

II Workshop del Programa TransNanoAvansens

Programa de I+D en Tecnología 2018, Comunidad de Madrid

Alejandro Valverde De la Fuente



12 de julio 2021



Grupo BIOUCM

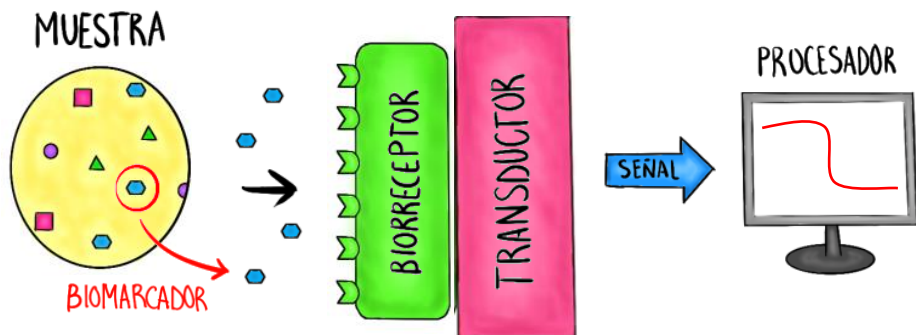
📍 Universidad Complutense de Madrid
Av. Complutense, s/n, 28040 Madrid



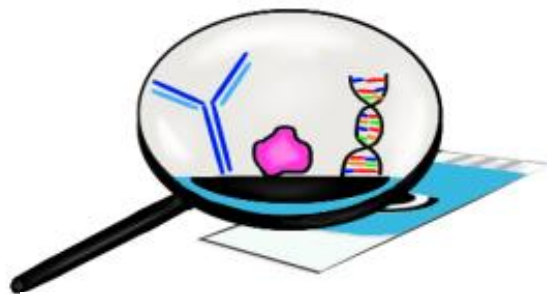
Investigadora principal: **Dra. Susana Campuzano**



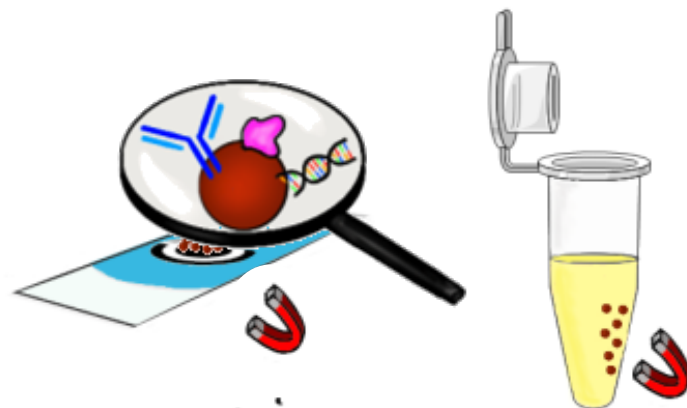
(Bio)sensores



**Dispositivos POC
(Point-Of-Care)**

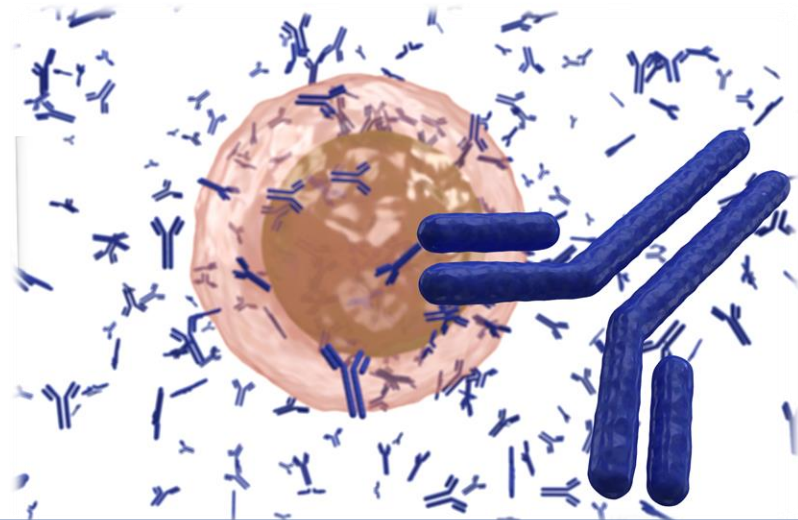
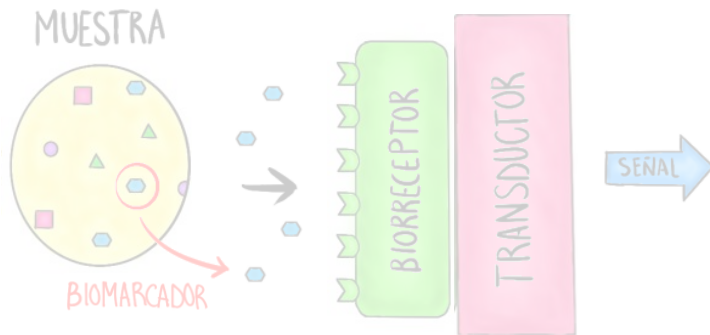


**ELECTRODO
INTEGRADO**



**micro-
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS
MODIFICADAS**

(Bio)sensores



PLATAFORMAS BIOSENSORAS PARA AUTOANTICUERPOS Y ANTÍGENOS PROTEICOS EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y DEGENERATIVAS

