UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

TESIS DOCTORAL

Herramientas bioelectroanalíticas de vanguardia para detectar enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer

Cutting-edge bioelectroanalytical tools to detect autoimmune, neurodegenerative and cancer diseases

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Beatriz Arévalo Pérez

DIRECTORES

Paloma Yáñez-Sedeño Orive
Susana Campuzano Ruiz
Verónica Serafín González-Carrato

© Beatriz Arévalo Pérez, 2024

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Programa de Doctorado de Química Avanzada

TESIS DOCTORAL

Herramientas bioelectroanalíticas de vanguardia para detectar enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer

Cutting-edge bioelectroanalytical tools to detect autoimmune, neurodegenerative and cancer diseases

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR

Beatriz Arévalo Pérez

Directores

Paloma Yáñez-Sedeño Orive
Susana Campuzano Ruiz
Verónica Serafín González-Carrato

Madrid, 2024

Los trabajos de investigación de la presente Tesis Doctoral se han realizado en el Grupo de Investigación de Electroanálisis y (Bio)Sensores Electroquímicos (GEBE) del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, creado en 1988 por el Prof. José Manuel Pingarrón y liderado desde noviembre de 2020 por la Prof.ª Susana Campuzano, y aprovechando la estrecha y fructífera colaboración que se mantiene con el grupo ProteoFun de la Unidad de Proteómica Funcional del Instituto de Salud Carlos III (UFIEC-ISCIII) y liderado por el Dr. Rodrigo Barderas.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la concesión del contrato predoctoral para la formación de doctores PRE2019-087596 asociado al proyecto RTI2018-096135-B-I00) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Las investigaciones realizadas en el marco de esta Tesis Doctoral también contaron con financiación de los siguientes proyectos: CTQ2015-64402-C2-1-R (Ministerio de Economía y Competitividad); RTI2018-096135-B-I00, RTI2018-095672-B-I00, PCI2018-093067, PID2019-103899RB-I00 y PID2021-122457OB-I00 (Ministerio de Ciencia e Innovación), NANOAVANSENS (S2013/MT–3029); TRANSNANOAVANSENS-CM (S2018/NMT-4349) (Programas I+D Tecnologías de la Comunidad de Madrid); y PI17CIII/00045, PI20CIII/00019 y PI20/00625 (AES-ISCIII/FEDER).

Cuidado con lo que deseas
porque puedes conseguirlo

Echando la vista atrás – y entendiendo que «*lo imposible solo tarda un poco más*» – el tiempo dedicado y las personas que me han acompañado han sido mi pilar fundamental para llegar al final de este viaje. Por eso, a todos los que, aun sin saberlo, habéis dejado vuestra huella, enseñanzas o valores, o habéis aportado vuestro granito para conseguir ser la persona que soy hoy: gracias.

Para empezar, me gustaría agradecer a mis directoras de Tesis. Paloma, gracias por enseñarme este mundo, acogerme desde el TFG y dejarme formar parte del GEBE para adentrarme en la investigación. Susana, gracias por tu dedicación, esfuerzo y confianza, por tu incesante afán de siempre mejorar y avanzar: sin ti no hubiera sido posible. Vero, mi flor, apareciste en mi camino por casualidad y supe que quería seguirte. Gracias por tu apoyo, por ser amiga y protección durante estos años; las mejores manos de las que aprender, con la alegría y maneras que te caracterizan, gracias por haberme dejado ser tu *niña*, eternamente agradecida de haber sido tu aprendiz.

A todas las personas que forman parte de este grupo. A José M. Pingarrón, a los profesores seniors: Julio, Lourdes, Araceli y María Pedrero. A Víctor RVM, Rebe, Eloy, Sandra, Claudia, Lorena y, sobre todo, a María Gamella y a Esther, gracias por vuestro cariño y ayuda siempre que la he necesitado. A los que han formado parte del GEBE: Gonzalo, Sara; y a los que han pasado por aquí: Claudia, Amira, Sofía, Amaya, Jenni y Sara.

Y dentro de este mundo de locos, quiero agradecer las amistades que me llevo: a Jose, por demostrar tanto en tan poco. A Víctor, por contradecirnos en todo como base de nuestra amistad. A Marina, por darme la paciencia y tranquilidad que me falta, tú puedes con todo. Y a mis rositos incondicionales: Alex, por ser mi alma gemela y la voz de mi conciencia, podría solo pensarlo y lo sabrías todo. Cris, mi mitad y mi suerte, creo que no hace falta explicarte lo mucho que te quiero. Gracias chicos por vuestro apoyo, amistad y locura: sois los mejores.

Agradecer al Dr. Rodrigo Barderas y su equipo ProteoFun del UFIEC-ISCIII por su colaboración y ayuda durante las investigaciones.

I would also like to thank to Prof. Joseph Wang for hosting me for 6 months in his Nanobioelectronics group of the Nanoengineering Department at UCSD (San Diego, California), as well as my lab mates: Nandha, Mahika, Shichao, Majo and Ana. A mis chilenos favoritos: Erick y Felipe, por acogerme en vuestra casa y hacerlo hogar durante esa corta pero intensa etapa. A Berta y Julián, al grupo de latinos: Gaby y Juan, Paula y Andrés, Diana, Vicky, Rodolfo… Y, cómo no, Marvic, por formar ese grupo de amigas. Pero mi mención especial va para Silvia: por aparecer y quedarte, mi compañera de batallas; gracias por ser mi apoyo en esta aventura.

A mis padres, Alfonso y Marga: gracias por dármelo todo. Por ser mis guías y espejo donde mirarme, por confiar en mí y apoyarme en cada paso dado. Esta Tesis, y todo lo que consigo, es vuestro.

A Álvaro, por acompañarme en este y todos los viajes. Gracias por creer siempre en mí, por tu apoyo incondicional y por ser mi luz y soporte en todo momento. Juntos somos el mejor equipo capaces de cumplir todos nuestros proyectos.

A mi hermano Alfonso, por enseñarme que los Arévalo Pérez vamos a por todas hasta el final, sin rendirnos y arrasando; y a Ana, gracias por tu cariño y complicidad.

Gracias a mis abuelos: Ángel, Encarni, Marga y Fede, por enseñarme el valor del esfuerzo, constancia y educación. Agradecer, por supuesto, el impulso de toda mi familia y, en especial, de Jimena, la niña de mis ojos, y Eva, la locura sin la que no puedo vivir.

A Tere, Edu y María, por acogerme y dejarme formar parte de vuestra familia.

A mis chicas, las de siempre: Marta, Laura y Nuria, por demostrarme el verdadero significado de la amistad, donde y cuando sea. Siempre estaré agradecida de teneros, por ser mi refugio en los peores momentos y recreo en los mejores. Gracias por crear y mantener, no solo este cuarteto increíble, si no una familia de ocho: gracias Mario, Carlos y Juan.

Gracias a ARS y, en especial, mis Riaza – Martín: sois mi segunda familia. Paula, mi *prima*, gracias por tu naturalidad, eres igual de especial que esencial en mi vida, no me faltes nunca.

A la gente de Alcalá y, en especial, gracias a Aitor, Cris, Jenni, Alex y Andrea por abrirme vuestros brazos.

A los chicos de PP&CC2.0, por acompañarme desde hace años en todos los aspectos de mi vida.

A Ron y a Gea, mi familia perruna.

Por último, agradecer como parte indispensable de mi vida a la gimnasia rítmica por los valores que me ha dado: la disciplina, esfuerzo y perseverancia. Gracias por las personas que ha puesto en mi camino; entrenadoras, gimnastas y amigas. Pero en especial, gracias al Club Madrid Promesas por darme casa los mejores años de mi vida deportiva: «insistir, persistir y nunca desistir» como lema.

ÍNDICE

Resumen – Abstract 7

Resumen 9

Abstract 13

Objetivos y plan de trabajo 17

Capítulo 1. Biosensores electroquímicos en el ámbito clínico 23

1.1. Biomarcadores de relevancia emergente para diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades prevalentes 25

1.1.1. Biomarcadores de enfermedades autoinmunes 29

Sistema inmune 29

Enfermedades autoinmunes 34

Biomarcadores de enfermedades autoinmunes: autoanticuerpos 37

Autoanticuerpos frente al centrómero (ACAs) 38

Autoanticuerpos frente a DNA de cadena doble (dsDNA-Abs) 40

Autoanticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles (ENAs-Abs) 40

Biomarcadores de enfermedades autoinmunes: citoquinas 41

1.1.2. Biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas 43

Sistema nervioso 43

Enfermedades neurodegenerativas 44

Biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas: autoanticuerpos 45

Autoanticuerpos frente a acuaporina 4 (AQP4-Abs) 46

1.1.3. Biomarcadores de cáncer 47

Cáncer 47

Cáncer de mama 49

Cáncer colorrectal 50

Biomarcadores de cáncer: proteínas 51

Metaloproteinasa de matriz 9 52

1.1.4. Relaciones entre enfermedades 53

Enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. Biomarcadores compartidos. . 53

Autoanticuerpos frente a DNA de cadena doble (dsDNA-Abs) 54

Autoanticuerpos frente a la acuaporina 4 (AQP4-Abs) 54

Enfermedades autoinmunes y cáncer 55

Sistema BAFF/APRIL 55

1.2. Plataformas biosensoras electroquímicas para la identificación y determinación de biomarcadores de enfermedades prevalentes 56

1.2.1. Evolución y características de los biosensores 56

Clasificación de los biosensores 60

Biorreceptor 61

Transductor 63

Sistema de procesamiento de la señal 66

Características de los biosensores 66

Biosensores electroquímicos 67

Electrodos serigrafiados 68

Clasificación de los biosensores electroquímicos 70

1.2.2. Estrategias de inmovilización de biomoléculas 74

Inmovilización a través de soportes sólidos 84

1.2.3. Bioplataformas electroquímicas asistidas por MBs 85

1.2.4. Nanomateriales como sistemas de amplificación de señal 88

Clasificación de los nanomateriales 89

Estrategias de amplificación de los nanomateriales 90

Capítulo 2. Metodología experimental 93

2.1. Instrumentación 95

2.1.1. Aparatos e instrumentos 95

2.1.2. Electrodos y dispositivos empleados en las medidas electroquímicas 96

2.2. Reactivos y disoluciones 98

2.2.1. Reactivos 98

Reactivos químicos 98

Reactivos biológicos comunes 99

Reactivos biológicos específicos para autoanticuerpos 100

Reactivos biológicos específicos para biomarcadores proteínicos 102

2.2.2. Disoluciones 102

Disoluciones reguladoras de pH 102

Disoluciones empleadas en la construcción de las bioplataformas 103

Disoluciones para las medidas electroquímicas 105

2.3. Micropartículas magnéticas 106

2.4. Muestras 108

Cultivo celular y producción de extractos 108

Suero 110

2.5. Procedimientos experimentales 111

2.5.1. Bioplataformas electroquímicas en formato integrado 111

Bioplataformas para la determinación de autoanticuerpos: Bioplataforma para la determinación de CENPB-Ab 112

Bioplataformas para la determinación de biomarcadores proteínicos: Bioplataforma dual para BAFF y APRIL 114

2.5.2. Bioplataformas electroquímicas asistidas por micropartículas magnéticas 120

Protocolos para el empleo de micropartículas magnéticas 121

Micropartículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxilo (HOOC-MBs). 121

Micropartículas magnéticas funcionalizadas con neutravidina (NA-MBs) o estreptavidina (Estrep-MBs). 126

Micropartículas magnéticas funcionalizadas con Co^{+2}-NTA (His-tag isolation-MBs). . 131

2.5.3. Análisis de muestras clínicas 135

2.6. Técnicas de determinación y caracterización electroquímicas 136

2.6.1. Amperometría 136

Captura magnética de las MBs para las medidas electroquímicas 138

2.6.2. Voltamperometría cíclica 141

2.6.3. Espectroscopia de impedancia electroquímica 142

2.7. Técnicas de caracterización no electroquímicas 143

2.7.1. Espectroscopia UV-visible 143

2.7.2. Espectroscopia Raman 143

2.7.3. Microscopía electrónica de barrido 144

2.7.4. Microscopía electrónica de transmisión 144

2.8. Tecnologías convencionales para la determinación de biomarcadores diana 145

2.8.1. ELISA 145

2.8.2. Western blot 149

2.9. Tratamiento estadístico de datos 150

Capítulo 3. Resultados y discusión 153

Parte I. Plataformas biosensoras electroquímicas para la determinación de autoanticuerpos 157

3.1. Desarrollo de bioplataformas electroquímicas individuales..... 159

3.1.1. Bioplataformas electroquímicas en formato integrado 159

Bioplataforma electroquímica para la determinación de autoanticuerpos frente a la proteína centromérica B (CENPB-Abs) 159

Optimización de las variables experimentales 160

Caracterización electroquímica 164

Calibrado y características analíticas 166

Estabilidad de almacenamiento 167

Estudios de regeneración y reutilización del biosensor 168

Estudio de selectividad 169

Aplicación al análisis de muestras de suero 170

3.1.2. Bioplataformas electroquímicas asistidas por micropartículas magnéticas 174

Bioplataforma electroquímica para la determinación de autoanticuerpos frente a AQP4 (AQP4-Abs) 174

Optimización de las variables experimentales 175

Calibrados y características analíticas 177

Estabilidad de almacenamiento 178

Estudio de selectividad 179

Aplicación al análisis de muestras de suero 179

Bioplataforma electroquímica para la determinación de autoanticuerpos frente a DNA de cadena doble (dsDNA-Abs) 183

Optimización de las variables experimentales 184

Calibrado y características analíticas 186

Estudio de selectividad 188

Estabilidad de almacenamiento 188

Aplicabilidad al análisis de muestras de suero 189

Bioplataforma electroquímica para la determinación de autoanticuerpos frente a la proteína centromérica B (CENPB-Abs) 192

Optimización de las variables experimentales 193

Calibrados y características analíticas 195

Estabilidad de almacenamiento 197

Estudios de regeneración y reutilización de la bioplataforma 198

Estudio de selectividad 198

Aplicación al análisis de muestras de suero 199

3.2. Desarrollo de bioplataformas electroquímicas multiplexadas asistidas por micropartículas magnéticas..... 202

Bioplataforma electroquímica dual para la determinación de autoanticuerpos frente a las proteínas centroméricas A (CENPA-Abs) y B (CENPB-Abs)..... 202
Optimización de las variables experimentales 203
Estudios de regeneración y reutilización de la bioplataforma individual para CENPA-Abs 206
Evaluación de la reactividad cruzada en la detección 207
Calibrados y características analíticas 208
Estabilidad de almacenamiento 209
Estudio de selectividad 210
Aplicación al análisis de muestras de suero 211
Bioplataforma electroquímica cuádruple para la determinación de autoanticuerpos frente a DNA de doble cadena (dsDNA-Abs) 216
Optimización de las variables experimentales 217
Evaluación de la viabilidad de multiplexado 219
Estudio de selectividad 220
Calibrados y características analíticas 221
Aplicación al análisis de muestras de suero 222
Bioplataforma electroquímica cuádruple para la determinación de autoanticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles (ENAs-Abs)..... 229
Optimización de las variables experimentales 230
Evaluación de la viabilidad de multiplexado 236
Calibrados y características analíticas 236
Estabilidad de almacenamiento 238
Estudio de selectividad 239
Aplicación al análisis de muestras de suero 241
Aplicación de las bioplataformas desarrolladas para la determinación óctuple de autoanticuerpos frente a dsDNA (dsDNA-Abs) y frente a ENAs (ENAs-Abs).... 252

Parte II. Plataformas biosensoras electroquímicas para la determinación de biomarcadores proteínicos 254

3.3. Desarrollo de bioplataformas electroquímicas individuales..... 255

3.3.1. Bioplataforma electroquímica asistida por micropartículas magnéticas 255
Bioplataforma electroquímica para la determinación de metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9)..... 255
Optimización de las variables experimentales. 256
Características analíticas y operacionales 259
Estabilidad de almacenamiento 261
Estudio de selectividad 262
Aplicación al análisis de muestras de suero y lisados celulares..... 263

3.4. Desarrollo de bioplataformas electroquímicas multiplexadas 267

3.4.1. Bioplataforma electroquímica en formato integrado 267

Bioplataforma electroquímica dual para la determinación de BAFF y APRIL 267

Nanoestructuras binarias de MoS_2 y nanotubos de carbono 268

Optimización de las variables experimentales 274

Estudio de caracterización electroquímica 281

Estudio de selectividad 284

Evaluación de la reactividad cruzada en la detección 284

Calibrados y características analíticas 285

Estudio de estabilidad de almacenamiento 289

Aplicación al análisis de muestras de suero y extractos celulares 291

3.4.2. Bioplataforma electroquímica asistida por MBs 298

Bioplataforma electroquímica dual para la determinación de BAFF y APRIL 298

Optimización de las variables experimentales 299

Evaluación de la reactividad cruzada en la detección 304

Calibrados y características analíticas 306

Estabilidad de almacenamiento 308

Estudio de selectividad 309

Aplicación al análisis de muestras de suero y extractos celulares 310

Capítulo 4. Conclusiones – Conclusions 319

Conclusiones 321

Conclusions 323

Bibliografía 325

Anexo 377

Glosario de abreviaturas 379

Contribución, difusión y transferencia de resultados 391

Publicaciones – Published papers 401

RESUMEN

ABSTRACT

RESUMEN

HERRAMIENTAS BIOELECTROANALÍTICAS DE VANGUARDIA PARA DETECTAR ENFERMEDADES AUTOINMUNES, NEURODEGENERATIVAS Y CÁNCER

A lo largo de los años ha persistido una incesante demanda investigadora, científica y tecnológica, cuyo fin reside en mejorar la calidad de vida de los seres humanos a través del avance de la medicina personalizada, buscando diagnósticos tempranos y fiables y la monitorización de enfermedades con el objetivo de adaptar los tratamientos en función de las características del paciente y el estadio de su enfermedad. Gracias al descubrimiento y estudio de los biomarcadores, se ha conocido el papel fundamental que desempeñan tanto en la identificación temprana de eventos clínicos como en la minimización de errores en el diagnóstico, y su capacidad para proporcionar información sobre la evolución de las enfermedades y la respuesta al tratamiento. Sin embargo, dada la complejidad de los sistemas biológicos, la evaluación de un único biomarcador conlleva a tomar decisiones menos robustas y fiables que cuando se analizan varios simultáneamente. Por ello, los avances en investigación y gestión de enfermedades prevalentes, con elevada mortalidad y morbilidad, se han centrado en análisis de biomarcadores clínicos con valor predictivo, de diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento. Se persigue el desarrollo de tecnologías sencillas y de bajo coste, con carácter multiplexado o multiómico, mínimamente invasivas, aplicables en diferentes entornos y por personal no especializado, capaces de identificar y determinar de forma robusta y fiable paneles de biomarcadores determinantes para avanzar en la medicina de precisión y mejorar la atención médica.

Los avances experimentados estos últimos años por los biosensores y, en particular, por los basados en transducción electroquímica, han confirmado su potencial como tecnologías competitivas frente a las tradicionales en términos de simplicidad, coste, carácter multiplexado y/o multiómico y aplicabilidad en el punto de necesidad para la identificación y determinación sensible y selectiva de biomarcadores en muestras de complejidad variada y elevada. Todos estos atributos hacen que actualmente se consideren herramientas clave en la vanguardia de los avances científicos en el campo médico.

Por todo ello, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido el **diseño, optimización, desarrollo y aplicación de bioplataformas electroquímicas disruptivas para la detección y determinación de biomarcadores asociados a enfermedades prevalentes, asistiendo a su diagnóstico fiable en muestras mínimamente invasivas**. Se han propuesto estrategias de inmovilización y detección novedosas y pioneras, basadas en formatos de ensayos implementados directamente sobre superficies electródicas desechables o de micropartículas magnéticas (MBs), que han demostrado su atractivo e idoneidad para diagnóstico y pronóstico de enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer, así como para establecer una relación entre ellas mediante el análisis individual o múltiple de biomarcadores candidatos en muestras de biopsias sólidas o líquidas. Además, se ha demostrado que son bioherramientas competitivas frente a las metodologías convencionales disponibles actualmente por sus excelentes características analíticas, en términos de sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, tiempos de ensayo reducidos y por permitir el análisis sencillo de las dianas en tan solo unos pocos microlitros de muestra sin tratamiento previo o mínimamente tratada. Asimismo, todas estas ventajas junto con su versatilidad de diseño, su viabilidad para la determinación multiplexada y su compatibilidad con dispositivos en el punto de atención las acerca hacia la tan buscada medicina personalizada que mejorará la calidad de vida de los pacientes y su supervivencia, y asegurará el aprovechamiento racional de los recursos sociales.

Las investigaciones llevadas a cabo en el marco de esta Tesis Doctoral se han presentado en diferentes capítulos, comentados concisamente a continuación, de acuerdo con el propósito de estudio.

El **primer capítulo** se compone, por un lado, de una breve visión acerca de los biomarcadores y su relevancia en las enfermedades prevalentes estudiadas: enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer y, por otro lado, una inmersión en el mundo de los biosensores y, específicamente, de los electroquímicos.

Así, en el *primer apartado* de este capítulo se introducen los biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y monitorización asociados al sistema inmune y nervioso y se describe cómo su desregulación alerta de la presencia de enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer.

En el *segundo apartado*, tras una breve actualización histórica de los biosensores, se exponen los componentes de éstos, sus propiedades y características y las subclasificaciones establecidas en función de ellos. Se profundiza en la transducción electroquímica empleando electrodos serigrafiados como herramienta potencial para la detección de los biomarcadores relevantes, en las estrategias de inmovilización directa o indirecta de elementos de reconocimiento empleando micropartículas magnéticas o sustratos electródicos desechables y se destacan las propiedades amplificadoras de los nanomateriales.

En el **segundo capítulo** se especifican la instrumentación, disoluciones y reactivos requeridos en los procedimientos experimentales empleados para desarrollar las bioplataformas electroquímicas y las muestras empleadas para su aplicación. Igualmente, se detallan las técnicas utilizadas para la detección electroquímica y para la caracterización de las superficies y nanomateriales, las metodologías usadas con fines de comparación y, finalmente, se explica brevemente el tratamiento estadístico de datos.

El **tercer capítulo** examina los aspectos más relevantes derivados de los estudios de investigación para los dos tipos principales de biomarcadores (autoanticuerpos y biomarcadores proteínicos) analizados a lo largo de la Tesis Doctoral.

La *parte I* discute los resultados obtenidos con las bioplataformas electroquímicas individuales o multiplexadas desarrolladas en formatos integrado o asistidos por MBs empleando electrodos serigrafiados de carbono con uno, dos, cuatro u ocho electrodos de trabajo para la determinación de *autoanticuerpos* relevantes en enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas.

La *parte II* examina los resultados derivados de una bioplataforma electroquímica individual asistida por MBs o dos duales, una en formato integrado empleando nanomateriales como estrategia de amplificación de la señal, y otra asistida por MBs, para el análisis de *biomarcadores proteínicos* asociados con el cáncer y con enfermedades autoinmunes.

La Memoria termina con un capítulo de **conclusiones** en el que se destacan los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos, las principales aportaciones de las investigaciones a la ciencia y a la sociedad y posibles perspectivas futuras.

Se incluye además un **Anexo** donde se aportan los PDFs de los trabajos publicados en revistas científicas y se detallan las actividades de internacionalización realizadas en el marco de esta Tesis Doctoral.

ABSTRACT

CUTTING-EDGE BIOELECTROANALYTICAL TOOLS TO DETECT AUTOIMMUNE, NEURODEGENERATIE AND CANCER DISEASES

Over the years, there has been an incessant demand for scientific and technological advancements aimed at improving the quality of life of human beings through personalized medicine. The goal is to achieve early and reliable diagnoses and diseases monitoring in order to adapt treatments according to the patient's characteristics and disease status. Thanks to the discovery and study of biomarkers, the fundamental role they play both in the early identification of clinical events and minimizing errors in diagnosis and their ability to provide information on the evolution of diseases and response to treatment, has been recognized.

However, given the complexity of biological systems, assessing a single biomarker can lead to less robust and reliable decisions than analyzing multiple biomarkers simultaneously. Therefore, research and management of prevalent diseases with high mortality and morbidity have focused on clinical biomarker analyses with predictive, diagnostic, prognostic and/or monitoring value. The aim is to develop simple, low-cost, multiplexed or multi-omics, minimally invasive technologies, applicable in different environments and can be used by non-specialised personnel. These technologies should be capable of robustly and reliably identifying and determinining panels of determinant biomarkers to advance precision medicine and improve medical care.

Recent advances in biosensors, particularly those based on electrochemical transduction, have confirmed their potential as competitive technologies compared to traditional ones in terms of simplicity, cost, multiplexed and/or multi-omics character, and applicability at the point of care for the sensitive and selective identification and determination of biomarkers in samples of varying and high complexity. All these attributes make them key tools at the forefront of scientific advances in the medical field.

Therefore, the main objective of this PhD Thesis has being the **design, optimization, development and application of disruptive electrochemical bioplatforms for the detection and determination of biomarkers related to prevalent disesases, assisting their reliable diagnosis in minimally invasive samples**. Novel and pioneering immobilization and detection strategies, based on assay formats implemented directly on disposable electrodes or magnetic microparticles (MBs) surfaces, have been proposed and have proven their attractiveness and suitability for the diagnosis and prognosis of autoimmune, neurodegenerative and cancer diseases, as well as for establising a relationship between them by single or multiple analysis of candidate biomarkers in solid or liquid biopsy samples. Furthermore, they have been shown to be competitive biotools compared to currently available conventional methodologies due to their excellent analytical characteristics, in terms of sensitivity, selectivity and reproducibility, short assay times, and by allowing the simple analysis of targets in just a few microlitres of untreated or barely treated samples. Likewise, all these advantages together with their versatility of design, feasibility for multiplexed determination and compatibility with point-of-care devices bring them closer to the much sought-after personalized medicine that will improve patients' quality of life and survival and will ensure the rational use of social resources.

The investigations carried out within this PhD Thesis have been presented in different chapters, briefly commented below, according to the purpose of the study.

The **first chapter** consists, on the one hand, of a concise overview of biomarkers and their relevance in the prevalent diseases studied: autoimmune, neurodegenerative diseases and cancer, and, on the other hand, an immersion into the biosensors field and, specifically, into the electrochemical ones.

Thus, the *first section* of this chapter introduces the diagnostic, prognostic and monitoring biomarkers related to the immune and nervous system, and describes how their dysregulation alerts to the presence of autoimmune, neurodegenerative and cancer diseases.

The *second section*, after a brief historial update on biosensors, explains their components, properties and characteristics, and the subclassification established according to them. Electrochemical transduction using screen-printed electrodes as a potential tool for the detection of relevant biomarkers, direct or indirect immobilization strategies of the recognition elements using magnetic microparticles or disposable electrode substrates, and the amplifying properties of nanomaterials are highlighted.

The **second chapter** specifies the instrumentation, solutions and reagents required in the experimental procedures used to develop the electrochemical bioplatforms, and the samples used for their application. It also details the techniques used for the electrochemical detection and the surfaces and nanomaterials characterization, the methodologies for comparison purposes and, finally, a short explanation of the statistical treatment of data.

The **third chapter** examines the most relevant aspects derived from research studies conducted for the two main types of biomarkers (autoantibodies and protein biomarkers) analyzed throughout the Doctoral Thesis.

Part I: discusses the results obtained with single or multiplexed electrochemical bioplatforms developed in integrated or MBs-assisted formats, using screen-printed carbon electrodes with one, two, four or eight working electrodes for the determination of relevant *autoantibodies* in autoimmune and neurodegenerative diseases.

Part II: discusses the results of a single electrochemical bioplatform assisted by MBs or two dual electrochemical platforms, the first one in integrated format using nanomaterials as signal amplification strategy, and the second one assisted by MBs, all intended for the analysis of *protein biomarkers* related to cancer and autoimmune diseases.

The Thesis ends with a chapter of **conclusions** that highlights the most relevant aspects of the results obtained, the main contributions of the research to science and society and possible future perspectives.

An **Annex** is also included where the PDFs of the published articles in scientific journals are included, and the internationalization activities carried out within the framework of this Doctoral Thesis are detailed.

OBJETIVOS

Y

PLAN DE TRABAJO

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El incesante esfuerzo por avanzar hacia una medicina de precisión con un enfoque innovador, donde la aplicación de terapias estandarizadas evoluciona hacia un cuidado de la salud personalizado capaz de adaptar los tratamientos de acuerdo con las características individuales de cada paciente, ha permitido mejorar la salud pública, optimizando la eficacia de los tratamientos y reduciendo posibles efectos adversos sobre los individuos. Por ello, el diagnóstico temprano, que se sabe juega un papel fundamental en este avance, ha escalado a primeras posiciones. Lograr detectar las enfermedades en sus etapas iniciales, antes de los primeros síntomas evidentes, permite adelantar el comienzo del tratamiento terapéutico e incrementar significativamente las posibilidades de controlar, e incluso, curar las enfermedades. Además, no solo ofrece la posibilidad de conseguir tratamientos exitosos, sino que ayuda a la prevención de complicaciones graves, reduciendo la carga económica y emocional de los pacientes cuando las enfermedades se diagnostican en estadios avanzados.

En este sentido, los biosensores han captado la atención de la mayoría de los estudios al haberse convertido en herramientas prometedoras y con eminente potencial capaces de detectar con elevada sensibilidad y precisión biomarcadores específicos de enfermedades prevalentes en muestras biológicas nada o mínimamente invasivas. La viabilidad para detectar niveles ínfimos, concentraciones de pico, e incluso femto, de una gran variedad de biomarcadores desregulados antes de que aparezcan los primeros síntomas clínicos ha contribuido indudablemente a mejorar la efectividad en los tratamientos y a avanzar en la investigación e implementación de la medicina personalizada. A todo ello se suma la posibilidad de monitorización longitudinal de los biomarcadores, proporcionando información esencial sobre la progresión de las enfermedades y la eficacia de los tratamientos, permitiendo el ajuste de las terapias según la respuesta individual. Además, la capacidad de fabricar dispositivos cada vez más pequeños, portátiles y capaces de operar en el punto de atención ha permitido la integración de los biosensores en dispositivos de uso doméstico, vestibles e incluso implantables, haciéndolos, por un lado, más accesibles y convenientes para los pacientes y, por otro lado, ampliando tremendamente sus posibilidades en el ámbito clínico.

En definitiva, los biosensores ofrecen una combinación única de sensibilidad, especificidad, rapidez, portabilidad, facilidad de uso, coste y capacidad de miniaturización y multiplexación que los ha convertido en herramientas valiosas para una amplia gama de aplicaciones, tanto clínicas como ambientales y alimentarias.

Como consecuencia, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido el diseño, desarrollo y aplicación de bioplataformas electroquímicas de vanguardia para la determinación rápida, sensible, selectiva y multiplexada de biomarcadores de respuesta humoral y/o inflamatoria de relevancia emergente en enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer. Desde el primer momento se ha pretendido ofrecer nuevas alternativas capaces de superar las limitaciones de las metodologías disponibles adoptando estrategias novedosas y multidisciplinares mediante el desarrollo de biosensores electroquímicos de fácil manejo, tiempos de respuesta cortos, compatibles con su empleo en el punto de atención y cuyos resultados, fiables y cuantitativos, faciliten tomar decisiones clínicas objetivas e inmediatas que permitan detectar las enfermedades en estadios tempranos y mejoren la fiabilidad del diagnóstico y con ello la eficiencia de las terapias, respondiendo a las necesidades de la medicina de precisión actual.

Los resultados obtenidos y presentados en esta Memoria con las bioplataformas electroquímicas desarrolladas en el laboratorio del Grupo de Investigación de Electroanálisis y (Bio)Sensores Electroquímicos (GEBE) del departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid han sido producto de una colaboración estrecha con el Grupo de Investigación ProteoFun de la Unidad de Proteómica Funcional del Instituto de Salud Carlos III de Madrid (UFIEC-ISCIII). En el marco de esta Tesis Doctoral, esta cooperación ha resultado muy importante para la producción de elementos de biorreconocimiento obtenidos con técnicas novedosas, para el suministro de muestras séricas y celulares adecuadamente procesadas y tratadas, y para la realización de exhaustivos tratamientos estadísticos que confirmen el potencial diagnóstico de los biomarcadores estudiados y establezcan valores de corte para asistir en problemáticas clínicas de relevancia.

Para desarrollar bioplataformas disruptivas que ofrezcan características competitivas frente a las convencionales y/o de última generación y con aplicabilidad en el mundo real, se ha seguido un planteamiento metodológico por etapas sucesivas:

1. Selección de los biomarcadores de interés de acuerdo con su potencial para asistir al diagnóstico, pronóstico y monitorización de enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer y que incluyen autoanticuerpos frente a: acuaporina-4 (AQP4-Abs), centrómero B (CENPB-Abs), centrómero A (CENPA-Abs), DNA de cadena doble (dsDNA-Abs), antígenos nucleares extraíbles (ENAs; anti-La/SSB, anti-Ro/SSA, anti-U1RNP70, anti-smRNP); citoquinas: BAFF y APRIL; y proteasas: metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9).
2. Diseño y selección de biorreceptores, de formatos de ensayo y de estrategias de amplificación para la determinación sensible y selectiva individual o multiplexada de los

biomarcadores diana: implementación directa sobre la superficie de trabajo de electrodos serigrafiados de carbono o empleo de partículas magnéticas (MBs) y de nanomateriales.

3. Preparación, optimización, caracterización y puesta a punto de las bioplataformas electroquímicas mediante el estudio de variables experimentales determinantes en su fabricación y funcionamiento.
4. Evaluación de las características analíticas y operacionales, selectividad y estabilidad de almacenamiento de las bioplataformas electroquímicas desarrolladas para la determinación de estándares adecuados.
5. Aplicación de las bioplataformas desarrolladas a la determinación individual o múltiple de los biomarcadores diana en muestras clínicamente relevantes de diferente naturaleza y complejidad de individuos sanos y pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, SLE; artritis reumatoide, RA; Síndrome de Sjögren, SS; Síndrome de CREST, SSc), neurodegenerativas (enfermedad del Alzheimer, AD) y cáncer (cáncer de mama, BC; cáncer colorrectal, CRC).
6. Comparación de los resultados que proporcionan las bioherramientas electroquímicas con los de metodologías convencionales (ELISA, *Western Blot*) y análisis estadístico de los resultados para confirmar el potencial diagnóstico de los biomarcadores, establecer valores de corte e identificar firmas características en escenarios particulares

CAPÍTULO 1.

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS EN EL ÁMBITO CLÍNICO

1.1. BIOMARCADORES DE RELEVANCIA EMERGENTE PARA DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE ENFERMEDADES PREVALENTES

El sino idílico dentro de la investigación clínica se sustenta en personalizar la atención médica para elaborar diagnósticos fiables, capaces de realizar monitorizaciones de enfermedades de forma descentralizada con el fin de adaptar los tratamientos en función de cada paciente y su estadio mejorando su eficiencia y minimizando posibles efectos secundarios. Con este fin, y gracias al potencial de los biomarcadores para detectar de forma temprana diversas neoplasias, reducir la tasa de diagnósticos erróneos y proporcionar información sobre la evolución, pronóstico y la respuesta al tratamiento [Mayeux, 2004], multitud de estudios se han enfocado hacia la posibilidad de establecer correlaciones entre las enfermedades y los cambios observados en distintas biomoléculas, estudiando sus niveles de expresión para mejorar el diagnóstico y el pronóstico de los pacientes.

