



www.neurobiomarcadores.com

MÓDULO 6

Biomarcadores en investigación básica y la tecnología de 'single molecule array' (SIMOA)

Lección 3

La tecnología de *single molecule array* (SIMOA): una nueva ventana en la exploración de las enfermedades neurodegenerativas

Dra. Raffaella Cipriani

Laboratory of Neurobiology, Achucarro Basque Center for Neuroscience, Leioa, Bizkaia

1. Introducción: biomarcadores y relevancia en la clínica

Un marcador biológico (**biomarcador**) es definido como “una característica definida que se mide como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas a una exposición o intervención”, incluidas las intervenciones terapéuticas ^{(1) (2)}. Los biomarcadores se pueden encontrar en la sangre, otros fluidos corporales, órganos y tejidos, y proporcionan una indicación del estado biológico de un organismo.

En función de su naturaleza, se distinguen **biomarcadores fisiológicos** (por ejemplo, la presión arterial y la temperatura corporal), **biomarcadores de imagen** (por ejemplo, la resonancia magnética con contraste para detectar tumores, los rayos X para detectar fracturas óseas, la angiografía) y **biomarcadores moleculares** (por ejemplo, el nivel de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad – LDL–, el recuento de glóbulos rojos, las enzimas hepáticas y el antígeno prostático específico –PSA–) (**Figura 1**) ⁽³⁾.

Los biomarcadores también se pueden clasificar por lo que miden y por sus posibles aplicaciones. Por ejemplo, un biomarcador puede confirmar un diagnóstico, dar informaciones sobre la probabilidad de desarrollar una enfermedad, su progresión y la respuesta a un tratamiento; también se distinguen biomarcadores de pronóstico y predictivos (**Figura 1**) ^{(1) (2)}.

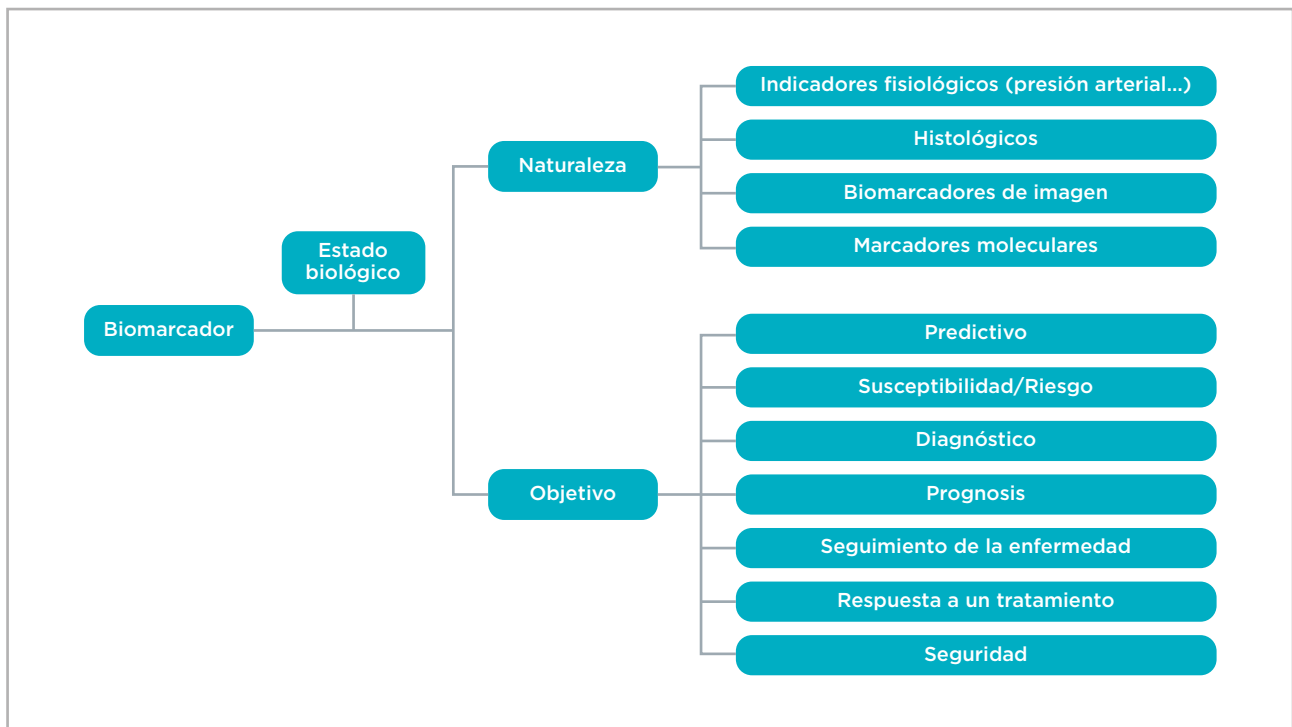


Figura 1. Clasificación de los biomarcadores. Los biomarcadores dan informaciones sobre el estado biológico de un organismo y se pueden clasificar en función de su naturaleza y sus posibles aplicaciones y objetivos en la clínica.

Los biomarcadores de naturaleza proteica representan una herramienta muy útil en la investigación, como también en la clínica y en el desarrollo de fármacos más efectivos. Los niveles endógenos de un biomarcador pueden dar información sobre el estadio de una enfermedad o su respuesta a un tratamiento, así como también sobre la susceptibilidad de sujetos sanos al desarrollo de determinadas condiciones patológicas. Sin embargo, la concentración de un biomarcador puede variar notablemente entre las fases presintomática, del comienzo de la enfermedad, sintomática o avanzada (**Figura 2A**). Además, independientemente del estadio de la enfermedad, los niveles de biomarcadores bajan notablemente en muestras más alejadas del foco de la enfermedad, aunque tienen la ventaja de poderse obtener con más facilidad y de forma menos invasiva (por ejemplo, muestra de sangre vs. biopsia de tejido) (**Figura 2A**). Eso implica que biomarcadores proteicos relevantes desde un punto de vista médico pueden encontrarse en concentraciones extremadamente bajas, por ejemplo, en sujetos sanos o en fases precoces de una patología, o en muestras biológicas poco invasivas. Por lo tanto, para su detección, hace falta disponer de técnicas con una sensibilidad muy elevada.