ELECTRODO
INTEGRADO

micro-
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS
MODIFICADAS

Determinación de RANKL

Regulador en la resorción ósea



Sobreexpresión de RANKL implica mayor degradación del hueso

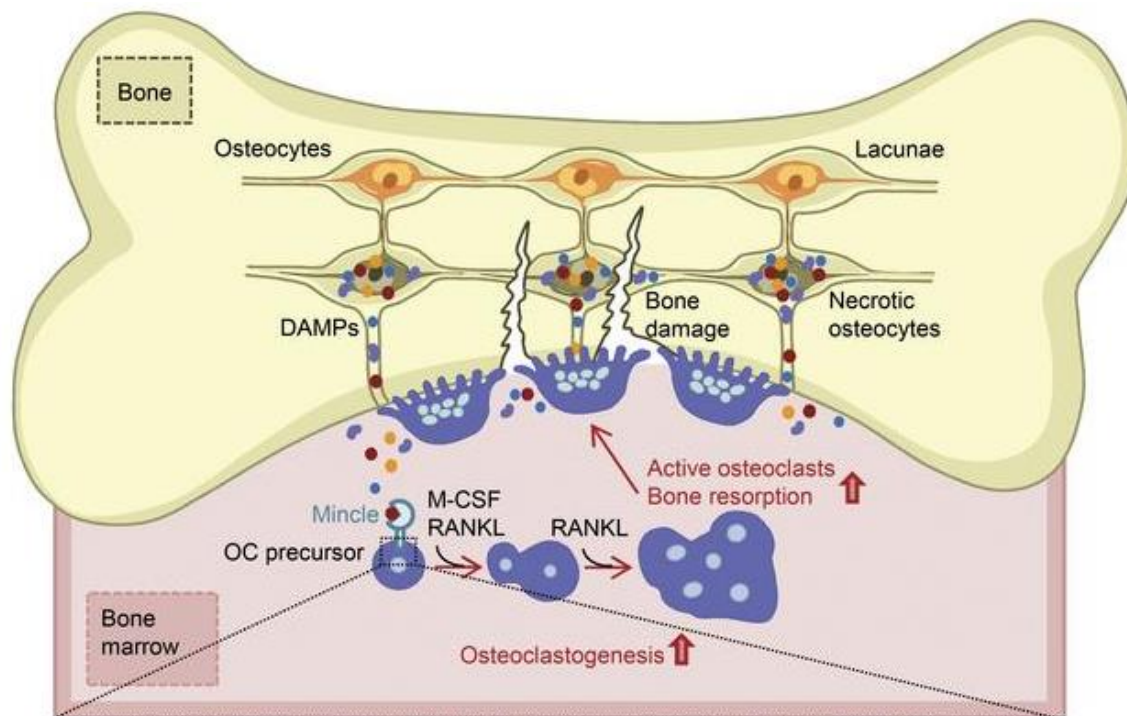


Enfermedades degenerativas del tejido óseo

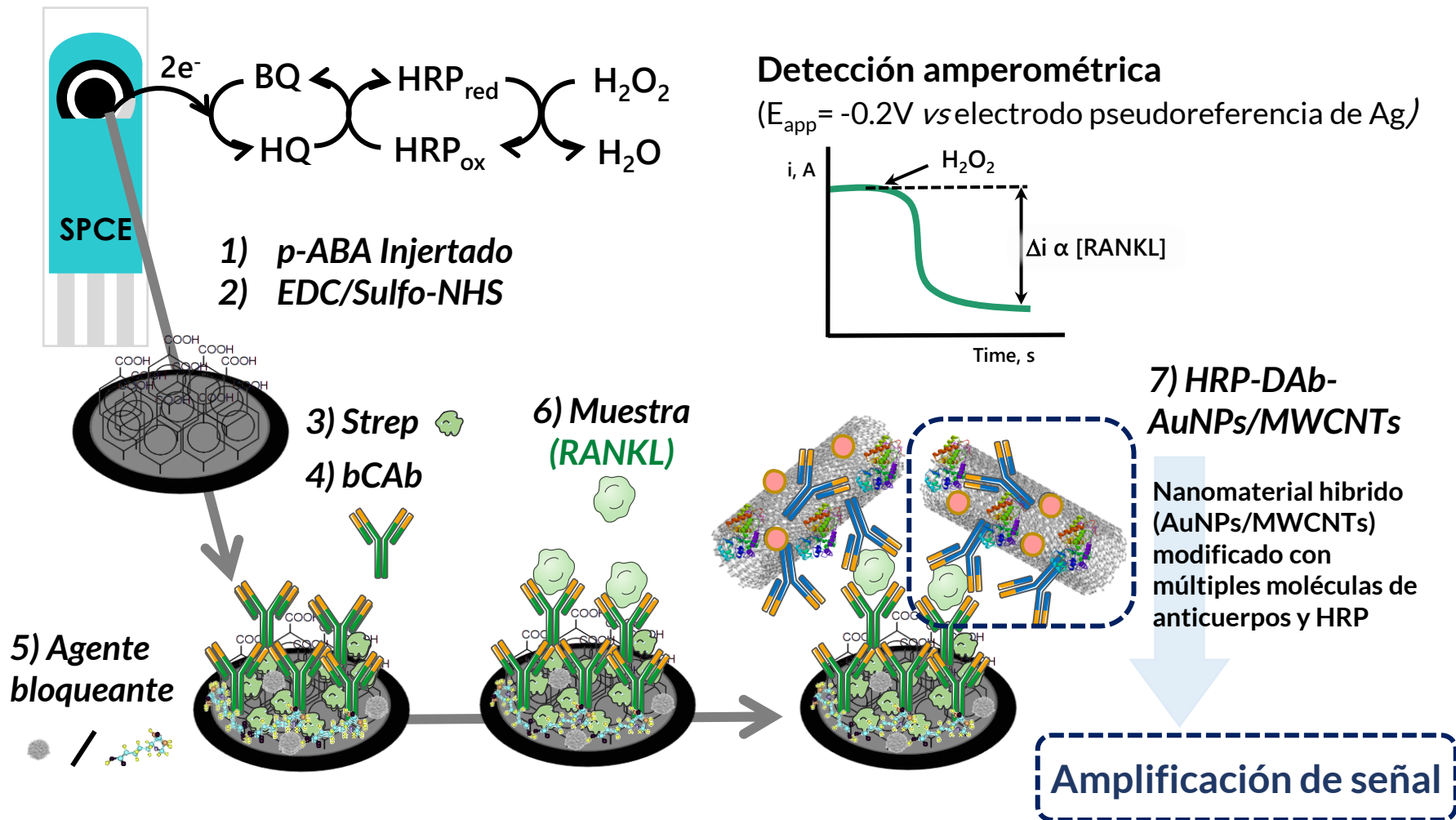
Artritis reumatoide
Osteoporosis

Carbon/Inorganic Hybrid Nanoarchitectures as Carriers for Signaling Elements in Electrochemical Immunosensors: First Biosensor for the Determination of the Inflammatory and Metastatic Processes Biomarker RANKL

Alejandro Valverde,^[a] Verónica Serafín,^[a] Ana Montero-Calle,^[b] Araceli González-Cortés,^[a] Rodrigo Barderas,^[b] Paloma Yáñez-Sedeño,^{*,[a]} Susana Campuzano,^{*,[a]} and José M. Pingarrón^[a]