El término "biomarcador" apareció por primera vez en artículos relacionados con el ámbito biológico en los años 70 del siglo pasado al ser empleado por Order y cols. [Order, 1977], modificado a finales de 1940 por Mundkur [Mundkur, 1949] como "marcadores bioquímicos" y de 1950 por Porter [Porter, 1957] como "marcadores biológicos". A principios de la década de 1980, Shubik [Shubik, 1983] empleó como sinónimo de biomarcador el término "marcador sustitutivo/subrogado", aunque no fue hasta mediados de esa década cuando Friedman, Furberg y De Mets [Friedman et al., 1985] lo plasmaron en un libro de ensayos clínicos. En este momento, se consideró que los biomarcadores representaban indicadores sensibles y específicos para evaluar las enfermedades, utilizándolos como sustitutivos de los criterios de valoración clínicos basados en conocimientos puramente teóricos y el sentido común. A finales de esa década, Hulka y cols. [Hulka & Wilcosky, 1988] especificó que los biomarcadores eran alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares medibles en medios biológicos como células, tejidos o fluidos humanos. Considerando todos estos antecedentes, y que el campo de los biomarcadores era un conjunto de términos confusos, a principios de la década de los 2000 los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. (NIH) establecieron una única definición para biomarcador: característica definida medible y evaluable objetivamente como indicación de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas para una intervención terapéutica. Sin embargo, algunas controversias en la descripción, como la objetividad en la evaluación, han llevado a establecer nuevas definiciones en las últimas décadas. Es por ello por lo que, por ejemplo, a mediados de la década de 2010 Fitzgerald [FitzGerald, 2016] los redefinió como una variante funcional o índice cuantitativo de un proceso biológico que permite predecir o reflejar la predisposición o evolución de una enfermedad o terapia (***figura 1.1***).

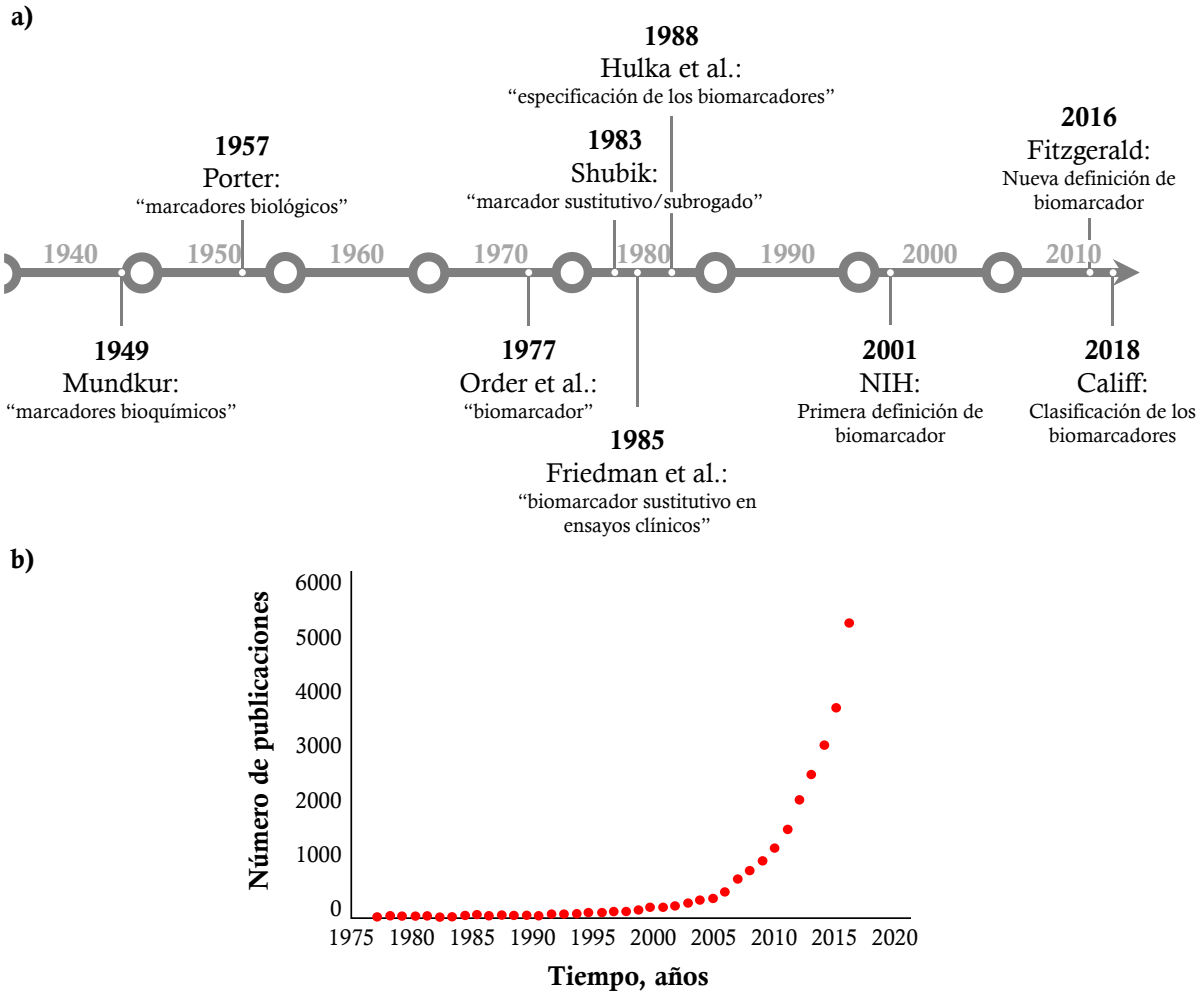


Figura 1.1. a) *Línea del tiempo de la evolución del uso del término "biomarcador".* ***b)*** *Número de publicaciones indexadas bajo los términos "biomarcador(es)", "marcador(es) subrogado(s)" y "criterio de valoración subrogado" en PubMed.*

No obstante, a pesar de todos los intentos, las definiciones se han considerado incompletas o cuestionables por pretender describir aspectos específicos [Aronson & Ferner, 2017]. Por ello, se han clasificado y definido los biomarcadores en subtipos de acuerdo con sus aplicaciones, siendo importante resaltar que un mismo biomarcador puede presentar múltiples criterios para diferentes usos. Además, aunque se puedan solapar estas definiciones, detallan características claramente distinguibles que permiten especificar las aplicaciones, de forma que se puede identificar correctamente el biomarcador, su relevancia para las enfermedades y su método de detección [Califf, 2018].

De esta manera, se ha definido una gran variedad de subtipos de biomarcadores que incluyen biomarcadores de diagnóstico, de pronóstico, predictivos, de monitorización y de detección temprana.

Los biomarcadores de diagnóstico son aquellos que permiten detectar o confirmar la existencia de una enfermedad o condición de interés, permitiendo incluso clasificar entre subtipos de una misma enfermedad. Uno de los propósitos de la investigación actual es desarrollar métodos de validación capaces de asegurar la detección y determinación fiable, precisa y reproducible del biomarcador diana empleando tecnologías de bajo coste que puedan ser utilizadas en análisis de rutina por personal no especializado.

Los biomarcadores de pronóstico se emplean para identificar la probabilidad de que ocurra un acontecimiento clínico, reaparición o progresión de la enfermedad en pacientes con una afección médica de interés. Generalmente, se utilizan en estudios de rutina con el fin de establecer los criterios para identificar poblaciones de riesgo. A diferencia de los biomarcadores predictivos que indican la probabilidad de que un paciente responda a un tratamiento específico, los de pronóstico se asocian con los resultados diferenciales de la enfermedad.

Un biomarcador es considerado de monitorización cuando puede ser medible secuencialmente para evaluar el estado de una enfermedad o condición médica tras los efectos de exposición a agentes que puedan afectar al estado del paciente. Si bien este concepto se solapa con otras categorías de los biomarcadores, tiene importantes aplicaciones en los ensayos clínicos. Así, los cambios observados por la medida de éstos facilitarán el estudio de la evolución del curso clínico de la enfermedad o trastorno, lo que ayudará a la toma de decisiones respecto a la situación del paciente o a la efectividad de los tratamientos farmacológicos en estudio [Cagney et al., 2018].

Teniendo en cuenta que los sistemas biológicos son complejos y multidimensionales, no es posible relacionar un único biomarcador con una enfermedad o trastorno, y se persigue la determinación simultánea de biomarcadores específicos para mejorar la fiabilidad en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades. Es por ello por lo que en los últimos años las investigaciones en el ámbito médico han buscado mejorar las condiciones y calidad de vida de los pacientes mediante la predicción del pronóstico de enfermedades prevalentes, desarrollo de tratamientos personalizados y la monitorización de la respuesta terapéutica a través del desarrollo y empleo de tecnologías sencillas y de bajo coste, aplicables tanto en entornos hospitalarios como domésticos para la identificación, determinación y validación de biomarcadores clínicamente relevantes, contribuyendo de esta manera al avance de la medicina de precisión y la atención médica individual.

Actualmente, los avances en la investigación y el tratamiento de enfermedades prevalentes, como el cáncer y las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, han mejorado significativamente los tratamientos terapéuticos. De hecho, está ampliamente aceptado que un diagnóstico temprano es la clave para mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes, así como para reducir la carga económica que supone la gestión de las enfermedades a los sistemas nacionales de salud. Hoy en día se sabe que la determinación de ciertos biomarcadores permite la detección de una enfermedad años antes de que aparezcan los primeros síntomas clínicos.

Los biomarcadores pueden identificarse y analizarse en un extenso abanico de matrices biológicas que incluyen, entre otras, tejidos, células o biofluidos como sangre circulante (suero, plasma y linfa), orina, saliva, sudor, fluidos genitales, leche materna o líquido cefalorraquídeo (***figura 1.2***) [Menetski et al., 2019].

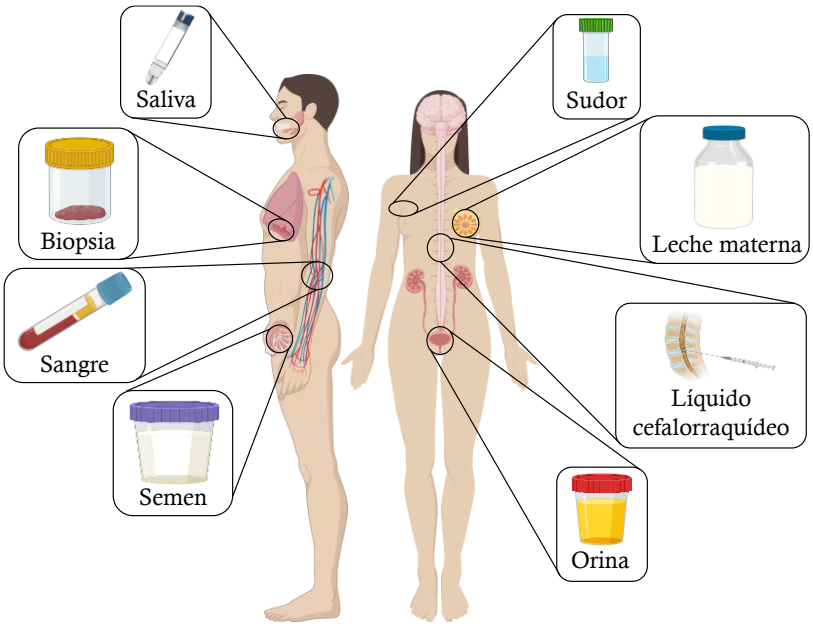


Figura 1.2. *Ejemplos de matrices biológicas humanas para el análisis de biomarcadores.*

La elección de la matriz biológica adecuada para la detección de los biomarcadores se ha considerado uno de los principales retos para los investigadores debido a que los niveles del biomarcador diana pueden variar en función de esta, llegando a ser indetectables en algunas muestras por diversas técnicas analíticas. Además, la detección ideal se llevaría a cabo en muestras lo menos invasivas posible, como son los fluidos biológicos secretados fuera del cuerpo: orina, saliva, sudor… En general, se considera que el análisis en este tipo de muestras, a diferencia de las obtenidas por técnicas invasivas, puede realizarse de forma sencilla, rápida, continuada y sin representar riesgos para el individuo, facilitando la fabricación y empleo de dispositivos portátiles y en el punto de atención [Martin et al., 2010; Zhang et al., 2020]. Sin embargo, la realidad práctica es que cada muestra biológica presenta ventajas y desventajas en términos de cantidad y facilidad de toma de muestra, condiciones de almacenamiento y estabilidad, pretratamiento para el análisis, etc., que resultan determinantes a la hora de seleccionarlas [De Bock et al., 2010].

Sobre la base de estos precedentes, los estudios de investigación clínica actuales, y en concreto, en esta Tesis Doctoral, se han centrado en identificar nuevos biomarcadores relacionados con las enfermedades prevalentes, y en particular con las enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer, con el fin de mejorar su diagnóstico, seguimiento y pronóstico.

1.1.1. BIOMARCADORES DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Sistema inmune

El sistema inmune es una intrincada constelación evolutiva, compleja y potente de elementos celulares y moleculares encargada de proteger al organismo de agentes patógenos, conocidos como antígenos, siendo capaz de discriminar entre lo propio y lo externo, así como entre lo externamente inofensivo y dañino. Actúa a través de dos vías de respuesta complementarias divididas en función de su velocidad de acción y especificidad (***figura 1.3***): la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Ambos sistemas trabajan de manera integrada, siendo el sistema innato el que activa al adquirido y éste utiliza los mecanismos del primero para eliminar a los agentes patógenos [Toche, 2012], tal y como se esquematiza en la ***figura 1.4***.

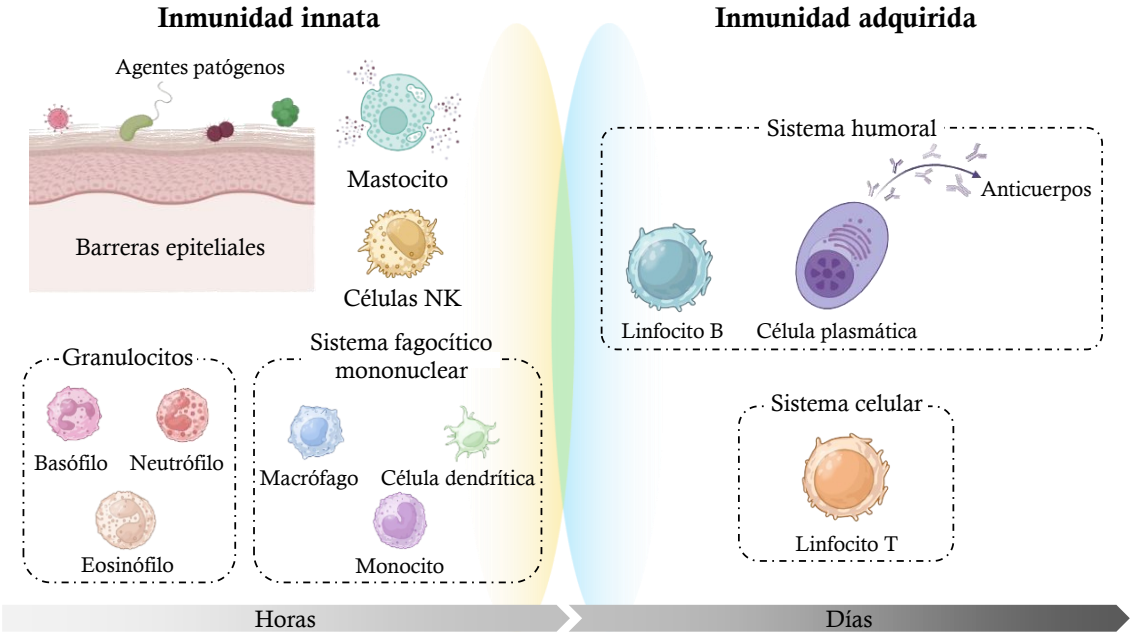


Figura 1.3. *Representación esquemática de los componentes del sistema inmune.*

La inmunidad innata es un complejo de barreras físicas y químicas, como la piel, las mucosas o el pH, y células inmunes que reaccionan de manera rápida y generalizada, mientras que la inmunidad adquirida, formada por moléculas como linfocitos, anticuerpos o citoquinas, requiere de activación previa y es específica del antígeno, por lo que su respuesta requiere más tiempo. A pesar de que esquemáticamente pueden parecer dos modos de respuesta diferentes, su mecanismo de acción está intrínsecamente relacionado, teniendo componentes inmunes compartidos.

El mecanismo de acción del sistema inmune comienza con la respuesta innata, siendo las barreras corporales la primera línea de defensa frente a los patógenos. Si éstos logran perturbarlas y traspasarlas, por un lado, se desencadenan respuestas inflamatorias agudas que dilatan los vasos sanguíneos para permitir la entrada de otras células inmunes y, por otro lado, se activa el sistema

del complemento, que está formado por un conjunto de proteínas. Estas, en su forma inactiva, son producidas en el hígado y están presentes en el torrente sanguíneo y en los tejidos. Cuando interaccionan con los agentes dañinos forman complejos multiméricos que pueden alterar las membranas patogénicas e inducir la lisis de éstos o marcar al patógeno para facilitar su reconocimiento por granulocitos y/o células fagocíticas.

Las células madre hematopoyéticas, originarias de la médula ósea, se diferencian en células linfoideas, que dan lugar a los linfocitos del sistema inmune adquirido, o en células mieloides, relativas al sistema inmune innato. Estas células, entre las que se encuentran los macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, migran y son capaces de adherirse a las moléculas patógenas y formar una vesícula de fagocitosis, conocida como fagosoma, que al fusionarse con lisosomas y orgánulos con enzimas digestivas deriva en el fagolisosoma, que finalmente degradará al patógeno en compuestos más pequeños. En particular, los macrófagos y las células dendríticas, también conocidos como células presentadoras de antígenos (APC del inglés *antigen-presenting cells*) procesan los antígenos patogénicos y sus fragmentos, lo que contribuye a la liberación de otras moléculas señalizadoras, como son las citoquinas, y a la activación de células del sistema inmune adquirido [Parkin & Cohen, 2001; McComb et al., 2019].

Por otra parte, las células madre hematopoyéticas de la médula ósea también se diferencian en células naturales asesinas (NK, del inglés *natural killer*), que ofrecen protección al organismo sin activación previa mediante el reconocimiento y destrucción citolítica de células alteradas, bien afectadas por virus o tumorales, a través de la unión a las células antígeno por receptores de superficie para secretar gránulos citotóxicos que contienen perforinas, para formar poros en la membrana y granzimas, que inducen la apoptosis [Paust & von Andrian, 2011].

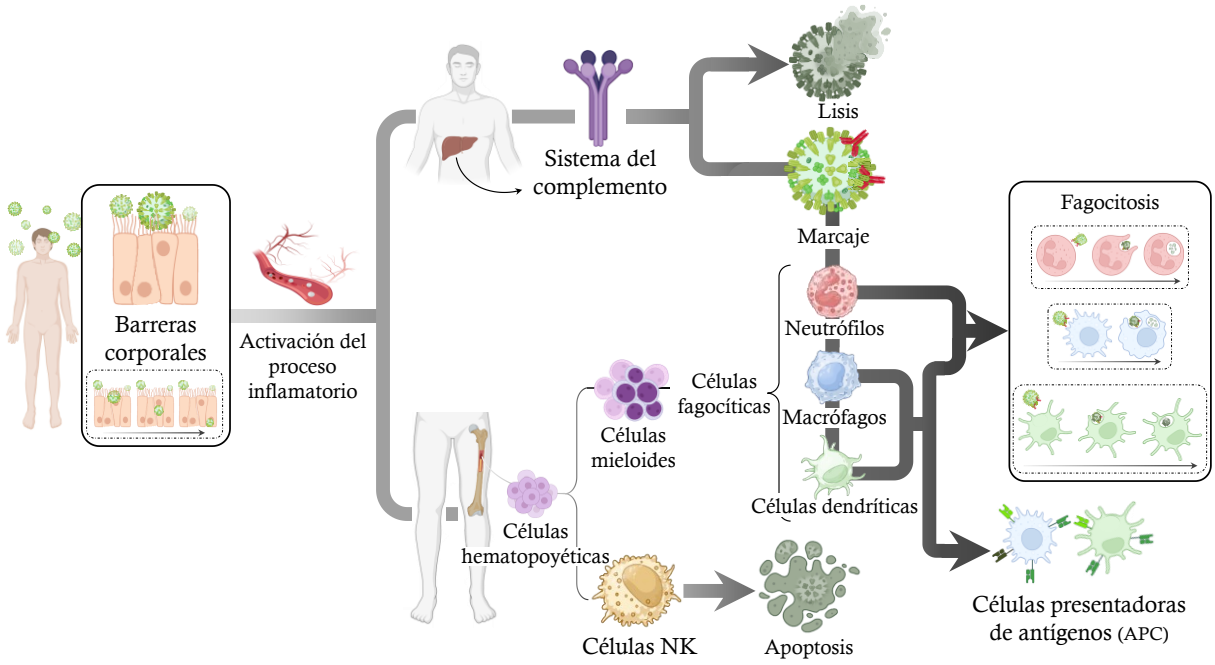


Figura 1.4. *Esquema de la respuesta inmune innata.*

A diferencia de la respuesta inmune innata, el sistema inmune adquirido o adaptativo requiere de activación para proporcionar respuestas específicas contra patógenos. Las células del sistema inmune adaptativo incluyen los linfocitos B, células formadas en la médula ósea y productoras de anticuerpos; y los linfocitos T, células que se forman y maduran en el timo y son efectoras de la respuesta inmunitaria celular. Una vez formados y madurados en los órganos primarios, los linfocitos se liberan a la sangre para distribuirse por todo el cuerpo, migrando a órganos secundarios como los ganglios linfáticos, bazo y amígdalas, donde circulan las células APC del sistema inmune innato, tras la captura y procesamiento de los antígenos patogénicos o fragmentos de éstos presentes en células infectadas, para presentarlos y activar los linfocitos T, que llevan a cabo la inmunidad celular, y los linfocitos B, que desarrollan la inmunidad humoral a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*) que detectan los patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMP, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) y asociados a peligros (DAMP, del inglés *danger-associated molecular patterns*) derivados del huésped o del entorno [Bonilla & Oettgen, 2010], como muestra la ***figura 1.5***.

Por un lado, los linfocitos T inactivos reconocen a través de su receptor al antígeno presentado por las células dendríticas, lo que deriva en la activación y diferenciación de linfocitos T efectores (citotóxicos, $CD8^+$, y colaboradores, $CD4^+$) y de memoria. Los linfocitos T pueden desempeñar un papel directo en la eliminación de patógenos, a través de los linfocitos T $CD8^+$ que liberan gránulos citotóxicos que inducen la apoptosis, o los linfocitos T $CD4^+$, cuya función se basa en actuar como células auxiliares que proporcionan señales cognitivas y liberan citoquinas que modularán la respuesta inmunitaria. Por último, también regulan las respuestas inmunes para reducir la autorreactividad o procesos excesivamente inflamatorios. Una vez que los linfocitos T activados han actuado frente al antígeno específico, una fracción de éstos se diferencia en células de memoria, esenciales para la inmunidad a largo plazo, proporcionando en caso de exposiciones repetidas del mismo antígeno una respuesta más rápida y efectiva [Abbas et al., 2009; Bonilla & Oettgen, 2010; Jäger & Kuchroo, 2010].

Las citoquinas son mediadores producidos y secretados tanto por células linfoides como por no linfoides que juegan un papel fundamental en la regulación y coordinación de las respuestas inmunes del sistema adquirido. Su principal clasificación proviene de los receptores a los que se unen, resultando en citoquinas de tipo I, familia hematopoyetina, y de tipo II, familia del interferón. Esta última gran familia está compuesta por ligandos relacionados estructuralmente, receptores e inhibidores que desempeñan diversas funciones implicadas tanto dentro como fuera del sistema inmune. Las citoquinas de tipo II, entre las que se encuentran TNFα, BAFF o APRIL, son mediadores fisiológicos de la inflamación secretados principalmente por los linfocitos T y las células mieloides para llevar a cabo sus funciones proinflamatorias, relacionadas con el buen desarrollo y funcionamiento del sistema inmune [O'Shea et al., 2019].

Por otro lado, los linfocitos B, a través de su receptor, reconocen al antígeno específico, que junto con la activación inducida por los linfocitos T colaboradores, canalizan la proliferación y diferenciación a células plasmáticas y de memoria. Al igual que ocurre en el caso de los linfocitos T, estas últimas otorgan inmunidad a largo plazo frente a los antígenos ya reconocidos. Asimismo, las células plasmáticas, forma activa de los linfocitos B, producirán y secretarán al sistema circulatorio y tejidos anticuerpos específicos frente al antígeno reconocido [Oracki et al., 2010; Pieper et al., 2013].

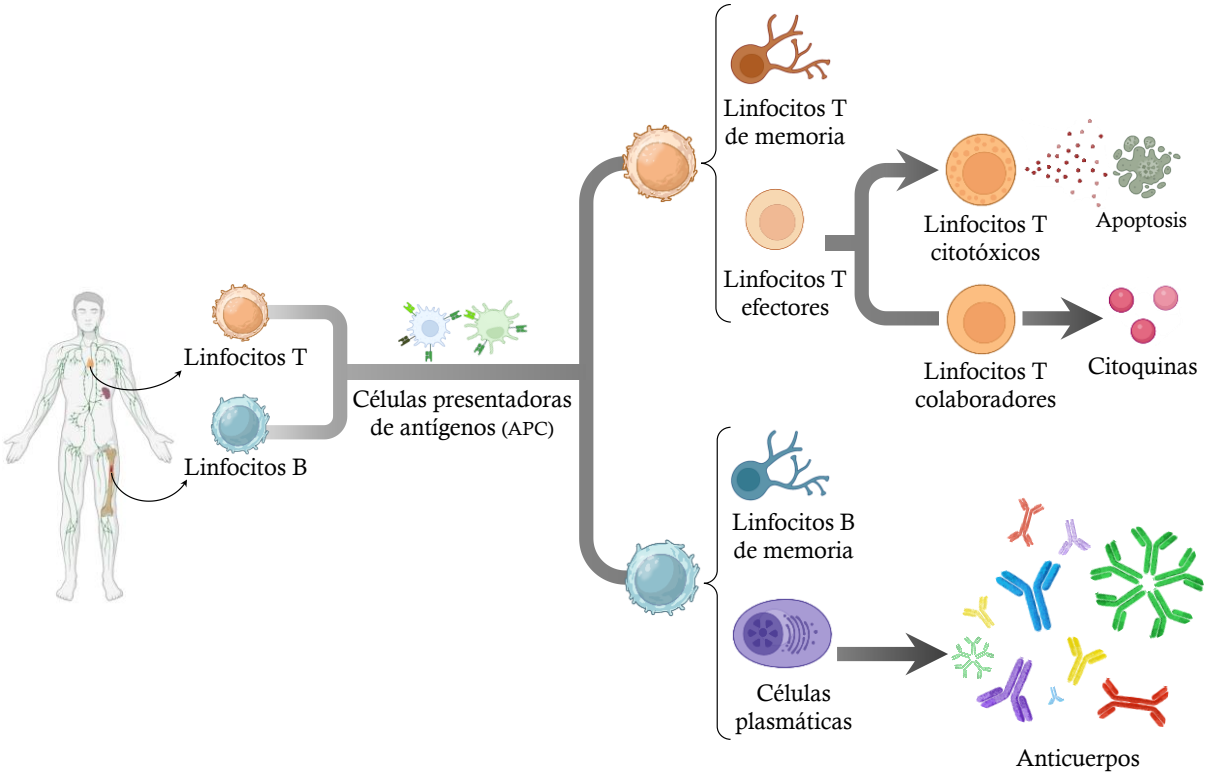


Figura 1.5. *Esquema de la respuesta inmune adquirida.*

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs) (***figura 1.6***) son esenciales para defender al organismo de infecciones y amenazas externas debido al papel fundamental que desempeñan en la respuesta inmune, con capacidad para neutralizar y bloquear a los patógenos y marcarlos para su reconocimiento por las células fagocíticas o para activar al sistema del complemento. Son glicoproteínas compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L), que conforman una región constante (Fc). Se distinguen diferentes clases de isotipos que incluyen inmunoglobulinas M (IgM), G (IgG), A (IgA), E (IgE) y D (IgD) con especificidades y momentos de actuación diversos; y una región variable (Fab) encargada de reconocer y unirse al antígeno específico [Novaretti & Dinardo, 2011].

Las inmunoglobulinas M (IgMs) se asocian con una respuesta inmunitaria primaria, por lo que clínicamente son útiles para el diagnóstico de infecciones agudas. En el desarrollo de los linfocitos B son expresadas en forma monomérica en la superficie de las células, pero la falta de

madurez se refleja en una baja afinidad al antígeno. Sin embargo, las interacciones multiméricas producidas por la estimulación antigénica derivan en su maduración formando multímeros, generalmente pentámeros, que tienden a ser más polirreactivos respondiendo a gran variedad de antígenos.

Las inmunoglobulinas G (IgGs), estructuralmente en forma de Y, son el isotipo más predominante y longevo del organismo, constituyendo alrededor del 70–80% de toda la concentración sérica de inmunoglobulinas. Las IgGs llevan a cabo la respuesta inmune secundaria, encargándose de neutralizar toxinas y patógenos, y gracias a su longevidad, proporcionan una protección duradera e inmunidad a largo plazo.

Las inmunoglobulinas A (IgAs), actúan principalmente en las mucosas y secreciones como saliva o leche materna contra los patógenos a través de la neutralización directa y/o impedimento para la interacción de éstos con la superficie. Su estructura puede ser mono o dimérica, forma esencial en su función protectora.

Por último, las inmunoglobulinas D (IgDs) y E (IgEs) son las de menor vida media, por lo que sus niveles séricos son los más bajos en el organismo. Mientras que las IgDs no presentan una función clara debido a que no participan en los mecanismos principales, las IgEs están asociadas con las reacciones de hipersensibilidad y alérgicas [Schroeder & Cavacini, 2010].

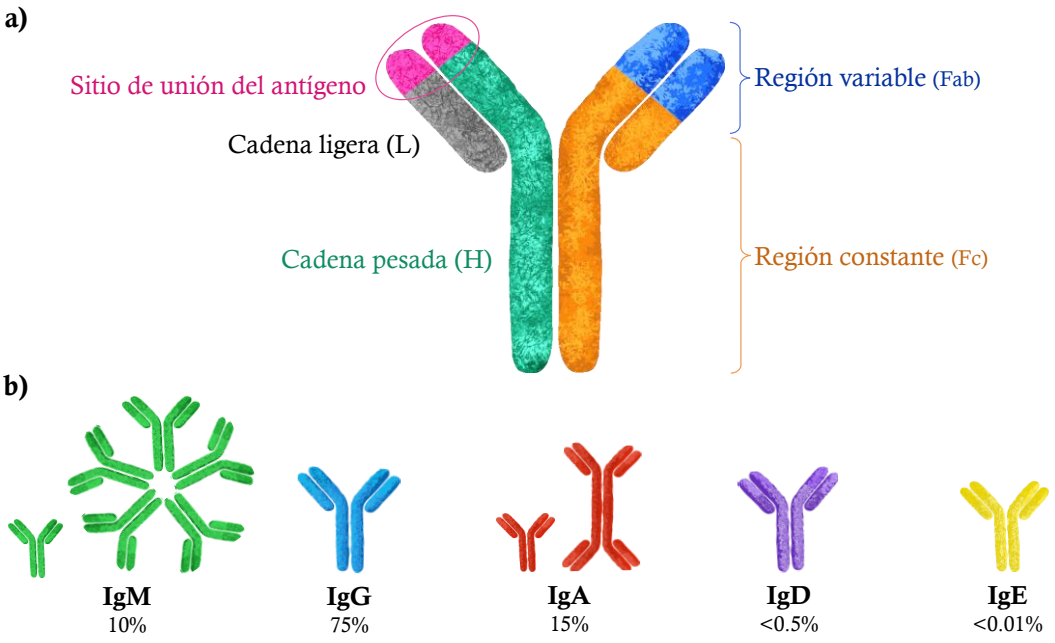


Figura 1.6. a) *Partes de un anticuerpo.* ***b)*** *Estructura y niveles séricos en porcentaje de los distintos isotipos de inmunoglobulinas.*

Enfermedades autoinmunes

Normalmente el sistema inmune es tolerante a las moléculas, células y tejidos del individuo, es decir, no reacciona contra componentes propios del organismo. Sin embargo, cuando se pierde la tolerancia, se produce un despliegue de autorreactividad frente a uno o varios componentes del propio organismo.

A lo largo del siglo XX se han desarrollado diversas teorías acerca del mecanismo de reconocimiento del sistema inmune y de las enfermedades autoinmunes, reconociendo en 1960 a Frank Macfarlane Burnet y Peter Brian con el Premio Nobel de Medicina por sus investigaciones sobre la tolerancia a los tejidos trasplantados. Las teorías propuestas a lo largo de décadas de investigación relativas a las enfermedades autoinmunes, que incluyen el modelo ideado por Janeway en 1989 basado en el concepto de la "infección-no propia" y el modelo de "peligro" de Matzinger descrito en 1994, han ofrecido una perspectiva más útil de la patogénesis de este tipo de trastornos [Bolon, 2010].

Inicialmente, las enfermedades autoinmunes fueron consideradas enfermedades raras, pero debido a su carácter epidemiológico, llegando a afectar al 5–8 % de la población mundial, y en mayor proporción al género femenino, se han colocado en la tercera categoría más común de enfermedades en países desarrollados, por detrás de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer [Cooper & Stroehla, 2003; Patrick, 2009], lo que ha redirigido a los estudios de investigación en medicina a descubrir los mecanismos inmunes que derivan en alguno de estos trastornos.

La tolerancia del sistema inmune está regulada por una red de interacciones secuenciales y bien reguladas entre las funciones inmunes innata y adquirida que garantiza el buen reconocimiento de los componentes propios. Sin embargo, cuando se desregulan los mecanismos que controlan el reconocimiento de los patógenos y se genera el autoataque a componentes propios, se desencadenan las respuestas autoinmunes. Así pues, los mecanismos involucrados en la pérdida de tolerancia se han entendido como una combinación de predisposición genética y factores del entorno (***figura 1.7***).

En un principio, examinando los historiales familiares de los pacientes que sufrían alguna enfermedad autoinmune, se pensó que los individuos podían estar genéticamente predispuestos a desarrollar estos trastornos, considerados poligénicos, cuando se contemplaron defectos en genes reguladores de inflamación, como el antígeno de linfocitos humanos (HLA). Esto provocaba un aumento de la susceptibilidad para desencadenar respuestas autoinmunes y, por tanto, alguna enfermedad. En cambio, estudios sobre la prevalencia de las enfermedades autoinmunes en gemelos y mellizos revelaron que la herencia representaba tan solo 1/3 del riesgo para padecer enfermedades autoinmunes, siendo los factores del entorno los que presentan un impacto más significativo.

