral Flow Immunoassay for Point-of-Care Detection of Sars-Cov-2 in Clinical Samples. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4* (4), 2974–2995. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00102>.
- (15) Zhang, L.; Dou, X. W.; Zhang, C.; Logrieco, A. F.; Yang, M. H. A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. *Toxins (Basel)*. **2018**, *10* (2). <https://doi.org/10.3390/toxins10020065>.
- (16) Kim, K.; Kashefi-Kheyraadi, L.; Joung, Y.; Kim, K.; Dang, H.; Chavan, S. G.; Lee, M. H.; Choo, J. Recent Advances in Sensitive Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Lateral Flow Assay Platforms for Point-of-Care Diagnostics of Infectious Diseases. *Sensors Actuators, B Chem.* **2021**, *329* (September), 129214. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129214>.
- (17) Calucho, E.; Parolo, C.; Rivas, L.; Álvarez-Diduk, R.; Merkoçi, A. Nanoparticle-Based Lateral Flow Assays. *Compr. Anal. Chem.* **2020**, *89*, 313–359. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2020.04.011>.
- (18) Hidding, J. A Therapeutic Battle: Antibodies vs. Aptamers. *Nanosci. master Progr.* **2017**, 1–20.
- (19) Byrne, B.; Stack, E.; Gilmartin, N.; O’Kennedy, R. Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins. *Sensors (Switzerland)* **2009**, *9* (6), 4407–4445. <https://doi.org/10.3390/s90604407>.
- (20) Yurushkin, M. V.; Gervich, L. R.; Bachurin, S. S.; Kletskii, M. E. Detection of Nucleotide Sequences Capable of Forming Non-Canonical DNA Structures: Application of Automata Theory. *Comput. Biol. Chem.* **2019**, *80* (April), 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.04.009>.
- (21) Aquino-Jarquín, G.; Toscano-Garibay, J. D. RNA Aptamer Evolution: Two Decades of Selection. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12* (12), 9155–9171. <https://doi.org/10.3390/ijms12129155>.
- (22) Ahmad Raston, N. H.; Nguyen, V. T.; Gu, M. B. A New Lateral Flow Strip Assay (LFSA) Using a Pair of Aptamers for the Detection of Vaspin. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *93*, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.061>.
- (23) Wen, W.; Huang, J. Y.; Bao, T.; Zhou, J.; Xia, H. X.; Zhang, X. H.; Wang, S. F.; Zhao, Y. Di. Increased Electrocatalyzed Performance through Hairpin Oligonucleotide Aptamer-Functionalized Gold Nanorods Labels and Graphene-Streptavidin Nanomatrix: Highly Selective and Sensitive Electrochemical Biosensor of Carcinoembryonic Antigen. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *83*, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.039>.
- (24) Chen, A.; Yang, S. Replacing Antibodies with Aptamers in Lateral Flow Immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *71*, 230–242. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.041>.
- (25) Shirshahi, V.; Tabatabaei, S. N.; Hatamie, S.; Saber, R. Photothermal Enhancement in Sensitivity of Lateral Flow Assays for Detection of E-Coli O157:H7. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2020**, *186*, 110721. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110721>.
- (26) Khlebtsov, B.; Khlebtsov, N. Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Lateral-Flow Immunoassay. *Nanomaterials* **2020**, *10* (11), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nano10112228>.
- (27) Capek, I. *DNA Engineered Noble Metal Nanoparticles: Fundamentals and State-*