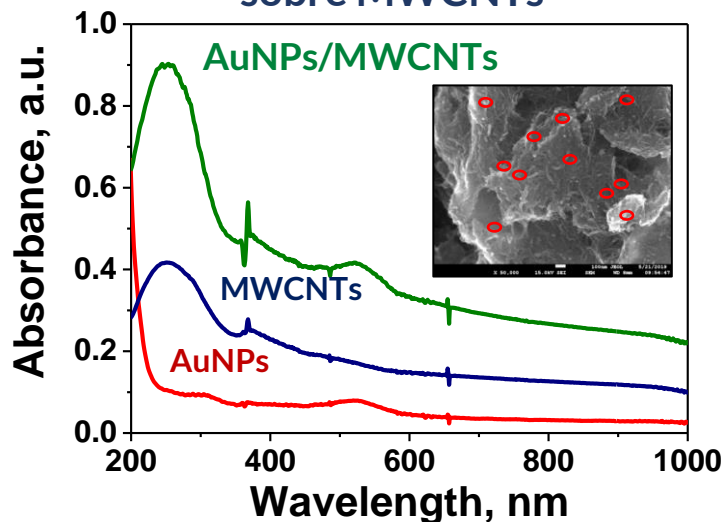


Diseño de la plataforma

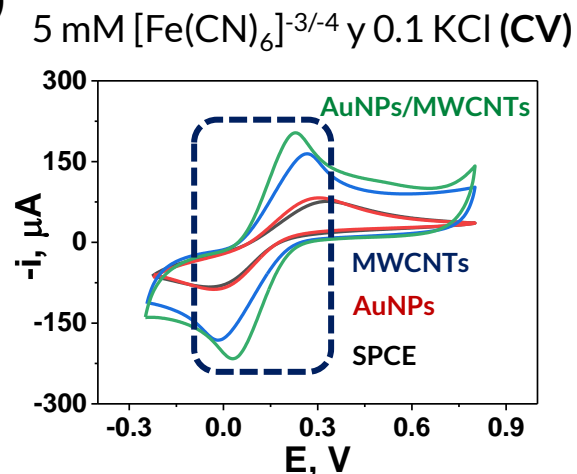
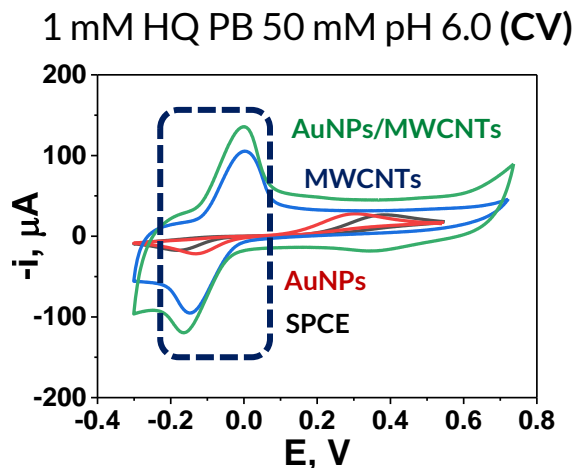




AuNPs ($\phi = 12 \pm 4$ nm) sobre MWCNTs



Efecto electrocatalítico sinérgico

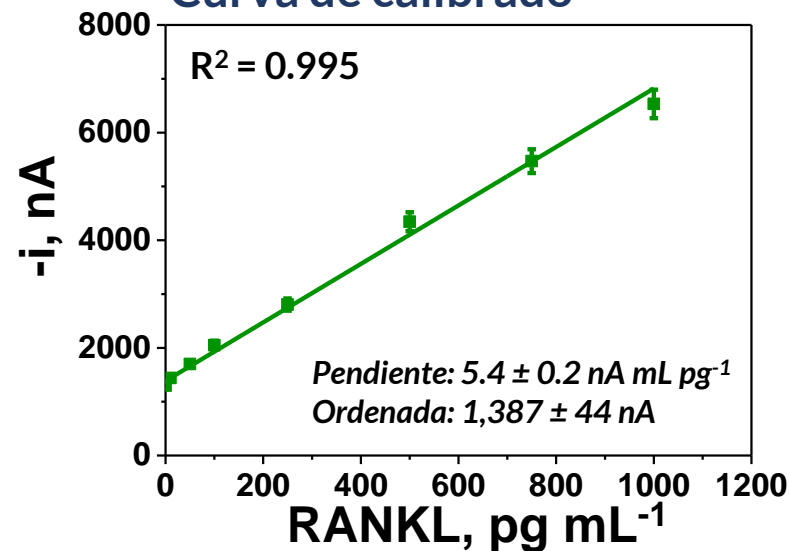


Características analíticas

Parámetros	Valores
Intervalo lineal, pg mL^{-1}	10.4 - 1000
LOD, pg mL^{-1} (n=10)*	3.1
RSD, % (n=10)	4.0
Estabilidad nanomaterial, días	20
Estabilidad inmunosensor, días	30

* $3x_{s_b}/\text{pendiente}$

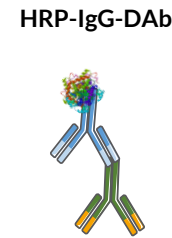
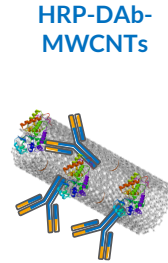
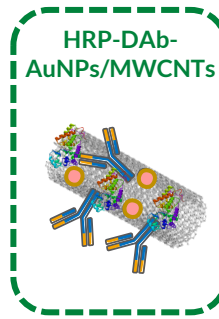
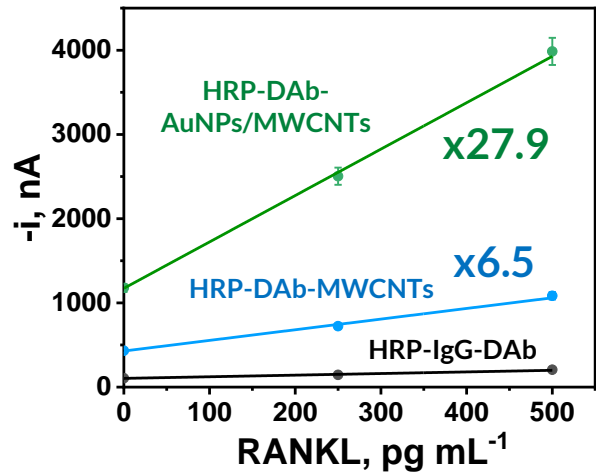
Curva de calibrado





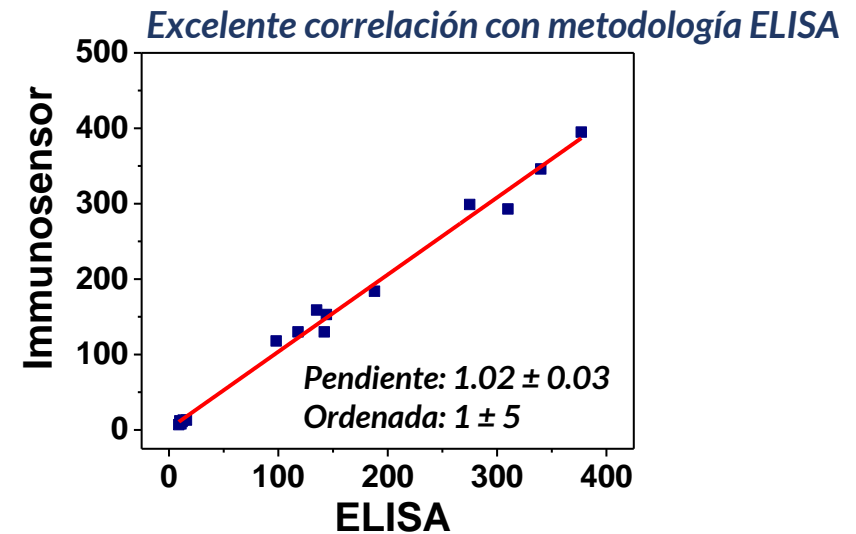
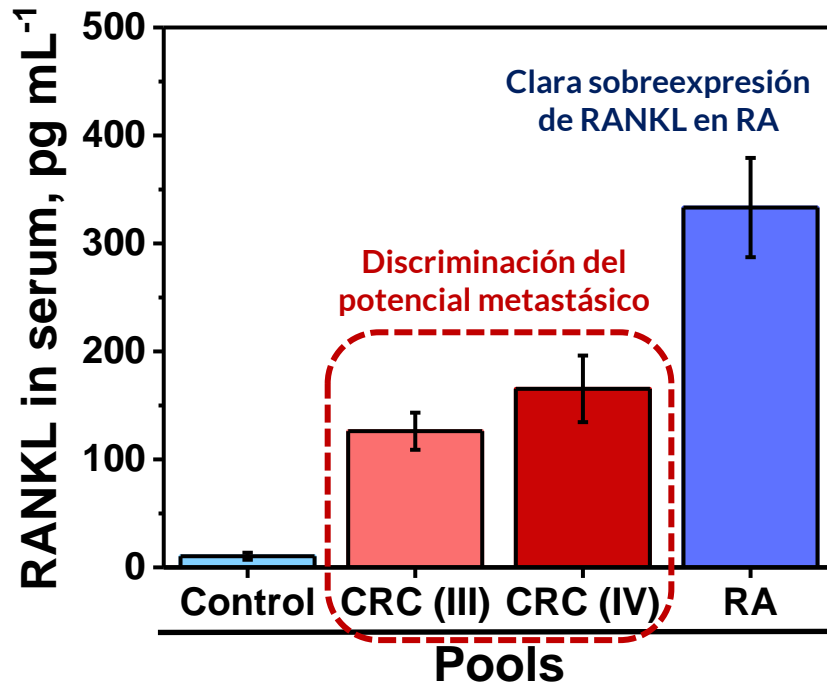
Antígenos proteicos: RANKL