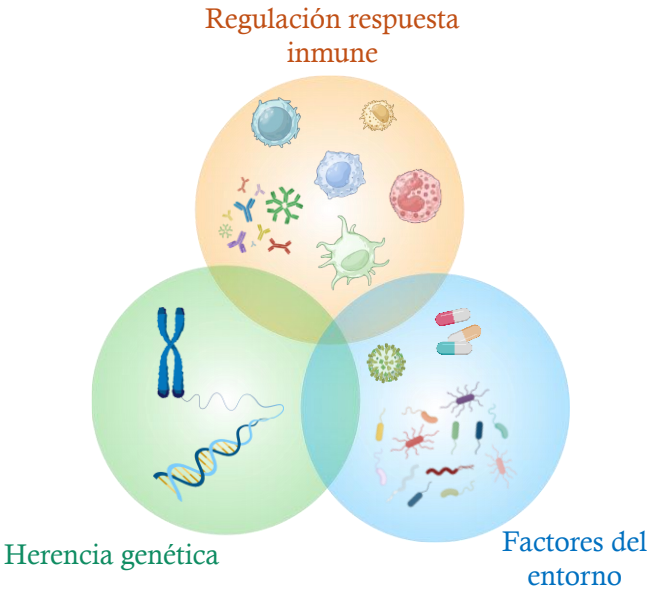


***Figura 1.7**. Esquema de los factores que aumentan el riesgo de padecer enfermedades autoinmunes.*

Entre estos factores del entorno, pueden destacarse las hormonas, la alimentación, los medicamentos, las toxinas y las infecciones, que aumentan el riesgo de padecer un trastorno autoinmune, por un lado, a través de la amplificación de la autoinmunidad en individuos genéticamente susceptibles y, por otro lado, mediante la rotura de la tolerancia en individuos genéticamente resistentes [Fairweather, 2007].

Las hormonas sexuales, tanto naturales como sintéticas, interactúan directamente con las células del sistema inmune a través de receptores internos o de superficie. Además, las hormonas esteroideas influyen en la proliferación de células inmunes y en la producción de anticuerpos, inhibiendo o amplificando la respuesta inmune. Estas conclusiones justifican el hecho de que las mujeres constituyan aproximadamente el 80% de los pacientes con enfermedades autoinmunes, siendo mayor el riesgo durante el periodo fértil, a excepción de la diabetes mellitus, la espondilitis anquilosante o la enfermedad inflamatoria cardiaca, enfermedades que afectan mayoritariamente a hombres.

De igual forma, agentes alimenticios como aditivos o pesticidas, o toxinas como metales o fármacos también pueden interferir en la regulación de la respuesta inmune. Por ejemplo, el yodo, un precursor de la hormona tiroidea tiroglobulina y un compuesto comúnmente presente en la dieta, convierte a esta hormona en un objetivo para el sistema inmunológico, lo que deriva en una sobreproducción de autoanticuerpos. En cambio, si bien se ha visto que algunos fármacos están relacionados con síndromes patológicos semejantes a las enfermedades autoinmunes, en todos los casos de trastornos inducidos por estos factores la enfermedad desaparece cuando se retira el fármaco.

Por otro lado, las infecciones fueron uno de los primeros factores asociados con las enfermedades autoinmunes. Sin embargo, como las infecciones generalmente ocurren mucho antes de la aparición de los primeros síntomas de las reacciones autoinmunes, es difícil vincular una causa específica de un agente infeccioso con una enfermedad. No obstante, se han propuesto diferentes mecanismos para describir el desencadenante de las respuestas autoinmunes por una infección, sustentados en el mimetismo molecular, atendiendo a la similitud entre los antígenos de los microorganismos y los autoantígenos, lo que induce la autoinmunidad al producirse una infección.

Las enfermedades autoinmunes abarcan un conjunto de alrededor 80 trastornos, muchos de ellos crónicos, que requieren atención médica para toda la vida, con diferente grado de prevalencia debido a que las afecciones son diferentes según las distintas poblaciones y regiones. No obstante, las más comunes incluyen la diabetes, psoriasis, artritis reumatoide (RA, del inglés *rheumatoid arthritis*), lupus eritematoso sistémico (SLE, del inglés *systhemic lupus erithematosus*), esclerosis múltiple (MS, del inglés *multiple sclerosis*), síndrome de Sjögren (SS) o esclerodermias. Las bioherramientas desarrolladas durante esta Tesis Doctoral, se han centrado en cuatro de estos trastornos, que se describen brevemente y se representan en la ***figura 1.8***.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad crónica que afecta en su mayor proporción a las articulaciones, conllevando dolor, hinchazón e incluso daño articular, aunque también pueden verse afectados otros órganos y tejidos. La enfermedad comienza cuando anticuerpos antiproteínas y anticomponentes celulares aparecen en el sistema circulatorio y alcanzan la membrana sinovial de las articulaciones. En este punto se produce la inflamación de éstas, provocando daños cartilaginosos y óseos [McInnes & O'Dell, 2010].

El lupus eritematoso sistémico (SLE) es una enfermedad muy heterogénea, cuyo diagnóstico supone un reto en la medicina debido a la gran variedad de manifestaciones clínicas que presentan los pacientes causados por la sobreactividad del sistema inmune, que induce una inflamación sistémica generalizada. No obstante, los síntomas más comunes incluyen erupciones cutáneas, siendo la más conocida la erupción "mariposa" sobre la nariz y mejillas, dolor en las articulaciones y afectaciones en los riñones, corazón y pulmones, entre otros [Kuhn et al., 2015; Dörner & Furie, 2019].

El síndrome de Sjögren (SS) es un trastorno linfoproliferativo caracterizado por la infiltración de células mononucleares en las glándulas exocrinas, principalmente salivales y lagrimales, provocando sequedad bucal y ocular, así como sequedad nasal, vaginal y dérmica. De hecho, esta enfermedad puede abarcar tanto un trastorno específico como un proceso sistémico que afecta a múltiples órganos, pudiendo presentarse solo o acompañado de otras enfermedades autoinmunes reumáticas [Jonsson & Brun, 2010].

Las esclerodermias son un conjunto de enfermedades autoinmunes relativas al tejido conectivo caracterizadas por el endurecimiento de la piel, llegando a afectar a órganos internos. Entre estas enfermedades se encuentra el síndrome de CREST (SSc), acrónimo referido a sus cinco características principales: Calcinosis, relativo al depósito de calcio en los tejidos que da lugar a nódulos duros; Raynaud, fenómeno que produce cambios en el tono de la piel de los dedos y extremidades; Esófago, siendo una característica su disfunción, implicando reflujo e incluso disfagia; Esclerodactilia (*sclerodactyly*) engrosamiento y endurecimiento de la piel de las falanges y Telangiectasia, manchas en la piel producidas por la dilatación de los vasos sanguíneos cercanos a la superficie de ésta [Koksuz et al., 2012].

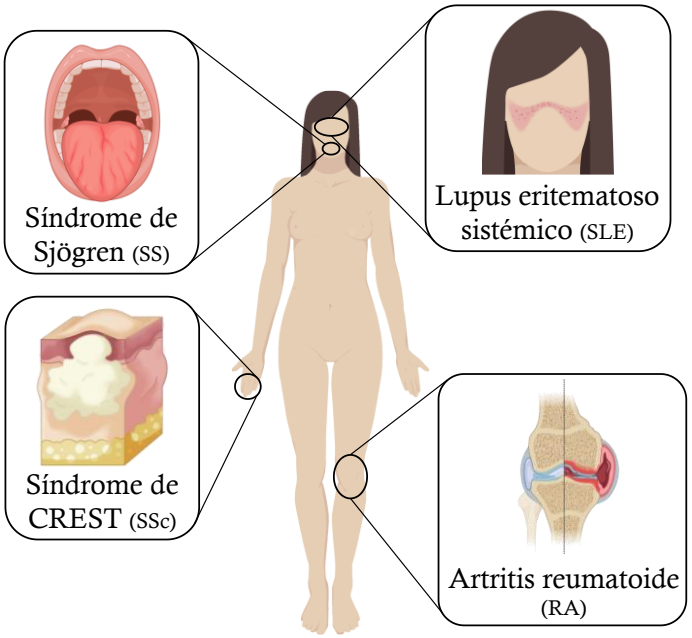


Figura 1.8. *Representación esquemática de las enfermedades autoinmunes en las que se ha enfocado esta Tesis Doctoral.*

Biomarcadores de enfermedades autoinmunes: autoanticuerpos

Si bien numerosos estudios han confirmado que la predisposición genética y los factores del entorno desencadenan las vías inmunitarias hacia una respuesta autoinmune dando lugar, en última instancia, a la destrucción de los tejidos, actualmente no existen herramientas clínicas capaces de predecir el riesgo de padecer alguno de estos trastornos. Sin embargo, a pesar de que la heterogeneidad de las enfermedades autoinmunes dificulta y hace imprecisa la evaluación médica y las pruebas de laboratorio, todas ellas comparten la característica común de presentar autoanticuerpos y factores de inflamación, incluyendo células fagocíticas, linfocitos T autorreactivos y células plasmáticas que afectan a un tejido en particular o contra antígenos generalizados [Fairweather, 2007], por lo que la identificación y determinación de este tipo de biomarcadores en muestras clínicas se emplea para predicción, pronóstico, clasificación y diagnóstico temprano de estas enfermedades [Maecker et al., 2012]. Aunque los autoanticuerpos

son los principales biomarcadores de estos trastornos, también existen biomoléculas como las citoquinas que contribuyen a mejorar los diagnósticos de las enfermedades autoinmunes.

Diversos estudios han encontrado que numerosos autoanticuerpos tienen especificidades diferentes, y que la mayoría se asocian con múltiples enfermedades, siendo muy pocos los específicos de una única enfermedad [Tan, 2012]. Entre los diferentes autoanticuerpos que existen, los autoanticuerpos antinucleares, que se unen a componentes nucleares de las células a través de proteínas o complejos proteínicos, desplegando subtipos de autoanticuerpos en función de su antígeno diana (**tabla 1.1**), son los principales biomarcadores de enfermedades autoinmunes y de las características más importantes de los trastornos reumáticos y sistémicos [Xiao, Z. X. et al., 2021].

Tabla 1.1. Autoanticuerpos antinucleares y sus enfermedades asociadas [Xiao, Z. X. et al., 2021].

Tipo de autoanticuerpo	***Antígeno diana***	***Enfermedad autoinmune***
Anti-centrómero (ACAs)	Centrómero	SSc
Anti-dsDNA (dsDNA-Abs)	DNA de cadena doble	SLE, RA
Anti-ENAs (ENAs-Abs)	Antígenos nucleares extraíbles	SLE, SS
Anti-Jo1	His-RNAt ligasa	Miopatía inflamatoria
Anti-topoisomerasa	Topoisomerasa tipo I	MS, esclerodermia, SLE
Anti-histona	Histonas	SLE, lupus eritematoso (LE) inducido por fármacos
Anti-p62	Nucleoporina 62	Cirrosis biliar primaria (PBC)
Anti-gp210	Membrana nuclear	
Anti-sp100	Sp100	
Anti-PM-Scl	Complejo del exosoma	Polimiositis (PM)
Anti-OJ	Isoleucil-tRNA sinterasa	

De todos ellos, esta Tesis Doctoral se ha centrado en CENP-Abs, dsDNA-Abs y ENAs-Abs.

Autoanticuerpos frente al centrómero (ACAs)

El centrómero (***figura 1.9***) es una parte esencial de los cromosomas que permite identificarlos en tipos según su posición. En él se localiza el cinetocoro, que presenta un papel crucial en la segregación cromosómica durante la división celular. Las funciones del cinetocoro, y por tanto del centrómero, residen en organizar y separar los cromosomas durante la mitosis y la meiosis, sirviendo de punto de anclaje para las fibras del huso mitótico y meiótico [McKinley & Cheeseman, 2016].

En las células eucariotas, el centrómero está formado por más de 100 proteínas diferentes, destacando las proteínas A y B. Por un lado, la proteína centromérica A (CENPA) es una isoforma especializada de la histona H3 que se encuentra en el cinetocoro reemplazando a las histonas nucleosómicas regulares (histona H3), y es clave en el ensamblaje del cinetocoro externo para conectar específicamente las fibras del humo mitótico durante la división celular (***figura 1.9***). Por otro lado, la proteína centromérica B (CENPB) está localizada en el centrómero uniéndose específicamente a las secuencias de DNA, presentando un papel fundamental en la estabilidad y duplicación de éstas. Así, la interacción entre ambas proteínas, junto con otras, es imprescindible para el buen funcionamiento del centrómero [Earnshaw, 2015].

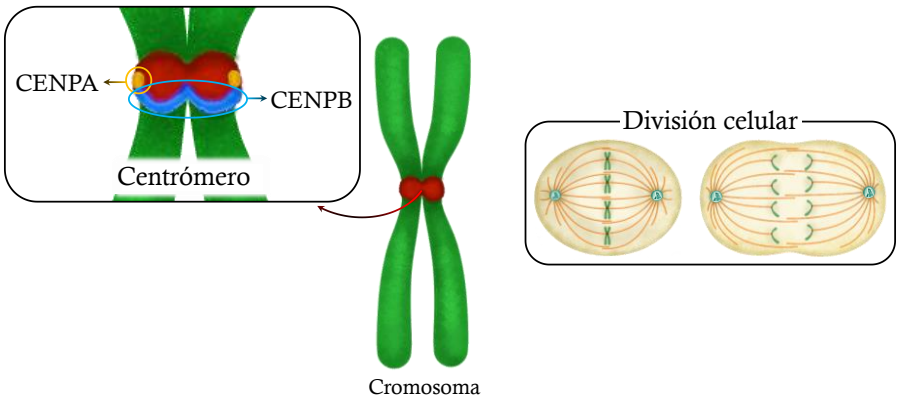


Figura 1.9. *Partes del cromosoma: centrómero y su participación en la división celular.*

Desafortunadamente, cuando se produce la pérdida de tolerancia del sistema inmune que induce enfermedades esclerodérmicas se generan, entre otros, autoanticuerpos frente a estas proteínas centroméricas años antes de que se desarrollen los primeros síntomas de la enfermedad. Por ello, los ACAs se han considerado biomarcadores clínicos para el diagnóstico temprano de esclerodermia, y más particularmente del SSc. Aunque estos biomarcadores son relativamente específicos de esta enfermedad, también se han encontrado alterados en pacientes con SLE, PBC, RA o SS [Fritzler et al., 2011].

En particular, los autoanticuerpos frente a la proteína centromérica B (CENPB-Abs) son los más empleados para la detección serológica de ACAs. Sin embargo, se ha observado que estos autoanticuerpos son más prevalentes en pacientes con SLE que los autoanticuerpos frente a la proteína centromérica A (CENPA-Abs). Es por ello por lo que a lo largo de las investigaciones han sugerido la importancia de analizar individualmente los diferentes ACAs para poder realizar un diagnóstico más fiable de las diferentes enfermedades [Mahler et al., 2010]. En consecuencia, en esta Tesis Doctoral se han desarrollado, en primera instancia, bioplataformas electroquímicas individuales en dos formatos diferentes para la determinación de CENPB-Abs, y posteriormente una bioplataforma electroquímica dual para la determinación simultánea de CENPA-Abs y CENPB-Abs.

Autoanticuerpos frente a DNA de cadena doble (dsDNA-Abs)

La producción de autoanticuerpos frente a DNA de cadena doble es una de las características principales de los pacientes que sufren SLE. No obstante, debido a la sintomatología compartida de las enfermedades autoinmunes y los mecanismos comunes involucrados, estos dsDNA-Abs también se han detectado en pacientes diagnosticados con otras enfermedades autoinmunes inflamatorias, como la RA.

Durante los procesos autoinmunes e inflamatorios, los autoanticuerpos se pueden ver alterados, afectando su estructura, isotipo y, por consiguiente, a la patogenicidad. De esta manera, a lo largo del desarrollo de estas enfermedades, y años antes de la aparición de los primeros síntomas, la presencia de los distintos isotipos de los autoanticuerpos evoluciona, tal y como se ha descrito previamente, desde la liberación inicial de IgMs, continuando con la producción más abundante y prevalente de IgGs, hasta las IgAs e IgEs [Neiman et al., 2019].

Por esta razón, y mejorando los diagnósticos que analizan únicamente IgGs séricas para evaluar el potencial de las enfermedades autoinmunes, en esta Tesis Doctoral se propuso realizar un isotipado preciso para completar el diagnóstico, evaluar el grado de afección, el estadio de las enfermedades autoinmunes como SLE o RA, y la respuesta terapéutica [Sim et al., 2020] a través del desarrollo de una bioplataforma cuádruple para la determinación individual de IgG, IgA e IgM y total de los tres isotipos anteriores frente a dsDNA.

Autoanticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles (ENAs-Abs)

Dentro de los subtipos de autoanticuerpos antinucleares (ANAs) se encuentran los autoanticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles (ENAs), biomarcadores con gran potencial diagnóstico de enfermedades autoinmunes reumáticas sistémicas como SLE o SS. Asimismo, el concepto ENAs-Abs es una combinación de diferentes autoanticuerpos que afectan a componentes celulares, generalmente proteínas presentes en el núcleo celular [Oh et al., 2020]. Los ENAs-Abs más comunes incluyen La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, RNP-Abs y smRNP-Abs.

Los autoanticuerpos frente a la ribonucleoproteína Smith del core (smRNP-Abs) son anticuerpos que actúan contra proteínas del complejo Smith y desregulan las funciones relativas al procesamiento y síntesis del RNA mensajero (RNAm). Debido a su elevada sensibilidad, su determinación está aceptada para el diagnóstico de pacientes con SLE [Migliorini et al., 2005]. Generalmente, estos autoanticuerpos van asociados a los autoanticuerpos frente a ribonucleoproteínas (RNP-Abs) y, en particular, frente a la ribonucleoproteína U1 nuclear pequeña (U1RNP-Abs). Estas ribonucleoproteínas, unidas a las proteínas Smith del core, forman parte del complejo de RNA compuesto por las subunidades: U1-A, U1-C y U1-70k, siendo esta última el componente más detectado (U1RNP70-Abs). A pesar de que estos autoanticuerpos (U1RNP-Abs) son un sello específico para el diagnóstico de la enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD,

del inglés *mixed connective tissue disease*), no son restrictivos, pues se han encontrado también en pacientes con SLE y SS [Tani et al., 2014].

En esta misma línea, los autoanticuerpos frente a la proteína La o antígeno B relativo al Síndrome de Sjögren (La/SSB-Abs), y proteína Ro o antígeno A relativo al Síndrome de Sjögren (Ro/SSA-Abs), son biomarcadores serológicos distintivos de SLE y SS, y específicamente su seropositividad se ha utilizado, de acuerdo con el Grupo de Consenso Americano-Europeo (AEGC, del inglés *American-European Consensus Group*), como criterio reconocido para el diagnóstico de SS [Quartuccio et al., 2015].

Por todo ello, en el marco de esta Tesis Doctoral, la identificación y determinación de estos biomarcadores específicos de SLE y SS ha sido uno de los objetivos perseguidos para mejorar las herramientas de diagnóstico, pronóstico y monitorización de enfermedades autoinmunes. Con esta idea en mente, se ha desarrollado una bioplataforma cuádruple para la determinación de la firma de autoanticuerpos La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs y smRNP-Abs.

Biomarcadores de enfermedades autoinmunes: citoquinas

Pese a que las células B autorreactivas son las principales productoras de los autoanticuerpos iniciadores y promotores de las respuestas autoinmunes, la influencia de otros factores como citoquinas, co-estimuladores y otras células inmunes que regulan la producción de autoanticuerpos pueden afectar a la progresión de las enfermedades autoinmunes y, particularmente, de enfermedades sistémicas como SLE [Xiao, Z. X. et al., 2019].

En especial, las citoquinas están estrechamente relacionadas con los procesos inflamatorios por su función vinculada a la regulación de la respuesta inmune, destacando la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *tumour necrosis factor*). En ella se incluyen dos proteínas transmembrana de tipo II triméricas de gran relevancia clínica (***figura 1.10***): el factor activador de células B (BAFF, del inglés *B-cell activating factor*) y el ligando inductor de la proliferación (APRIL, del inglés *A proliferation-inducing ligand*). Por un lado, BAFF es una proteína transmembrana que puede ser secretada en forma soluble homotrimérica o polimérica tras la escisión de la membrana celular en el sitio de la proteasa furina. En cambio, APRIL se escinde proteolíticamente en el aparato de Golgi antes de su liberación y se secreta mayoritariamente en forma soluble [Mackay et al., 2007]. Debido a la similitud en la estructura de ambas citoquinas liberadas por las células mieloides, estas comparten algunos receptores expresados por células B, con los que interactúan individualmente o en conjunto a través de la formación de heterómeros, para desencadenar sus funciones basadas en la promoción y regulación del crecimiento, maduración, supervivencia y diferenciación celular. Tanto BAFF como APRIL interaccionan con los receptores antígeno de maduración de células B (BCMA, del inglés *B-cell maturation antigen*) y activador transmembrana e interaccionador del ligando ciclifilina (TACI, del inglés *transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor*), mientras que solo BAFF se une al receptor de BAFF (BAFF-R, del inglés *BAFF receptor*).

Este último receptor es esencial tanto para la supervivencia como para la maduración de las células B inmaduras. Por otro lado, TACI es decisivo en la respuesta independiente de las células T sobre los anticuerpos de las células B frente a antígenos del tipo I y II, así como también en la regulación del tipo de células B. Finalmente, BCMA promueve la supervivencia de las células plasmáticas [Vincent et al., 2014].

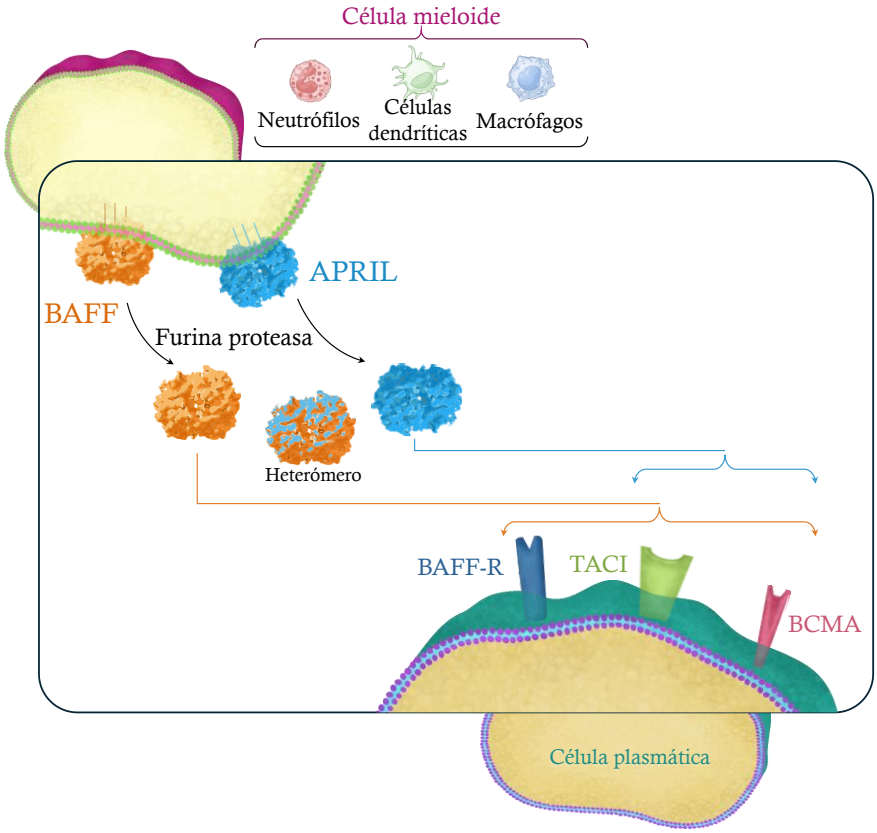


Figura 1.10. *Esquema de interacción de las citoquinas BAFF y APRIL con sus receptores.*

Como se ha mencionado anteriormente, ambas citoquinas son capaces de promover y regular el crecimiento, maduración, supervivencia y diferenciación de las células B. Sin embargo, la desregulación de estos factores puede ser clave en la disrupción de la tolerancia, involucrándolas en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes [Magliozzi et al., 2020]. De hecho, diversos estudios han demostrado que pacientes diagnosticados con SLE, e incluso en los primeros estadios de SS y de RA, presentan elevados niveles séricos de estas citoquinas, lo que las sitúa como prometedores biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes sistémicas reumáticas [Vincent et al., 2014]. Por este motivo, durante las investigaciones llevadas a cabo durante esta Tesis Doctoral se han desarrollado bioplataformas electroquímicas duales para la determinación simultánea de estas dos citoquinas de gran relevancia clínica.

1.1.2. BIOMARCADORES DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Sistema nervioso

El sistema nervioso es el encargado de recoger estímulos del entorno a través de los órganos sensoriales, procesar la información, interpretarla y generar respuestas eléctricas y químicas. En la misma línea, es capaz de regular el movimiento por la contracción y relajación muscular, de mantener el equilibrio y la coordinación, desencadenar respuestas de estrés y regular las emociones. El sistema nervioso comprende el sistema nervioso central (SNC), y el sistema nervioso periférico (SNP), que constituyen una unidad indivisible.

El sistema nervioso central (SNC) da origen a los nervios motores que finalizan en los efectores para conducir los estímulos recogidos por los receptores. Está constituido por el encéfalo, quien controla y regula las funciones cognitivas, motoras y autónomas voluntarias; y por la médula espinal que conecta los nervios espinales hacia los centros superiores, siendo responsable del equilibrio y coordinación motora y de la transmisión de las señales, controlando las funciones motoras y los reflejos involuntarios.

El sistema nervioso periférico (SNP) lo forman receptores, nervios periféricos y ganglios extendidos desde la médula espinal y cerebro hacia el resto del cuerpo. El SNP se encarga de transmitir, por un lado, las señales sensoriales desde los receptores hasta el SNC y, por otro lado, las señales motoras desde el SNC hacia los músculos [Brodal, 2016; Escobar & Pimienta, 2016].

Ambos complejos están formados por un conjunto de células nerviosas, las neuronas, encargadas de desarrollar las funciones, y células soporte llamadas células gliales, que son las responsables de proteger a las neuronas (***figura 1.11***).

Las neuronas son las unidades básicas del sistema nervioso y presentan un papel multifuncional esencial para el buen funcionamiento de éste. Estructuralmente están constituidas por un núcleo, ramificaciones llamadas dendritas que reciben la información a través de impulsos eléctricos, y una prolongación llamada axón, que a su vez puede dividirse en miles de ramas para conectarse con otras neuronas, enviando el estímulo a las demás neuronas. Si bien el funcionamiento de las neuronas es complejo, se sabe que cada neurona recibe en una sinapsis la misma información que muchas otras, por lo que su mecanismo de acción no se considera aislado.

Sin embargo, sin las células gliales, la función del sistema nervioso no puede comprenderse. Estas células no neuronales intervienen en la sinapsis, desempeñando un papel fundamental en el aprendizaje y la memoria. Los astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann, ependimocitos y microglía forman en conjunto el grupo de estas células.

En particular, los astrocitos están asociados tanto con las neuronas como con el resto del organismo, constituyendo la envoltura de la sinapsis central y, especialmente, su importancia reside en su función reguladora de la señalización sináptica mediante la unión, transporte y metabolismo de los neurotransmisores [Bustamante Zuleta, 2007].

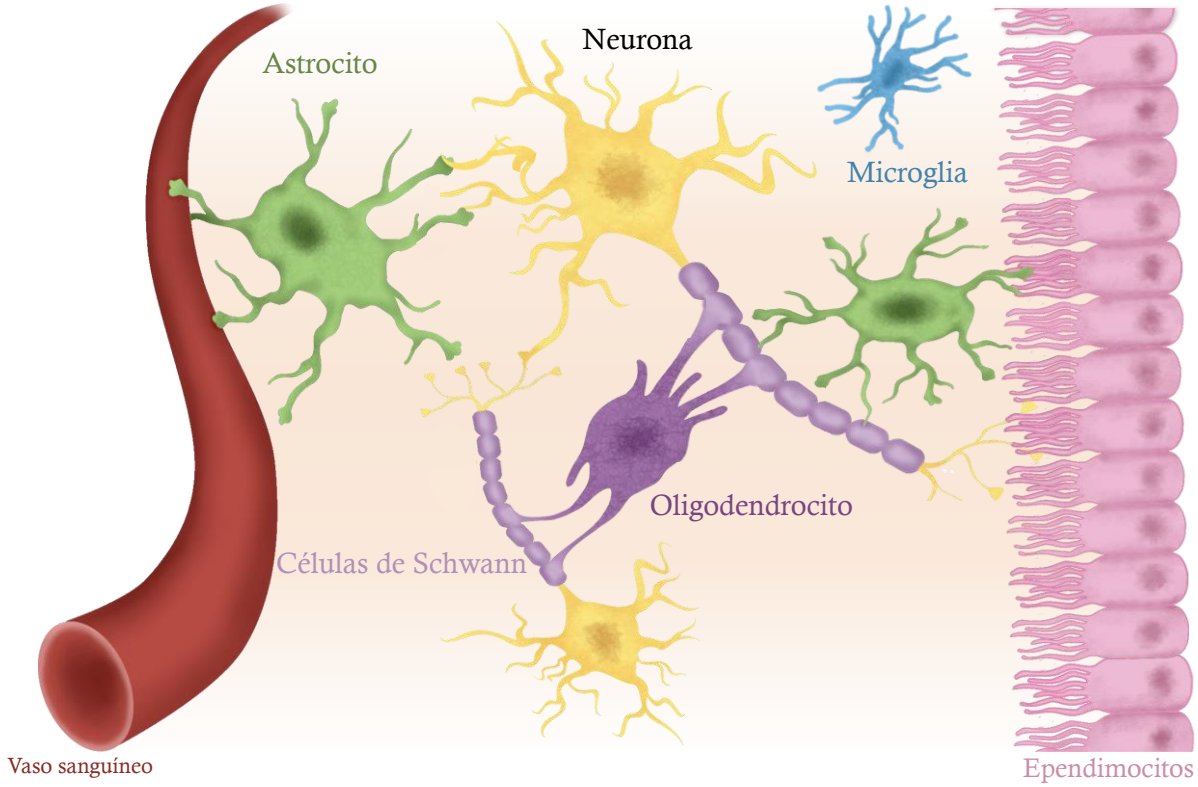


Figura 1.11. *Sistema nervioso: neuronas y células gliales.*

Desafortunadamente, cuando se produce una interrupción en la actividad neuronal, la transmisión sináptica y los mecanismos neuronales se ven desregulados, desencadenando la aparición de las enfermedades neurodegenerativas.

Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas abarcan un conjunto de trastornos, por un lado, del movimiento piramidal, es decir, voluntario y preciso, y/o extrapiramidal, referido a los movimientos involuntarios y automáticos; así como a los relativos a las acciones cognitivas, caracterizados por un descenso progresivo de las funciones sinápticas y una pérdida neuronal irreversible, que ocasionan síntomas clínicos variados en los individuos afectados, comunes a diferentes síndromes. La demencia es un síndrome relacionado con el deterioro de las funciones cognitivas, y el trastorno más común entre los pacientes que sufren procesos neurodegenerativos. Si bien no es una única condición, la demencia puede derivarse de condiciones médicas entre las que se pueden englobar la enfermedad del Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer's disease*), la enfermedad del Parkinson o la MS [Dugger & Dickson, 2017; Arvanitakis et al., 2019].

En especial, la enfermedad del Alzheimer (AD) es la principal causa de demencia y el trastorno más prevalente en la neurodegeneración, afectando al córtex cerebral y al hipocampo. Sus principales desencadenantes, que provocan la disfunción y muerte neuronal, son, por un lado, la deposición y acumulación de β-amiloide en forma insoluble sobre placas del espacio extracelular y paredes de los vasos sanguíneos y, por otro lado, la formación y acumulación proteica en nudos neurofibrilares [Masters et al., 2015].

Desafortunadamente, el único diagnóstico real capaz de confirmar estas enfermedades se obtiene tras la realización de autopsias. Sin embargo, existen algunos factores que definen y caracterizan estas enfermedades, como son la vulnerabilidad anatómica y los procesos asociados a la progresiva disfunción y muerte neuronal [Dugger & Dickson, 2017]. A pesar de que estas enfermedades están ampliamente reconocidas por esta sucesión de acciones, comparten procesos patológicos con enfermedades autoinmunes y neoplásicas [Miteva et al., 2023].

Por ejemplo, en las últimas décadas se ha prestado atención a la activación inmunológica a través del sistema nervioso central (SNC), demostrándose que no todas las respuestas inmunitarias en el SNC son perjudiciales, pues en algunos casos contribuyen a la reparación y regeneración de las células y tejidos. Se sabe que la interacción inmunitaria tanto a nivel celular como molecular del sistema nervioso comprende numerosas reacciones complejas en las que las células inmunes no solo segregan neurotoxinas, sino también moléculas neuroprotectoras [Amor et al., 2010].

Biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas: autoanticuerpos

Centrándose en las neurotoxinas, se ha observado que el SNC, inducido por el sistema inmune, es capaz de expresar a través de los oligodendrocitos, neuronas y células endoteliales un repertorio de PRRs que contribuyen a la inflamación neuronal [Voet et al., 2019]. Esta inflamación resulta, tras procesos derivados de la pérdida de tolerancia, en la respuesta autoinmune que genera la sobreproducción de autoanticuerpos. Dicho proceso, asociado a trastornos de demencia principalmente, provoca la reacción de los autoanticuerpos frente a proteínas de superficie de las neuronas y de otras células del cerebro, y también resulta en la liberación de péptidos y proteínas tras el colapso patológico. De este modo, las investigaciones se han redirigido al análisis cuantitativo de los perfiles de estos autoanticuerpos que actúan frente a proteínas neuronales para obtener información específica sobre el inicio y mecanismos y gravedad de la patología cerebral [Kocurova et al., 2022].

Muchas de las enfermedades neurodegenerativas que afectan al SNC se asocian con la desintegración de la barrera hematoencefálica que conduce a la liberación descontrolada de proteínas neuronales y gliales tras la activación de la respuesta autoinmune [Sweeney et al., 2019]. Es por ello por lo que la implicación de las reacciones autoinmunes ha conducido a designar a las enfermedades neurodegenerativas como parte de estos trastornos. Por ejemplo, la MS es una afección inflamatoria del SNC desmielinizante que tiene origen en la sobreactuación de los

autoanticuerpos. De hecho, igual que ocurría en las enfermedades autoinmunes, algunos autoanticuerpos pueden generar trastornos neurológicos aparentemente similares, por lo que el estudio de sus perfiles se considera una información relevante para el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de cada enfermedad [DeMarshall et al., 2015]. Así, el descubrimiento de que algunos autoanticuerpos que interaccionan contra antígenos neuronales provocan disfunciones cerebrales ha supuesto un cambio en el paradigma de los trastornos neurológicos, ofreciendo nuevas opciones diagnósticas y terapéuticas, y, permitiendo además reclasificar algunos trastornos como la neuromielitis óptica (NMO, del inglés *neuromyelitis optica*) [Prüss, 2021].