- (28) Peiris, S.; McMurtrie, J.; Zhu, H. Y. Metal Nanoparticle Photocatalysts: Emerging Processes for Green Organic Synthesis. *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6* (2), 320–338. <https://doi.org/10.1039/c5cy02048d>.
- (29) Jiang, H. Nanoplasmonic Sensors Based on Periodic Arrays of Gold Nanoparticles, The University of Western Ontario, 2011.
- (30) Hermanson, G. T.; Hermanson, G. T. Chapter 2 – The Chemistry of Reactive Groups. In *Bioconjugate Techniques*; 2008; pp 169–212. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370501-3.00002-3>.
- (31) Borse, V.; Konwar, A.; Jayant, R.; Patil, P. Perspectives of Characterization and Bioconjugation of Gold Nanoparticles and Their Application in Lateral Flow Immunosensing. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, *10*, 878–902. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00771-y>.
- (32) Zhang, Y.; Li, M.; Gao, X.; Chen, Y.; Liu, T. Nanotechnology in Cancer Diagnosis: Progress, Challenges and Opportunities. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0833-3>.
- (33) Ruppert, C.; Phogat, N.; Laufer, S.; Kohl, M.; Deigner, H. P. A Smartphone Readout System for Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Assays: Application to Monitoring of Digoxigenin. *Microchim. Acta* **2019**, *186* (2), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3195-6>.
- (34) Pelaz, B.; Grazu, V.; Ibarra, A.; Magen, C.; Del Pino, P.; De La Fuente, J. M. Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications. *Langmuir* **2012**, *28* (24), 8965–8970. <https://doi.org/10.1021/la204712u>.
- (35) Hernández, Y.; Lagos, L. K.; Galarreta, B. C. Development of a Label-Free-SERS Gold Nanoaptasensor for the Accessible Determination of Ochratoxin A. *Sens. Bio-Sensing Res.* **2020**, *28* (December 2019), 100331. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2020.100331>.
- (36) Ramírez-Jiménez, R.; Artiga, Á.; Mitchell, S. G.; Martín-Rapún, R.; de la Fuente, J. M. Surfactant-Free Synthesis and Scalable Purification of Triangular Gold Nanoprisms with Low Non-Specific Cellular Uptake. *Nanomaterials* **2020**, *10* (3), 1–10. <https://doi.org/10.3390/nano10030539>.
- (37) Veliz, L.; Licuona, M.; Cordova, S.; Hernández, Y.; Galarreta, B. C. Development of an LSPR Nanoaptasensor for AFB1 Screening in Amaranth Extract Solutions. *Opt. InfoBase Conf. Pap.* **2020**, *Part F186-*, 4–5. <https://doi.org/10.1364/noma.2020.notu1c.4>.
- (38) Wang, X.; Choi, N.; Cheng, Z.; Ko, J.; Chen, L.; Choo, J. Simultaneous Detection of Dual Nucleic Acids Using a SERS-Based Lateral Flow Assay Biosensor. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (2), 1163–1169. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03536>.
- (39) Shu, H.; Wen, W.; Xiong, H.; Zhang, X.; Wang, S. Novel Electrochemical Aptamer Biosensor Based on Gold Nanoparticles Signal Amplification for the Detection of Carcinoembryonic Antigen. *Electrochem. commun.* **2013**, *37*, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.09.018>.
- (40) He, Y.; Zeng, K.; Gurung, A. S.; Baloda, M.; Xu, H.; Zhang, X.; Liu, G. Visual Detection of Single-Nucleotide Polymorphism with Hairpin Oligonucleotide-Functionalized Gold Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (17), 7169–7177.

<https://doi.org/10.1021/ac101275s>.

- (41) Zhao, W.; Lin, L.; Hsing, I. M. Rapid Synthesis of DNA-Functionalized Gold Nanoparticles in Salt Solution Using Mononucleotide-Mediated Conjugation. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (6), 1218–1222. <https://doi.org/10.1021/bc900080p>.
- (42) Huang, Y.; Wen, W.; Du, D.; Zhang, X.; Wang, S.; Lin, Y. A Universal Lateral Flow Biosensor for Proteins and DNAs Based on the Conformational Change of Hairpin Oligonucleotide and Its Use for Logic Gate Operations. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 598–604. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.007>.
- (43) Gurung, A. S. Visual Detection Of Cancer Biomarkers With Aptamer Functionalized-Gold Nanoparticles, North Dakota State University, 2014. <https://doi.org/10.4324/9781315721606-101>.
- (44) Mao, X.; Ma, Y.; Zhang, A.; Zhang, L.; Zeng, L.; Liu, G. Disposable Nucleic Acid Biosensors Based on Gold Nanoparticle Probes and Lateral Flow Strip. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (4), 1660–1668. <https://doi.org/10.1021/ac8024653>.
- (45) Amendola, V.; Pilot, R.; Frascioni, M.; Maragò, O. M.; Iati, M. A. Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles: A Review. *J. Phys. Condens. Matter* **2017**, *29* (20). <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.