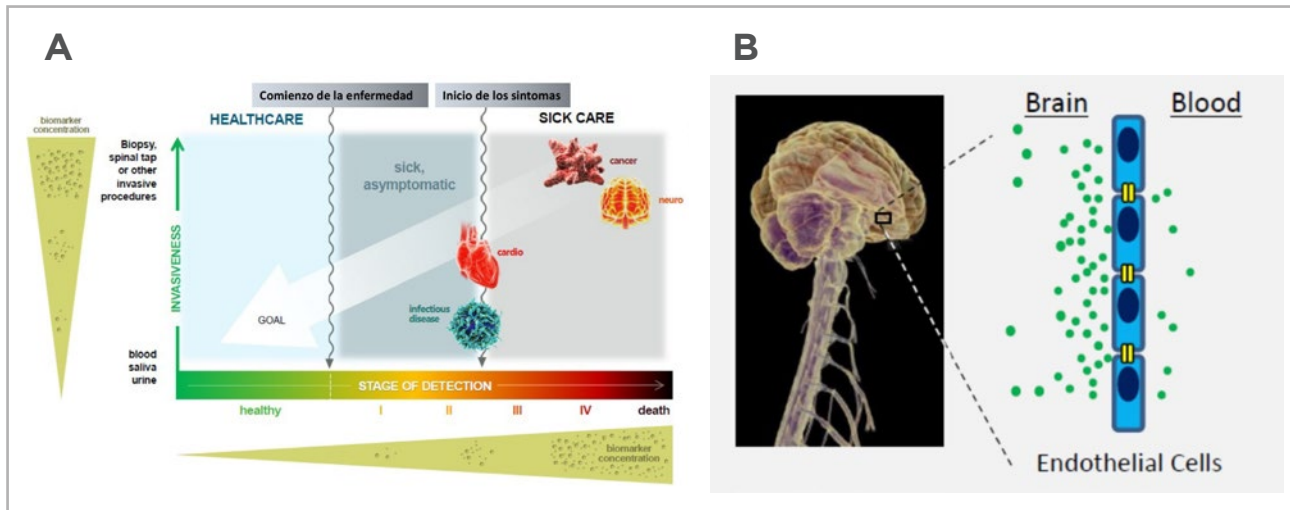


Figura 2. Relevancia de los biomarcadores. A: una de las dianas de la medicina preventiva es poder detectar biomarcadores de enfermedad de forma temprana y en fluidos biológicos de fácil accesibilidad y no invasivos; para eso, hay que disponer de técnicas avanzadas de detección (adaptada de Quanterix); B: los biomarcadores de enfermedades neurológicas se pueden encontrar en concentraciones elevadas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y de allí pueden pasar a la sangre, donde mantienen niveles de concentración mucho más bajos. Inmunoensayos ultrasensibles pueden detectar estas moléculas indicadoras de neurodegeneración no solo en el LCR sino también en la sangre.

Los inmunoensayos, basados en la interacción antígeno-anticuerpo, siguen siendo la tecnología más específica para detectar biomarcadores de naturaleza proteica. Sin embargo, los inmunoensayos convencionales como el ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima), la quimioluminiscencia o la electroquimioluminiscencia (ECL) limitan los niveles de detección al orden del nano- o picomolar, no permitiendo la medición de una gran cantidad de proteínas secretadas que se encuentran por debajo de este umbral. Al contrario, un inmunoensayo de nueva generación, la tecnología SIMOA (*single molecule array*), recientemente desarrollada por la empresa Quanterix (Billerica, MA, USA), ha permitido alcanzar niveles de detección ultrasensible de femtomolar, abriendo nuevos escenarios en el estudio de los biomarcadores de naturaleza proteica.

El campo de las enfermedades neurodegenerativas, en particular, se está beneficiando del desarrollo de esta tecnología. Los biomarcadores que se originan en el sistema nervioso central (SNC) y que reflejan los procesos patológicos responsables de las enfermedades neurodegenerativas se pueden encontrar en concentración elevada en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en concentración

mucho más baja en la sangre (**Figura 2B**). Disponer de técnicas de detección ultrasensible como el SIMOA permite trasladar el estudio de biomarcadores de neurodegeneración desde las muestras de LCR a muestras de sangre, más fácil de obtener.

A continuación, se va a describir cómo la tecnología SIMOA alcanza esta ultrasensibilidad, en comparación con otros inmunoensayos convencionales.

1.1. Inmunoensayos convencionales y limitaciones

El ELISA o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima es el método clásico comúnmente usado para la detección de proteínas y se basa en la interacción antígeno-anticuerpo. Brevemente, un anticuerpo de captura que se inmoviliza en un sustrato sólido se une a una proteína de interés presente en las muestras analizadas. Varios tipos de muestras pueden ser analizadas, incluidos plasma, suero, células y tejidos, medios acondicionados u orina.

Existen diferentes formatos de ELISA, de los cuales el más común es el ELISA de tipo sándwich, que utiliza 2 anticuerpos, uno de captura, inmovilizado en una superficie (por ejemplo, la superficie plástica de un pocillo de placa de 96 pocillos), y uno de detección marcado, para detectar una proteína *target* (**Figura 3A**). El anticuerpo de detección es marcado con una enzima (peroxidasa de rábano picante -HRP-) a través de la unión biotina-avidina. La enzima HRP produce, en presencia de un sustrato, una señal medible, colorimétrica o fluorescente. En el caso de la señal colorimétrica, la HRP reduce un sustrato cromogénico, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), a su forma azul y oxidada. El cambio de color es proporcional a la cantidad de HRP y, por lo tanto, a la cantidad de proteína diana en la muestra. La reacción colorimétrica se detiene añadiendo ácido sulfúrico y el color cambia de azul a amarillo. La absorbancia se mide a 450 nm utilizando un lector de microplacas.