Autoanticuerpos frente a acuaporina 4 (AQP4-Abs)

La NMO, un trastorno inflamatorio del SNC que afecta principalmente a los nervios ópticos y a la médula espinal, fue durante muchas décadas considerada un subtipo clínico de la MS. Sin embargo, Lennon y colaboradores [Lennon et al., 2004] descubrieron, en 2004, una inmunoglobulina sérica específica en un conjunto de pacientes con esta afección. Describieron cómo estos autoanticuerpos se unían a los extremos de los astrocitos adyacentes a los microvasos sanguíneos, a los espacios de Virchow Robin (EVR) y a la piamadre. Las investigaciones realizadas a parir de este nuevo descubrimiento identificaron que el antígeno diana era la acuaporina 4 (AQP4) [Jarius & Wildemann, 2013].

La AQP4 es una proteína perteneciente a la familia de las proteínas de membrana transportadoras de agua, que se expresa como isoforma corta (M23) o larga (M1) por los astrocitos, constituyendo el canal de agua más abundante del SNC. Su papel es crucial en la eliminación de productos de desecho del cerebro. Cuando las inmunoglobulinas atacan a estas proteínas se produce una neuroinflamación que afecta a la permeabilidad al agua de los astrocitos y deriva en el daño celular patogénico de la NMO [Verkman et al., 2013; Valenza et al., 2020].

Los autoanticuerpos frente a AQP4 (AQP4-Abs), también reconocidos como NMO-IgG debido a su casi exclusividad en este tipo de pacientes, permitieron demostrar que esta enfermedad tenía un factor humoral que la distinguía de la MS [Jarius & Wildemann, 2010]. No obstante, también se han encontrado AQP4-Abs en pacientes con enfermedades autoinmunes y degenerativas similares, como la mielitis transversa longitudinal extensa (LETM, del inglés *longitudinally extensive transverse myelitis*) y en pacientes con lesiones cerebrales. Con el objetivo de profundizar en su potencial clínico, en esta Tesis Doctoral se desarrolló una bioplataforma electroquímica que se enfrentó a la determinación de AQP4-Abs en muestras de pacientes con AD, la enfermedad más común con lesión cerebral.

1.1.3. BIOMARCADORES DE CÁNCER

Cáncer

El cáncer, segunda enfermedad más prevalente en el mundo en relación con su mortalidad y morbilidad, engloba un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular anormal y descontrolado [Ullah et al., 2009]. La inducción de este descontrol celular está causada tanto por factores internos, entre los que se incluyen mutaciones, hormonas y condiciones inmunológicas, como por factores externos adquiridos, como el tabaco, la alimentación, la radiación o las infecciones. En cambio, los factores genéticos suponen tan solo el 5–10% de los motivos que provocan el cáncer, por lo que se ha demostrado que las interacciones celulares con los factores externos son el principal motivo de impulso para las mutaciones celulares que originan estos trastornos [Anand et al., 2008]. Estas mutaciones celulares se ven promovidas principalmente por alteraciones en tres clases de genes: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores de DNA. En conjunto, estos genes mutados contribuyen al desarrollo de los genotipos y fenotipos del cáncer, adquiriendo una resistencia al mecanismo natural e inherente de la muerte celular, apoptosis, lo que supone la desregulación en la proliferación de las células [Bhatt et al., 2010].

La apoptosis es el mecanismo biológico de regulación celular esencial para el desarrollo normal, homeostasis y eliminación de células dañadas en organismos multicelulares. Consiste en una sucesión de procesos coordinados, resumidos en la contracción celular, condensación de la cromatina y fragmentación tanto del núcleo como de la célula, que mantienen el control del número de células. Cuando este mecanismo se desregula se produce una multiplicación descontrolada de las células, desarrollando masas celulares anormales denominadas tumores, tal y como se representa en la ***figura 1.12*** [Cotter, 2009].

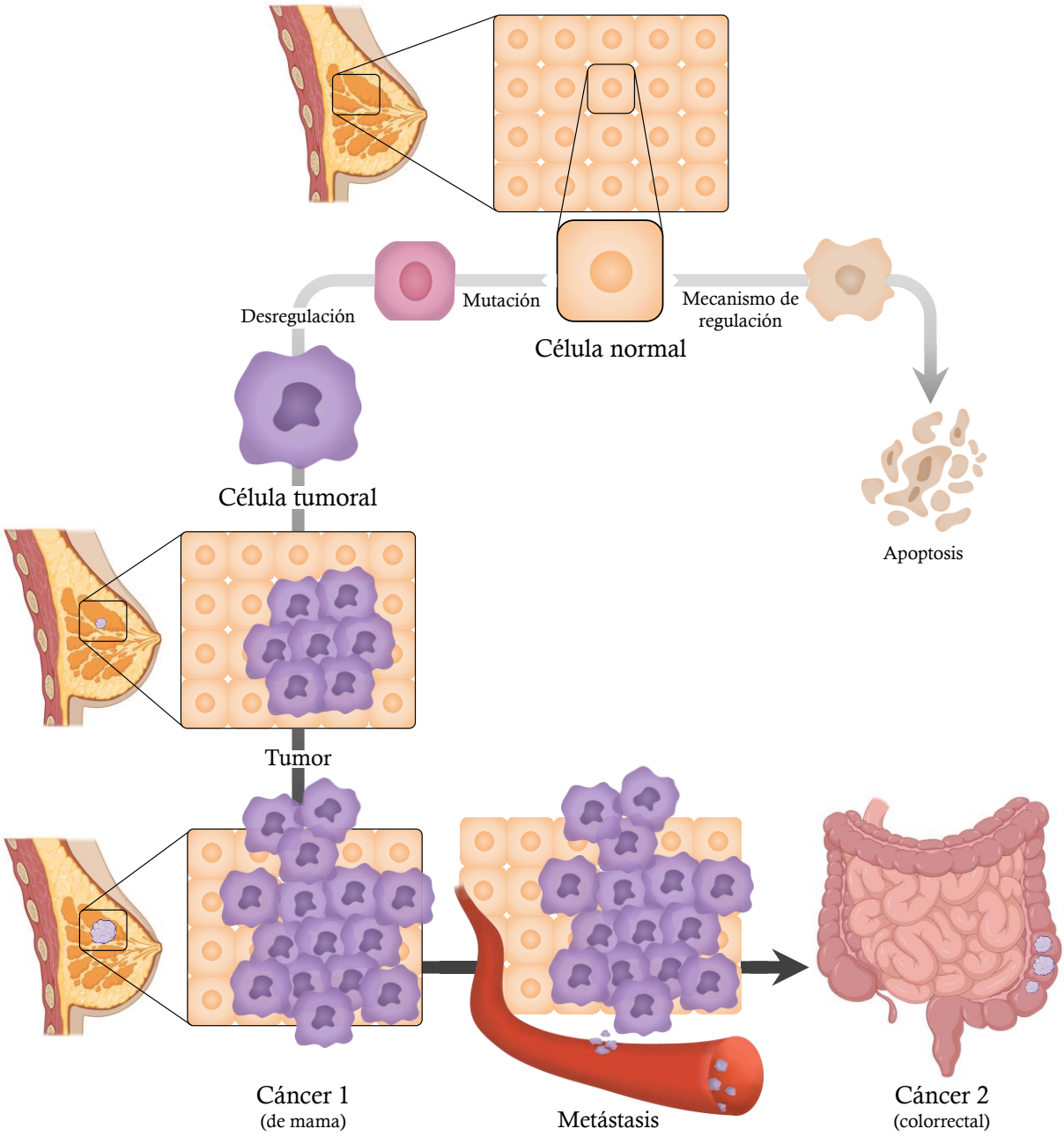


Figura 1.12. *Apoptosis vs. progresión tumoral.*

Sin embargo, no todos los tumores son precedentes de cáncer, pues existen tumores benignos y tumores malignos (***figura 1.13***). Aunque los tumores benignos generalmente no se consideran problemáticos, es necesario mantenerlos controlados pues pueden convertirse en malignos. Se caracterizan por un crecimiento lento y con bordes distinguidos, así como una localización fija que no invade otros tejidos. A diferencia de ellos, los tumores malignos o cancerígenos tienen bordes irregulares que se expanden descontroladamente. De hecho, lo más importante es que son capaces de invadir tejidos y órganos, pudiendo diseminarse a través del sistema linfático o sanguíneo, dando lugar a la metástasis [Patel, 2020].

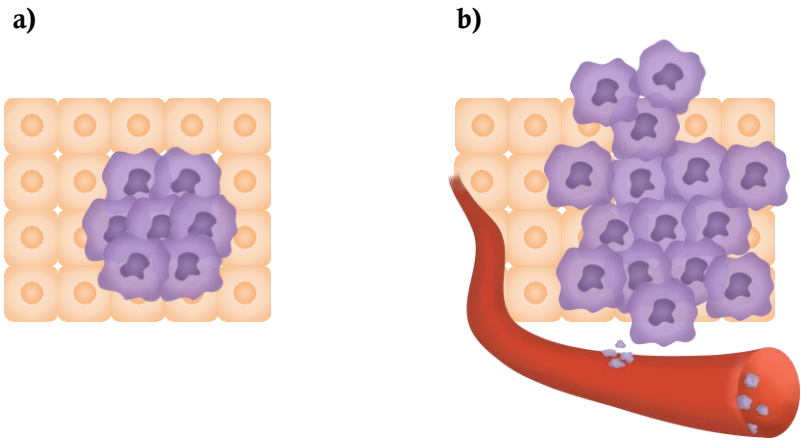


Figura 1.13. a) *Tumor benigno vs.* ***b)*** *tumor maligno.*

Se estima que alrededor del 40% de la población mundial será diagnosticada con algún tipo de cáncer en algún momento de su vida. El descontrol celular y, por ende, el crecimiento tumoral puede originarse en cualquier parte del organismo, dando lugar a diferentes tipos de cáncer con características y prevalencia distintas en función del tipo de células y ubicación afectadas. Actualmente, los cánceres más comunes comprenden, entre otros, el cáncer de mama y el cáncer colorrectal [NIH, 2020].

Cáncer de mama

El cáncer de mama (BC, del inglés *breast cancer*) es el cáncer más común en las mujeres, siendo 100 veces mayor su prevalencia en mujeres que en hombres. El origen de esta enfermedad reside en el crecimiento errático y proliferación de las células del tejido mamario, el cual está compuesto por las glándulas productoras de leche y sus conductos, el estroma, que incluye los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama, y el tejido inmune-linfático que elimina los fluidos y desechos celulares [Sharma et al., 2010].

Hay que señalar que este tipo de cáncer no es homogéneo, lo que ha llevado a establecer su clasificación en diferentes subtipos asociados a distintas características biológicas e implicaciones clínicas para poder aplicar terapias médicas exitosas. Con este fin, se llevaron a cabo análisis de perfiles de expresión empleando microarrays que permitieron utilizar como criterio para su clasificación el nivel de expresión de tres receptores: el receptor de estrógenos (ER, del inglés *estrogen receptor*), el receptor de progesterona (PR, del inglés *progesterone receptor*) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, del inglés *human epidermal growth factor receptor 2*). De acuerdo con los perfiles de expresión de estos tres receptores, se establecieron cuatro subgrupos de BC: luminal A, luminal B, HER2 sobreexpresado y cáncer de mama basal o triple negativo (TNBC, del inglés *triple negative breast cancer*) (**tabla 1.2**).

Los subgrupos luminal A y luminal B se diferencian del resto por la expresión de ER. Se caracterizan por perfiles génicos similares a las células epiteliales luminales normales de la mama,

así como también a genes relacionados con la activación del ER. En particular, el subtipo luminal A es el más común y el de mejor pronóstico, representando entre el 40–50% del total de los diagnósticos de BC. En cambio, los cánceres de tipo luminal B son de mayor grado, por lo que su pronóstico es peor que el anterior. La expresión de genes relacionados con el ER es menor, pero mayor en lo relativo a la proliferación. Debido a ello, las terapias de cánceres del tipo luminal A suelen incluir únicamente de terapia hormonal, mientras que los de tipo luminal B pueden requerir además quimioterapia.

Por otro lado, los cánceres del subtipo HER2 son de alto grado tumoral con un curso clínico agresivo, comprendiendo el 15% del BC. Se caracterizan por la sobreexpresión de genes asociados a HER2, mientras que son negativos a ER y PR. A pesar de su agresividad, responden muy bien a las terapias dirigidas contra HER2.

Finalmente, el TNBC afecta a las células mamarias basales. Si bien sí presenta sobreexpresión de genes de proliferación, no expresa ninguno de los receptores diana, lo que hace que sea el subtipo con peor pronóstico [Tsang & Tse, 2020].

Tabla 1.2. Resumen del perfil génico de los subtipos de cáncer de mama.

Subtipos de BC	***Perfil génico***		
	Expresión de ER	*Expresión de PR*	*Expresión de HER2*
Luminal A	+	≥ 20 %	–
Luminal B	+	< 20 %	+
HER2	–	–	+
TNBC	–	–	–

Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CRC, del inglés *colorectal cancer*) es el cuarto cáncer más común en hombres, el tercero en las mujeres y el más diagnosticado del tracto gastrointestinal, representando aproximadamente el 13% de los tumores malignos del organismo [Granados-Romero et al., 2017]. La tumorigénesis de este cáncer producido en el colon o recto surge de una secuencia pólipo-carcinoma, causada por la acumulación de sucesivas alteraciones genéticas y epigenéticas, que conducen a la transformación y progresión de las células epiteliales colónicas normales, conocidos como pólipos que derivan finalmente en un carcinoma [Saif & Chu, 2010].

Generalmente, el CRC comienza como un pólipo benigno en la mucosa intestinal, conocido como adenoma, que cuando se transforma en una lesión maligna da lugar a tres tipos de adenomas: tubular, tubulovelloso o velloso, de acuerdo con su histología. El estadio de estos adenomas simples o múltiples, cuyo tamaño puede variar desde menos de 1 cm hasta 2 cm, predeterminó la clasificación según el sistema Astler-coller-Dukes o TNM. Esta clasificación permite diferenciar

entre la propagación de la extensión a través de las capas de la pared colónica o rectal (T), la presencia de adenomas en el ganglio linfático (N) y la metástasis en órganos distantes (M) [Granados-Romero et al., 2017].

Asimismo, en función del origen y expresión del carcinoma, se han descrito tres tipos de CRC: i) esporádico, constituye entre el 60 y 80% de todos los CRC, se diagnostica con este término cuando el individuo no es portador de ninguna mutación que lo haga susceptible a desarrollar este tipo de cáncer; ii) familiar, cuando en la línea de consanguinidad primaria han padecido un cáncer esporádico sin identificarse ningún gen asociado a él; y, por último, iii) hereditario, que está asociado a dos variantes que predisponen a los individuos a padecer este cáncer. Estas dos variantes incluyen la poliposis adenomatosa familiar, es decir, la tendencia a presentar múltiples pólipos que se pueden convertir en malignos y, por otro lado, la no-poliposis colorrectal hereditaria (HNPCC, del inglés *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*), un trastorno hereditario que aumenta el riesgo de padecer CRC por mutaciones génicas [Arvelo et al., 2015]. Debido a que estos procesos pueden tardar hasta 8–12 años en desarrollarse, es necesario disponer de herramientas que permitan el diagnóstico temprano de esta enfermedad.

Biomarcadores de cáncer: proteínas

En el punto de mira de la investigación actual se encuentran los estudios de tecnologías y herramientas capaces de identificar, cuantificar y evaluar firmas celulares relacionadas con la conversión de sistemas normales en tumorales. Esta prometedora investigación busca proporcionar información esencial sobre la etiología del cáncer, imprescindible tanto para el diagnóstico temprano como para su tratamiento. Si bien técnicas como mamografías o colonoscopias son empleadas para la detección precoz de estas enfermedades prevalentes, se ha visto que los biomarcadores son herramientas muy útiles para la detección temprana del cáncer, su diagnóstico y pronóstico en los pacientes que lo sufren, además de permitir el seguimiento tanto de los tratamientos como de la progresión de la enfermedad. De hecho, los biomarcadores también se emplean como localizadores de los tumores, y permiten determinar el subtipo y el estadio, así como la firma celular de tejidos adyacentes.

La evolución en el estudio del cáncer ha revelado numerosos tipos de biomarcadores, como los biomarcadores citogenéticos, basados en aberraciones en la estructura y número de los cromosomas; biomarcadores genéticos, capaces de detectar variaciones en la función de los genes por modificaciones en éstos; biomarcadores epigenéticos, asociados a los cambios epigenéticos en los cromosomas que inducen alteraciones en los perfiles de expresión. También se han descrito recientemente células como biomarcadores, determinando células monitorizables que aparecen en el sistema circulatorio cuando los tumores se encuentran en fases avanzadas; biomarcadores víricos, virus capaces de inducir el cáncer; y antígenos moleculares como biomarcadores. Estos últimos se han considerado como parte de las líneas de investigación de esta Tesis Doctoral [Bhatt

et al., 2010]. Además, las células cancerígenas liberan proteínas y macromoléculas a los fluidos extracelulares que pueden llegar al torrente sanguíneo y servir como potenciales biomarcadores séricos.

Entre la diversidad de biomarcadores séricos descritos para la detección del cáncer, las metaloproteinasas de matriz (MMPs, del inglés *matrix metalloproteinases*) han cobrado particular relevancia por su importante papel en muchos procesos fisiológicos como el desarrollo, cicatrización y remodelación de tejidos [Mondal et al., 2020].

Metaloproteinasa de matriz 9

Las MMPs son endopeptidasas dependientes del Zn^{+2} presentes tanto intracelularmente como unidas a la membrana y cuyas funciones están asociadas con la degeneración de proteínas de la matriz extracelular [Vu et al., 2018]. En condiciones fisiológicas normales, están estrictamente reguladas y son expresadas, en primer lugar, como cimógenos inactivos (proenzimas) al interaccionar con el Zn^{+2}, activándose posteriormente con la pérdida de esta interacción por la acción de proteinasas. Sin embargo, cuando ocurre un desequilibrio entre su activación e inhibición por desregulación de los inhibidores de MMPs, encargados de mantener la activación de las proenzimas, se desata un proceso de desregulación y sobreexpresión de éstas, influido también por otros factores como las citoquinas, que desencadenan acciones asociadas a enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes e incluso algunos tipos de cáncer [Nagase et al., 2006; Scannevin et al., 2017].

En particular, la MMP-9, la MMP más compleja de esta familia, es la encargada de estimular o frenar la degradación de la membrana extracelular a través de la degeneración de gelatinas y colágenos durante los procesos asociados con la remodelación de los tejidos. Se ha descrito que la membrana extracelular presenta un papel importante en el desarrollo del cáncer y que las células tumorales secretan agentes, entre los que se encuentran la MMP-9, que interacciona con las membranas extracelulares de células normales para su remodelación y libera factores que generan un microambiente favorable para la tumorigénesis. Igualmente, la MMP-9 liberada por las células normales es utilizada por las células cancerígenas al unirse en su superficie [Noel et al., 2008; Liu, Y. et al., 2015].

De acuerdo con la literatura, la MMP-9 juega un papel imprescindible en la angiogénesis e invasión cancerígena, habiéndose encontrado niveles séricos de MMP-9 elevados en pacientes con CRC [Hurst et al., 2007] y BC [Radisky, E. S. & Radisky, D. C., 2010].

Con estos antecedentes, en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado una bioplataforma electroquímica para la detección de MMP-9, que se ha aplicado a su determinación en sueros de pacientes con distintos subtipos de BC.

1.1.4. Relaciones entre enfermedades

Como se ha detallado a lo largo de este capítulo, los procesos inflamatorios derivados de las respuestas inmunológicas pueden ser precedentes de otras enfermedades proinflamatorias como las enfermedades neurodegenerativas o el cáncer.

Enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. Biomarcadores compartidos.

Si bien es cierto que la mayoría de las investigaciones acerca de las enfermedades neurodegenerativas, y especialmente sobre la demencia, corroboran que factores como la deposición anormal de proteínas presentan un papel patogénico fundamental, no hay claridad ni consenso en los mecanismos que lo inician y participan en la progresión de los procesos fisiopatológicos. No obstante, se han llevado a cabo estudios que confirman que la desregulación inmunológica está implicada en la demencia neurodegenerativa. De esta manera, hay evidencias sólidas de que, a pesar de que la autoinmunidad no es la primera causa de las enfermedades neurodegenerativas, sí contribuye al riesgo para padecerlas y/o agravarlas [Yokoyama et al., 2016]. Por ello, una característica que vincula las enfermedades neurodegenerativas con las autoinmunes se fundamenta en el daño neuronal y la inflamación provocados por sustancias neurotóxicas proinflamatorias y por los procesos inmunológicos, asociados a la activación de los linfocitos y los macrófagos [Herz et al., 2010; Altmann, 2018].

Tradicionalmente se ha considerado al SNC como una zona privilegiada delimitada por barreras físicas y moleculares, como la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés *blood-brain barrier*), y un sistema de vasos linfáticos meníngeos que aíslan a sus componentes neuronales de la respuesta inmune [Krot & Rolls, 2021]. Sin embargo, se ha visto que estas barreras que controlan la entrada de las células inmunes a través del drenaje linfático también las guían hacia los ganglios linfáticos cervicales, principal sitio de presentación de antígenos neuronales frente a los linfocitos B, lo que estimula la producción de anticuerpos [Sun, B. L. et al., 2018].

Gracias a los avances en las pruebas experimentales capaces de proporcionar cada vez mayor sensibilidad, se han podido determinar los niveles séricos de los autoanticuerpos, considerablemente inferiores por la barrera hematoencefálica, y correlacionarlos con los del fluido cerebroespinal. De esta manera, se ha sugerido que en condiciones fisiológicas normales las inmunoglobulinas que pueden penetrar en el SNC desde la circulación periférica son limitadas, mientras que cuando se padece una afección sus niveles cerebroespinales y séricos se incrementan, demostrando que la infiltración y llegada de las células inmunes al SNC, y principalmente a los ganglios linfáticos cervicales, estimulan la aparición y evolución de las enfermedades del SNC [Sabatino et al., 2019; Kocurova et al., 2022].

Estudios recientes han proporcionado evidencias consistentes sobre el papel que ejerce la desregulación inmunológica sobre las enfermedades neurodegenerativas, demostrando que existe una estrecha relación entre la autoinmunidad sistémica y la demencia. De hecho, estos estudios han revelado que hay un mayor riesgo de padecer Alzheimer y demencia en los individuos con enfermedades autoinmunes sistémicas como SLE o SS. Además, esta relación entre los trastornos autoinmunes y neurodegenerativos se ha visto también respaldada por una alta prevalencia a resultados positivos en ANAs [Arshad et al., 2021].

Conociendo estos antecedentes, en esta Tesis Doctoral también se ha buscado relacionar algunos de los biomarcadores evaluados para enfermedades autoinmunes con trastornos neurodegenerativos y viceversa.

Autoanticuerpos frente a DNA de cadena doble (dsDNA-Abs)

Aunque los ANAs son una marca específica de las enfermedades autoinmunes sistémicas, también se han encontrado estos anticuerpos en el torrente sanguíneo y en el fluido cerebroespinal de individuos afectados por enfermedades neurodegenerativas [Mecocci et al., 1993].

Así, la presencia de dsDNA-Abs en pacientes afectados por trastornos autoinmunes como SLE o RA y con enfermedades neurodegenerativas como AD, revalida la contribución de los procesos inflamatorios desregulados provenientes de las respuestas inmunes sobre la progresión de la demencia neurodegenerativa.

Autoanticuerpos frente a la acuaporina 4 (AQP4-Abs)

Aunque en este capítulo se ha mencionado la casi-exclusividad de la presencia de AQP4-Abs en NMO, existen evidencias, como por ejemplo la capacidad de los AQP4-Abs de unirse al dominio extracelular de la proteína presente en astrocitos y la activación del sistema complemento, que sugieren que esta enfermedad degenerativa podría formar parte del conjunto de enfermedades autoinmunes humorales. Esto, junto con demostraciones clínicas que han descrito daños periféricos más allá del SNC provocados por los AQP4-Abs, ha incitado a la investigación a recapacitar acerca de la exclusividad de estos biomarcadores en NMO. Así, las reflexiones acerca de su posible seropositividad en otras enfermedades autoinmunes han confirmado que estos autoanticuerpos están presentes en individuos que no sufren NMO, pero sí enfermedades sistémicas como SLE [Moraitis et al., 2019; Schmetzer et al., 2021].

Las investigaciones abordadas en esta Tesis Doctoral y que demuestran la presencia de AQP4-Abs en pacientes con SLE lo corroboran.

Enfermedades autoinmunes y cáncer

La relación entre las enfermedades autoinmunes y el cáncer se considera bidireccional y dinámica debido a que, por un lado, se ha observado en algunos trastornos autoinmunes un elevado número de neoplasias malignas y, por otro lado, a que algunas de estas neoplasias pueden aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes [Giat et al., 2017]. De esta manera, los avances en este campo de investigación han permitido revelar cómo la inflamación crónica de los trastornos autoinmunes contribuye a la promoción del cáncer, del mismo modo que las respuestas inmunes antitumorales pueden desencadenar una reacción cruzada con los propios tejidos, lo que podría conducir al despliegue de la autoinmunidad [Masetti et al., 2021].

A pesar de que el sistema inmune es el encargado de defender al organismo a través de la liberación de células y otros mediadores, tal y como se ha descrito previamente, cuando se produce un fallo en la tolerancia de estos mecanismos se desencadena un proceso de inflamación generalizada. Esta inflamación crónica inducida por las reacciones autoinmunes, que además provocan el daño de los tejidos, desata la liberación de citoquinas capaces de estimular el desarrollo de tumores a través de diferentes medios como daños al DNA celular, estimulación del crecimiento y supervivencia de las células, promoción de la angiogénesis y aumento del potencial para la invasión celular. Por ello, se considera que las citoquinas también participan en el comienzo y la progresión del cáncer [Balkwill & Mantovani, 2001].

En particular, el SLE se ha considerado la enfermedad autoinmune con mayor riesgo de presentar tumores malignos derivados de neoplasias hematológicas. De hecho, la ruta propuesta para el desarrollo de estas neoplasias en los pacientes afectados por SLE implica el sistema de citoquinas BAFF/APRIL.

Sistema BAFF/APRIL

Las citoquinas BAFF y APRIL, asociadas a la activación de los linfocitos para su actuación en el sistema inmune, también son partícipes de una cascada de conexiones complejas que regulan procesos celulares entre los que se incluyen la apoptosis y mantenimiento de la supervivencia, diferenciación celular, proliferación y migración. Es por ello por lo que el sistema BAFF/APRIL es considerado un regulador patológico del microambiente, apoyando el crecimiento tumoral tanto en cánceres hematológicos como en cánceres sólidos, habiéndose observado la hiperexpresión de su perfil en numerosas enfermedades oncológicas, entre las que destacan el BC y el CRC [Ullah & Mackay, 2023].

Con estos antecedentes en esta Tesis Doctoral también se consideró relevante evaluar la presencia y relación de ambas citoquinas con SLE y CRC, analizando su contenido en muestras de pacientes diagnosticados con estas enfermedades empleando bioplataformas electroquímicas.

1.2. PLATAFORMAS BIOSENSORAS ELECTROQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE ENFERMEDADES PREVALENTES

La importancia cada vez mayor que cobra la identificación y determinación de biomarcadores de enfermedades prevalentes, y el papel fundamental que desempeñan en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las enfermedades, ha guiado al progreso científico hacia el desarrollo de herramientas analíticas rápidas, sensibles, de bajo coste, idealmente de carácter multiplexado y multiómico y aplicables en punto de necesidad, y capaces de proporcionar información robusta fiable para mejorar los diagnósticos, seguimientos y pronósticos clínicos, y con ello la eficacia de las terapias aplicadas, la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes [Kobeissy et al., 2014; Wang, L. et al., 2015].

En esta incesante búsqueda de nuevas metodologías analíticas, los biosensores electroquímicos juegan un papel cada vez más predominante por ser capaces de responder a las necesidades que demanda la clínica y la sociedad actual en términos de simplicidad, tiempo de respuesta, coste asequible, carácter descentralizado y potencial para proporcionar información múltiple y/o de diferente carácter ómico [Ronkainen et al., 2010].

1.2.1. EVOLUCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOSENSORES

La evolución de los organismos vivos, desde sus orígenes hace millones de años hasta la actualidad, ha progresado gradual y adaptativamente a través de sus sentidos. Aunque esta evolución no ha dejado en igualdad de condiciones a todas las especies, pues las ballenas son capaces de oír frecuencias infrasónicas y los perros poseen un olfato extremadamente agudo, los seres humanos, en un afán de supervivencia, así como de adaptación al medio, han empleado a lo largo de los siglos sus mejores habilidades para contrarrestar estas carencias en sus sentidos y tratar de acercarse al mundo molecular. Los avances científicos en este campo desde el siglo XX se esquematizan en la ***figura 1.14*** y **tabla 1.3**.

En el Antiguo Egipto (aproximadamente en el siglo II a. C.) se utilizaban los comportamientos de los animales como indicadores de anomalías en alimentos, líquidos y excrementos para anticipar algunas enfermedades, como la detección de diabetes en orina. Posteriormente, en la época de los romanos, también se usaba a los animales como centinelas, y particularmente a las aves, que más adelante en Estados Unidos serían canarios, para evaluar la contaminación por monóxido de carbono.

Sin embargo, no fue hasta 1956 cuando las investigaciones realizadas por Leland C. Clark Jr. revolucionaron el mundo de los métodos analíticos, que precedieron a los estudios de los sensores hasta conseguir lo que conocemos en la actualidad como biosensor. Clark, conocido como el "padre de los biosensores" desarrolló el primer sensor químico para medir O_2 en sangre empleando por primera vez un sistema de electrodos. Más adelante, sobre la base del concepto de

catálisis enzimática, acopló la enzima glucosa oxidasa con una membrana de diálisis en el electrodo de oxígeno, desarrollando el primer biosensor oficial de la historia, reconocido como electrodo enzimático, que era capaz de medir glucosa. Años después, en 1967, Updike y Hicks adaptaron este concepto para la determinación cuantitativa de glucosa. De igual manera, Guilbault y Montalvo en 1969 desarrollaron el primer biosensor enzimático potenciométrico para la detección de urea.

Los avances que se realizaron sobre la base del biosensor enzimático proporcionado por Clark resultaron, a partir de la mitad de los años 1970, en el estallido de la investigación en este campo de la química, comenzando las primeras comercializaciones de biosensores para la determinación de glucosa. Los investigadores se dieron cuenta del abanico tremendo de posibilidades que ofrecía la cantidad de combinaciones posibles entre distintos elementos biológicos y transductores, dando lugar a gran variedad de dispositivos que hacían uso de enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos o receptores celulares, entre otros, acoplados a transductores, por ejemplo, electroquímicos, ópticos o piezoeléctricos. De este modo, cada combinación empleando estrategias diferentes tenía y satisfacía el objetivo de dar solución a numerosos problemas analíticos dentro del ámbito de la salud, la alimentación, la industria o el medioambiente.

El progreso de los biosensores continuó en las décadas de 1980 y 1990 implementando nuevas estrategias de detección, nuevos conceptos de bio-sensorización basados en la nanotecnología y en la miniaturización y portabilidad de los dispositivos [Newman & Turner, 2007; Yoo & Lee, 2010; Ridhorkar, 2023].

En la actualidad, el progreso de los biosensores ha logrado objetivos impensables para aquellos años. El interés recurrente por mejorar la calidad de vida, no solo a través de la salud de los seres humanos sino también en relación con el entorno, y por tanto en las áreas de la medicina, la industria alimentaria o el medio ambiente, alcanza actualmente al mundo de los biosensores. De esta manera, el avance de estas herramientas durante el siglo XXI puede decirse que se ha dirigido a modernizar algunas de sus características más valoradas, como la portabilidad, explorando en este caso la posibilidad de crear dispositivos "vestibles" (*wearable biosensors*) capaces de monitorizar diferentes analitos sobre piel, tela y otras superficies, o la multiplexación para determinar simultáneamente distintos biomarcadores, así como también a ampliar las técnicas de fabricación de bioplataformas con nuevos nanomateriales y metodologías de síntesis e inmovilización, haciendo uso de las herramientas de la Química Verde y su aplicación gracias al enriquecimiento ofrecido por tecnologías emergentes, estando inmersos en la actualidad en su acoplamiento con herramientas de inteligencia artificial [Qureshi et al., 2023].

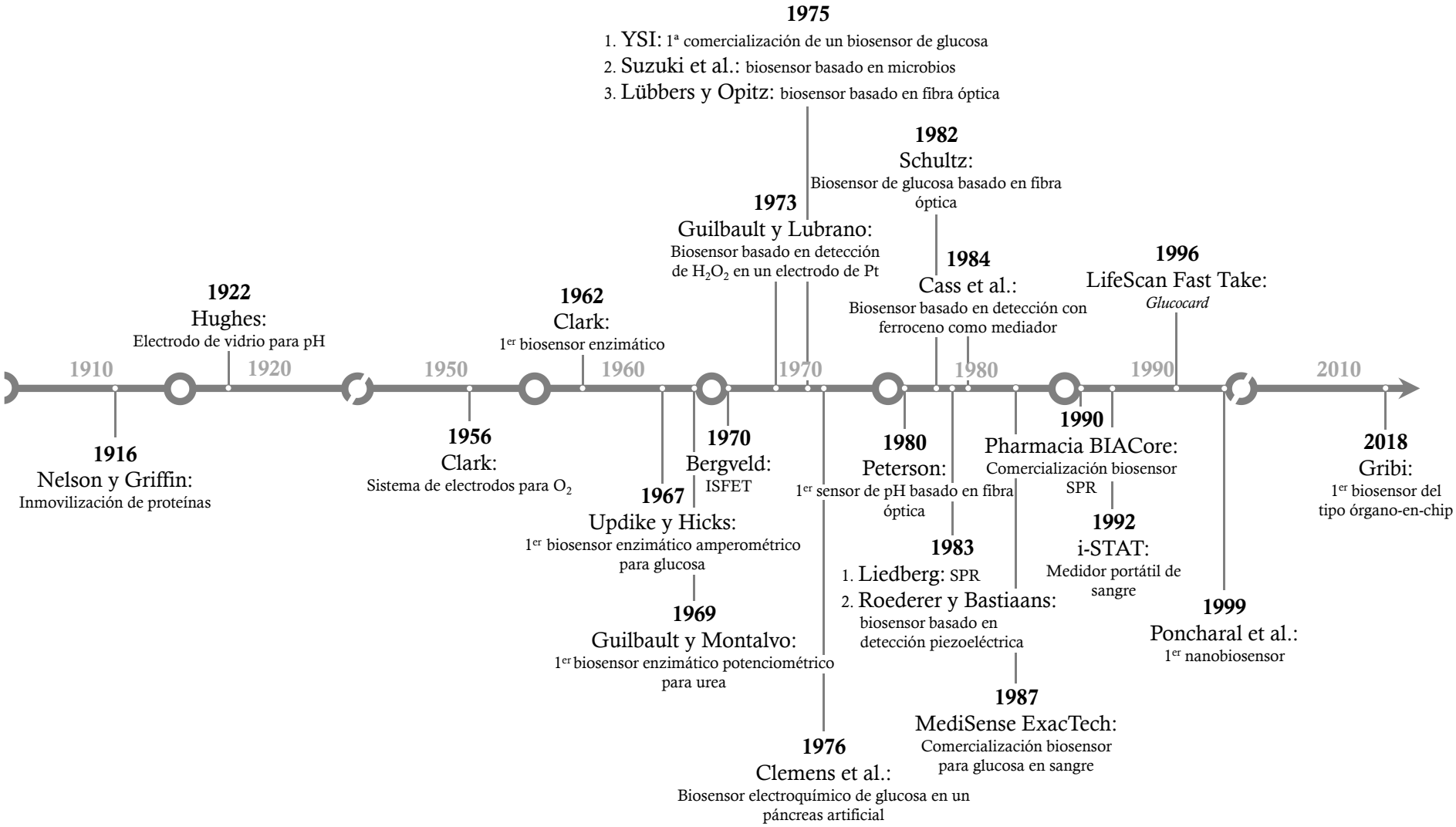


Figura 1.14. *Cronología de la evolución de los biosensores.*

Tabla 1.3. Evolución de los avances científicos en el ámbito de los biosensores.