Factor de amplificación



Gran aumento de la sensibilidad con AuNPs/MWCNTs

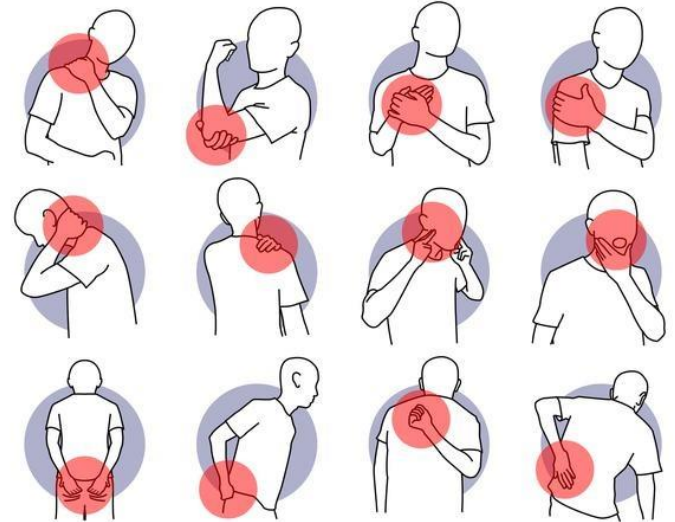
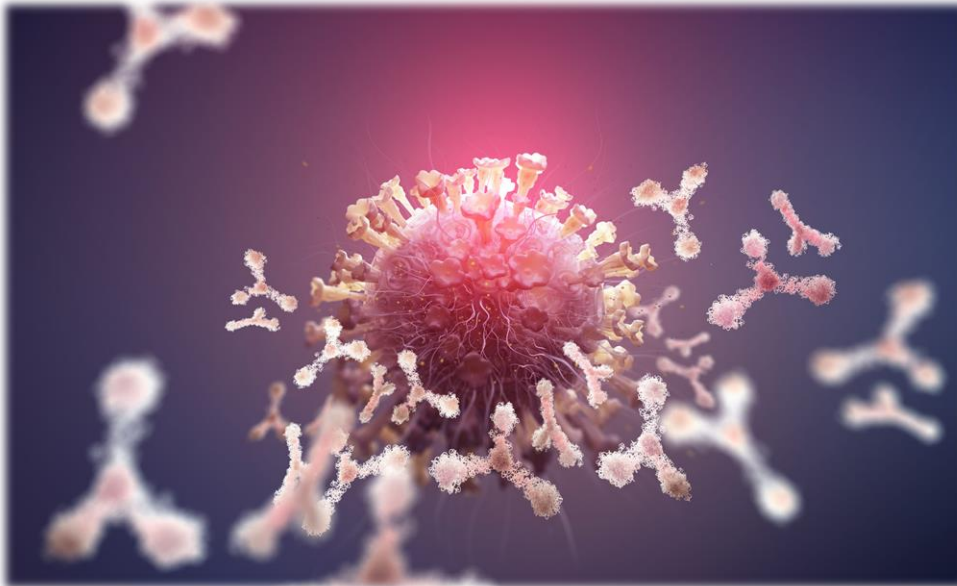
5 μL de suero humano (90 min de ensayo)





Caracterización de la respuesta humoral

Nivel sérico de autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes y/o degenerativas



Detección precoz y seguimiento de enfermedades



Determinación de AAbs frente a dsDNA en suero

Perfil de inmunidad
(IgGs, IgMs e IgAs)



AAbs reconocen DNA de cadena doble y su concentración sérica está relacionada con la gravedad de la enfermedad



Enfermedades autoinmunes
Lupus eritematoso sistémico
Artritis reumatoide

Biosensors and Bioelectronics 160 (2020) 112233



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

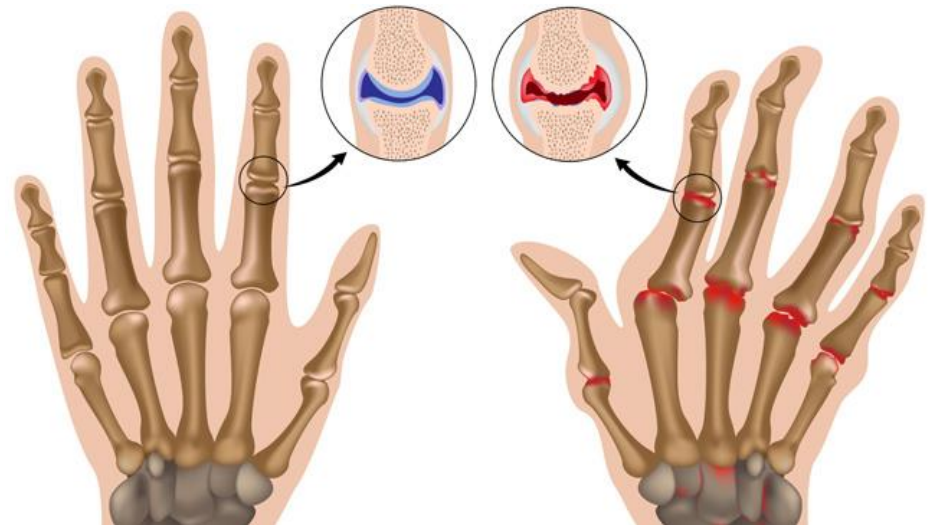
Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/bios>



Fast and sensitive diagnosis of autoimmune disorders through amperometric biosensing of serum anti-dsDNA autoantibodies

Beatriz Arévalo ^{a,1}, Verónica Serafín ^{a,1}, Marta Sánchez-Paniagua ^b, Ana Montero-Calle ^c, Rodrigo Barderas ^c, Beatriz López-Ruiz ^b, Susana Campuzano ^{a,1*}, Paloma Yáñez-Sedeño ^{a,2}, José M. Pingarrón ^a