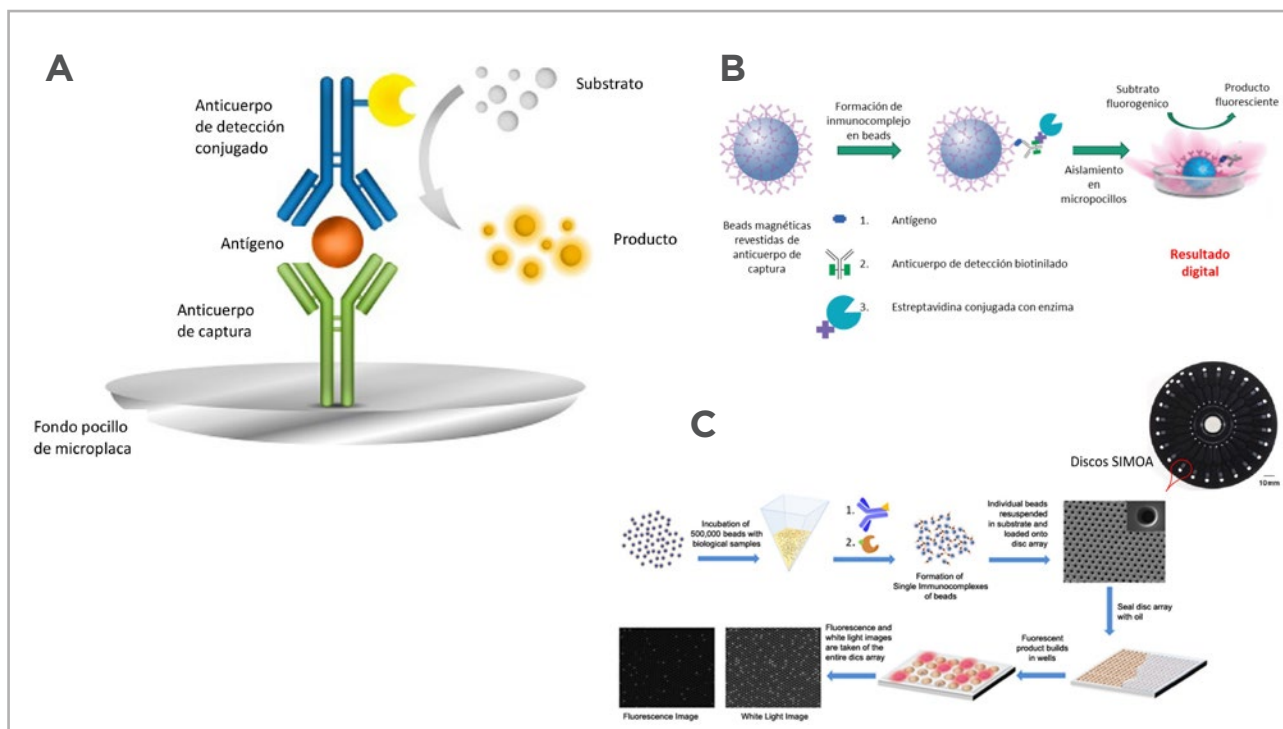


Figura 3. Resumen gráfico de la técnica SIMOA. A: ELISA de tipo sándwich clásico; B: formación del inmunocomplejo y su compartimentalización con la técnica SIMOA; C: resumen del flujo de trabajo de un ensayo SIMOA; el inserto muestra un disco SIMOA, con los 24 arrays; 1: anticuerpo de detección; 2: enzima conjugada con estreptoavidina.

Este formato de tipo sándwich es muy específico y la concentración del analito se puede determinar con una curva estándar, mediante la utilización de concentraciones conocidas de antígeno. La sensibilidad de un ELISA estándar depende de la sensibilidad de los anticuerpos utilizados y generalmente se queda en el rango de pg/mL.

Si la enzima acoplada al anticuerpo de detección cataliza una reacción quimioluminiscente, con emisión de fotones y producción de luz, se habla de CLIA (*chemiluminescent immunoassay*). Generalmente, los ensayos CLIA tienen una sensibilidad más alta que los ELISA estándar. Una variante aún más sensible es el ECL (*electrochemiluminescent*), donde el anticuerpo de detección está conjugado, en vez de con una enzima, con una molécula que produce directamente luz durante una reacción electroquímica. El uso de una señal eléctrica en lugar de óptica (como en el ELISA) confiere a la ECL una mayor sensibilidad, aunque no baja del rango de pg/mL ⁽⁴⁾.

Como se ha especificado previamente, la señal producida enzimáticamente o electroquímicamente es directamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra, sin llegar a medir niveles de molécula única y devolviendo una señal de tipo analógico. La sensibilidad analítica resulta limitada por la misma técnica, porque la señal, independientemente de su naturaleza, difunde y se diluye en un volumen grande (generalmente 100 μL), y hacen falta millones de moléculas para superar el fondo y llegar al límite de detección.

Además de ser un inmunoensayo analógico, el ELISA y sus variantes no se han integrado en un sistema automatizado que pueda reducir la variabilidad y aumentar la eficiencia, reduciendo el tiempo de trabajo. Al contrario, el flujo de trabajo para un inmunoensayo convencional implica varias intervenciones por parte del usuario, como en la preparación de las muestras, en las incubaciones con los anticuerpos o los lavados.

1.2. Tecnología SIMOA: principios y procedimiento

Recientemente, se ha introducido un método digital de ELISA basado en matrices (*arrays*) de una sola molécula (*single molecule array* -SIMOA-) (5), que permite la detección de hasta una única molécula proteica en inmunocomplejos marcados con una única enzima. Esta técnica ha permitido aumentar considerablemente la sensibilidad del inmunoensayo hasta concentraciones de subfemtomolar, resultando en una sensibilidad analítica 100-1.000 veces mayor que un ELISA convencional y permitiendo la detección de biomarcadores de interés sea a niveles normales, en sujetos sanos o presintomáticos, o a niveles agudos, en diferentes tipos de muestras, especialmente en sangre.

Un ensayo SIMOA sigue siendo, en efecto, un ensayo ELISA sándwich clásico, ya que se basa en la formación de inmunocomplejos entre anticuerpo de captura (*capture antibody*), antígeno, anticuerpo de detección (*detection antibody*) conjugado con biotina y estreptoavidina marcada con enzima (**β -galactosidasa**) (Figura 3B).

Un ensayo SIMOA se puede dividir en 2 partes principales: una primera fase de captura y marcado del analito *target* (un ELISA estándar), seguida del aislamiento de cada inmunocomplejo para la cuantificación del analito (digitalización); y una segunda parte de conteo de moléculas y procesamiento de los datos digitales.