Año	*Suceso*
1916	J. Nelson y E. Griffin notifican el primer informe sobre la inmovilización de proteínas [Nelson & Griffin, 1916].
1922	W. Hughes desarrolla el primer electrodo de vidrio para pH [Hughes, 1922].
1956	L. C. Clark Jr. describe el primer sistema de electrodos para medir O_2 [Clark, 1956].
1962	L. C. Clark Jr. implementa el primer biosensor enzimático [Clark & Lyons, 1962].
1967	S. J. Updike y G. P. Hicks desarrollan el primer biosensor enzimático amperométrico [Updike & Hicks, 1967].
1969	G. C. Guilbault y J. G. Montalvo reportan el primer biosensor amperométrico para detectar enzimáticamente urea [Guilbault & Montalvo, 1969].
1970	P. Bergveld descubre el primer transistor de efecto de campo sensible a los iones [Bergveld, 1970].
1973	G. C. Guilbault y G. J. Lubrano implementan la detección de glucosa y lactato monitorizando H_2O_2 en un electrodo de Pt [Guilbault & Lubrano, 1973].
1975	- Yellow Spring Instruments (YSI) comercializa el primer biosensor para glucosa. - S. Suzuki y su grupo revelan el primer biosensor basado en microbios [Suzuki et al., 1975]. - D. W. Lübbers y N. Opitz publican un biosensor basado en fibra óptica para la detección de CO_2 y O_2 [Lübbers & Opitz, 1975].
1976	A. H. Clemens y su grupo desarrollan por primera vez un biosensor implantado en un páncreas artificial [Clemens et al., 1976].
1980	J. Peterson y G. Vurek comprueban el primer sensor de pH fibra óptica para gasometría en sangre [Peterson & Vurek, 1984].
1982	J. S. Schultz manifiesta el primer biosensor de fibra óptica para detectar glucosa [Schultz, 1982].
1983	- B. Liedberg y su equipo observan la resonancia de plasmón superficial (SPR, del inglés *surface plasmon resonance*) [Liedberg et al., 1983]. - J. Roederer y G. Baastiaans desarrollan el primer biosensor con detección piezoeléctrica [Roederer & Bastiaans, 1983].
1984	A. E. Cass y su grupo emplean ferroceno como mediador en la detección amperométrica [Cass et al., 1984].
1990	Pharmacia BIACore comercializa el primer biosensor basado en SPR.
1992	i-STAT lanza el primer biosensor portátil para sangre.
1996	LifeScan Fast Take comercializa el primer biosensor de glucosa en sangre asistido por tiras: *Glucocard*.
1999	P. Poncharal y su equipo demuestran la nanotecnología desarrollando el primer nanobiosensor [Poncharal et al., 1999].
2018	S. Gribi y su grupo exponen un biosensor del tipo órgano-en-chip para evaluar la conducción del impulso nervioso [Gribi et al., 2018].

De la misma manera que la metodología de los biosensores ha evolucionado, su terminología también. Si bien los primeros autores los definieron como dispositivos analíticos autónomos que respondían selectiva y reversiblemente a la concentración o actividad de especies químicas en muestras biológicas, la falta de precisión en el concepto sobre el material biológico activo derivó a la aclaración de que un biosensor es un dispositivo que asocia estrechamente un elemento sensorial biológico y un transductor [Coulet, 2019]. Así, y de acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, del inglés *International Union of Pure and Applied Chemistry*), finalmente se detalló que un biosensor es un dispositivo bioanalítico autónomo que tiene una capa de biomoléculas en contacto muy próximo con el transductor que produce señales eléctricas. De este modo, las biomoléculas que lo forman están dentro o en contacto estrecho con el transductor de manera que producen una señal eléctrica equivalente a un analito [Bhardwaj, 2015].

Clasificación de los biosensores

Los principios de operación de un biosensor comprenden, por un lado, el reconocimiento biológico y, por otro lado, la detección, de manera que el analito de interés es reconocido biológicamente proporcionando una respuesta que con la acción del transductor se convierte en una señal eléctrica. Este mecanismo se lleva a cabo gracias a los tres principales componentes de los biosensores: sistema de reconocimiento biológico o biorreceptor, transductor y sistema de procesamiento de la señal (***figura 1.15***) [Morrison et al., 2008].

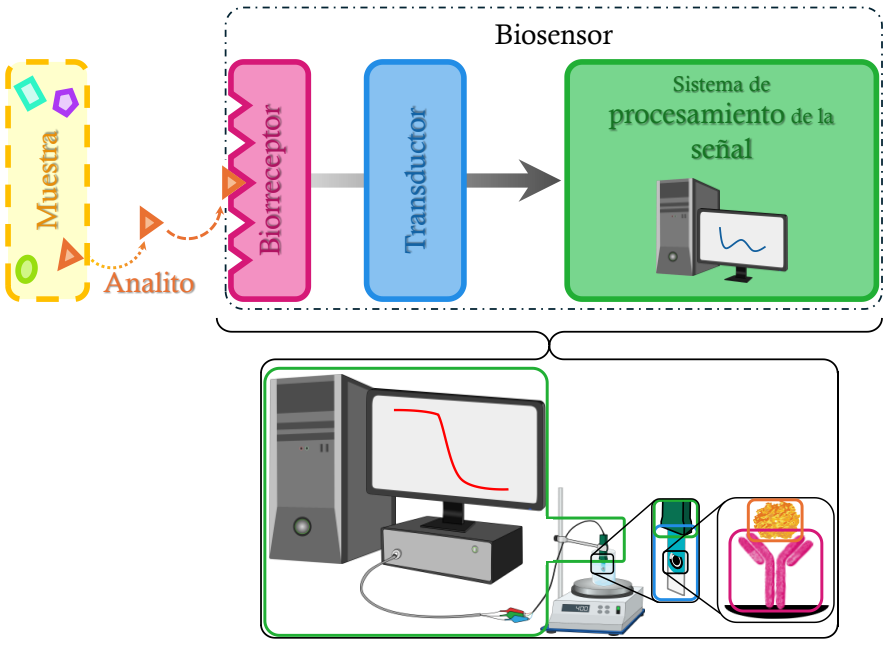


Figura 1.15. *Representación esquemática de los componentes de un biosensor. Ejemplo de modelo de biosensor empleado en esta Tesis Doctoral.*

Biorreceptor

El biorreceptor es una especie molecular que identifica al analito diana selectivamente a través de un mecanismo de reconocimiento bioquímico y lo une a la superficie del sensor para su medida. Por ende, la especificidad de un biosensor depende de él, convirtiéndose en el elemento distintivo de cada biosensor.

En función del tipo de elemento de biorreconocimiento empleado en el desarrollo del biosensor se ha elaborado una clasificación de los biosensores. Los biorreceptores más comunes, mostrados en la ***figura 1.16***, son o están basados en anticuerpos, ácidos nucleicos, enzimas o células [Karunakaran et al., 2015].

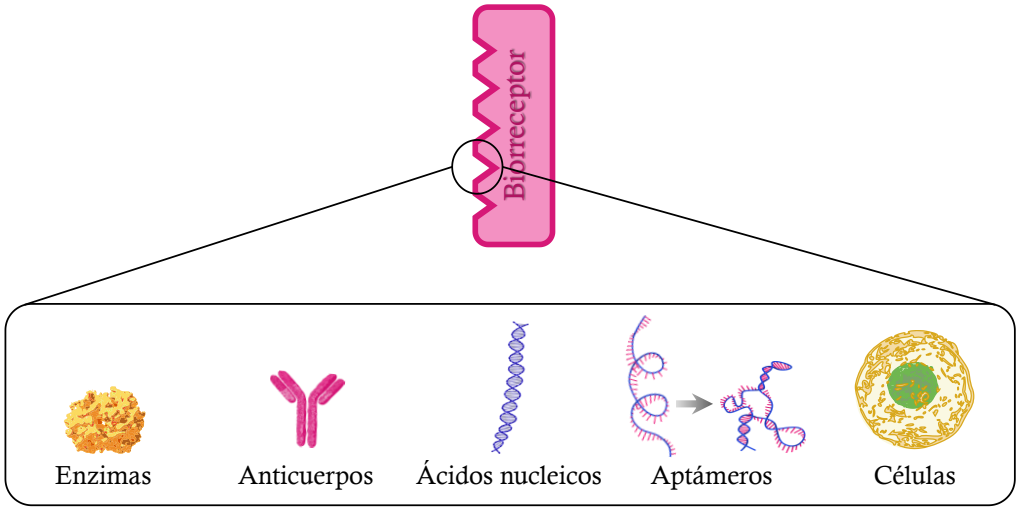


Figura 1.16. *Tipos de biorreceptores más comunes en biosensores.*

Biosensores enzimáticos

Tras los estudios pioneros realizados por L. C. Clark, los biosensores basados en el empleo de enzimas han sido ampliamente desarrollados. Las enzimas se inmovilizan sobre una matriz soporte sobre el transductor para formar la capa de reconocimiento, de manera que, gracias a sus propiedades de unión y actividad catalítica, hacen posible la detección de los analitos. Entre las enzimas más comunes usadas para la preparación de biosensores: oxidorreductasas, deshidrogenasas, transferasas, hidrolasas o liasas [Monošík et al., 2012], destacan la enzima glucosa oxidasa (GOx) [Liu, Y. et al., 2019], la peroxidasa de rábano (HRP) [Spychalska et al., 2020] y la alcohol deshidrogenasa (ADH) [Bilgi & Ayranci, 2016] debido a sus habilidades de biorreconocimiento, facilidad de utilización y elevado número de aplicaciones.

Los elementos de biorreconocimiento enzimáticos ofrecen grandes ventajas en términos de especificidad y sensibilidad, sencillez y posibilidad de redimensionamiento y multianálisis, y permiten el desarrollo de dispositivos rápidos, precisos y útiles para sistemas de monitorización. Sin embargo, la dependencia crítica de las enzimas de factores fisicoquímicos como la temperatura o el pH, que pueden provocar su desnaturalización o agregación, devalúan la aplicabilidad de los

biosensores enzimáticos. Además, las matrices complejas en las que se encuentran los biomarcadores en las muestras pueden contener inhibidores biológicos que dificultan la detección del analito diana. Por lo tanto, la fabricación de este tipo de biosensores requiere que se preste una especial atención a las condiciones experimentales de trabajo [Rocchitta et al., 2016; Gupta, U. et al., 2022].

Todo lo anterior, unido a que la obtención de grandes cantidades de enzimas naturales en algunas ocasiones puede resultar costoso y afectar a su actividad catalítica, ha hecho que el futuro de los biosensores enzimáticos haya evolucionado hacia el uso de nanomateriales con actividad catalítica pseudoenzimática (nanozimas) que exhiben propiedades fisicoquímicas únicas y miméticas con las características intrínsecas de las enzimas naturales [Alvarado-Ramírez et al., 2021].

Inmunosensores

El empleo de los anticuerpos como biorreceptores ha conseguido proporcionar límites de detección suficientemente bajos para detectar y determinar una innumerable cantidad de biomarcadores, lo que resulta inviable con otras herramientas analíticas. Estos biosensores se fundamentan en la inmunorreactividad específica del anticuerpo por el antígeno diana, formando un inmunocomplejo acoplado al transductor [Karunakaran et al., 2015; Aydin, M. et al., 2021].

La producción natural de los anticuerpos se genera a partir de una respuesta inmunológica frente a la presencia de un antígeno extraño, lo que induce la afinidad específica de los anticuerpos hacia este antígeno diana [Cristea et al., 2015]. Puede decirse que, experimentalmente se ha conseguido generar anticuerpos capaces de detectar casi cualquier molécula. Estos se dividen en dos clases: anticuerpos policlonales (AbP) y anticuerpos monoclonales (AbM). Los AbP proceden de la inmunización sucesiva de un animal, generalmente cabra, al que se le presenta el antígeno en varios intervalos para inducir memoria inmunológica. Por otro lado, los AbM proceden de la extracción de las células B activas de órganos linfoides de animales expuestos al antígeno, generalmente ratones o conejos, que posteriormente se fusionan con células plasmáticas tumorales que no secretan anticuerpos propios. Después de una selección exhaustiva de las células híbridas, se clonan en cultivos para obtener infinitas réplicas que generarán AbM idénticos. Si bien el uso de AbM es recomendable para la preparación de biosensores debido a su mayor selectividad frente al antígeno y menor variabilidad, traducida a una mejor reproducibilidad, el proceso de obtención es mucho más costoso y no siempre es posible llevarlo a cabo [Magadán-Mompó et al., 2011].

Genosensores y aptasensores

El empleo de secuencias de ácidos nucleicos para la preparación de biosensores ha supuesto un gran avance en el diagnóstico e identificación de enfermedades a través del estudio de las mutaciones o la expresión génica, entre otros. El desarrollo de los biosensores basados en ácidos nucleicos, denominados genosensores, se fundamenta en la modificación de un sustrato con sondas

de ácidos nucleicos específicas capaces de detectar las complementarias a través de procesos de hibridación. La sonda de ácido nucleico, empleada como elemento de biorreconocimiento, proporciona la selectividad de los biosensores, mientras que la sensibilidad dependerá de la eficiencia del proceso de hibridación [Liu, A. et al., 2012].

Por otro lado, los aptasensores emplean como elemento de biorreconocimiento los aptámeros, que son secuencias de RNA o DNA que exhiben elevada afinidad por las moléculas diana y cambian de conformación en su presencia. A pesar de que sus propiedades los hacen muy competitivos frente a los biosensores basados en enzimas o anticuerpos, en algunas ocasiones su uso se ve limitado por el todavía escaso conocimiento de su potencial [Song, S. et al., 2008].

Biosensores basados en células

Las células o los microorganismos, enteros o parte de ellos, pueden utilizarse como elementos de biorreconocimiento en los biosensores debido a la gran variedad de receptores que expresan, permitiendo interacciones específicas con algunas especies. De esta manera, además de proporcionar una respuesta cuantitativa a estímulos específicos, pueden determinar más de un analito suponiendo menos esfuerzo y gasto. Este tipo de biosensores incluyen diferentes tipos de células como bacterias, hongos y levaduras, algas y algunas células superiores como las procedentes de peces, ratas e incluso células humanas [Gupta, N. et al., 2019].

Aunque constituyen una herramienta analítica útil para determinar y evaluar los efectos fisiológicos de analitos bioactivos, la estabilidad celular, selectividad y prolongación de la vida útil del biorreceptor suponen un reto en el desarrollo y optimización de estos biosensores. Es por ello por lo que se persigue encontrar alternativas que imiten el comportamiento celular haciendo uso de biotecnologías como la nanotecnología, la microfluídica y el cribado de alto contenido [Liu, Q. et al., 2014].

Transductor

El transductor es otro componente fundamental de los biosensores. Es un dispositivo encargado de convertir la señal de biorreconocimiento en una señal medible. Esta señal detectable da lugar a una segunda clasificación de los biosensores en ópticos, electroquímicos, calorimétricos, gravimétricos, electrónicos o magnéticos [Karunakaran et al., 2015; Viswananthan & Govindasamy, 2019].

Biosensores ópticos

Los biosensores ópticos son aquellos en los que la información analítica genera una respuesta empleando la interacción con la radiación electromagnética. Las formas de transducción más comunes se basan en medidas de absorbancia, reflectancia, emisión de fluorescencia o resonancia de plasmón superficial (SPR, del inglés s*urface plasmon resonance*) que ocurren en las franjas del UV, visible o infrarrojo cercano [Borisov & Wolfbeis, 2008]. Cuando se produce el biorreconocimiento,

la interacción molecular en la superficie del transductor modula las características de la luz como intensidad, fase o polarización.

La base de cualquier biosensor óptico es la guía de ondas ópticas, cuyos mecanismos de estabilidad, flexibilidad, ausencia de ruido y conductividad de luz eficiente la hacen ideal para su implementación en los biosensores. La detección se fundamenta en el campo evanescente, que permite monitorización directa de pequeños cambios en las propiedades ópticas.

Dependiendo del efecto físico empleado para medir la variación óptica, los biosensores pueden subclasificarse en los de fibra óptica, como el desarrollado por Murugan y cols. para el COVID-19 [Murugan et al., 2020], los de resonancia de plasmón superficial (SPR, del inglés *surface plasmon resonance*) como por ejemplo el publicado por Chaudhary y cols. para el diagnóstico rápido de malaria [Chaudhary et al., 2021] o los integrados basados en guías planas o canales [Lechuga, 2005] entre los que se puede citar el descrito por Tung y cols. para la detección de fenotipos celulares [Tung et al., 2012].

Biosensores electroquímicos

La mayoría de los biosensores emplean este tipo de transducción debido a su alta sensibilidad, selectividad, bajo coste, facilidad de uso, portabilidad y capacidad de multiplexado. El fundamento de la detección electroquímica es la medida de respuestas debidas a la interacción de la materia con la energía eléctrica, de modo que las señales monitorizables contienen información convertible en señales eléctricas basadas en medidas de corriente, acumulación de potencial o alteraciones en las propiedades conductoras entre dos electrodos. A diferencia de los biosensores ópticos, estas medidas se pueden llevar a cabo en fluidos turbios u opacos, lo que los hace más compatibles para aplicaciones en el área clínica o medioambiental [Ronkainen et al., 2010; Singh, A. et al., 2021].

Las técnicas electroquímicas más utilizadas para la transducción con biosensores son la (crono)amperometría, la voltamperometría cíclica (CV, del inglés *cyclic voltammetry*) y la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, del inglés *electrochemical impedance spectroscopy*). Estas dos últimas son las comúnmente utilizadas para la caracterización electroquímica de los procesos de modificación de la superficie del electrodo, mientras que la (crono)amperometría es la técnica más sencilla para recoger la información de las reacciones electroquímicas que ocurren en la superficie de un electrodo por medida de la intensidad de corriente resultante aplicando un potencial constante entre el electrodo de trabajo (WE, del inglés *working electrode*) y el electrodo de referencia (RE, del inglés *reference electrode*) [Pupim Ferreira et al., 2013]. De un modo similar, aunque aplicando un barrido de potencial entre valores elegidos, también se utilizan las técnicas voltamperométricas, como la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV, del inglés *differential pulse voltammetry*) [Gupta, V. K. et al., 2011].

Las características ideales que ofrece este tipo de transducción para responder a las demandas actuales de la sociedad han llevado a seleccionarla para las investigaciones de esta Tesis Doctoral.

Biosensores calorimétricos

El desarrollo de los biosensores calorimétricos se cimenta en que todos los procesos bioquímicos que implican un intercambio de calor [Xie et al., 1999]. Así, el cambio de temperatura asociado a la interacción entre el elemento de biorreconocimiento y el analito diana se mide con un termistor, generalmente un óxido metálico, o con un termófilo como un semiconductor cerámico, que permiten relacionar dicha variación con la cantidad de reactivos consumidos o de productos formados [Karunakaran et al., 2015].

Biosensores piezoeléctricos

El fundamento de estos biosensores reside en un principio micro-electromecánico derivado de variaciones gravimétricas en las que la frecuencia de resonancia de un cristal, generalmente de cuarzo, oscila por las interacciones entre el analito y el biorreceptor. El medio de propagación de la onda de resonancia da lugar a dos subclases de biosensores: los de propagación a través del interior del sustrato (BAW, del inglés *bulk acoustic wave*), entre los que destacan la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, del inglés *quartz crystal microbalance*) o sobre la superficie del sustrato (SAW, del inglés *surface acoustic wave*) [Pohanka, 2017].

Biosensores magnetoelásticos

Análogamente a los anteriores, los biosensores magnetoelásticos siguen el mismo principio gravimétrico que los piezoeléctricos, pero la detección deriva de cambios en las dimensiones de un material magnetoelástico cuando se expone a un campo magnético. Cuando una fina tira de un material magnetoelástico se expone a pulsos magnéticos, la tira oscila emitiendo un campo magnético. La frecuencia, amplitud y amortiguación proporciona información sobre las diferentes capas formadas en el biosensor cuando se produce la interacción entre el analito y el biorreceptor [Grimes et al., 2002].

Biosensores eléctricos

La transducción basada en el transistor del efecto de campo (FET, del inglés *field effect transistor*), descrita en un biosensor por primera vez por Bergveld en 1970 [Bergveld, 1970], es actualmente una candidata adecuada para los biosensores del tipo "*label-free*", es decir, sin necesidad de marcaje. El transductor consta de tres electrodos: fuente, drenaje y puerta, de modo que cuando se produce una interacción con el analito o cambio de concentración de éste en la región entre el drenaje y la fuente, se produce un cambio en la carga cercano a la interfaz del sensor, entre el drenaje y la puerta, que induce un cambio de voltaje efectivo que conduce a un cambio en la corriente [Wadhera et al., 2019].

Sistema de procesamiento de la señal

Consiste en la parte electrónica del biosensor que se encarga de procesar la señal generada en la transducción para su visualización. Es un conjunto de circuitos electrónicos complejos que procesan la señal mediante amplificación y conversión para trasladarla de formato analógico a digital [Bhalla et al., 2016].

Todos y cada uno de los componentes de un biosensor deben ser capaces de proporcionar a éste atributos estáticos y dinámicos adecuados para su aplicación, los cuales serán optimizados a lo largo de la fabricación del biosensor [Bhalla et al., 2016].

Características de los biosensores

Selectividad

Posiblemente esta es la característica más importante de los biosensores. Se atribuye al elemento de biorreconocimiento, que puede ser específico si es capaz de detectar únicamente un analito presente en una muestra que contiene otros componentes y contaminantes.

Sensibilidad

Aunque se define por el valor de la pendiente de los calibrados, es común que se utilice como criterio de "sensibilidad" la cantidad mínima detectable por el biosensor del analito diana. Habitualmente se utilizan los valores del límite de detección (LOD, del inglés *limit of detection*) y del límite de cuantificación (LOQ, del inglés *limit of quantification*). En muchas aplicaciones médicas, alimentarias o medioambientales se requieren límites muy bajos, de órdenes de magnitud desde ng mL^{-1} hasta fg mL^{-1} debido a los valores de corte establecidos tanto para el diagnóstico temprano y seguimiento de enfermedades, como para la detección de trazas en diferentes tipos de muestras.

Reproducibilidad

Es la capacidad de un biosensor para generar respuestas idénticas o similares en unas condiciones experimentales idénticas. Depende de muchos factores entre los que se incluye la inmovilización y estabilidad del biorreceptor, y la precisión del transductor. Cuanto más reproducibles sean las señales proporcionadas por el biosensor, mayor será la fiabilidad del dispositivo.

Estabilidad

Considerada como el grado de susceptibilidad a perturbaciones dentro y alrededor del sistema, como temperaturas, pH, degradación de las biomoléculas, etc. Estas variaciones pueden influir en el registro de la señal, lo que implica un error en la concentración registrada para el analito afectando a la precisión y exactitud. Es una característica particularmente relevante en las

aplicaciones de los biosensores que requieren una monitorización continua o largos periodos de almacenamiento y con vistas a su futura comercialización.

Linealidad

Evaluada matemáticamente de acuerdo con la ***ecuación 1.1*** de regresión lineal:

$$y = a + bx \qquad \textbf{\textit{Ecuación 1.1}}$$

donde "y" es la señal registrada, "x" la concentración del analito y "m" es la pendiente relacionada con la sensibilidad. Muestra la exactitud de las medidas cuando se relaciona con el coeficiente de correlación (r), o de determinación (R^2). Por otro lado, una característica vinculada a la linealidad es el intervalo en que esta propiedad se cumple (intervalo dinámico lineal).

Biosensores electroquímicos

Desde las aportaciones de L. C. Clark en 1962 hasta nuestros días, los biosensores electroquímicos han sido objeto permanente de investigación, y han experimentado un desarrollo sin precedentes derivado de las oportunidades y propiedades que ofrecen al combinar la selectividad de los biorreceptores con la elevada sensibilidad proporcionada por la detección electroquímica. Además, gracias al progreso tecnológico y los avances en la instrumentación electroquímica, ha sido posible la miniaturización de estos biosensores e incrementar su utilización para muchas aplicaciones que requieren portabilidad, medidas rápidas y pequeñas cantidades de muestra, ampliando también sus posibilidades de comercialización [Pohanka & Skládal, 2008].

Aunque se han investigado diferentes tipos de transductores con aplicación a una gran variedad de analitos, puede decirse que los transductores electroquímicos son hoy en día los más utilizados, superando a los demás en número y en grado de desarrollo, independientemente del destino de aplicación del biosensor. Esto se debe, por un lado, a la necesidad de analizar tipos muy diversos de muestras para la determinación de biomarcadores en tiempos cortos empleando plataformas de bajo coste y, por otro lado, a la posibilidad de detección múltiple de los biomarcadores de interés (incluso de diferente nivel molecular) que muchas veces se requiere, pudiéndose emplear además formatos inalámbricos tanto para la detección como para la adquisición de datos. En consecuencia, los biosensores electroquímicos aúnan todas las ventajas necesarias para facilitar las tareas en el campo de la medicina, para la monitorización de enfermedades y la obtención de pruebas diagnósticas, en el análisis alimentario, para mayor seguridad y control de calidad o en aplicaciones medioambientales, a nivel de residuos, contaminantes ambientales y amenazas biológicas [Cesewski & Johnson, 2020].

Los transductores electroquímicos están basados en el empleo de electrodos constituidos por materiales conductores o semiconductores. Sobre el electrodo de trabajo se inmoviliza directa o indirectamente el elemento de biorreconocimiento y tras la captura del analito diana, a través de los electrodos y el transductor, la energía química asociada a esta interacción se convierte en una respuesta electroquímica [Iqbal et al., 2012].

Electrodos serigrafiados

El uso de los electrodos tradicionales que empleaban grandes células electroquímicas se ha visto desplazado por la necesidad de miniaturización de los componentes de los biosensores para desarrollar dispositivos que puedan utilizarse en el punto de atención. En este contexto, la fabricación y uso de electrodos serigrafiados (SPEs, del inglés screen-printed electrodes) ha crecido exponencialmente gracias, ente otros, a la reducción de los volúmenes de muestra necesarios, requiriendo tan solo unos pocos microlitros, y a su portabilidad, lo que ha potenciado su utilización en múltiples aplicaciones, así como el empleo de células electroquímicas mucho más pequeñas, favoreciendo a la disminución del tamaño total del sistema de diagnóstico para integrarlos en los dispositivos en el punto de atención. La tecnología de la serigrafía ha sido ampliamente desarrollada y ha evolucionado desde la década de 1990, permitiendo la fabricación en masa de biosensores electroquímicos económicos y desechables, con viabilidad para el análisis multiplexado, reproducibles y robustos, que han eliminado los problemas asociados a la limpieza de los electrodos clásicos sólidos evitando efectos de memoria [Renedo et al., 2007; Taleat et al., 2014].

Las plataformas de electrodos serigrafiados contienen un sistema de tres electrodos, representado en la ***figura 1.17***: electrodo de trabajo (WE), sobre el que se inmoviliza, directa o indirectamente, el elemento de biorreconocimiento que interaccionará con el analito y donde ocurre la reacción electroquímica; electrodo de referencia (o pseudoreferencia) (RE), mediante el que se establece una diferencia de potencial constante y conocida con el WE, garantizando así la reproducibilidad de las medidas; y electrodo auxiliar o contraelectrodo (AE) que cierra el circuito eléctrico, permitiendo un flujo de corriente sin interferir en la medida electroquímica. Así, el potencial se aplica entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo y la intensidad de corriente fluye entre éste y el electrodo auxiliar [Pohanka & Skládal, 2008].

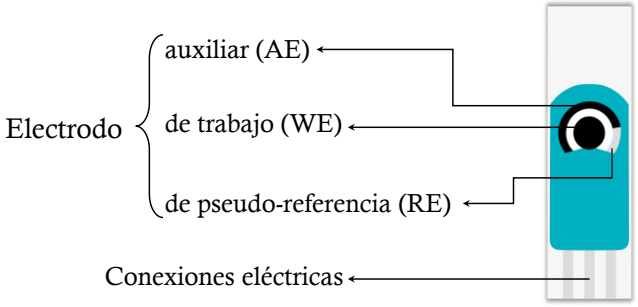


Figura 1.17. *Componentes de un electrodo serigrafiado.*

Los SPEs se fabrican, de acuerdo con el esquema de la ***figura 1.18***, en sustratos cerámicos o plásticos sobre los que se imprimen diferentes tipos de tintas, las más típicas son las de carbono, grafito, plata y oro, cuya composición es fundamental para fines electroquímicos. Debe contener tres componentes esenciales: una carga conductora, un aglutinante no conductor y un disolvente volátil, no contaminados para garantizar la actividad electroquímica única de la carga conductora en una amplia ventana de potencial electroquímico. Cuando la tinta se imprime sobre el sustrato, el disolvente volátil se evapora y deja a la carga conductora adherida al aglutinante, proceso conocido como "curado". Dependiendo del curado, el aglutinante puede precipitar o polimerizase [Fletcher, 2015].

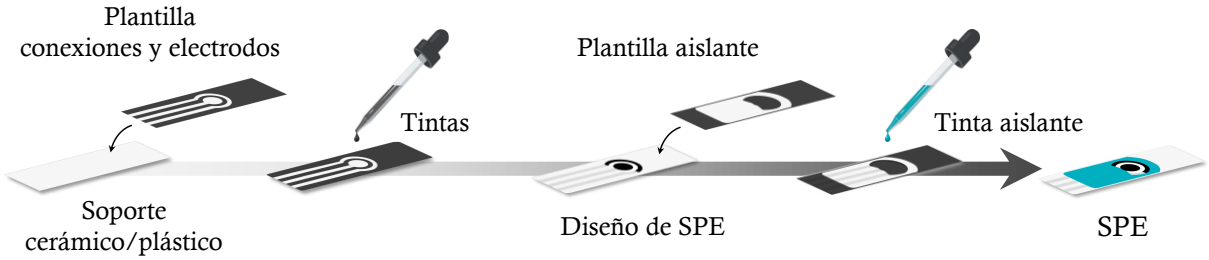


Figura 1.18. *Etapas del proceso de fabricación de SPEs.*

La fabricación de electrodos serigrafiados ha dado lugar a su comercialización con múltiples formatos, variando sus formas geométricas: circulares, elípticas, etc., el material de los electrodos: carbono (empleados en esta Tesis Doctoral), oro, platino, etc., así como posibilidad de multiplexado añadiendo en una misma superficie varios electrodos de trabajo (WE), desde uno (SPE), dos (SP_2E), cuatro (SP_4E) u ocho (SP_8E) hasta crear plataformas de 96 electrodos ($SP_{96}E$), como se muestra la ***figura 1.19***. La gran versatilidad que ofrecen los electrodos serigrafiados permite su selección de acuerdo con la selectividad y sensibilidad y el número de dianas que se requiere determinar.

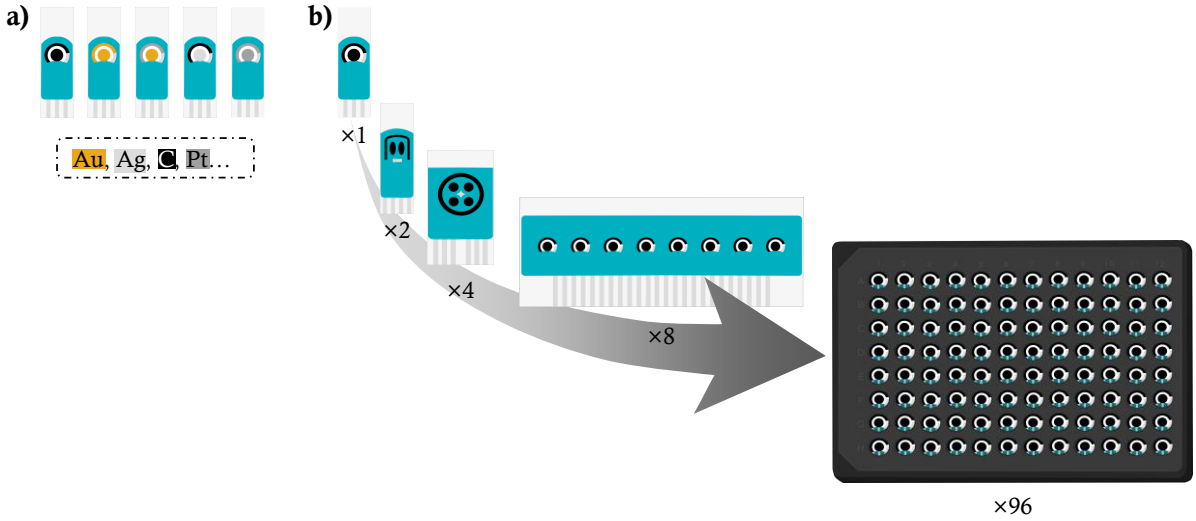


Figura 1.19. a) *Ejemplos de tintas empleadas en diferentes WE y AE de SPEs.* ***b)*** *Multiplexación.*

Cabe destacar, además, que estas características se pueden mejorar gracias a la posibilidad de modificación de la superficie con diversos materiales (***figura 1.20***): polímeros, moléculas orgánicas, nanomateriales derivados del carbono (nanotubos de carbono, grafeno, etc.), nanopartículas metálicas, de óxidos o de sales (AuNPs, CeO_2NPs, MoS_2NPs, etc.), así como también con el material biológico esencial para construir el biosensor: enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, células, etc., lo que confiere una gran versatilidad a estos electrodos y en general a los biosensores electroquímicos basados en su empleo [Pérez-Fernández et al., 2020].