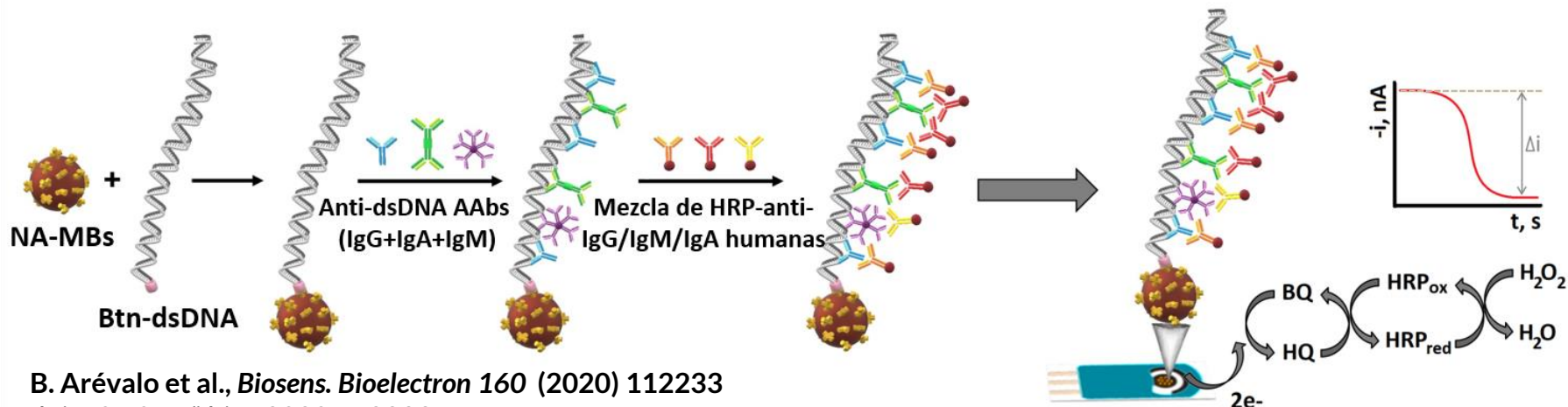


Sano

Artritis reumatoide

Diseño de la plataforma

Btn-dsDNA: obtenido por PCR a partir de plásmido humano



B. Arévalo et al., *Biosens. Bioelectron* 160 (2020) 112233
doi: 10.1016/j.bios.2020.112233

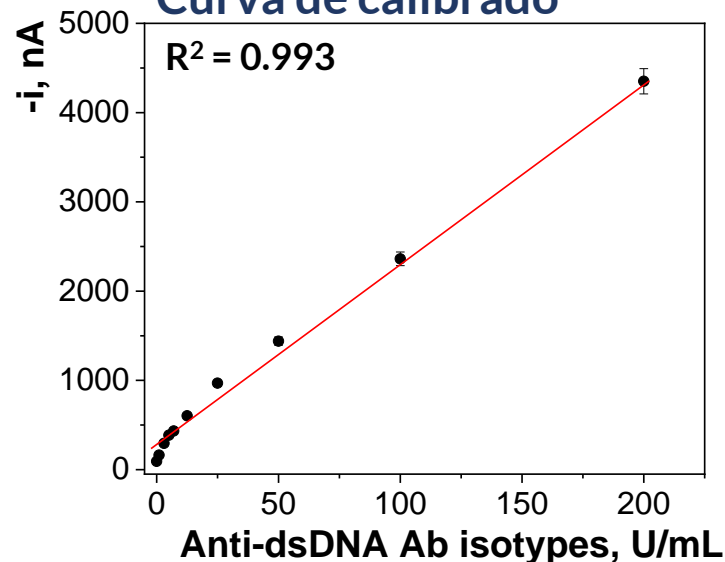
Características analíticas

Parámetros	Valores
Intervalo lineal, U mL ⁻¹	1 - 200
Pendiente, nA mL U ⁻¹	20.7 ± 0.6
Ordenada origen, nA	270 ± 40
LOD, U mL ⁻¹ (n=10)*	0.3
RSD, % (n=8)	3.3

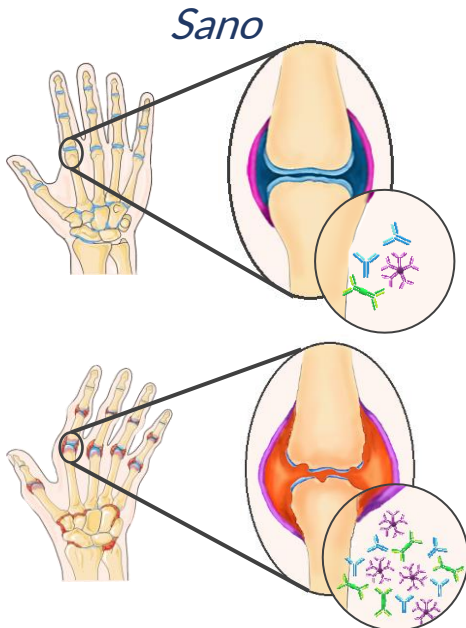
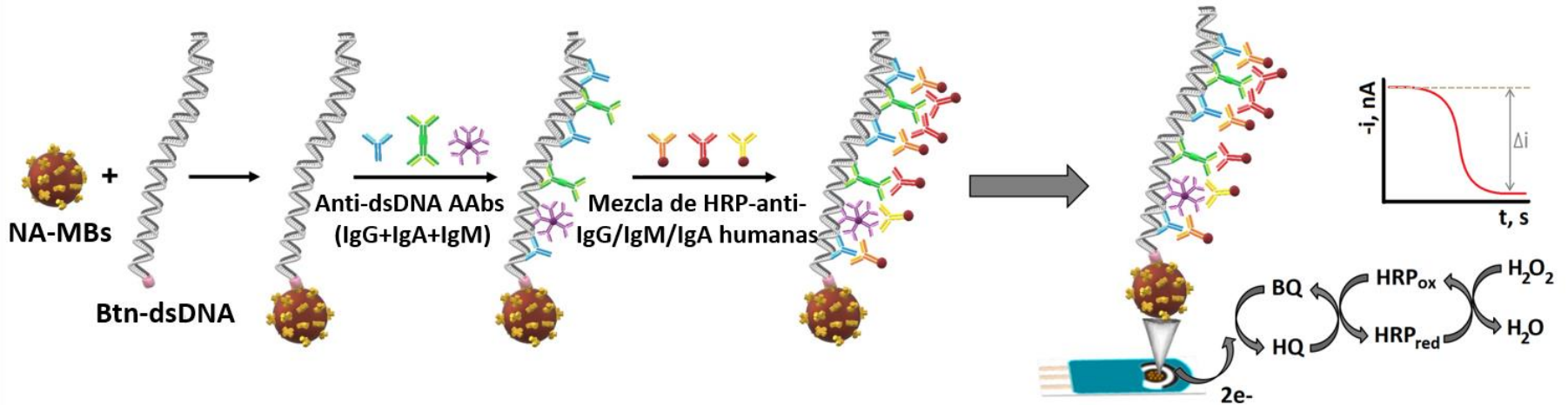
* $3\sigma_s/\text{pendiente}$

45 min de ensayo

Curva de calibrado



Aplicabilidad en muestras de suero



Artritis reumatoide

Suero	[AAbs-dsDNA]*, U mL ⁻¹	
	Inmunosensor (RSD, %)	ELISA (RSD, %)
Individuos sanos (Control)	8 ± 2 (1.1)	8 ± 1 (4.4)
	13 ± 3 (3.8)	15 ± 3 (3.2)
	19 ± 4 (3.4)	16 ± 6 (5.4)
Pacientes con RA	1000 ± 40 (4.4)	1100 ± 60 (5.3)
	1770 ± 90 (5.3)	1740 ± 80 (4.3)
	2430 ± 50 (2.2)	2300 ± 100 (5.8)