En la primera fase del ensayo, el anticuerpo de captura y el de detección reconocen el analito target presente en la muestra biológica uniéndose a epítomos diferentes, mientras que la estreptoavidina, debido a su elevada afinidad por la biotina, une a esta última la enzima β -galactosidasa responsable de catalizar la reacción que produce la señal, en este caso fluorescente, en presencia de un sustrato fluorogénico (**resorufina β -D-galactopiranósido**). A diferencia de un ELISA clásico, en un ensayo SIMOA el anticuerpo de captura está conjugado a microesferas (beads) magnéticas microscópicas (2,7 μm de diámetro) en vez de estar pegado en el fondo de los pocillos de una placa (**Figura 3B**). Los inmunocomplejos así formados, constituidos por *bead*-anticuerpo de captura-analito *target*-anticuerpo de detección marcado con enzima vienen, por tanto, aislados, en presencia del sustrato fluorogénico, en micropocillos cuya dimensión del orden de femtolitros permite a una sola *bead* alojarse (**Figuras 3B y 3C**). Los micropocillos están organizados en discos SIMOA de 24 *arrays* y cada *array* contiene unos 216.000 micropocillos (**Figura 3C**). Cada *array* de micropocillos es utilizado por una sola muestra; eso significa que cada disco SIMOA vale para el análisis simultáneo de 24 muestras.

Después de que los inmunocomplejos se han cargado en los *arrays*, cada uno en su micropocillo en presencia del sustrato, sigue un proceso de sellado con aceite para eliminar factores confundentes como polvo, detritos, exceso de *beads* y para limitar al máximo la difusión del producto fluorescente. En cada micropocillo va a ocurrir la reacción de detección catalizada por la enzima estreptoavidina- β -galactosidasa, conjugado por medio de la unión biotina-estreptoavidina al anticuerpo de detección. Se genera así un producto fluorescente (**resorufina**) en un volumen muy pequeño (50 fL) (**Figura 3C**). Sigue un proceso de *imaging* y cuantificación del analito (véase más adelante).

La compartimentalización de la reacción, junto a la escasa difusión de la fluorescencia debido al sellado de cada pocillo con aceite, permite la detección de hasta una sola molécula de biomarcador de interés, ya que localmente la concentración de producto fluorescente asociado hasta a un solo inmunocomplejo resulta muy elevada y por lo tanto medible. En un inmunoensayo convencional, al contrario, la reacción enzima-sustrato se produce en un volumen mucho mayor, entre 50 y 100 μL , diluyendo la señal del producto fluorescente. La difusión y la dilución de la señal limita, por lo tanto, la sensibilidad de los inmunoensayos convencionales en el rango de picomolar, como se ha explicado en el párrafo anterior.

La imagen de cada *array* es adquirida por un sistema de imagen que incluye un microscopio y una cámara: el sistema permite la adquisición de imágenes en campo claro y de fluorescencia (574 nm excitación-620 nm emisión) de cada *array*. La imagen en campo claro se usa para detectar la presencia de beads. La imagen de fluorescencia indica la actividad enzimática en cada micropocillo e, indirectamente, la presencia del analito *target*.

La señal fluorescente viene captada por una cámara que abarca el *array* completo: cada micropocillo con señal (activo) o sin señal (inactivo) se cuenta como *ON* u *OFF*, respectivamente, y constituye una señal digital correspondiente a la presencia o ausencia de al menos una molécula de enzima. El “digital” atribuido a la técnica deriva de esta forma de análisis, posible gracias a la compartimentalización de cada inmunocomplejo. A través del análisis computarizado de las imágenes adquiridas, se determina la fracción de beads asociada con enzimas (*fraction ON* -fON-) y la intensidad de la fluorescencia por cada pocillo, y se calcula el promedio de enzimas por cada *bead* (*average enzyme per bead* -AEB-), que representa la unidad fundamental para el cálculo de la concentración de analito *target* con la técnica SIMOA. Usando una curva de calibrado con concentraciones conocidas del analito *target*, desde los AEB se calcula la concentración de analito en cada muestra.

Una ulterior ventaja de la tecnología SIMOA es su doble enfoque, digital y analógico, dependiendo de la concentración de analito *target* en la muestra analizada (**Figura 4A**). A bajas concentraciones de analito, cada *bead* estará estadísticamente asociada con una sola enzima o ninguna, y, para calcular los AEB, las imágenes serán analizadas de forma digital, contando los micropocillos activos/*ON*. A concentraciones más altas, cuando cada *bead* tiene asociado por lo menos una enzima o más, los AEB se calculan de forma analógica, mediante la medición de la intensidad de fluorescencia media de las beads activas y conociendo la intensidad de fluorescencia media generada por una sola enzima.