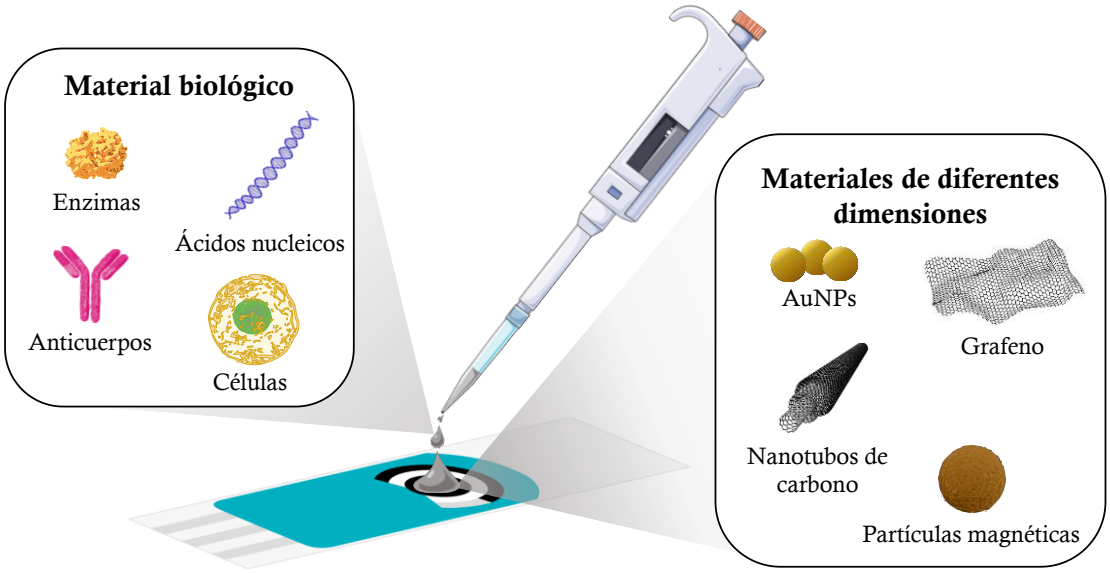


Figura 1.20. *Modificación de la superficie electródica con distintos materiales biológicos y nano o micrométricos artificiales.*

Hay que señalar finalmente que los dispositivos de medida basados en biosensores electroquímicos también han evolucionado en su conjunto, y actualmente se diseñan alternativas portátiles inalámbricas del tamaño de una tarjeta de crédito, adecuadas y de coste asequible para su aplicación en el punto de atención [García-Miranda Ferrari et al., 2021].

Clasificación de los biosensores electroquímicos

Biosensores potenciométricos

La transducción se basa en los principios de los electrodos selectivos de iones y de los transistores de efecto de campo sensibles a iones. De esta manera, se mide la acumulación de carga de potencial sobre el electrodo de trabajo frente al electrodo de referencia dentro de una célula electroquímica donde no hay flujo de corriente, siguiendo la ecuación de Nernst (***ecuación 1.2***):

$$E_{célula} = E^{0}_{célula} - \frac{RT}{nF} LnQ \qquad \textbf{\textit{Ecuación 1.2}}$$

donde "$E_{célula}$" es el potencial medido en ausencia de corriente, "$E^0_{célula}$" es una contribución constante de potencial en la célula, "R" la constante universal de gases, "T" la temperatura (K),

"n" el número de cargas en la reacción electródica, "F" la constante de Faraday y "Q" la relación de concentraciones del ánodo frente al cátodo [Grieshaber et al., 2008].

Los biosensores potenciométricos son capaces de proporcionar información sobre la actividad iónica, colocándolos en la técnica estándar para análisis clínicos de iones, y en particular los electrolitos biológicamente relevantes en fluidos fisiológicos o células (Na^+, K^+, Ca^{+2} o Cl^-), frente a las demás metodologías analíticas que relacionan la concentración total [Ding & Qin, 2020]. Sin embargo, con los avances de los últimos años ha sido posible el análisis de otros analitos, tales como neurotransmisores, proteínas, bacterias, pequeñas moléculas y toxinas, aprovechando el uso de receptores biomiméticos como intercambiadores de iones en la membrana polimérica, adición de enzimas selectivas que formen los iones para los que la membrana es selectiva, y formatos moleculares tipo sándwich que emplean anticuerpos, DNA, proteínas o aptámeros que se integran en la membrana [Walker et al., 2021].

Biosensores amperométricos y voltamperométricos

La amperometría es una técnica electroquímica que consiste en medir la oxidación o reducción electroquímica de una especie electroactiva mediante la aplicación de un potencial apropiado, dando lugar a una corriente anódica o catódica [Amine & Mohammadi, 2018].

La técnica electroquímica comúnmente más utilizada dentro del campo de los biosensores es la (crono)amperometría, que consiste en aplicar un potencial constante al electrodo y medir la intensidad de corriente en función del tiempo. Cuando, tras la aplicación del potencial constante, un reactivo electroactivo transforma su estado de oxidación en la superficie del electrodo, se produce una variación de corriente proporcional a esta oxidorreducción, que será directa o inversamente proporcional a la concentración del analito [Belluzo et al., 2008].

Aunque la configuración del sistema del transductor puede consistir únicamente en dos electrodos, WE y RE, el control del potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo es limitado a altas intensidades de corriente, lo que se ve reflejado en un rango lineal más corto. Para solventarlo, generalmente se emplea el sistema de tres electrodos descrito previamente (***figura 1.17***), y que incluye el electrodo auxiliar (AE) [Pohanka & Skládal, 2008].

Por otro lado, la voltamperometría cíclica (CV) es otra de las técnicas electroquímicas más utilizadas para la determinación de las propiedades redox de diferentes analitos. Se aplica un barrido cíclico de potencial desde un valor inicial hasta un valor final para volver de nuevo al inicial, a una velocidad (ν) establecida, mientras se registra la intensidad de corriente [Chevion et al., 2000].

Biosensores impedimétricos

La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) es la técnica de transducción que emplean estos biosensores, en la que se mide una amplia gama de frecuencias de potencial de corriente alterna entre 100 kHz y 1 mHz estableciendo una relación entre la corriente y la diferencia de potencial empleada [Hammond et al., 2016]. Tras la aplicación de una perturbación sinusoidal de voltaje para un conjunto de frecuencias y, al mismo tiempo, el registro de la respuesta sinusoidal de la corriente resultante, se genera una relación de amplitud entre la tensión y corriente y el desfase entre la entrada y salida, impedancia (Z), que depende de la frecuencia de perturbación [Ciucci, 2019]. De este modo, la impedancia electroquímica (Z) global es la suma de la parte real (Z'), vinculada a procesos resistivos, y la parte imaginaria (Z''), relativa a los procesos capacitivos [Mei et al., 2018].

La interpretación de los procesos de reacción de EIS se esquematiza con circuitos eléctricos equivalentes formado por resistencias, condensadores y/o elementos de fase constantes, combinados en paralelo o en serie. El modelo de circuito equivalente más conocido es el de Randles-Ershler (***figura 1.21.a***), que se emplea para muchas superficies conductoras. Incluye la resistencia óhmica (R_S) de la disolución electrolítica entre el electrodo de trabajo (WE) y el de referencia (RE), la resistencia a la transferencia de carga (R_{CT}), la capacitancia de doble capa relacionada con la de la capa bioactiva compleja, y la impedancia de Warburg (Z_W), en régimen de difusión normal a través de la capa compleja a la superficie del electrodo [Bahadir & Sezgintürk, 2015; Bahadir & Sezgintürk, 2016].

La representación de cada punto de EIS da lugar al gráfico o espectro de Nyquist (***figura 1.21.b***), representando en el eje de abscisas la parte real (Z'), y la parte imaginaria negativa (–Z'') en las ordenadas. El gráfico comienza con una primera región que se relaciona con el control cinético. Primero aparece, como resultado de aplicar altas frecuencias, solo la transferencia de carga (R_S), seguido de un semicírculo por cada capa de revestimiento, resultante de la capacitancia de doble capa (C_{DL}) y la resistencia a la transferencia de carga (R_{CT}). Cuanto más rápida sea la transferencia de carga, más pequeño será el diámetro del semicírculo y viceversa. A medida que disminuye la frecuencia, aparece una segunda región donde comienza la difusión de carga entre la interfase electrodo–electrolito, haciéndose sustancial la transferencia de masa de las especies redox hacia y desde la interfase. Idealmente, esta parte lineal presenta un ángulo de 45º frente al arco de la primera región, conociéndose como región de Warburg, aunque puede desviarse ±10º o pertenecer a un sistema no ideal [Laschuk et al., 2021].

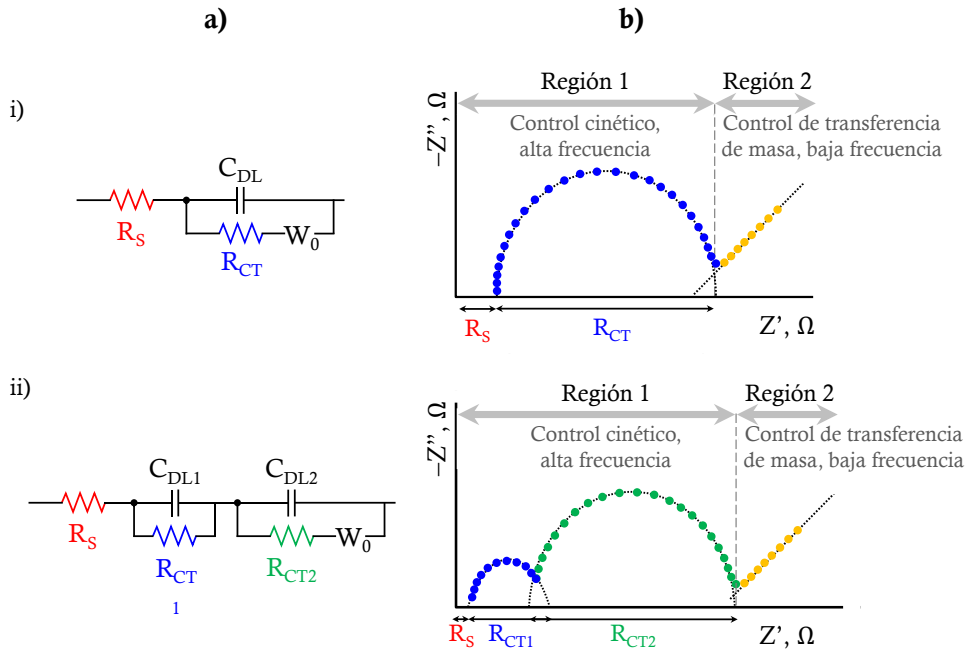


Figura 1.21. a) *Circuito equivalente de Randles-Ershler y* ***b)*** *gráfico de Nyquist para un sistema electroquímico con i) una o ii) dos capas de recubrimiento.*

De esta manera, a través de estos biosensores se obtiene información útil sobre los cambios fisicoquímicos ocurridos cuando un analito se une al elemento de biorreconocimiento inmovilizado sobre el electrodo [Macdonald et al., 2005].

1.2.2. ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS

El principio fundamental de los biosensores consiste en medir una reacción de reconocimiento biológico ocurrida en la superficie del transductor a través de la interacción con el biorreceptor. Por ello, la inmovilización del elemento de biorreconocimiento directa o indirectamente sobre la superficie del transductor (***figura 1.22***) se considera una etapa crítica. Si bien el biorreceptor se puede inmovilizar sobre la superficie del transductor de forma directa, existen diversas metodologías para inmovilizar las biomoléculas de manera indirecta sobre el transductor [Camarero, 2008].

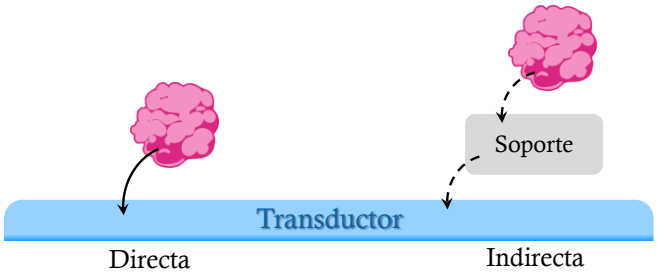


Figura 1.22. *Inmovilización directa e indirecta del biorreceptor sobre la superficie del transductor.*

Se debe prestar una especial atención a la metodología de inmovilización empleada en el desarrollo del biosensor, pues el elemento biológico debe mantenerse estable en la superficie, permitir la difusión de sustratos y productos, así como una excelente transferencia de electrones en el caso de los biosensores electroquímicos. Además, los procesos empleados para inmovilizar al biorreceptor deben ser reproducibles con el fin de conseguir biosensores precisos y fiables [Bhardwaj, 2014].

Entre todos los métodos de inmovilización del elemento de biorreconocimiento, los más comunes, resumidos en la **tabla 1.4** y esquematizados en la ***figura 1.23***, incluyen: adsorción, atrapamiento, entrecruzamiento con reactivos químicos funcionales o copolimerización en una matriz polimérica, unión covalente, autoensamblaje, interacciones de afinidad, quelación, o combinación de algunas de estos procedimientos. Aunque en algunas ocasiones no existen diferencias significativas cuando el biorreceptor se inmoviliza de forma aleatoria u orientada, otras veces pueden bloquearse los grupos funcionales o esenciales del biorreceptor implicados en la reacción de biorreconocimiento, por lo que será necesario llevar a cabo una inmovilización orientada. Además, la inmovilización en la superficie del transductor puede ser reversible, si una vez usado se puede retirar el biorreceptor, o irreversible, cuando los enlaces son fuertes o existe un impedimento para su liberación. Por lo tanto, la buena elección del tipo de inmovilización empleada será esencial para el correcto funcionamiento del biosensor [Prieto-Simon et al., 2008; Viswananthan & Govindasamy, 2019].

Tabla 1.4. Principales métodos de inmovilización del biorreceptor sobre la superficie del transductor.

Método	***Reversible/ Irreversible***	***Orientada/ No orientada***
Adsorción	Reversible	No
Interacciones por afinidad		Sí
Quelación		Sí
Atrapamiento	Irreversible	No
Entrecruzamiento/ copolimerización		
Unión covalente		
Autoensamblaje		Sí

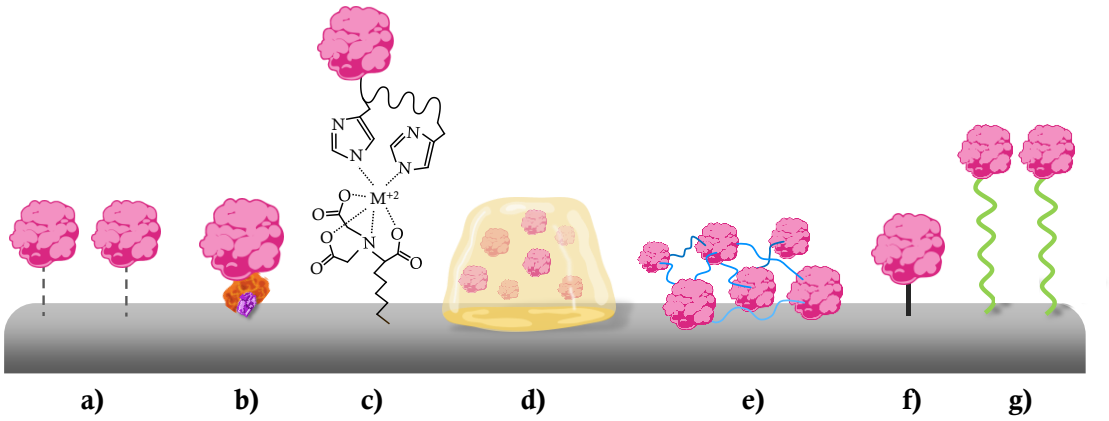


Figura 1.23. *Métodos de inmovilización:* ***a)*** *adsorción,* ***b)*** *interacción por afinidad (biotina–estreptavidina),* ***c)*** *quelación,* ***d)*** *atrapamiento,* ***e)*** *entrecruzamiento/copolimerización,* ***f)*** *unión covalente y* ***g)*** *autoensamblaje.*

Inmovilización por adsorción

La inmovilización del elemento de biorreconocimiento a través del mecanismo de adsorción consiste en el empleo de interacciones físicas generadas entre la superficie del transductor y el biorreceptor, entre las que se incluyen fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno. Es un proceso sencillo y rápido que no requiere de otros reactivos y mantiene las funciones y estructura de la biomolécula, sin embargo, la fijación es débil y no permanente. Se emplea comúnmente en biosensores enzimáticos, y aunque todos los transductores permiten este tipo de inmovilización, no todas las enzimas se pueden inmovilizar por este método [Jesionowski et al., 2014].

Inmovilización por atrapamiento

En este proceso se forma o transforma un sólido o gel en presencia del elemento de biorreconocimiento de manera que éste queda atrapado, covalentemente o no, dentro de la matriz del material a medida que éste se construye, por efecto de tamaño, fuerzas supramoleculares o bien por combinación de ambos fenómenos. Para la formación del material, generalmente un gel, es necesario una matriz sólida reticulada y un líquido confinado que proporcione un medio adecuado para que la biomolécula retenida se encuentre en sus condiciones óptimas.

Aunque es el método de inmovilización más rápido y genera menos posibilidades de ocasionar cambios conformacionales en la biomolécula receptora, se puede producir la liberación de éstas cuando el material formado es demasiado poroso, y si no lo es puede verse dificultada la difusión. Por ello, este proceso de inmovilización necesita un compromiso en el tamaño del poro para proporcionar un atrapamiento satisfactorio con una difusión correcta y un movimiento restringido de la biomolécula [Imam et al., 2021].

Inmovilización por entrecruzamiento o copolimerización

Consiste en la formación de enlaces cruzados intermoleculares irreversibles entre las biomoléculas del biorreceptor sin unirse a ningún soporte. Así, la inmovilización se lleva a cabo con ayuda de un reactivo multifuncional que actúa como enlace para conectar las biomoléculas y formar agregados tridimensionales reticulados. Entre los reactivos más comunes empleados en este proceso se encuentra el glutaraldehído, que entrecruza las moléculas a través de los grupos amino libres de residuos de lisina.

Es un método simple, basado en enlaces químicos fuertes, por lo que aumenta la estabilidad y no hay posibilidad de liberación o pérdida de biomoléculas. Sin embargo, en algunas ocasiones pueden producirse modificaciones severas en estas moléculas ocasionadas por cambios conformacionales que impliquen pérdidas en la funcionalidad. No obstante, esto se puede minimizar incorporando proteínas inertes como gelatina o albúmina de suero bovino (BSA) durante el proceso de entrecruzamiento [Nguyen, H. & Kim, 2017].

Inmovilización por autoensamblaje

Con el fin de evitar posibles procesos de difusión de los biorreceptores de las capas formadas para la interacción de éstos con la superficie del transductor, y de la liberación de las biomoléculas de reconocimiento por las interacciones débiles dependientes de otros factores, se ha desarrollado esta técnica de autoensamblaje muy apropiada para la inmovilización de biomoléculas.

El precedente del autoensamblaje fueron las investigaciones de Langmuir y Blodgett, los cuales desarrollaron una capa de grosor molecular o multicapas del grosor molecular deseado, conocidas como películas LB, que se unían a superficies de silicona o cristal mediante uniones

anfifílicas de las moléculas. Sin embargo, la estabilidad de estas películas era frágil y en algunos casos inducía la desnaturalización de algunas estructuras moleculares [Oliveira et al., 2022].

Por ello, las películas de LB derivaron en el desarrollo de las monocapas autoensambladas (SAM, del inglés *self-assembled monolayer*), cuya longitud y orientación depende de la cadena de hidrocarburos. Estas SAMs requieren pequeñas cantidades de reactivos y son fácilmente integrables en superficies aprovechando los grupos funcionales de las moléculas y las propiedades de la superficie, por lo que la estrategia de formación dependerá de las características fisicoquímicas de ambas partes. De entre todas las monocapas posibles, las más empleadas en el campo de los biosensores son las SAMs de siloxanos sobre siliconas y de tioles sobre superficies de oro [Samanta & Sarkar, 2011].

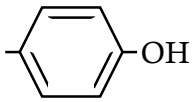
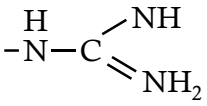
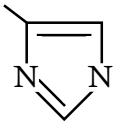
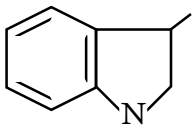
El ensamblaje sobre silicona se lleva a cabo comúnmente empleando triclorosilosano, un compuesto altamente reactivo incompatible con soluciones acuosas y polares con grupos funcionales como –OH o $–NH_2$ en la cadena lineal del hidrocarburo. No obstante, pueden sustituirse por reactivos inertes como alcanos o halógenos.

Por otro lado, la formación de las monocapas sobre superficies de oro se fundamenta en la interacción de los grupos tiol con este material, pudiendo incorporar sobre una cadena hidrocarbonada grupos funcionales como –OH, –COOH o $–NH_2$ [Vericat et al., 2010]. La inmovilización del elemento de biorreconocimiento sobre los grupos funcionales de la monocapa se puede llevar a cabo por interacciones no covalentes o enlaces covalentes, recomendándose una longitud de cadena adecuadamente larga para que los grupos funcionales sean accesibles. Además, en muchas ocasiones se incluyen grupos espaciadores con glicoles para mejorar esta accesibilidad.

Inmovilización por unión covalente

La formación de enlaces covalentes mediante la reacción de los grupos funcionales presentes en la superficie del elemento de biorreconocimiento proporciona una inmovilización estable. Este método se puede utilizar en cualquier proteína que presente grupos funcionales a través de sus cadenas de aminoácidos (**tabla 1.5**). Así, los grupos funcionales más empleados para la inmovilización covalente son: grupos amino y carboxilo, fenoles, grupos tiol, imidazol, hidroxilo o grupos indol [Novick & Rozzell, 2005].

Tabla 1.5. Grupos funcionales para la inmovilización covalente.

Grupo funcional	*Estructura*	*Aminoácido*
Amino	$-NH_2$	Lisina: ε-amino N-terminal
Carboxilo	$-HOOC$	Ácido glutámico, Ácido aspártico } carboxilato C-terminal
Tiol	$-SH$	Cisteína
Disulfuro	$-S-S-$	
Fenol		Tirosina
Guanidina		Arginina
Imidazol		Histidina
Indol		Triptófano
Tioéter	$-CH_2-S-$	Metionina
Hidroxilo	$-OH$	Serina Treonina

El procedimiento para la inmovilización del elemento de biorreconocimiento sobre la superficie del transductor se esquematiza en dos etapas: (1) activación de la superficie del transductor empleando moléculas de unión como glutaraldehído (–CHO–) o carbodiimidas (–N=C=N–) para la generación de grupos electrófilos y (2) acoplamiento covalente de la biomolécula sobre el soporte activado a través de grupos nucleófilos [Nguyen, H. & Kim, 2017]. De esta manera se consigue una inmovilización del biorreceptor irreversible y estable a través de enlaces naturales, por lo que no hay posibilidad de liberación del elemento de biorreconocimiento durante su uso. Sin embargo, cuando los residuos de aminoácidos esenciales participan en las funciones de la biomolécula se debe prestar cuidadosa atención para que no se vean involucrados en los enlaces covalentes [Brena & Batista-Viera, 2006].

En la mayoría de los trabajos desarrollados en el marco de esta Tesis Doctoral se ha empleado la inmovilización covalente basada en el establecimiento de un enlace amida: Primero es necesario activar los grupos carboxilo que suelen estar presentes en la superficie electródica, funcionalizándolos por conversión a ésteres activos mediante la reacción con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxisulfosuccinimida (NHSS), que es soluble en disolventes acuosos. El residuo NHS éster resultante en la superficie del transductor es capaz de reaccionar con los grupos amino del biorreceptor, formando un enlace amida irreversible (***figura 1.24***) [Wong et al., 2009].

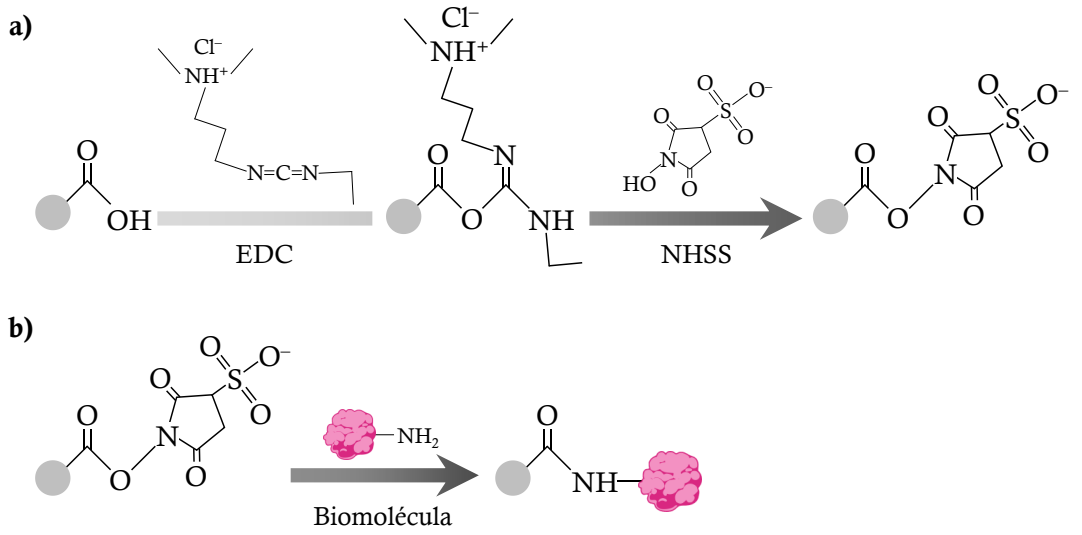


Figura 1.24. a) *Reacción de activación de los grupos carboxilo a través de la química EDC/NHSS.* ***b)*** *Inmovilización de biomoléculas por enlace amida.*

Como se ha señalado, para aplicar el procedimiento anterior, la superficie a modificar con el elemento de reconocimiento biológico debe contener grupos carboxilo. Por ello, y en el caso de los biosensores desarrollados en esta Tesis Doctoral directamente sobre la superficie del electrodo, es necesario modificar previamente la superficie del electrodo serigrafiado con estos grupos. Esta modificación puede hacerse de distintas maneras. En nuestras investigaciones se optó por llevar a cabo una modificación química de la superficie electródica con grupos carboxilo mediante un procedimiento de *electrografting* o injertado electroquímico, como en el caso de la bioplataforma electroquímica dual desarrollada en formato integrado para la determinación simultánea de las citoquinas BAFF y APRIL ([Arévalo et al., 2022b]). Para ello, se funcionaliza el electrodo de trabajo (WE) aplicando un barrido de potencial comprendido entre 0.0 y –1.0 V con una disolución que contiene la sal de diazonio obtenida previamente mediante la reacción de diazotación entre el ácido *p*-aminobenzoico (*p*-ABA) y $NaNO_2$ en medio ácido y frío (***figura 1.25***).

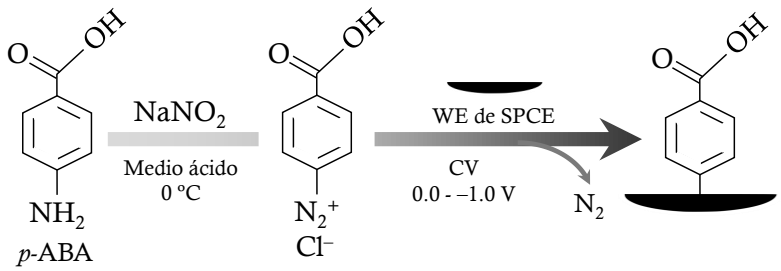


Figura 1.25. *Reacción de diazotación.*

Inmovilización por interacciones de afinidad

Una buena alternativa a los métodos de inmovilización previamente descritos consiste en la creación de enlaces de (bio)afinidad entre un soporte activado y un grupo específico presente en la biomolécula. Así, se inmoviliza el biorreceptor a través de una cola de afinidad posicionada en una secuencia específica que no afecta ni a la estructura ni a su correcto funcionamiento. De este modo se consigue una inmovilización selectiva y orientada para todas las biomoléculas del elemento de biorreconocimiento [Andreescu et al., 2006].

Las estrategias de inmovilización por afinidad se cimentan en las fuertes biointeracciones que presentan diferentes pares de afinidad, destacando: biotina–derivado de avidina, entre los que se encuentran la estreptavidina (Estrep) y neutravidina (NA); anticuerpo–antígeno; lectina–carbohidrato; o proteínas bacterianas A/G–región Fc de inmunoglobulinas. La inmovilización a través de estos pares de afinidad puede realizarse mediante dos mecanismos diferentes. Por un lado, la superficie del transductor es activada para unir uno de los ligandos del par de afinidad y, posteriormente, el biorreceptor presenta afinidad intrínseca por medio de la cual se enlaza a su par. En el segundo caso, el biorreceptor debe conjugarse con el otro ligando del par de afinidad para poder interaccionar con el par unido en la superficie del transductor. Esta conjugación puede obtenerse por entrecruzamiento químico o por fusión con la biomolécula [Roy & Gupta, 2006].

A lo largo de esta Tesis Doctoral, este método de inmovilización orientada ha sido ampliamente utilizado. Por una parte, destacan las interacciones de bioafinidad entre la biotina y los derivados de avidina empleadas tanto para la inmovilización del elemento de biorreconocimiento: inmovilización de anticuerpos biotinilados (b-cAb), como en la bioplataforma electroquímica dual desarrollada en formato integrado para la determinación simultánea de BAFF y APRIL ([Arévalo et al., 2022b]); inmovilización de proteínas antígeno biotiniladas (b-antígeno), empleada en la bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación de AQP4-Abs ([Arévalo et al., 2022a]); o inmovilización de cadenas de DNA (b-DNA), como la b-dsDNA utilizada en la bioplataforma cuádruple asistida por MBs para la determinación de IgG, IgA, IgM humanas y el total de los isotipos frente a dsDNA ([Arévalo et al., 2023b]), como para el marcaje enzimático de anticuerpos secundarios de detección biotinilados (b-dAb) con la enzima peroxidasa

de rábano conjugada con estreptavidina (Estrep-HRP) en la bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación de MMP-9 [Arévalo et al., 2021].

Por otra parte, las interacciones anticuerpo–antígeno han sido la base de las bioplataformas electroquímicas desarrolladas en el marco de esta Tesis Doctoral.

Tipos de inmunoensayos

Existe una primera clasificación general de los inmunoensayos en función del tipo de estrategia de marcaje empleada, diferenciándose entre inmunoensayos directos o *label-free*, donde los analitos proporcionan por ellos mismos una señal detectable por el transductor sin necesidad de emplear una etiqueta de marcaje; o indirectos o *label-based*, que requieren de un marcaje que proporcione una señal directa o inversamente proporcional al analito. A pesar del potencial que muestran los inmunoensayos directos, muy pocas sustancias poseen propiedades medibles, por lo que destacan los inmunoensayos indirectos. Dentro de la electroquímica, los marcajes más comunes son los enzimáticos con peroxidasa de rábano (HRP) y fosfatasa alcalina (AP) [Rogers, 2000].

En segundo lugar, los inmunoensayos también se clasifican según su formato (***figura 1.26***) en: inmunoensayos de tipo directo, competitivo o sándwich [Datta, P., 2019].

Los inmunoensayos de tipo directo, mencionados previamente, son exclusivos a la capacidad intrínseca del antígeno diana para proporcionar directamente al transductor una señal medible. En el campo de la transducción electroquímica, la determinación de analitos electroactivos sin apoyo de moléculas amplificadoras de la señal, y particularmente a las concentraciones tan bajas necesarias en algunas áreas como la clínica o la alimentaria, ha supuesto un reto [Zhang. H. & Miller, 2019]. No obstante, sí se han desarrollado bioplataformas electroquímicas basadas en este tipo de formato, como la desarrollada por Torrente-Rodríguez y cols., ([Torrente-Rodríguez et al., 2013]) para la determinación de lactoperoxidasa (LPO), un agente antibacteriano presente en leche bovina con actividad peroxidasa.

Los inmunoensayos de tipo competitivo se emplean mayoritariamente cuando los analitos son moléculas pequeñas con bajos pesos moleculares, como es el caso de algunas hormonas, que requieren cantidades limitadas de un único anticuerpo específico para el analito diana y el analito marcado con una etiqueta. En el formato competitivo directo, el anticuerpo se inmoviliza sobre la fase sólida y el analito diana compite con el mismo analito diana marcado por los limitados sitios de unión del anticuerpo, generando una señal inversamente proporcional a la concentración de dicho analito diana.

Los inmunoensayos tipo sándwich, generalmente utilizados para moléculas con elevado peso molecular como proteínas o péptidos, emplean dos anticuerpos específicos diferentes que reconocen dos epítopos distintos en el analito diana. Uno de ellos se inmoviliza en la superficie sólida, capturando selectivamente al analito diana, mientras que el otro anticuerpo es el portador

de la etiqueta que proporcionará una señal medible directamente proporcional a la concentración del analito diana. En general, este tipo de formato es más específico y presenta menor señal de fondo que el tipo competitivo.

En ambos formatos de inmunoensayo, la detección puede ser directa o indirecta. Así, cuando la molécula marcada se une directamente al analito, se produce una detección directa. En cambio, si es necesario un reactivo intermedio para capturar ese analito y posteriormente ser marcado, el ensayo es indirecto. Por lo general, esta detección indirecta se lleva a cabo con anticuerpos anti-especie marcados con la etiqueta que reconocen al anticuerpo de detección que selectivamente ha capturado al analito diana [Hsieh & Rao, 2017].