Discriminación de pacientes con artritis reumatoide

*valor medio ± t×s/√n, n = 3, α = 0.05



Determinación de AAbs frente a AQP4 en suero

Proteína de canal de agua expresada en los astrocitos del SNC



AAbs se unen a la proteína AQP4 alterando su función (daño cerebral)



Enfermedades autoinmunes y/o neurodegenerativas

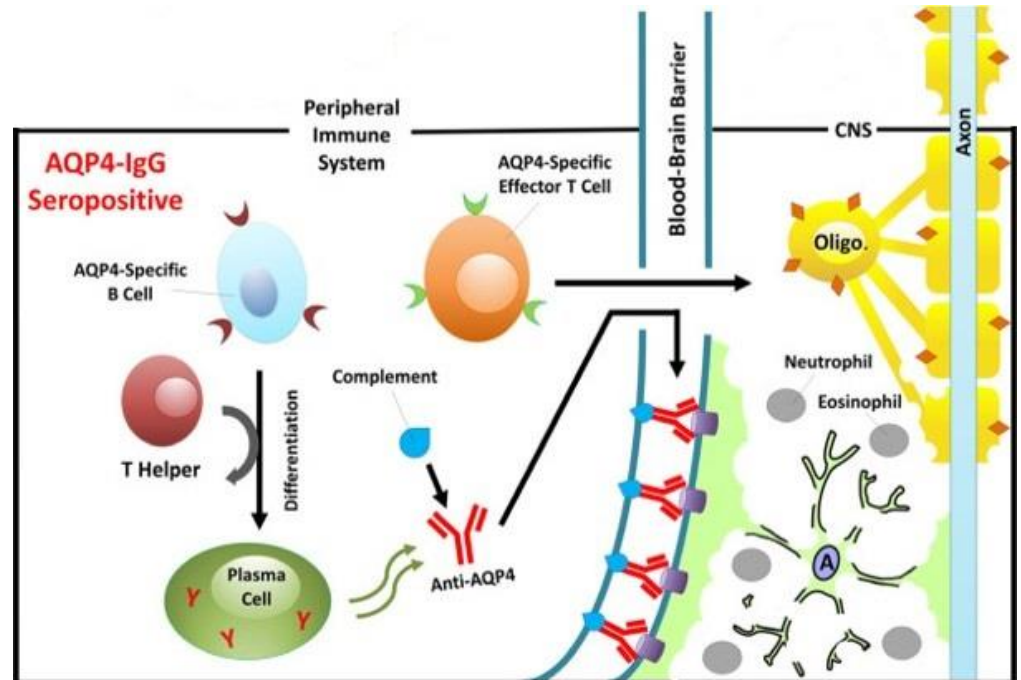
Neuromielitis óptica

Enfermedad de Alzheimer

Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

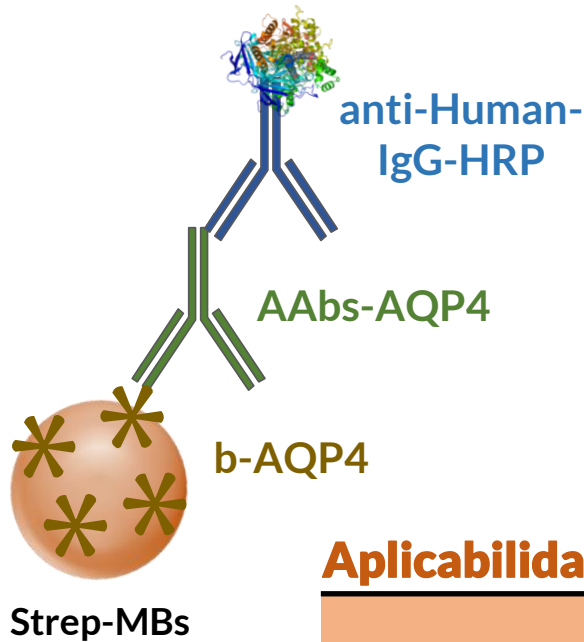
Enfermedad de Parkinson

En preparación para publicación





Diseño de la plataforma



Características analíticas

Parámetros	Valores
Intervalo lineal, pg mL^{-1}	30 – 2500
RSD, % (n=10)	2.5
LOD, pg mL^{-1} (n=10)*	8.8
Tiempo de ensayo, min	90

* $3x_{s_b}/\text{pendiente}$

LOD 45 veces inferior que metodología ELISA
y tiempo de ensayo 3 veces más corto

Aplicabilidad en muestras de suero

Suero	[AAbs-AQP4]*, ng mL^{-1}	
	Inmunosensor (RSD, %)	ELISA (RSD, %)
Individuos sanos (Control)	156 ± 7 (2.6)	170 ± 20 (6.1)
	170 ± 10 (3.6)	160 ± 20 (6.1)
	190 ± 10 (3.5)	200 ± 20 (6.2)
Pacientes con AD	1600 ± 100 (4.6)	1500 ± 200 (5.9)
	3300 ± 300 (4.6)	3200 ± 300 (5.8)
	1300 ± 100 (4.0)	1300 ± 200 (6.9)

Sobreexpresión de
AAbs-AQP4 en AD

*valor medio $\pm t_{x,s}/\sqrt{n}$, $n = 3$, $\alpha = 0.05$



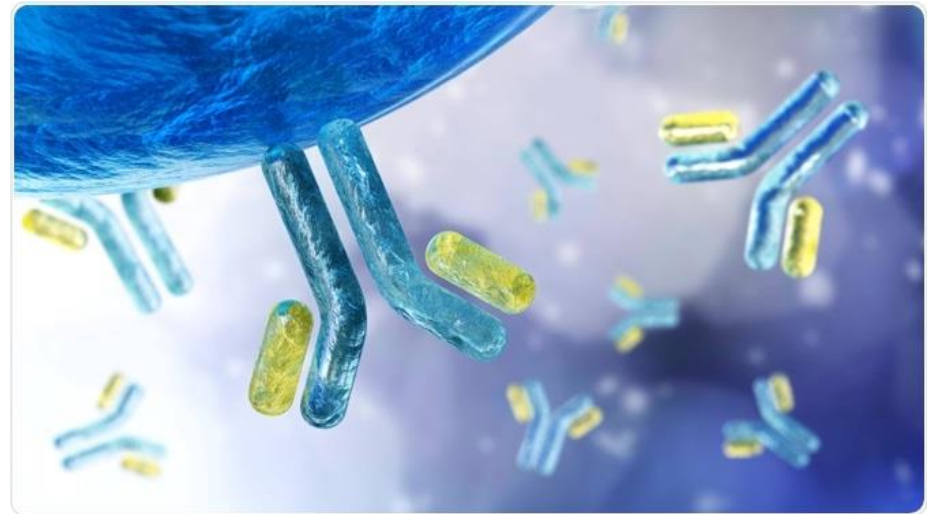
Bioplataforma amperométrica multiplexada para diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer



Detección de AAbs específicos en suero de pacientes diagnosticados con AD e individuos sanos