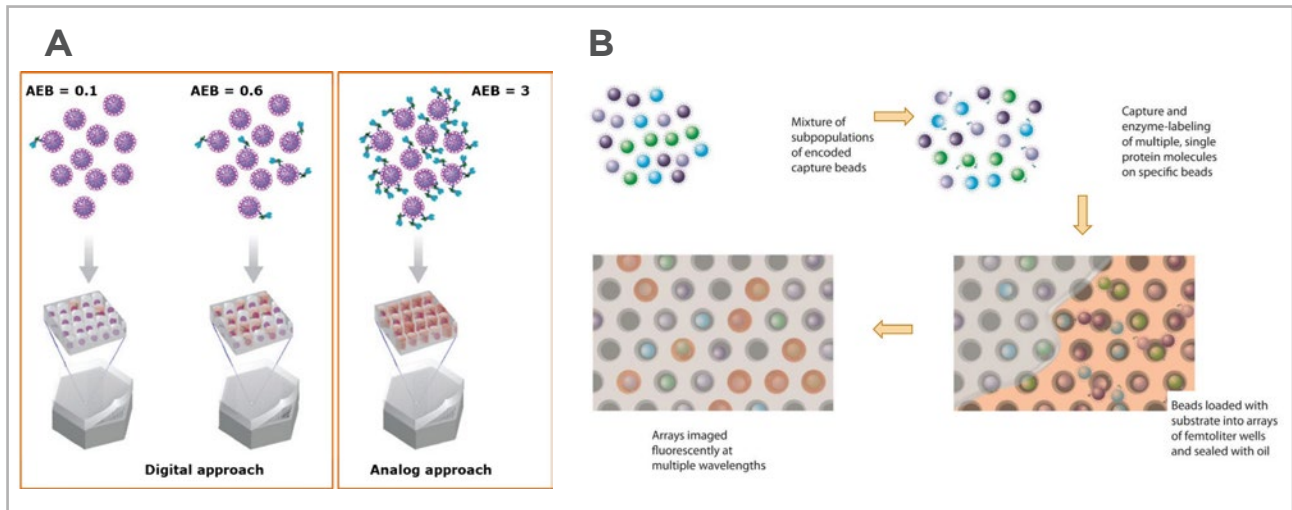


Figura 4. A: doble enfoque, digital y analógico, de la tecnología SIMOA. A bajas concentraciones del analito target, cuando cada microesfera está estadísticamente asociada con una enzima o ninguna, el número de pocillos activos es directamente proporcional al número de moléculas presentes en la muestra inicial y la cuantificación es digital. A concentraciones elevadas de analito, cuando cada microesfera tiene al menos una enzima o más, la cuantificación es analógica y tiene en cuenta la intensidad media de la fluorescencia de las microesferas activas y la fluorescencia generada por una única enzima (adaptada de Rissin *et al.*, 2011); B: capacidad de *multiplexing* de la tecnología SIMOA. Usando diferentes subpoblaciones de microesferas para diferentes analitos target, la tecnología SIMOA permite el análisis de hasta 6 biomarcadores a la vez en la misma muestra (adaptada de Rissin *et al.*, 2013).

Este doble enfoque combina la ultrasensibilidad de la técnica con un amplio rango analítico y permite la detección de biomarcadores en un amplio rango de concentraciones, clínicamente relevante ⁽⁶⁾.

Cabe destacar que se han desarrollado ensayos SIMOA *multiplexing*, que permiten medir en la misma muestra hasta 6 diferentes analitos a la vez, con el consecuente ahorro de volumen de muestra y tiempo de análisis, sin comprometer la sensibilidad del ensayo. La posibilidad de detectar diferentes biomarcadores a la vez se obtiene utilizando una combinación de *beads* codificadas con diferentes propiedades de fluorescencia e intensidad para cada analito de interés (**Figura 4B**). En la fase de *imaging*, las diferentes subpoblaciones de *beads* vienen identificadas por sus propiedades intrínsecas. Una vez identificada cada subpoblación, la señal de la resorufina debida a cada inmunocomplejo sigue igual, exactamente como para los ensayos para un solo biomarcador (*singleplex*), y se utiliza para la cuantificación de cada analito (como se ha descrito arriba).

La tecnología SIMOA ha sido desarrollada y comercializada por la empresa estadounidense **Quanterix**, en 2 tipologías de plataformas, como se describe a continuación. Actualmente, su relevancia científico-clínica y traslacional se refleja en su amplia utilización para aplicaciones de investigación en varias áreas terapéuticas, que incluyen oncología, neurología, cardiología, inflamación y enfermedades infecciosas.

1.2.1. Plataformas disponibles

La tecnología SIMOA basada en microesferas está disponible en 2 formatos: integrada en un instrumento completamente automatizado, el HD-X, o en un instrumento semiautomático de dimensiones menores y de sobremesa, el SR-X. El principio básico, la separación de cada inmunocomplejo en un único pocillo de un volumen de femtolitros, es el mismo en ambas plataformas, como también es el mismo el flujo de trabajo. Por lo tanto, las diferencias entre las 2 plataformas están principalmente en la cantidad de trabajo manual que hace falta para obtener los resultados y en las dimensiones.

1.2.2. HD-X

El primer analizador SIMOA disponible en el mercado, comercializado por la empresa Quanterix, fue el analizador HD-1 (7). El analizador HD-X (**Figura 5A**) es el modelo más avanzado y mantiene el mismo flujo de trabajo del modelo anterior, mejorando la productividad y la flexibilidad para el usuario, e incorporando un sistema de control interno de temperatura.

El analizador HD-X constituye una plataforma completamente automatizada de inmunoensayos basados en microesferas SIMOA, que une la ultrasensibilidad en la detección de proteínas con la completa automatización: el equipo se encarga de realizar todos los pasos del ensayo, reduciendo al mínimo la intervención por parte del usuario, con la consecuente minimización de la variabilidad y el aumento de reproducibilidad y el rendimiento. Una vez que los reactivos se cargan en el instrumento, se tarda aproximadamente 3 horas en obtener los datos. El equipo también permite el análisis simultáneo de hasta 6 biomarcadores a la vez.