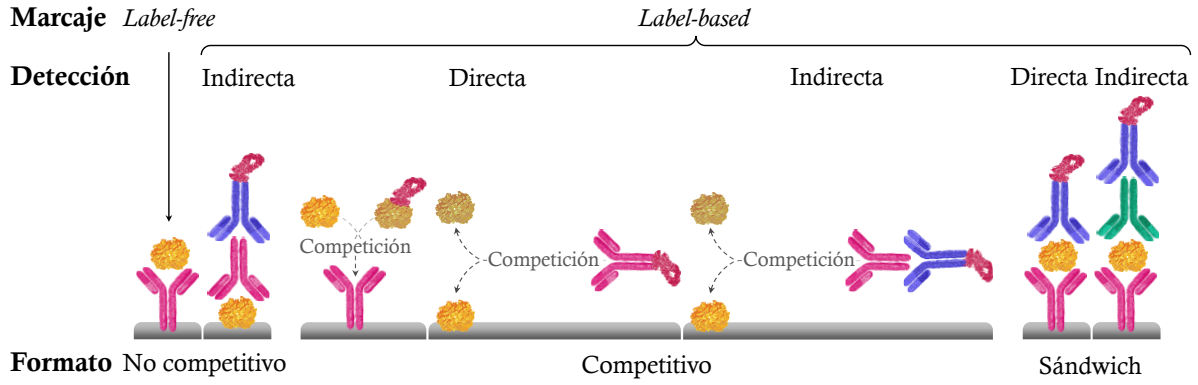


Figura 1.26. *Formatos de inmunoensayos.*

Inmovilización por quelación

Aunque podría ser considerada una inmovilización por afinidad, en muchas clasificaciones este tipo de inmovilización se considera separadamente. Cuando una biomolécula presenta una etiqueta de histidinas (His-tag), por lo general una cadena de 6 histidinas, es posible llevar a cabo su inmovilización sobre la superficie del transductor a través de la formación de un complejo quelato entre iones metálicos de transición bivalentes, principalmente Co^{+2}, Ni^{+2} o Cu^{+2}, y las mitades del grupo imidazol de las His, por medio de agentes quelantes como ácido nitrilotriacético (NTA) o iminodiacético (IDA) (***figura 1.27.a***) [Reichel et al., 2007]. Así, se consigue una inmovilización estable y orientada que no afecta a las funciones ni a la estructura de la biomolécula, y que se ofrece competitiva frente a la inmovilización covalente debido a su elevada selectividad y al espaciado adecuado con el que se inmovilizan los biorreceptores, lo que mejora la eficiencia en los procesos de biorreconocimiento [Zhou et al., 2021]. De hecho, para la inmovilización sobre los electrodos serigrafiados de carbono empleados durante las investigaciones de esta Tesis Doctoral, el ácido nitrilotriacético (NTA) fue sustituido por un derivado de éste, como el HS-NTA (N-[Nα,Nα-Bis(carboximetil)-L-lisina]-12-mercaptododecanamida) para enlazarse directamente sobre la superficie electródica sin necesidad de su modificación previa con grupos carboxilo por

electrografting o injertado electroquímico, lo que simplificaba el procedimiento frente a la metodología convencional covalente empleando carbodiimida/succinimida.

Además, la formación de los complejos permite una reversibilidad que posibilita la regeneración de la superficie del transductor, bien en condiciones suaves empleando una base de Lewis, por ejemplo, imidazol, que actúe como ligando competitivo (***figura 1.27.b***), o bien con un pH ácido o incluso un ligando quelante como AEDT que permita el intercambio iónico [Ley et al., 2011].

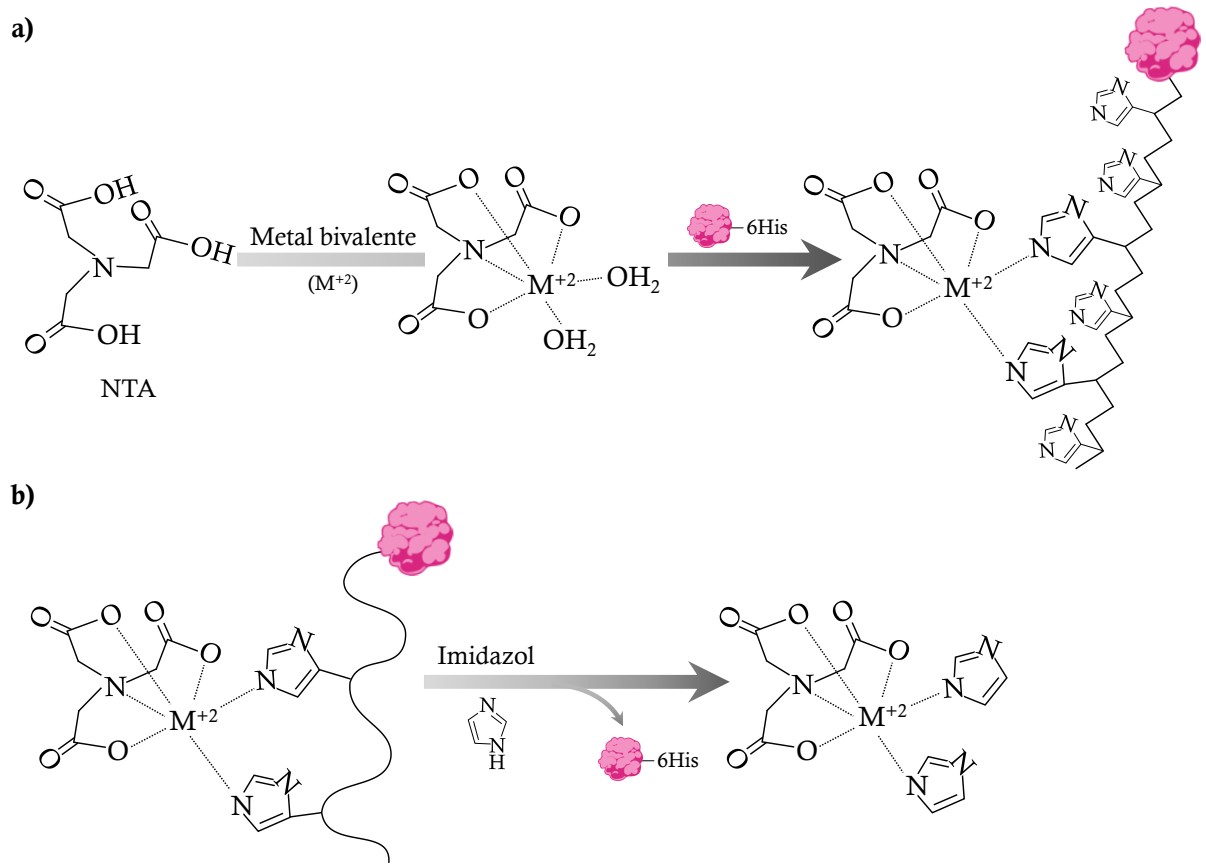


Figura 1.27. a) *Reacción de formación del complejo quelante con His.* ***b)*** *Reversibilidad con imidazol.*

La principal desventaja de esta inmovilización es que solo es posible llevarla a cabo cuando el elemento de biorreconocimiento está funcionalizado con -His-tag y que pueden producirse reacciones de desplazamiento del biorreceptor inmovilizado en presencia de otras proteínas portadoras de His como las inmunoglobulinas.

Inmovilización a través de soportes sólidos

La inmovilización de biomoléculas mediante uniones covalentes o interacciones no covalentes en soportes sólidos se ha considerado una metodología exitosa para el desarrollo de biosensores selectivos, eficientes y sensibles. Estos materiales sólidos deben poseer propiedades fisicoquímicas y biológicas distintivas, además de posibilidad para recubrimiento con grupos funcionales que permitan establecer interacciones no covalentes o uniones covalentes con las biomoléculas a inmovilizar. Así, la buena elección del soporte sólido juega un papel fundamental en los procesos de inmovilización de los biorreceptores, cuidando de que el biorreceptor conserve su estructura y funcionalidad tras la inmovilización. Idealmente, estos soportes deben tener un coste asequible, ser inertes, estables y regenerables [Datta, S. et al., 2013].

Los soportes sólidos más comunes empleados en la inmovilización de biomoléculas son los soportes inorgánicos como partículas de sílice, materiales minerales, nanotubos de carbono, grafeno o partículas magnéticas, que ofrecen una gran área superficial, buenas propiedades fisicoquímicas, y estabilidad térmica y química adecuadas. No obstante, algunos soportes orgánicos sintéticos o biológicos como redes de polímeros microporosos, por ejemplo, el colágeno o el quitosano, también han demostrado presentar buena estabilidad química y mecánica, elevada área superficial y funcionalización ajustable, que los ha convertido en buenas alternativas de soportes sólidos [Esfandiari et al., 2022].

1.2.3. Bioplataformas electroquímicas asistidas por MBs

Después de años empleándose como método de purificación y extracción de componentes celulares [Xiao, D. et al., 2016], las partículas magnéticas (MPs o MBs, del inglés *magnetic particles/beads*) se consideran actualmente excelentes soportes para la inmovilización de biomoléculas en el desarrollo de biosensores. Esto es debido, entre otras razones, a sus propiedades magnéticas, que permiten su dispersión y aislamiento de una matriz a través de sus interacciones con las fuerzas magnéticas de un campo externo. Así es posible el aislamiento y preconcentración del analito presente en muestras complejas, de manera que se simplifica el pretratamiento de las muestras y se reduce el volumen necesario para la inmovilización y posterior interacción con el analito, lo que mejora los protocolos de ensayo, haciéndolos mucho más sencillos y versátiles [Yáñez-Sedeño et al., 2016; Fortunati et al., 2023] (***figura 1.28***).

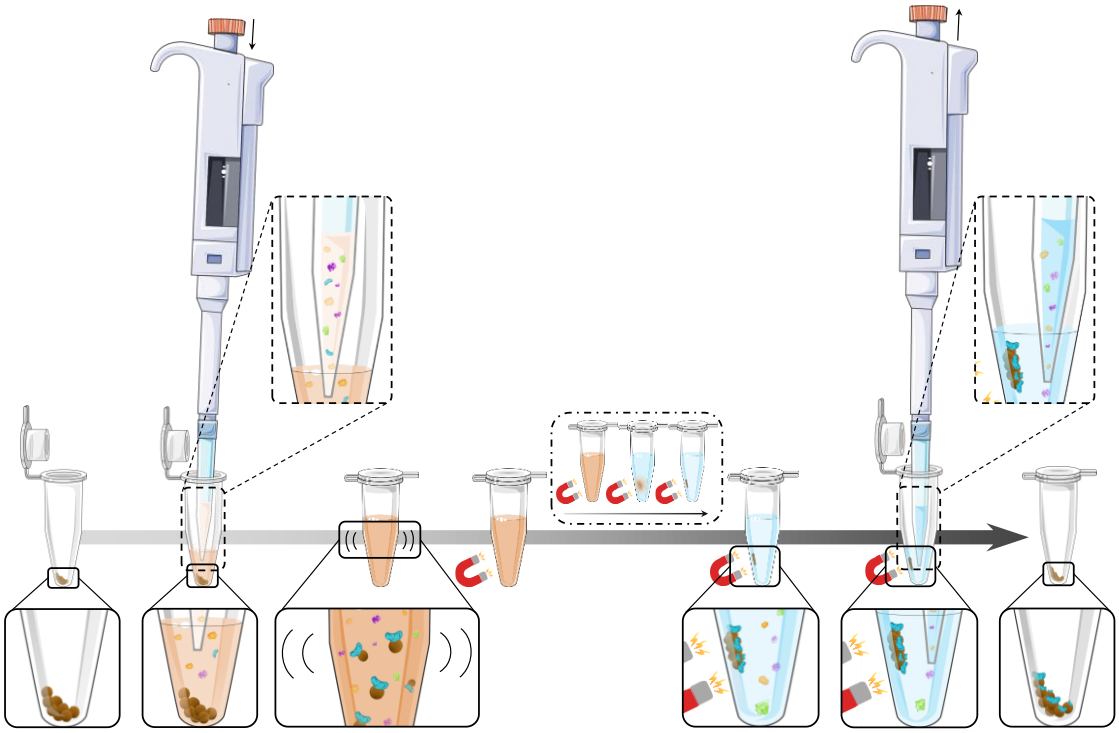


Figura 1.28. *Ejemplo de reconocimiento y aislamiento de MBs empleadas como soportes sólidos en disolución.*

Las MBs son esferas de tamaño micro o nanométrico formadas por un núcleo metálico ferromagnético, basado en Fe, Co o Ni, aleaciones, óxidos o estructuras compuestas, que presenta propiedades paramagnéticas cuya intensidad de magnetismo es proporcional al campo magnético exterior y es susceptible a su positividad. Entre todos los materiales inorgánicos que proporcionan esta propiedad magnética, las partículas de óxido de hierro, y en concreto Fe_3O_4 y Fe_2O_3, son las más utilizadas debido a su fácil disponibilidad y superparamagnetismo.

Este núcleo de magnetita es recubierto, mediante diferentes técnicas como el método sol-gel o el de microemulsión, por una matriz generalmente de sílice o polimérica que presenta una capa de hidrocarburos de cadena larga que, por un lado, lo protege y proporciona estabilidad en los disolventes por impedimento estérico y, por otro lado, permite la funcionalización de sus grupos para la inmovilización adecuada, por enlaces covalentes o interacciones electrostáticas o de afinidad, del elemento de biorreconocimiento [Xiao, D. et al., 2016]. Gracias a la versatilidad del recubrimiento, existe disponibilidad comercial de una gran variedad de MBs funcionalizadas con diversos grupos funcionales: carboxilo, amina, aldehído, hidroxilo o tiol, complejos quelantes y biomoléculas como anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas A o G y estreptavidina o neutravidina capaces de interactuar con otros grupos reactivos o biomoléculas para el reconocimiento selectivo de los analitos diana [Pedrero et al., 2012; Yáñez-Sedeño et al., 2016] (***figura 1.29***).

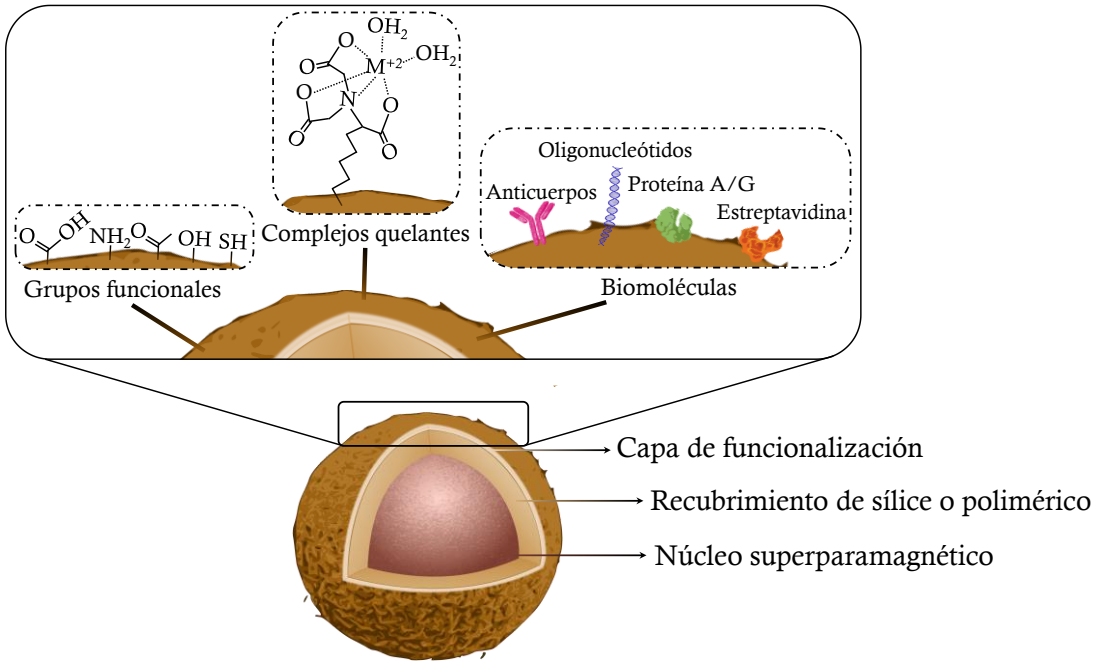


Figura 1.29. *Estructura general de las MBs.*

La estructura esférica con el recubrimiento funcionalizado de las MBs proporciona una gran área superficial, ofreciendo la adecuada inmovilización de un mayor número de biorreceptores o analitos específicos que en superficies planas [Trindade Ximenes et al., 2021]. De hecho, las propiedades superparamagnéticas permiten su purificación y preconcentración mediante lavados controlados por la interacción con un imán externo. De esta manera, las MBs se aíslan magnéticamente para la extracción de los reactivos que no hayan interaccionado y de los componentes no deseados presentes en la matriz y posteriormente se vuelven a dispersar, protocolo mostrado en la ***figura 1.30*** [Erdem et al., 2005]. Además, al emplearse las MBs en disolución bajo agitación continua se reducen las cinéticas de los procesos de reconocimiento.

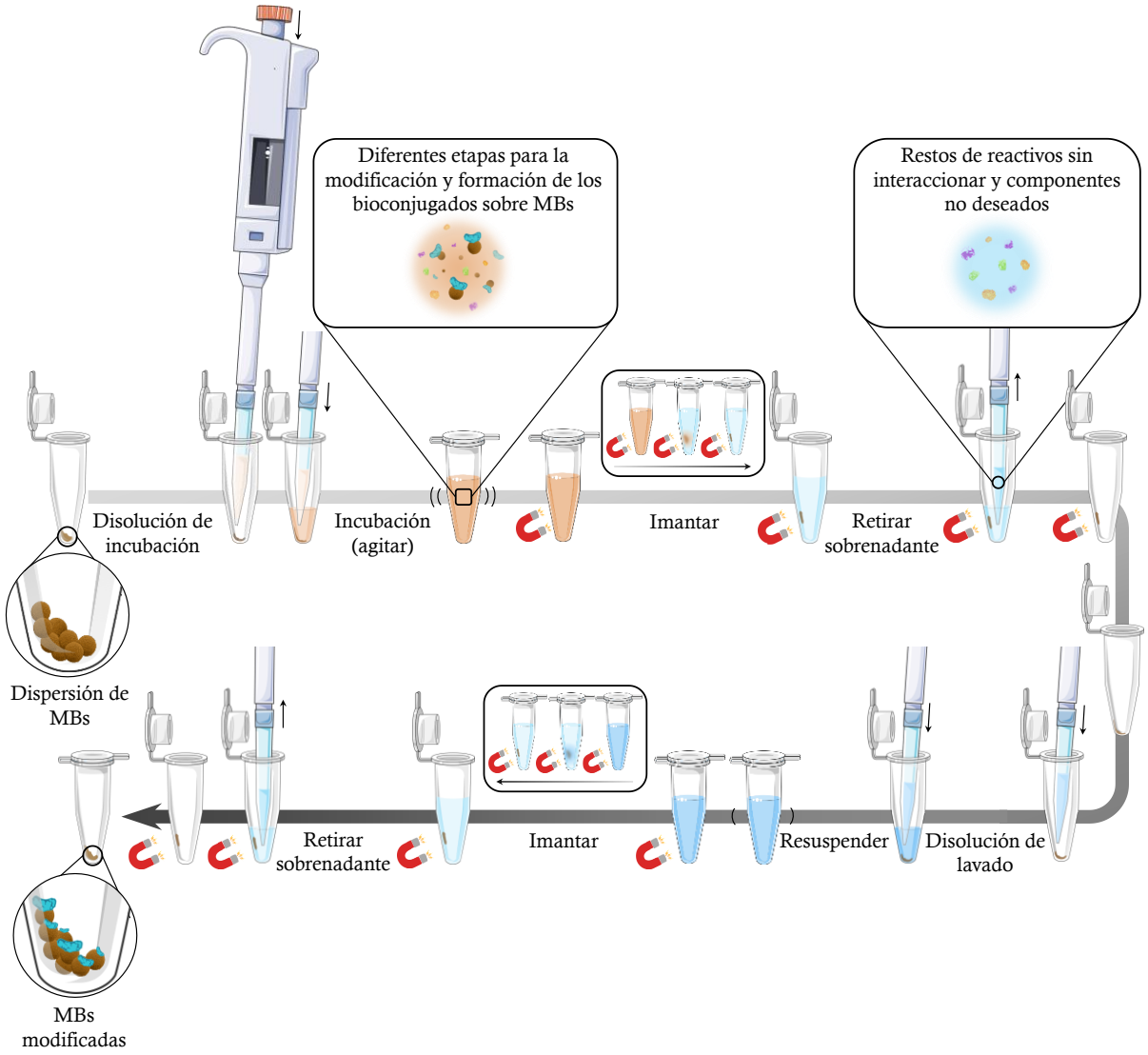


Figura 1.30. *Protocolo de empleo de MBs en disolución.*

Todo lo descrito anteriormente contribuye a alcanzar una elevada sensibilidad, con límites de detección mejores frente a otros métodos, y menor efecto matriz, simplificando la determinación de biomarcadores en muestras complejas. A estas ventajas se suman la estabilidad de almacenamiento, el menor volumen de muestra requerido y la posibilidad de reducir las etapas de ensayo.

Las MBs se han convertido en un soporte alternativo muy útil y versátil gracias a su posibilidad de funcionalización y modificación capaz de reconocer numerosos tipos de analitos. Debido a esto, han sido ampliamente empleadas en el desarrollo de biosensores y, particularmente, en las bioplataformas desarrolladas en esta Tesis Doctoral.

1.2.4. NANOMATERIALES COMO SISTEMAS DE AMPLIFICACIÓN DE SEÑAL

La inminente necesidad de alcanzar sensibilidades superiores a las proporcionadas por los métodos analíticos convencionales derivó en el desarrollo de herramientas de amplificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) y en la espectrometría de masas. Sin embargo, estos métodos altamente sensibles son destructivos y generalmente suelen requerir una laboriosa derivatización, coste elevado y personal especializado. Además, con la evolución de los ensayos miniaturizados y teniendo en cuenta que los biosensores basados en ensayos de bioafinidad convencionales frecuentemente capturan un pequeño número de biomoléculas marcadoras por evento de reconocimiento, se buscaron alternativas a las técnicas de amplificación conocidas, encontrándose, dentro del campo de los nanomateriales, metodologías únicas para desarrollar dispositivos novedosos y bioensayos altamente sensibles [Wang, J., 2005].

Los métodos de la amplificación de la señal basada en nanomateriales han captado la atención tanto de las aplicaciones analíticas como bioanalíticas. Es una metodología muy prometedora capaz de proporcionar excelentes propiedades analíticas debido al efecto sinérgico entre la actividad catalítica y la conductividad que ofrecen, acelerando la transducción de la señal y ofreciendo límites de detección inferiores [Lei & Ju, 2012].

Para su uso como sistemas de amplificación, se aprovecha el pequeño tamaño de estos materiales y su elevada relación superficie/volumen que admite la inmovilización de una alta carga de moléculas receptoras o señalizadoras, y posibilita su empleo como portadores o trazadores, catalizadores o conductores electrónicos. El objetivo de amplificación se consigue funcionalizando el nanomaterial con biomoléculas de biorreconocimiento u otros nanomateriales afines a través de interacciones no covalentes; como adsorción física, interacciones de afinidad o atrapamiento; o por interacciones covalentes con grupos funcionales superficiales [Fenzl et al., 2016].

En este ámbito de la amplificación de la señal, cabe destacar, además de las excelentes condiciones ofrecidas por su elevada área superficial, otra característica destacable de especial importancia en el caso de los biosensores electroquímicos: su excelente conductividad eléctrica. Así, entre los diversos nanomateriales, los más utilizados para este objetivo son los nanotubos de carbono (CNTs, del inglés *carbon nanotubes*), el grafeno y sus óxidos (GO y rGO), y las nanopartículas metálicas.

Clasificación de los nanomateriales

Los nanomateriales se clasifican en función del número de dimensiones como 0D, 1D, 2D y 3D (***figura 1.31***) [Lim & Ahmed, 2016].

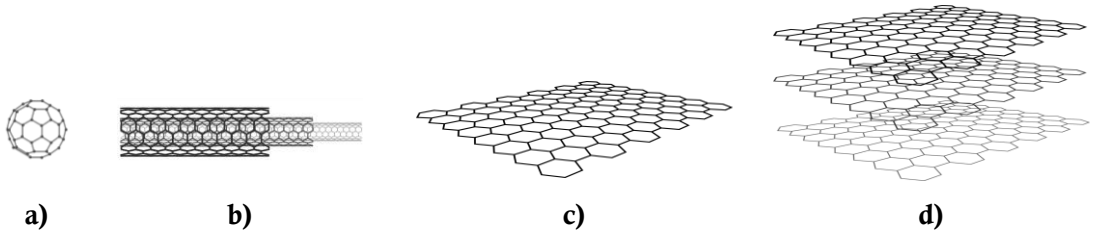


Figura 1.31. *Modelos moleculares de diferentes subtipos de nanomateriales en* ***a)*** *0D,* ***b)*** *1D,* ***c)*** *2D y* ***d)*** *3D.*

Los nanomateriales 0D comprenden nanopartículas esféricas o casi esféricas cuyas dimensiones se confinan en la nanoescala, siendo todas menores de 100 nm. De este modo, a estas partículas ultrapequeñas se les induce el efecto denominado confinamiento cuántico, de forma que las propiedades físicas y químicas se modifican por la restricción espacial de las partículas a una escala nanométrica. Entre estos nanomateriales destacan las nanopartículas metálicas (NPs), los puntos cuánticos (QD, del inglés *quantum dots*) o los fullerenos esféricos [Goh et al., 2020].

En segundo lugar, el subtipo de nanomateriales 1D presentan dos de sus dimensiones dentro del rango de la nanoescala, ofreciendo relaciones de aspecto mayores compatibles con las estructuras biológicas. Numerosas morfologías componen este tipo de nanomateriales, incluyendo los óxidos metálicos 1D como nanorods, nanofibras, nanocables o nanopilares. Asimismo, los nanotubos de carbono destacan por ser materiales 1D ampliamente utilizados en el campo de los biosensores gracias a sus propiedades eléctricas [Byakodi et al., 2022].

Se consideran nanomateriales bidimensionales cuando dos de sus dimensiones se encuentran fuera de la nanoescala, como es el caso de las nanoláminas, películas, placas y redes en 2D. Dentro de esta categoría destacan las láminas de grafeno, que exhiben una combinación única de propiedades ópticas, electrónicas y electroquímicas, así como también propiedades de adsorción superficial molecular, lo que las convierte en candidatas excelentes para su aplicación en dispositivos biosensibles [Prattis et al., 2021]. No obstante, los dicalcogenuros de metales de transición han desplazado al grafeno en algunas aplicaciones por las excelentes y diferenciales propiedades fisicoquímicas. Entre ellos, el disulfuro de molibdeno (MoS_2) ha captado la atención de las investigaciones en nanociencia gracias a su biocompatibilidad, semiconductividad y actividad peroxidasa catalítica intrínseca. Es un nanomaterial laminar semiconductor cuyo salto de banda indirecto se transforma en transición directa cuando su grosor es nanométrico, proporcionando mejores características que el grafeno o sus óxidos. Por todo ello, los nanomateriales de MoS_2 se han convertido en una alternativa potente para el desarrollo de biosensores [Eda et al., 2011; Kalantar-zadeh & Ou, 2016].

Finalmente, las nanoestructuras 3D generalmente son una amalgama de diferentes características de nanoescala en una única estructura que ofrece una superficie electroactiva superior al resto de nanomateriales, por lo que se les considera de los mejores compuestos para mejorar la eficacia en la detección con biosensores a través de la señalización de analitos y amplificación de señal. Destacan las estructuras metalorgánicas (MOFs, del inglés *metal organic frameworks*) que permiten la inmovilización de biomoléculas por su flexibilidad estructural, posibilidad de realizar modificaciones post-sintéticas y porosidad controlable [Byakodi et al., 2022].

Estrategias de amplificación de los nanomateriales

La biofuncionalización de los nanomateriales ha permitido su transformación para acelerar la transferencia de electrones; reducir la energía de activación, actuando como catalizadores o imitadores de enzimas; concentrar los analitos, de manera que pueden ejercer como transportadores de moléculas de señalización, de reconocimiento o productoras de la señal; o pueden desempeñar funciones de emisión electrónica. De esta forma, la introducción de los nanomateriales en el campo de la biodetección proporciona una gran versatilidad y facilita la preparación de sistemas de amplificación de la señal, reduciendo las limitaciones de las metodologías analíticas clásicas y haciendo posibles nuevos conceptos en el diseño de los biosensores [Ju, 2018].

Uno de los métodos de amplificación más desarrollados en los últimos años consiste en aumentar la proporción de la etiqueta de señalización y el ligando de reconocimiento específico por cada evento de reconocimiento. Gracias a los nanomateriales y su elevada área superficial, se ha conseguido portar más moléculas señalizadoras y enzimas que producen una señal amplificada en un único proceso de reconocimiento. Además, teniendo en cuenta la efectividad de actividad de las reacciones enzimáticas, la conjugación de enzimas a diferentes nanomateriales ha resultado ser una estrategia muy conveniente para este propósito [Fenzl et al., 2016].

Por otro lado, como se ha señalado, la actividad catalítica de las enzimas ha sido el principal fundamento objeto de estudio dentro del campo de los biosensores. Sin embargo, ya se ha indicado que, debido a su limitada estabilidad y fácil desnaturalización, se ha buscado una alternativa a estas biomoléculas a través de la síntesis de biomoléculas miméticas o de nanoestructuras con propiedades catalíticas. Actualmente se conoce una variedad de nanomateriales que presentan actividad catalítica intrínseca, y que actúan para complementar o sustituir la actividad de las enzimas naturales [Wang, J. & Gu, 2015].

Como consecuencia de la versatilidad ofrecida por los nanomateriales, en esta Tesis Doctoral se han combinado nanoláminas estrechamente apiladas de MoS_2 con nanomateriales de carbono para sintetizar nanocompuestos de MoS_2 que actúan, por un lado, como nanoestructuras que transportan biomoléculas de reconocimiento (anticuerpos de detección) y de señalización (enzima peroxidasa de rábano, HRP), junto con actividad pseudocatalítica, demostrando amplificar la señal en la determinación de las citoquinas BAFF y APRIL.

CAPÍTULO 2.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. INSTRUMENTACIÓN

En este apartado se describen los aparatos, electrodos y dispositivos empleados para la preparación y fabricación de los biosensores desarrollados en esta Tesis Doctoral, así como para la realización de las medidas, manipulación y análisis de estándares y muestras biológicas.

La instrumentación utilizada para los estudios de caracterización no electroquímica y comparación de resultados se detallan en los Apartados 2.7 y 2.8.

2.1.1. APARATOS E INSTRUMENTOS

Para obtener las medidas electroquímicas se emplearon los siguientes potenciostatos:

- Potenciostato multicanal CHI812B (CH Instruments, Inc.) controlado por el *software* CHI812B para llevar a cabo medidas amperométricas sobre biosensores en formato integrado y sobre bioplataformas asistidas por MBs para detección individual, dual o cuádruple.
- Potenciostato-galvanostato μStat 8000 (Metrohm DropSens) controlado por el *software* DropView 8400 para llevar a cabo medidas amperométricas sobre bioplataformas óctuples asistidas por MBs.
- Potenciostato μAutolabIII/FRA2 (Metrohm Autolab) controlado por el *software* GPES y FRA empleado para realizar las medidas mediante voltamperometría cíclica (CV) y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) de los biosensores desarrollados en formato integrado, así como caracterización de los nanomateriales sintetizados.

Las medidas amperométricas realizadas en disolución bajo agitación constante se llevaron a cabo sumergiendo la bioplataforma correspondiente en una célula de medida de vidrio (Pobel S.A.) de 10 mL (bioplataformas individuales o duales) o 20 mL (bioplataformas cuádruples). Las condiciones de agitación de las disoluciones para realizar estas medidas o las requeridas en otros procesos, se consiguieron mediante el uso de un agitador magnético MCG05E (Ovan) y un imán.

Para medir el pH de las disoluciones se empleó un pH-metro BASIC 20+ (Crison), calibrado diariamente con disoluciones reguladoras de pH 4.01, 7.00 y 9.21 a 25.0 ± 0.5 ºC. Además, se utilizó una balanza analítica de alta precisión (Sartorius Secura), un agitador vortex F202A0173 (Velp Scientifica), un baño de ultrasonidos Elmasonic S60H (Elma), un horno Meditronic P-Selecta y una microcentrífuga MPW-65R (MPW Med. Instruments).

Para la preparación de las bioplataformas asistidas por MBs se utilizó un concentrador magnético DynaMag™-2 (ThermoFisher-Invitrogen™, Cat. No.: 12321D), que permite la captura magnética de las micropartículas y el descarte del sobrenadante, así como un incubador MT100 (Universal Labortechnik) provisto de un sistema de control de temperatura y agitación, para la implementación de los bioensayos sobre las MBs.

La manipulación de reactivos especiales en términos de estabilidad, posible contaminación y seguridad, como es el caso del dsDNA y las muestras de origen biológico, se realizó por medio del empleo de una cabina de seguridad microbiológica de flujo laminar AH-100 (Telstar BioSTAR), así como un autoclave Trade (Raypa) para esterilizar las disoluciones y el material de laboratorio a elevada presión (1 atm) y temperatura (121 ºC) durante 15 minutos.

Todas las disoluciones acuosas usadas se prepararon con agua obtenida mediante el sistema de purificación de agua *millipore* Milli-Q IQ 7000 *Ultrapure Water System* 18.2 MΩ cm (Milli-Q, Cat. No.: ZIQ7000T0C).

2.1.2. ELECTRODOS Y DISPOSITIVOS EMPLEADOS EN LAS MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

Se emplearon electrodos serigrafiados de carbono Metrohm-DropSens (***figura 2.1***) individuales (SPCE, DRP-110: 3.4 × 1.0 × 0.05 cm), duales (SP_2CE, DRP-X1110: 3.4 × 1.0 × 0.05 cm), cuádruples (SP_4CE, DRP-4W110: 3.8 × 2.0 × 0.1 cm) y óctuples (SP_8CE, DRP-8X110: 3.4 × 7.9 × 0.1 cm) con conexiones de plata y tres superficies electródicas impresas sobre un sustrato cerámico. Dichas superficies electródicas consisten en:

- Uno o varios electrodos de trabajo (WE) de carbono cuya área geométrica depende del tipo utilizado: SPCE, un WE circular con Ø de 4 mm y A = 12.6 mm^2, SP_2CE, dos WEs elípticos con $Ø_{menor}$ de 2 mm y $Ø_{mayor}$ de 4 mm y A = 6.3 mm^2, SP_4CE, cuatro WEs circulares con Ø de 2.95 mm y A = 7.4 mm^2, y SP_8CE, ocho WEs circulares con Ø de 2.56 mm y A = 5.2 mm^2.
- Un electrodo de pseudoreferencia (RE) de plata.
- Un electrodo auxiliar (CE) de carbono.

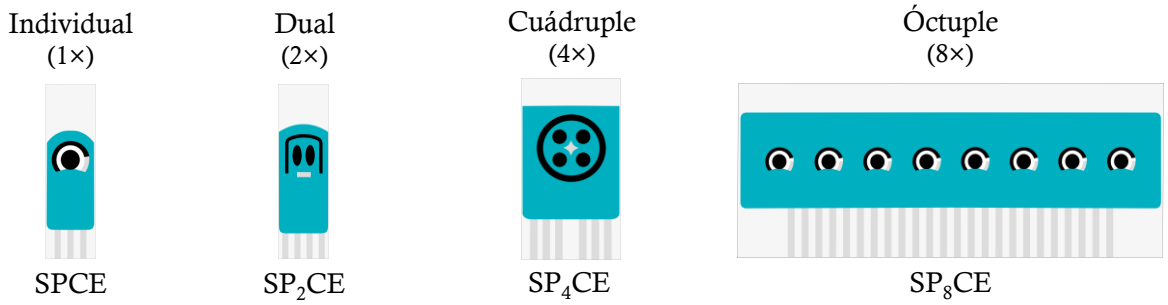


Figura 2.1. *Electrodos serigrafiados de carbono con una (SPCE), dos (SP_2CE), cuatro (SP_4CE) u ocho (SP_8CE) superficies electródicas.*

Para llevar a cabo las medidas electroquímicas sobre las bioplataformas asistidas por MBs, y con el fin de asegurar la captura eficiente y reproducible de los bioconjugados magnéticos sobre la superficie de los WEs, se emplearon carcasas provistas de imanes de Nd embutidos (***figura 2.2***). Las carcasas utilizadas para las medidas con los SPCE, SP_2CE y SP_4CE fueron de fabricación casera, de polimetilmetacrilato (PMMA) y provistas con uno, dos o cuatro imanes (AIMAN GZ) respectivamente. Para las medidas con SP_8CE se utilizó una carcasa comercial de teflón MAGNET8X (Metrohm-DropSens) provista con ocho imanes.