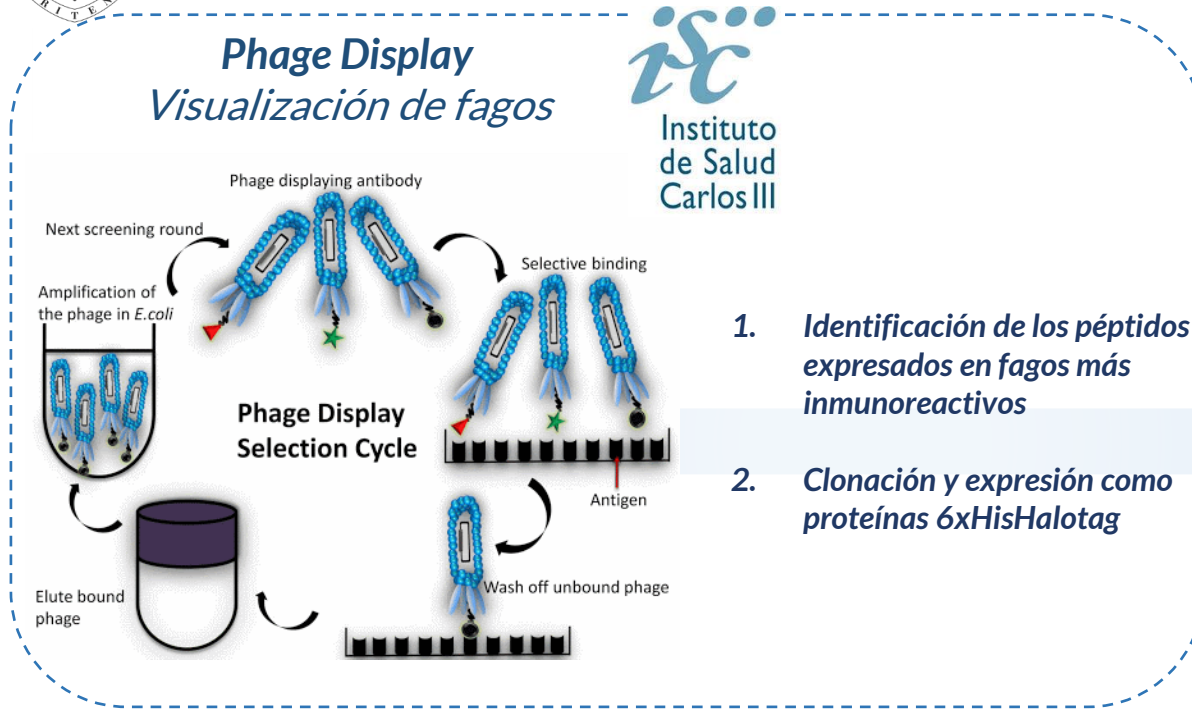


Firma de autoanticuerpos
Panel de biomarcadores

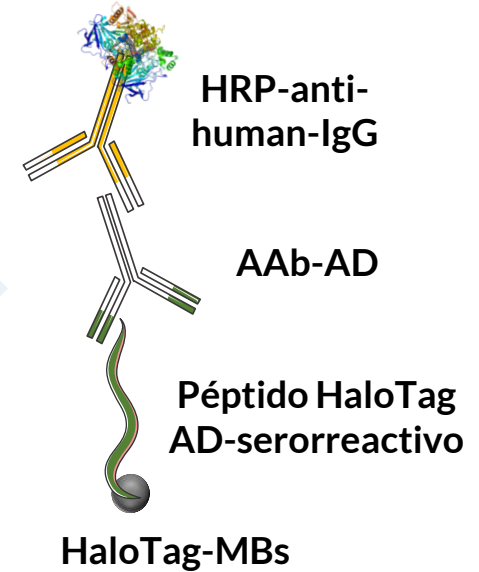




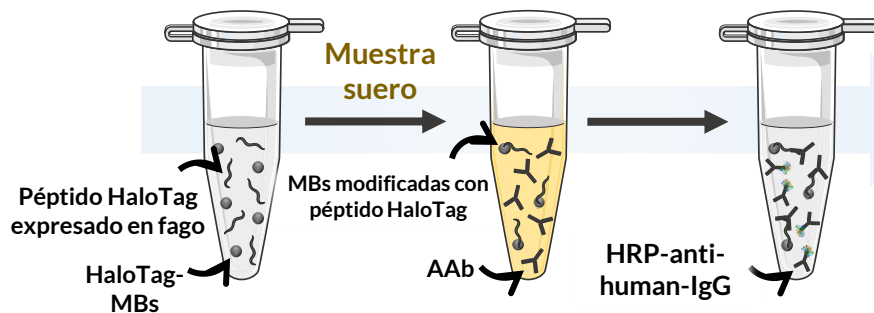
Autoanticuerpos: Diagnóstico de AD



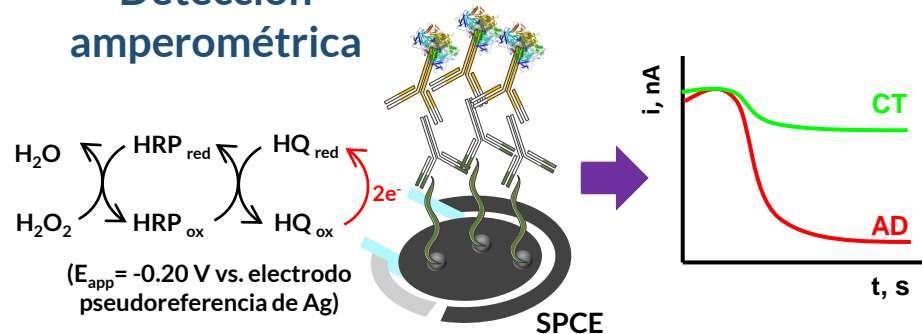
MBs modificadas



Aislamiento y marcaje de AAbs-AD

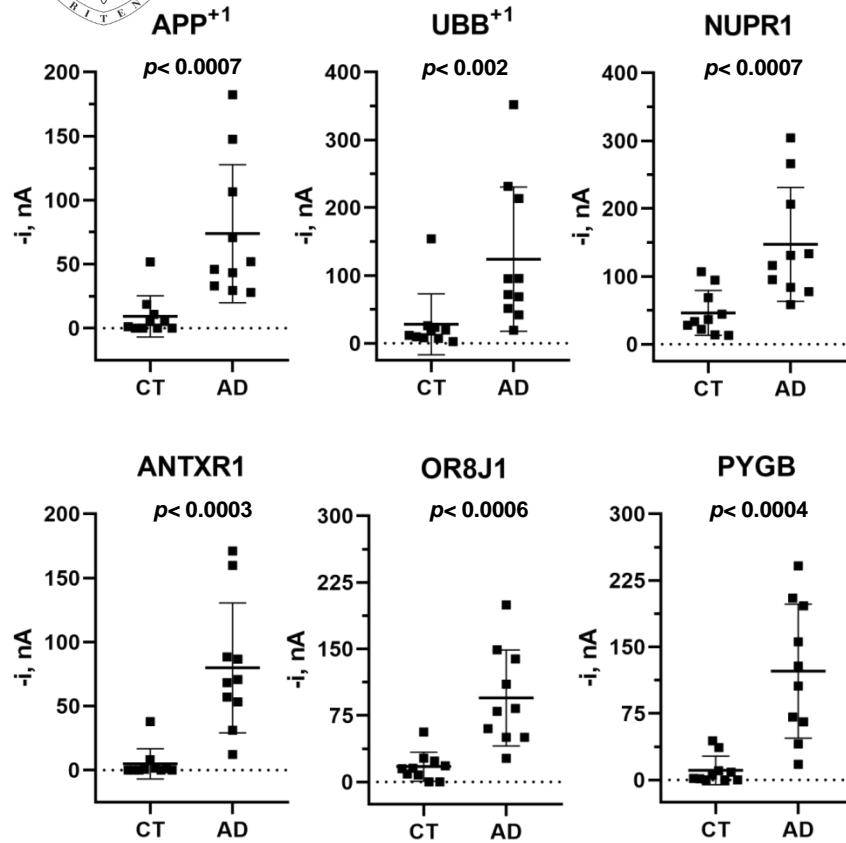


Detección amperométrica

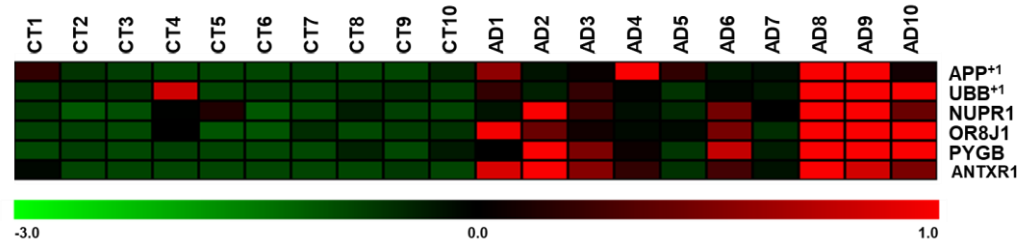
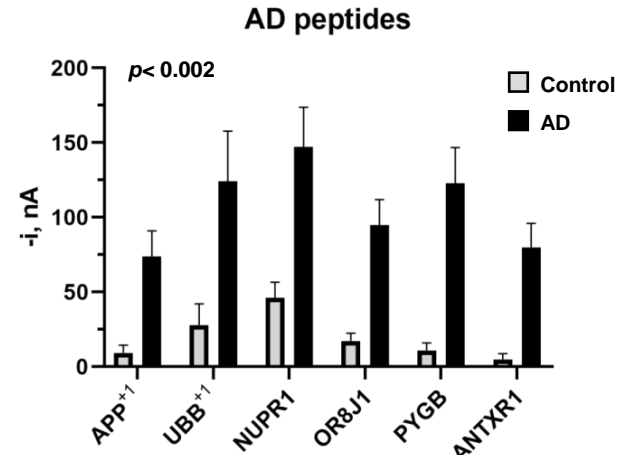




Autoanticuerpos: Diagnóstico de AD



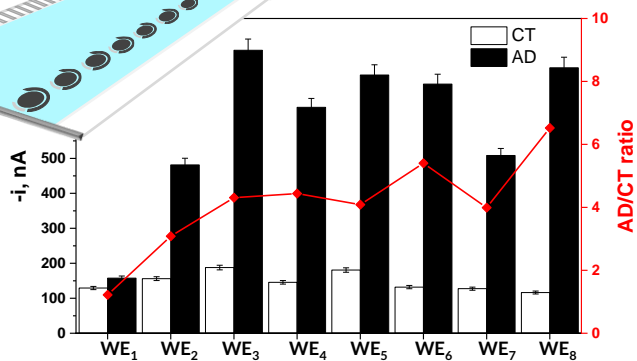
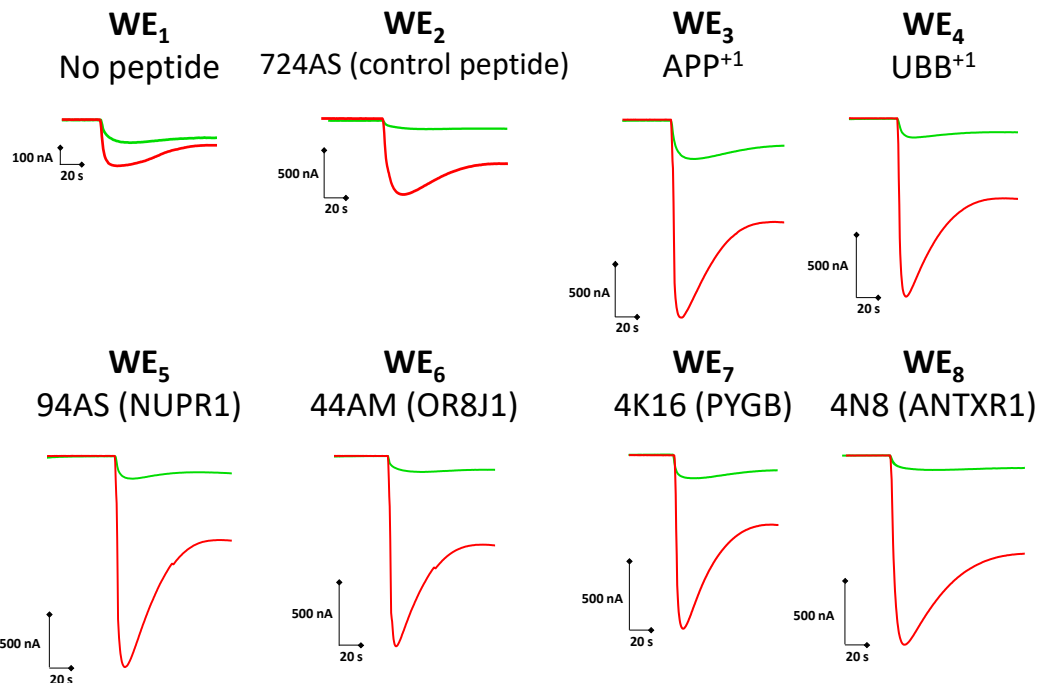
Dilución suero 1/1000



Alta sensibilidad y selectividad para discriminación de AD

Péptido	AUC, %	Sensibilidad, %	Especificidad, %
94AS (NUPR1)	92.0	90.0	80.0
4K16 (PYGB)	97.0	100.0	80.0
4N8 (ANTXR1)	98.0	100.0	90.0
44AM (OR8J1)	96.0	100.0	80.0
APP ⁺¹	95.0	100.0	90.0
UBB ⁺¹	90.0	90.0	90.0
Todos los péptidos	100.0	100.0	100.0

Detección
amperométrica
en SP_8CE



Discriminación de pacientes con AD mediante
la detección multiplexada de AAbs en suero

Fácil implementación en placas electroquímicas de 96xELISA

Diagnóstico fiable y
mínimamente invasivo
(dispositivos POC)

Aceptado hoy y propuesta de
portada principal en revista



Agradecimientos



**Comunidad
de Madrid**

TransNano Avansens

II Workshop del Programa TransNanoAvansens

Programa de I+D en Tecnología 2018, Comunidad de Madrid

Alejandro Valverde De la Fuente



12 de julio 2021