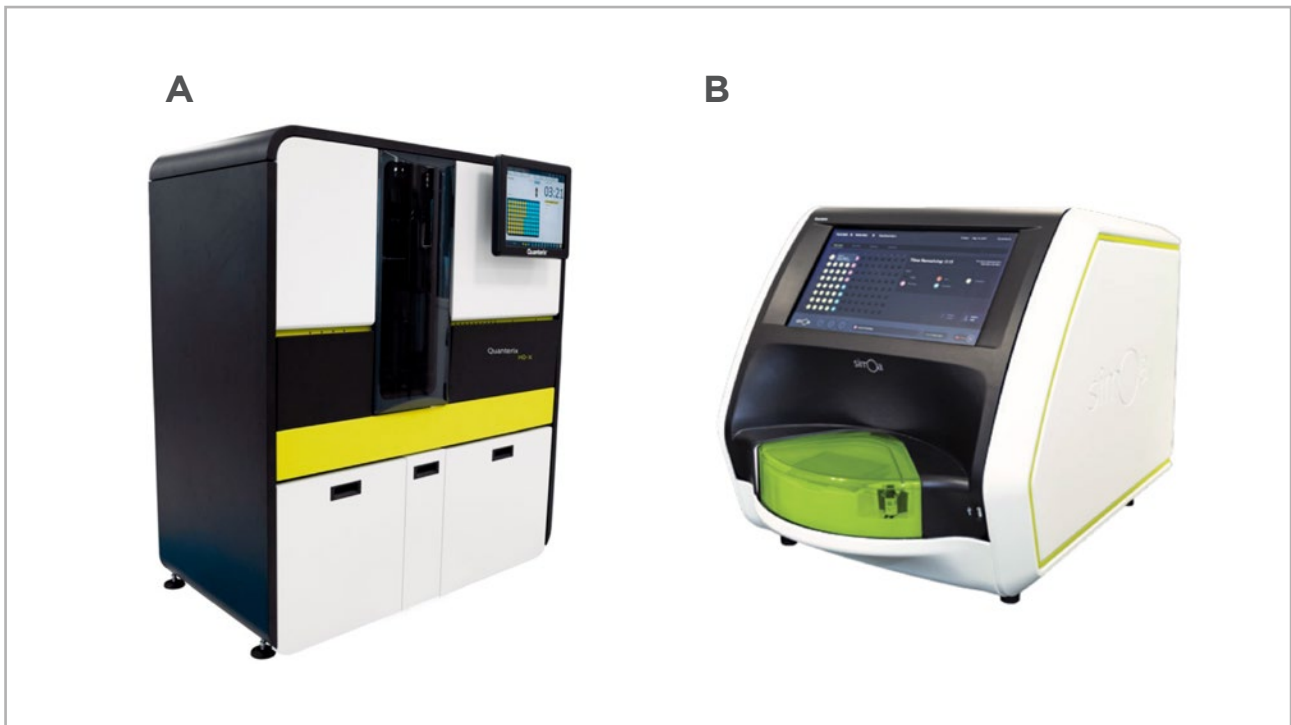


Figura 5. A: analizador SIMOA HD-X. El equipo SIMOA HD-X es un instrumento completamente automatizado, que lleva a cabo todas las fases del ensayo; B: analizador SIMOA SR-X. Se trata de un instrumento más compacto, de sobremesa, semiautomático, que requiere intervención por parte del usuario.

Un analizador SIMOA HD-X se compone de 5 módulos principales ⁽⁷⁾:

1. Módulo de entrada para reactivos, fungible (pipetas, cubetas, discos), y muestras.
2. Módulo para *buffers* y desechos.
3. Interfaz de control para el usuario, con pantalla táctil y ordenador integrados, para el control del instrumento, de los ensayos y de los resultados.
4. Módulo de química, que es un robot de procesamiento secuencial para el ensayo ELISA basado en microesferas descrito en el parágrafo anterior (**Figura 3C**): 2 pipeteadores robóticos se encargan de todas las operaciones de incubación de la muestra con microesferas, anticuerpos y enzimas, y de los lavados.



5. Módulo SIMOA *load-seal-image* (LSI), donde se cargan los discos SIMOA con los inmunocomplejos y el sustrato, y se sacan las imágenes de cada *array* a través de un sistema óptico basado en fluorescencia, que incluye un módulo de iluminación y un microscopio con lentes objetivo y rueda de filtro. Las imágenes, capturadas por una cámara, vienen analizadas a través de un *software* y la señal fluorescente se transforma en concentración por medio de una curva de calibrado.

1.2.3. SR-X

El equipo SR-X (**Figura 5B**) es un instrumento más compacto, de sobremesa, que une las capacidades de detección de proteínas a nivel ultrasensible con la versatilidad de dimensiones y de flujo de trabajo. La preparación de la muestra, como también los pasos de incubación con los reactivos y las fases de lavados son manuales, mientras que el equipo se encarga de cargar las muestras en los *arrays*, de la detección de la señal en los discos SIMOA y de devolver los resultados de concentración. Como en el caso del equipo HD-X, el SR-X permite la detección en *multiplex* de hasta 6 biomarcadores a la vez usando un volumen bajo de muestra.

2. Aplicaciones de la tecnología SIMOA

2.1. Campos de aplicación y ensayos disponibles

Desde su desarrollo, la tecnología SIMOA ha tenido una implementación progresivamente mayor, tanto en la investigación como en la clínica.

La casa comercial Quanterix dispone de un centenar de ensayos listos para usar, con aplicación potencial en el estudio de una variedad de condiciones patológicas.

También, ofrece la posibilidad de desarrollar ensayos a medida, ampliando ulteriormente el campo de aplicación de la técnica.

La tecnología SIMOA ha encontrado amplio uso en el ámbito oncológico, inmunológico, en enfermedades infecciosas y del sistema nervioso. En oncología, por ejemplo, el estudio de biomarcadores oncológicos en sangre tiene el potencial de monitorizar el riesgo de cáncer, identificar tumores en etapas muy tempranas, discriminar entre células benignas y malignas, o predecir y monitorizar la evolución o la respuesta al tratamiento. Algunos biomarcadores medidos con SIMOA relevantes en el ámbito oncológico son, entre otros: PSA, que se puede utilizar como un indicador de la enfermedad de la próstata; CA125 (antígeno del cáncer 125), asociado con el cáncer ovárico; o VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), cuyos niveles elevados pueden relacionarse con el crecimiento tumoral y la metástasis.

Un amplio panel de ensayos SIMOA para citocinas y quimiocinas, así como para moléculas inflamatorias y antiinflamatorias (por ejemplo, IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-8, TNF- α , IL-17A), tienen aplicación en el campo de las enfermedades infecciosas, en inflamación e inmunología, permitiendo la cuantificación de estas moléculas en suero y plasma. Recientemente, el analizador HD-X ha sido utilizado para medir los niveles y perfiles de citocinas en pacientes con COVID-19, tanto asintomáticos como sintomáticos.

2.2. SIMOA y enfermedades neurodegenerativas

Los biomarcadores proteicos de las enfermedades del sistema nervioso pueden representar un producto de la enfermedad o un reflejo del daño causado a nivel central, y permiten cuantificar los procesos patológicos de las neuronas, los astrocitos y la inflamación.

Estas moléculas, presentes en discreta concentración en el tejido cerebral, pueden pasar al LCR y, de aquí, a la sangre. Las muestras de LCR son difíciles de obtener, debido a que la punción lumbar es un procedimiento invasivo; al contrario, la sangre es una fuente no invasiva de biomarcadores, pero las proteínas neurológicas suelen ser menos abundantes en este tipo de muestra. Inmunoensayos ultrasensibles como el SIMOA miden biomarcadores sanguíneos previamente indetectables, lo que permite a los investigadores apreciar cambios de concentración pequeños pero importantes. La posibilidad de detectar con una simple analítica de sangre biomarcadores de enfermedades neurológicas es especialmente relevante a nivel clínico, ya que puede revolucionar la modalidad de monitorización de los pacientes neurológicos y el efecto terapéutico en *trials* clínicos, y asistir en la formulación de diagnósticos precoces y pronósticos más precisos ⁽⁸⁾ ⁽⁹⁾. Por lo tanto, los biomarcadores sanguíneos pueden ayudar por un lado en los estudios preclínicos y la investigación básica, y por el otro ser una herramienta fundamental en la clínica.

La **Figura 6** muestra un resumen de los principales biomarcadores para algunas de las enfermedades neurológicas más conocidas ⁽⁹⁾. Después del daño axonal, se libera una variedad de proteínas neuronales en los espacios intersticiales y se difunden al LCR y la sangre. Los marcadores más estudiados de daño axonal están representados por neurofilamentos, como el neurofilamento de cadena ligera (NfL) y las proteínas tau.

Biomarcadores más específicos de *pathways* patofisiológicos están representados, por ejemplo, por formas fosforiladas de la proteína tau e isoformas del péptido β amiloide en el caso de la enfermedad de Alzheimer, o especies de α -sinucleína en el caso de sinucleinopatías ⁽⁸⁾ ⁽⁹⁾.

Los niveles de estos biomarcadores proteicos se pueden ahora medir en sangre gracias a la ultrasensibilidad proporcionada por los ensayos SIMOA.

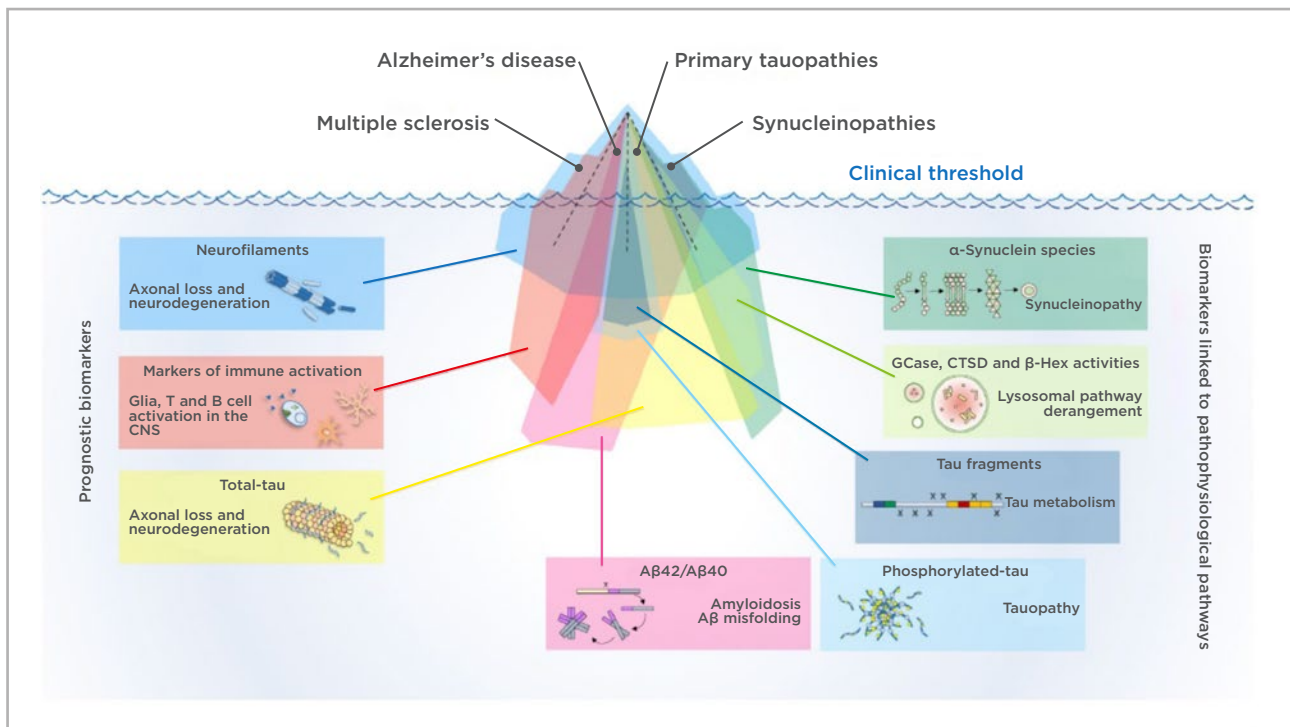


Figura 6. Resumen gráfico de los principales biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas. Adaptada de Gaetani *et al.*, 2020.

2.2.1. El paradigma del neurofilamento de cadena ligera

El NfL es un componente del citoesqueleto de las neuronas. La ruptura de la membrana axonal como consecuencia de un daño o patología libera NfL en el líquido intersticial y finalmente en el LCR y la sangre. Por lo tanto, NfL es un importante biomarcador de daño neuroaxonal, potencialmente útil para monitorizar la progresión de una enfermedad y para evaluar la eficacia y/o la toxicidad de futuras estrategias de tratamientos neuroprotectores. Los niveles de NfL en el LCR en varias condiciones patológicas han sido medidos usando inmunoensayos convencionales; sin embargo, una cuantificación fiable de este biomarcador en sangre ha sido compleja hasta el desarrollo de inmunoensayos ultrasensibles como la tecnología SIMOA. Usando esta técnica, se han medido los niveles de NfL en suero en muestras de controles y enfermos con una sensibilidad analítica y una reproducibilidad mucho mayores respecto a otras técnicas, y se ha demostrado una fuerte correlación entre los niveles de esta molécula en LCR y suero ⁽⁴⁾. Estos resultados prometedores con la tecnología SIMOA han impulsado estudios de los

niveles de NfL en sangre en cohortes de pacientes longitudinales grandes y bien caracterizadas, en varias patologías del sistema nervioso, incluyendo, entre otras, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, y con el propósito de aclarar si el NfL en sangre se puede usar a nivel clínico como indicador de la gravedad de la enfermedad y para determinar el pronóstico.

Un importante estudio realizado con el analizador SIMOA en 2 amplias e independientes cohortes de 13 diferentes enfermedades neurodegenerativas ha demostrado que el NfL en plasma aumenta en los principales trastornos neurodegenerativos; sin embargo, el NfL en plasma es clínicamente útil para identificar trastornos parkinsonianos atípicos en pacientes con parkinsonismo, demencia en personas con síndrome de Down, demencia entre los trastornos psiquiátricos y demencia frontotemporal en pacientes con deterioro cognitivo⁽¹⁰⁾. Además, el NfL plasmático puede diferenciar entre depresión moderada/grave y trastornos neurodegenerativos⁽¹⁰⁾.

Existe una fuerte correlación entre la edad y los niveles de NfL, ya que el NfL aumenta de forma no lineal con la edad^{(11) (12)}. Por lo tanto, a la hora de usar el NfL como biomarcador diagnóstico o pronóstico es fundamental considerar la edad como factor de corrección.

Recientemente, el analizador SIMOA ha sido utilizado en un estudio en una amplia cohorte de pacientes con esclerosis múltiple, donde los niveles en suero del NfL, corregidos por la edad y el índice de masa corporal, se han usado para establecer rangos de referencia, útiles a nivel clínico para individualizar al paciente con peor prognosis, predecir el riesgo de recaída o empeoramiento de la enfermedad y para monitorizar la respuesta al tratamiento⁽¹³⁾. En función de los resultados obtenidos, el equipo investigador ha desarrollado una aplicación *online* que otros investigadores y médicos pueden usar para calcular los rangos de referencia de los niveles séricos de NfL para una persona determinada⁽¹³⁾.

En conclusión, el NfL se puede considerar un biomarcador neurológico universal, que detecta específicamente el daño neuronal independientemente de la enfermedad que lo causa. La tecnología SIMOA ha permitido estudiar este biomarcador en amplias cohortes de pacientes y controles sanos, estableciendo rangos de referencia para sus niveles en sangre utilizables en la atención clínica de pacientes neurológicos.

Conclusiones

- La detección de biomarcadores proteicos en fluidos biológicos como la sangre representa una importante herramienta diagnóstica y terapéutica. El desarrollo de la tecnología SIMOA, una forma digital de ELISA, ha permitido la detección de biomarcadores proteicos relevantes en la investigación y en la clínica a niveles ultrasensibles, alcanzando el rango de femtomolar.
- Con la tecnología SIMOA, la molécula proteica de interés viene capturada por un anticuerpo específico conjugado a microesferas y posteriormente marcada con una enzima. Cada microesfera viene aislada y sellada en *arrays* de micropocillos con un volumen de femtolitros en presencia del sustrato de la enzima. El producto fluorescente generado por una sola enzima puede ser detectado.
- La tecnología SIMOA combina la detección digital con la analógica, dependiendo de la concentración de la proteína de interés en la muestra de partida.
- La tecnología SIMOA está integrada en un equipamiento completamente automatizado, el HD-X, que reduce al mínimo la intervención por parte del usuario, aumentando la eficiencia y disminuyendo la variabilidad del inmunoensayo.
- La ultrasensibilidad proporcionada por la técnica SIMOA ha permitido trasladar el estudio de los biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas desde el cerebro al LCR y a la sangre, donde se encuentran en concentraciones notablemente más bajas y cuyos análisis habían sido hasta ahora dificultados por las limitaciones de detección de los inmunoensayos convencionales.
- El estudio del biomarcador de daño axonal NfL en sangre a través de la tecnología SIMOA ha permitido recientemente establecer rangos de referencia para el seguimiento de pacientes de esclerosis múltiple.



Bibliografía

1. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med* (Maywood). 2018 Feb 1;243(3):213-21. [\[Pubmed\]](#)
2. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016. [\[Pubmed\]](#)
3. U. S. Food and Drugs Administration (FDA). About Biomarkers and Qualification. FDA; 2021. Disponible en: [\[Enlace\]](#)
4. Kuhle J, Barro C, Andreasson U, Derfuss T, Lindberg R, Sandelius Å, et al. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin Chem Lab Med*. 2016 Oct 1;54(10):1655-61. [\[Pubmed\]](#)
5. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol*. 2010 Jun 23;28(6):595-9. [\[Pubmed\]](#)
6. Rissin DM, Fournier DR, Piech T, Kan CW, Campbell TG, Song L, et al. Simultaneous Detection of Single Molecules and Singulated Ensembles of Molecules Enables Immunoassays with Broad Dynamic Range. *Anal Chem*. 2011 Mar 15;83(6):2279-85. [\[Pubmed\]](#)
7. Wilson DH, Rissin DM, Kan CW, Fournier DR, Piech T, Campbell TG, et al. The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *J Lab Autom*. 2016 Aug 1;21(4):533-47. [\[Pubmed\]](#)
8. Barro C, Zetterberg H. The blood biomarkers puzzle – A review of protein biomarkers in neurodegenerative diseases. *J Neurosci Methods*. 2021 Sep 1;361:109281. [\[Pubmed\]](#)
9. Gaetani L, Paolini Paoletti F, Bellomo G, Mancini A, Simoni S, di Filippo M, et al. CSF and Blood Biomarkers in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Diseases: Implications for Treatment. *Trends Pharmacol Sci*. 2020 Dec 1;41(12):1023-37. [\[Pubmed\]](#)
10. Ashton NJ, Janelidze S, al Khleifat A, Leuzy A, van der Ende EL, Karikari TK, et al. A multicentre validation study of the diagnostic value of plasma neurofilament light. *Nat Commun*. 2021 Dec 7;12(1):3400. [\[Pubmed\]](#)
11. Khalil M, Pirpamer L, Hofer E, Voortman MM, Barro C, Leppert D, et al. Serum neurofilament light levels in normal aging and their association with morphologic brain changes. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1):812. [\[Pubmed\]](#)
12. Harp C, Thanei GA, Jia X, Kuhle J, Leppert D, Schaedelin S, et al. Development of an age-adjusted model for blood neurofilament light chain. *Ann Clin Transl Neurol*. 2022 Apr 1;9(4):444-53. [\[Pubmed\]](#)
13. Benkert P, Meier S, Schaedelin S, Manouchehrinia A, Yaldizli Ö, Maceski A, et al. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol*. 2022 Mar 1;21(3):246-57. [\[Pubmed\]](#)