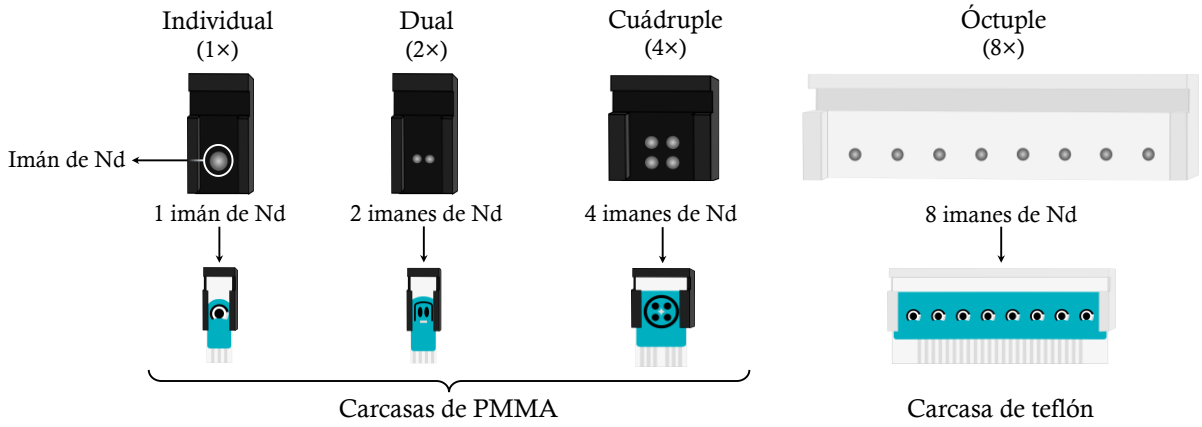


Figura 2.2. *Carcasas empleadas para la transducción electroquímica con las bioplataformas asistidas por MBs.*

Como interfase entre los electrodos y el potenciostato se emplearon cables conectores específicos (Metrohm-DropSens) para cada tipo de electrodo: DRP-CAC (SPCE), DRP-BICAC (SP_2CE), DRP-CONNECT4W (SP_4CE) y DRP-CAC8X (SP_8CE).

2.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

2.2.1. REACTIVOS

Reactivos químicos

Los reactivos químicos comerciales utilizados en la preparación de las disoluciones fueron: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES, Biotechnik Gerbu, Cat. No.: 1080), cloruro sódico (NaCl, Scharlab, Cat. No.: SO02271000), cloruro potásico (KCl, Scharlab, Cat. No.: PO02011000), hidrógeno fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4, PanReac AppliChem, Cat. No.: 141679), dihidrogenofosfato sódico dihidratado ($NaH_2PO_4{\cdot}2H_2O$, Scharlab, Cat. No.: SO03341000), tris-(hidroximetil)-aminometano-HCl (Tris-HCl, PanReac AppliChem, Cat. No.: A1379), etilendiaminotetracetato disódico ($Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$, Merk, Cat. No.: 324503), Tween 20® (Sigma-Aldrich, Cat. No.: 274348), carbonato sódico (Na_2CO_3, PanReac Appli Chem, Cat. No.: 791768-500G), hidrógenocarbonato sódico ($NaHCO_3$, Sigma-Aldrich, Cat. No.: SO0129), acetato sódico ($CH_3COONa{\cdot}3H_2O$, Merck, Cat. No.: 106267), ácido clorhídrico 37% v/v (HCl, Sigma-Aldrich, Cat. No.: 30721) e hidróxido sódico (NaOH, Labkem, Cat. No.: SOHY-P0A-1k0).

Otros reactivos utilizados para modificar los electrodos de trabajo y/o preparar los bioconjugados fueron: nitrito sódico ($NaNO_2$, PanReac AppliChem, Cat. No.: 131703) y ácido 4-aminobenzoico (*p*-ABA, Acros Organics, Cat. No.: AC146212500) usados en el *electrografting* o injertado electroquímico; clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, Acros Organics Cat. No.: 171440100) y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (NHSS, Fluorochem Cat. No.: 038186) empleados en las etapas de activación de los grupos carboxílicos; etanolamina (Sigma-Aldrich, Cat. No.: 398136) usada en las etapas de bloqueo; N-[Nα,Nα-Bis(carboximetil)-L-lisina]-12-mercaptododecanamida (HS-NTA, Sigma-Aldrich, Cat. No.: 38152) y cloruro de cobalto (II) hexahidratado ($CoCl_2{\cdot}6H_2O$, PanReac, Cat. No.: 141257.1209) para formar el complejo NTA-Co^{+2}, e imidazol (Sigma-Aldrich, Cat. No.: I2399) para la liberación del biorreceptor con tag de His inmovilizado sobre el complejo NTA-Co^{+2}.

En la síntesis de las nanoestructuras híbridas de nanotubos de carbono y MoS_2 (sección 2.5.1.) se emplearon nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza (MWCNTs, ϕ 30 ± 15 nm, NanoLab, Cat. No.: PD30L15), oxidados por tratamiento con ácido nítrico 65% v/v (HNO_3, Scharlab, Cat. No.: AC15991000) y ácido sulfúrico 95–97% v/v (H_2SO_4, Scharlab, Cat. No.: AC20652500). También se utilizó heptamolibdato de amonio tetrahidratado ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}{\cdot}4H_2O$, Sigma-Aldrich, Cat. No.: A7302) y tiourea (Sigma-Aldrich, Cat. No.: T8656). Con fines comparativos, se usó óxido de grafeno (NIT.GO.M.140.10, Nanoinnova Technologies).

La detección amperométrica se realizó empleando hidroquinona (HQ, Sigma-Aldrich, Cat. No.: H9003) y peróxido de hidrógeno 30% v/v (H_2O_2, Sigma-Aldrich, Cat. No.: H1009). Para los estudios de caracterización electroquímica mediante CV y EIS se utilizaron las sales ferrocianuro potásico trihidratado ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, Sigma-Aldrich, Cat. No.: P3289) y ferricianuro potásico ($K_3Fe(CN)_6$, Molekula, Cat. No.: 19316295).

Reactivos biológicos comunes

Para la preparación de la superficie electródica de las bioplataformas desarrolladas en formato integrado basados en la química covalente asistida por EDC/NHSS se emplearon disoluciones de neutravidina (NA, ThermoFisher Scientific, Ref.: 31000) y estreptavidina de *Streptomyces avidinii* (Estrep, Sigma-Aldrich, Ref.: S4762), así como biotina (Biotechnik Gerbu, Cat. No.: 1363) y caseína de leche bovina (Sigma-Aldrich, Cat. No.: C7078) para las etapas de bloqueo.

Para el marcaje enzimático con peroxidasa de rábano (HRP) se empleó: i) la enzima (HRP, Sigma-Aldrich, Cat. No.: P8250); ii) anticuerpos policlonales secundarios conjugados con HRP selectivos a: IgGs humanas (HRP-anti-hIgG, Abcam, Cat. No.: ab97225), IgGs de ratón (HRP-anti-rIgG, Abcam, Ref.: ab97265), IgGs de conejo (HRP-anti-cIgG, BioRad, Cat. No.: 1706515), IgAs humanas (HRP-anti-hIgA, Jackson ImmunoResearch, Cat. No.: 109-035-011) o IgMs humanas (HRP-anti-hIgM, Jackson ImmunoResearch, Cat. No.: 109-035-129) en función del biomarcador/anticuerpo de detección a marcar; y iii) un conjugado de estreptavidina con HRP (Estrep-HRP, Roche, Cat. No.: 11089153001) para el marcaje de anticuerpos de detección biotinilados.

Para los estudios de selectividad de las bioplataformas desarrolladas se ensayaron como potenciales interferentes: E-cadherina humana (E-CDH, Bio-Techne R&D Systems S.L.U., Ref.: DYC4225), receptor α2 de la interleucina-13 (IL-13Rα2, Bio-Techne R&D Systems, Ref.: DY614), neurofilamento-L (NfL, Cell Signaling Technology®, Cat. No.: 99175), tau-441 humana recombinante (TAU, BioLegend®, Cat. No.: 842501), proteína humana de unión al DNA de respuesta transactiva de 43 kDa (TDP-43, Abcam, Cat. No.: ab224788), cadherina-17 (CDH-17, Origene, Ref.: TP720740), factor de necrosis tumoral (TNF, Bio-Techne R&D Systems, Cat. No.: DY210), hemoglobina humana (HB, Sigma-Aldrich, Ref.: H7379), IgG de suero humano (hIgG, Sigma-Aldrich, Ref.: I2511), albúmina de suero humano (HSA, Sigma-Aldrich, Cat. No.: A1653) y albúmina de suero bovino (BSA, 100% Type VH, Gerbu Biotechnik GmbH, Cat. No.: 90604-29-8).

Reactivos biológicos específicos para autoanticuerpos

Al igual que en el apartado anterior, los reactivos biológicos específicos empleados para la determinación de autoanticuerpos se obtuvieron de los kits ELISA disponibles comercialmente. Estos se describen a continuación en función de la configuración desarrollada:

Bioplataforma para anticuerpos frente acuaporina-4 (AQP4-Abs): se empleó el kit comercial *Human AQP4 Abs* ELISA kit (Cusabio, Cat. No.: CSB-E13568h) que contenía proteína AQP4 humana biotinilada (b-AQP4), estándar de anticuerpo frente a AQP4 humana (AQP4-Ab), diluyente de muestra ($SD_{AQP4\text{-}Abs}$), diluyente de HRP-avidina ($HD_{AQP4\text{-}Abs}$) y disolución reguladora de lavado ($WB_{AQP4\text{-}Abs}$). Además, se analizaron tres controles comerciales, uno negativo y dos positivos (control I y control II) contenidos en el kit comercial Elisa RSR™ AQP4 Ab Version 2 (RSR Limited).

Bioplataforma para anticuerpos frente a la proteína centromérica B (CENPB-Abs): se emplearon dos tipos de proteínas en función del biosensor desarrollado. Para la bioplataforma de detección individual en formato integrado (sección 2.5.1) o asistida por MBs (sección 2.5.2) se utilizó la proteína humana recombinante centromérica B producida con un tag de His (CENPB, Creative Diagnostics, Cat. No.: DAG600) y para la bioplataforma dual (sección 2.5.2), proteína humana recombinante centromérica B producida con un tag de His (CENPB, Boster Biological Technology, Cat. No.: PROTP07199). También se utilizó el kit comercial *Centromere B Antibody* IgG ELISA kit (Creative Diagnostics, Cat. No.: DEIA1684) que contenía calibradores del anticuerpo frente a CENPB (CENPB-Ab) y controles negativo y positivo (preparados en regulador de suero/matriz), disolución de un anticuerpo policlonal de conejo selectivo a IgG humana conjugado con HRP (HRP-anti-hIgG), y disolución reguladora de lavado ($WB_{CENPB\text{-}Abs}$) 50×.

Bioplataforma para anticuerpos frente a la proteína centromérica A (CENPA-Abs): se empleó la proteína humana recombinante centromérica producida con un tag de His (CENPA, Boster Biological Technology, Cat. No.: PROTP49450) y estándar de anticuerpo producido en conejo frente a la proteína centromérica A (CENPA-Abs, Sigma-Aldrich, Ref.: SAB4500130).

Bioplataforma para anticuerpos frente a DNA de cadena doble (dsDNA-Abs): se empleó un DNA de cadena doble biotinilado (b-dsDNA) sintetizado a partir de un plásmido humano por el grupo de investigación ProteoFun de la UFIEC-ISCIII, y el kit comercial anti-dsDNA Abs ELISA kit (Creative Diagnostics, Cat. No.: DEIA1681) que contenía calibradores de anticuerpos frente a DNA de cadena doble (dsDNA-Abs) y controles negativo y positivo (preparados en regulador de suero/matriz), disolución de conjugado enzimático formada por una mezcla de anticuerpos policlonales de conejo selectivos a IgGs, IgAs e IgMs humanas conjugados con HRP (HRP-anti-h(IgG/IgA/IgM)), disolución reguladora de muestra ($SB_{dsDNA\text{-}Abs}$, 5×) y disolución reguladora de lavado ($WB_{dsDNA\text{-}Abs}$, 50×).

Bioplataforma para anticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles (ENAs-Abs): para la preparación de esta bioplataforma se utilizaron los siguientes reactivos comerciales adquiridos de Creative Diagnostics:

- Anticuerpos frente al factor La de protección contra exonucleasas de unión a RNA pequeño (La/SSB-Abs), proteína humana La/SSB producida con un tag de His (La/SSB, Cat. No.: DAG264) y el kit comercial *SSB(La) Antibody* IgG ELISA kit (Cat. No.: DEIA1688).
- Anticuerpos frente a la proteína de unión a RNA Y (Ro/SSA-Abs), proteína humana recombinante miembro 2 de la familia de Dominio TROVE producida con un tag de His (TROVE2/ Ro/SSA, Cat. No.: DAG624) y el kit comercial *SS-A (Ro) Antibody* IgG ELISA kit (Cat. No.: DEIA1685).
- Anticuerpos frente a la ribonucleoproteína pequeña nuclear U1 subunidad 70 (U1-RNP70-Abs), proteína humana recombinante ribonucleoproteína pequeña nuclear 70 kDa (U1) producida con un tag de His (U1-snRNP70, Cat. No.: DAG604) y el kit comercial RNP 70 Ab ELISA kit (Cat. No.: DEIA4147).
- Anticuerpos frente a la ribonucleoproteína Smith del core (smRNP-Abs). Se utilizaron la proteína humana recombinante antígeno RNP/Sm (smRNP, Cat. No.: DG-T1223) y el kit comercial *RNP/Sm Antibody* IgG ELISA kit (Cat. No.: DEIA1690).

Además, los kits comerciales contenían calibradores de anticuerpos frente a su correspondiente antígeno y controles negativos y positivos (preparados en su respectivo regulador de suero/matriz), así como disolución de conjugado enzimático conteniendo anticuerpos policlonales de conejo conjugados a HRP selectivos a IgGs humanas (HRP-anti-hIgG) y reguladores de lavado ($WB_{Ro/SSA-Abs}$; $WB_{U1\text{-}snRNP70\text{-}Abs}$; $WB_{smRNP\text{-}Abs}$ 50× y $WB_{La/SSB\text{-}Abs}$ 10×).

Estos mismos reactivos se utilizaron para aplicar la tecnología ELISA en cada caso, con el fin de comparar los resultados obtenidos con los de las bioplataformas desarrolladas, empleando además 3,3´,5,5´tetrametilbenzidina (TMB, 1-Step™ Ultra TMB-ELISA, Thermo Scientific™, Ref. 34028) para la medida colorimétrica.

Las disoluciones empleadas en esta Tesis Doctoral se prepararon en agua Milli-Q, excepto las disoluciones bloqueantes comerciales usadas para minimizar adsorciones inespecíficas en algunas de las bioplataformas desarrolladas: disolución PBS suplementada con caseína al 1% (p/v) lista para usar (BB, Cat. No.: 37528) y disolución PBS libre de proteínas (PFBB, Cat. No.: 37572) de Thermo Scientific™.

Reactivos biológicos específicos para biomarcadores proteínicos

Los reactivos biológicos específicos empleados para la detección de estos biomarcadores fueron los siguientes:

Bioplataforma para metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9): se utilizaron los reactivos suministrados en el kit comercial *Human MMP-9* DuoSet ELISA (R&D Systems, Cat. No.: DY911): anticuerpo de ratón anti-MMP-9 humana, empleado como anticuerpo de captura ($cAb_{MMP\text{-}9}$), anticuerpo de cabra biotinilado anti-MMP-9 humana, como anticuerpo detector ($b\text{-}dAb_{MMP\text{-}9}$) y proteína humana recombinante MMP-9, como estándar.

Bioplataforma para factor activador de células B (BAFF): se usaron los reactivos incluidos en el kit comercial *Human BAFF/BLyS/TNFSF13B* DuoSet ELISA (R&D Systems, Cat. No.: DY124-05): anticuerpo de cabra biotinilado anti-BAFF humana ($b\text{-}cAb_{BAFF}$), anticuerpo de ratón anti-BAFF (dAb_{BAFF}) y proteína humana recombinante BAFF, como estándar.

Bioplataforma para ligando A inductor de proliferación (APRIL): los reactivos procedían del kit comercial *Human APRIL/TNFSF13* DuoSet ELISA (R&D Systems, Cat. No.: DY884B): anticuerpo de ratón anti-APRIL humana (cAb_{APRIL}, en el biosensor asistido por MBs (sección 2.5.2) y dAb_{APRIL}, en el biosensor en formato integrado (sección 2.5.1)), anticuerpo de ratón biotinilado anti-APRIL humana ($b\text{-}dAb_{BAFF}$ en el biosensor asistido por MBs (sección 2.5.2) y $b\text{-}cAb_{APRIL}$, en el biosensor en formato integrado (sección 2.5.1)) y proteína humana recombinante APRIL, como estándar.

2.2.2. DISOLUCIONES

Disoluciones reguladoras de pH

A continuación, se describen las disoluciones reguladoras de pH empleadas para la preparación de las bioplataformas desarrolladas en esta Tesis Doctoral.

- *Disolución reguladora fosfato salina (PBS) 100 mM de pH 7.4*. Se preparó disolviendo 8.7 g de Na_2HPO_4, 5.4 g de NaH_2PO_4, 8 g de NaCl y 0.2 g de KCl en un volumen final de 1 L de agua Milli-Q y ajuste de pH a 7.4.
- *Disolución reguladora fosfato salina (PBS) 10 mM de pH 7.4*. Se preparó por dilución de la disolución PBS 100 mM y ajuste de pH a 7.4.
- *Disolución PBS 100 mM de pH 7.4 suplementada con 0.05% (v/v) de Tween 20® (PBST).* Se preparó añadiendo el volumen adecuado de Tween 20® a la disolución PBS 100 mM y ajuste de pH a 7.4.
- *Disolución reguladora fosfato (PB) 1 M.* Se preparó disolviendo 8.5 g de Na_2HPO_4 y 129.8 g de NaH_2PO_4 en un volumen final de 1 L de agua Milli-Q.

- *Disolución reguladora fosfato (PB) 100 mM de pH 8.0.* Se preparó por dilución de PB 1 M y ajuste a pH 8.0.
- *Disolución reguladora fosfato (PB) 50 mM de pH 6.0.* Se preparó por dilución de PB 1 M y ajuste de pH a 6.0.
- *Disolución reguladora de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 25 mM de pH 5.0.* Se preparó disolviendo 1.22 g de MES en un volumen final de 250 mL de agua Milli-Q y ajuste de pH a 5.0.
- *Disolución tris-(hidroximetil)-aminometano-HCl (Tris-HCl) 100 mM de pH 7.2.* Se preparó disolviendo 1.21 g de Tris-HCl en un volumen final de 100 mL de agua Milli-Q y ajuste de pH a 7.2.
- *Disolución Binding and Washing (B&W): Tris-HCl 10 mM de pH 7.5 suplementada con 1 mM AEDT y 1 mM NaCl.* Se preparó por dilución de la disolución Tris-HCl 100 mM añadiendo la cantidad adecuada de AEDT y NaCl y ajustando el pH a 7.5.
- *Disolución reguladora carbonato (CB) 50 mM de pH 9.6.* Se preparó disolviendo 0.08 g de Na_2CO_3 y 0.146 g de $NaHCO_3$ en un volumen final de 50 mL de agua Milli-Q y ajuste de pH a 9.6.
- *Disolución reguladora acetato (AcB) 100 mM de pH 4.5.* Se preparó disolviendo 0.82 g de CH_3COONa en un volumen final de 100 mL de agua Milli-Q y ajuste de pH a 4.5.
- *Disolución comercial de PBS suplementada con caseína al 1% (p/v)* (BB, Cat. No.: 37528) de Thermo Scientific™.
- *Disolución comercial de PBS libre de proteínas* (PFBB, Cat. No.: 37572) de Thermo Scientific™.
- *Disolución de HCl 1 M*. Se preparó por dilución de HCl 37 % (v/v) en agua Milli-Q.

Disoluciones empleadas en la construcción de las bioplataformas

Además de las disoluciones reguladoras de pH descritas anteriormente, para la fabricación de las bioplataformas electroquímicas desarrolladas se han utilizado también las siguientes:

- *Disoluciones de biorreactivos de captura.* Las disoluciones de trabajo de los anticuerpos, proteínas o DNA de captura empleadas en las bioplataformas desarrolladas en formatos integrados se prepararon a la concentración deseada en cada caso mediante dilución en el volumen requerido de PBS 10 mM de pH 7.4.

  Para la preparación de las bioplataformas asistidas por MBs, los biorreactivos se diluían en diferentes disoluciones reguladoras dependiendo del tipo de micropartículas empleadas: para HOOC-MBs en MES 25 mM de pH 5.0; para NA-MBs o Estrep-MBs, en PBS 10 mM de pH 7.4 o B&W; y para His-tag *isolation*-MBs en PBS 10 mM de pH 7.4.

- *Disoluciones de anticuerpos de detección o marcaje enzimático.* Se prepararon mediante dilución adecuada en el volumen requerido de PFBB, BB o el diluyente correspondiente del kit comercial para conseguir la concentración deseada.
- *Disoluciones de estándares/calibradores o muestras.* Se prepararon por dilución adecuada en el volumen requerido de PFBB, BB o el diluyente correspondiente del kit comercial para conseguir la concentración deseada.
- *Disolución de p-ABA 1 mg mL^{-1}.* Disolución empleada en la formación de la sal de diazonio para modificar los WEs de SPCE o SP_2CEs mediante *grafting* o injertado electroquímico. Se preparó disolviendo 10 mg de *p*-ABA en 10 mL de HCl 1 M.
- *Disolución de $NaNO_2$ 2 mM.* Disolución empleada en la formación de la sal de diazonio para modificar los WEs de SPCE o SP_2CEs mediante *grafting* o injertado electroquímico. Se preparó disolviendo 1.4 mg de $NaNO_2$ en 10 mL de agua Milli-Q.
- *Disoluciones de EDC/NHSS de diferente concentración: 50:50 mg mL^{-1}, 100:100 mM o 400:100 mM*. Estas disoluciones se emplearon para activar los grupos carboxilo de las HOOC-MBs, de los WEs previamente modificados mediante *grafting*, o de los nanotubos de carbono carboxilados (c-MWCNTs). Se prepararon inmediatamente antes de su empleo disolviendo las cantidades adecuadas de EDC y NHSS en el volumen apropiado de MES 25 mM de pH 5.0 o PBS 100 mM de pH 7.4 en el caso de c-MWCNTs.
- *Disolución de HS-NTA 1 mM.* Disolución empleada para modificar el WE de los SPCEs para fabricar la bioplataforma en formato integrado para la determinación de CENPB-Ab. Se preparó disolviendo 1 mg de HS-NTA en 2 mL de CB 50 mM de pH 9.6.
- *Disolución de $CoCl_2$ 7.5 mM.* Empleada para formar el complejo de Co^{+2}-NTA sobre el WE de los SPCEs para la determinación de CENPB-Ab. Se preparó disolviendo 3.6 mg de la sal en un volumen final de 2 mL de AcB 100 mM de pH 4.5.
- *Disoluciones de neutravidina (NA) de 400 o 600 μg mL^{-1}.* Empleadas para la inmovilización de los anticuerpos de captura biotinilados en la bioplataforma integrada dual para la determinación de BAFF y APRIL, respectivamente. Se preparó diluyendo el volumen adecuado de la disolución de NA comercial de 10 mg mL^{-1} en el volumen apropiado de MES 25 mM de pH 5.0.
- *Disolución de etanolamina 1 M*. Empleada para bloquear los posibles grupos residuales de las HOOC-MBs activadas tras la inmovilización de los biorreactivos de captura. Se preparó, en condiciones inertes (atmósfera de N_2) justo antes de su empleo, diluyendo 30 μL de la disolución de etanolamina comercial a un volumen final de 500 μL con PB 100 mM de pH 8.0.

- *Disolución de biotina 2 mg mL^{-1}.* Empleada para bloquear la NA libre residual sobre los WEs de la bioplataforma dual integrada para la determinación de BAFF y APRIL, tras la inmovilización de los anticuerpos biotinilados de captura. Se preparó disolviendo 1 mg de biotina en 500 µL de PBS 10 mM de pH 7.4.

Disoluciones para las medidas electroquímicas

Para la obtención de las respuestas electroquímicas proporcionadas por las bioplataformas desarrolladas en esta Tesis Doctoral, se han utilizado las siguientes disoluciones:

- *Disolución de HQ 100 mM.* Disolución empleada para llevar a cabo las medidas amperométricas en disoluciones agitadas. Se preparó previamente a la medida disolviendo 11 mg de HQ en 1 mL de PB 50 mM de pH 6.0.
- *Disolución de HQ 1 mM.* Disolución empleada para realizar las medidas amperométricas en gota. Se preparó previamente a la medida por dilución adecuada de la disolución de HQ 100 mM en PB 50 mM de pH 6.0.
- *Disolución de H_2O_2 100 mM.* Disolución empleada para llevar a cabo las medidas amperométricas en disoluciones agitadas. Se preparó justo antes de realizar la medida diluyendo 51 µL de H_2O_2 30 % (v/v) en un volumen final de 5 mL de PB 50 mM de pH 6.0.
- *Disolución de H_2O_2 5 mM.* Disolución empleada para realizar las medidas amperométricas en gota. Se preparó inmediatamente antes de la medida por dilución adecuada de la disolución de H_2O_2 100 mM en PB 50 mM de pH 6.0.
- *Disolución de $Fe(CN)_6^{3-}$/$Fe(CN)_6^{4-}$ 5 mM.* Disolución empleada para realizar los estudios de caracterización electroquímica por CV y EIS. Se preparó disolviendo 16 mg de $K_3Fe(CN)_6$, 21 mg de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ y 75 mg de KCl en un volumen final de 10 mL de agua Milli-Q.

2.3. MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Las bioplataformas asistidas por MBs se basan en el uso de estas partículas como microsoportes magnéticos para la implementación del bioensayo correspondiente sobre su superficie. El fácil manejo de las MBs se fundamenta en sus propiedades magnéticas (***figura 2.3***), que permiten llevar a cabo las etapas de incubación con la disolución requerida en tubos de microcentrífuga bajo agitación constante, mejorando las cinéticas y la eficiencia de las reacciones de afinidad. Una vez finalizadas dichas etapas, se retira la disolución de incubación y se hacen los lavados correspondientes, procesos facilitados por la imantación de las MBs con ayuda de un concentrador magnético.

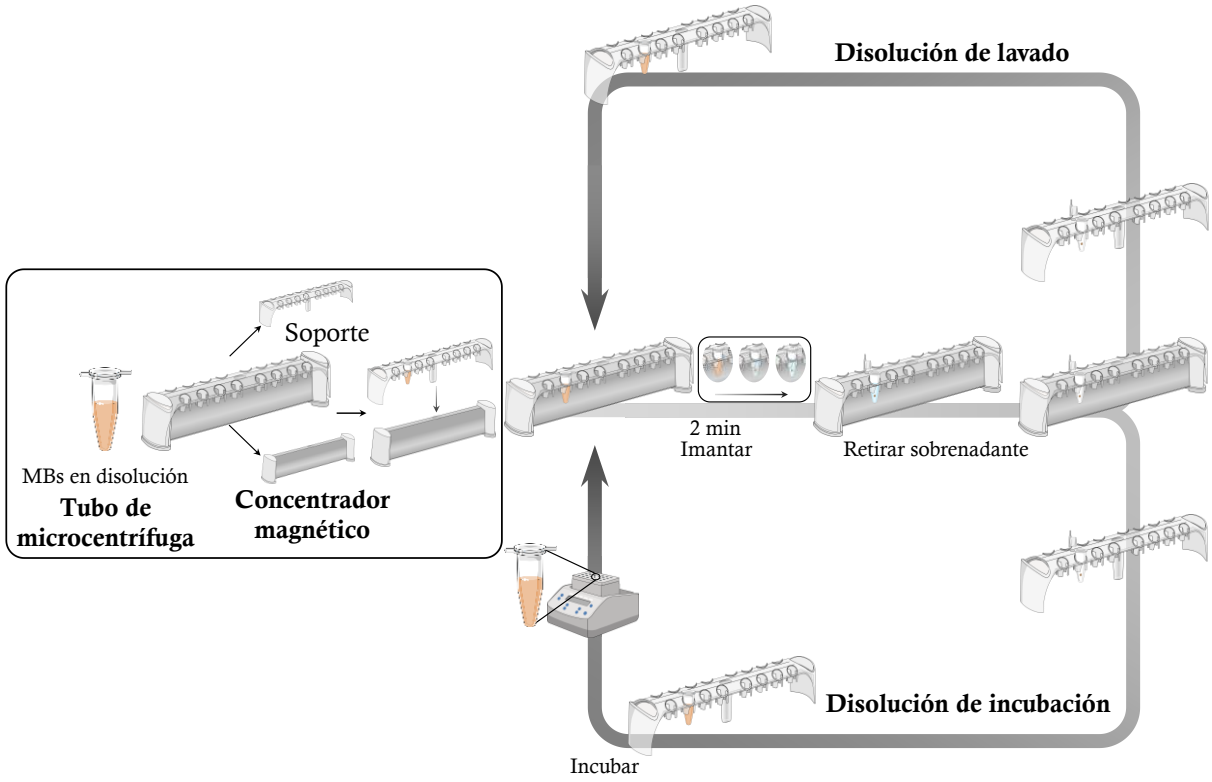


Figura 2.3. *Esquema de las etapas de incubación y de lavado de las MBs empleando el concentrador magnético.*

Entre los distintos tipos de MBs que se dispone comercialmente, en esta Tesis Doctoral se han empleado los siguientes:

Micropartículas magnéticas carboxiladas (***figura 2.4.a***) (HOOC-MBs, Ø de 2.8 µm, ~ 2×10^9 MBs mL^{-1}, Dynabeads™ M-270 *Carboxylic acid* ThermoFisher-Invitrogen™, Cat. No.: 14305D), empleadas para la inmovilización covalente de los inmunorreactivos mediante enlace tipo amida con las aminas primarias de las biomoléculas correspondientes. Para llevar a cabo este proceso, se realizó previamente una activación de los grupos carboxilo empleando la química EDC/NHSS.

La inmovilización de biomoléculas biotiniladas se llevó a cabo mediante interacciones de afinidad avidina-biotina empleando MBs funcionalizadas con neutravidina (***figura 2.4.b***) (NA-

MBs, Ø de 1 µm, 10 mg mL^{-1}, Sera-Mag™ SpeedBeads™ *Neutravidin Coated Magnetic Particles* GE Healthcare, Cat. No.: GE78152104010350) o estreptavidina (***figura 2.4.c***) (Estrep-MBs, Ø de 2.8 µm, 10 mg mL^{-1}, Dynabeads™ M-280 *Streptavidin* ThermoFisher-Invitrogen™, Cat. No.: 11205D).

Por último, se emplearon MBs funcionalizadas con un complejo de Co^{+2}-NTA capaces de inmovilizar biomoléculas conjugadas con tag de His (***figura 2.4.d***) (His-Tag *isolation*-MBs, Ø de 1 µm, 40 mg mL^{-1}, Dynabeads™ His-Tag *Isolation and Pulldown* ThermoFisher-Invitrogen™, Cat. No.: 10103D). Como se describirá más adelante, la inmovilización de este tipo de biomoléculas se lleva a cabo a través de la coordinación selectiva de las His a un ligando tetradentado complejado con Co^{+2} (sección 2.5.1).

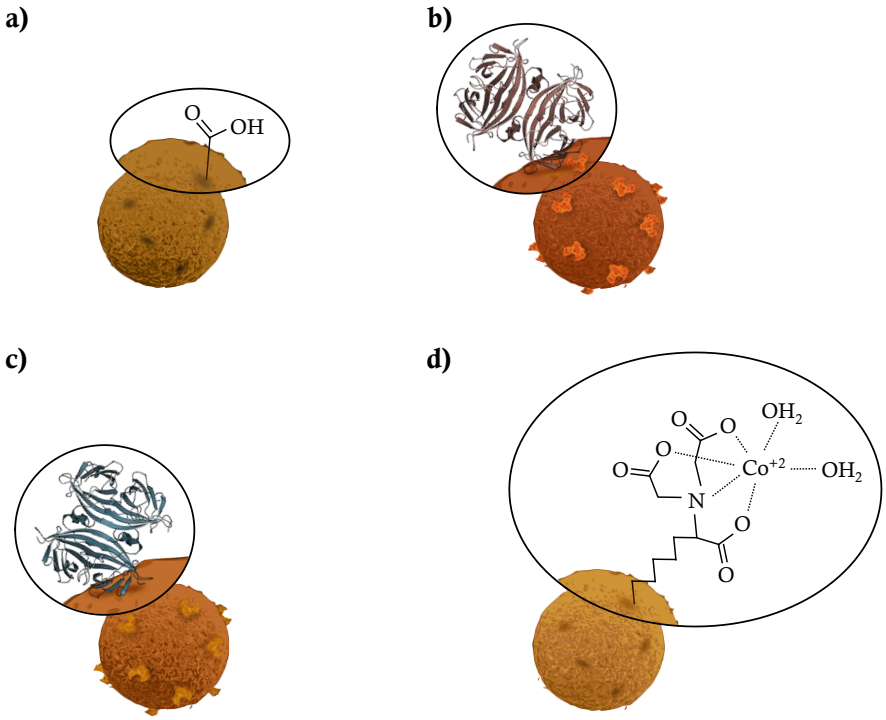


Figura 2.4. *Micropartículas magnéticas funcionalizadas con* ***a)*** *grupos carboxilo (HOOC-MBs)* ***b)*** *neutravidina (NA-MBs)* ***c)*** *estreptavidina (Estrep-MBs) y* ***d)*** *complejo de Co^{+2}-NTA (His-tag isolation-MBs).*

2.4. MUESTRAS

Con el fin de demostrar la aplicabilidad real de las bioplataformas y la relevancia clínica de los biomarcadores seleccionados para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas y cáncer, las bioplataformas electroquímicas desarrollados en esta Tesis Doctoral se enfrentaron a la determinación del contenido endógeno de los biomarcadores investigados en muestras clínicas reales de diferente naturaleza y elevada complejidad.

Todos los experimentos llevados a cabo cumplieron con las normas éticas y las directrices, reglamentos y normativas pertinentes de la Universidad Complutense de Madrid, de los hospitales, las instituciones y los organismos involucrados. La colección y cesión de las muestras proporcionadas por diferentes organismos e instituciones fue aprobada por los Comités Éticos de Investigación y las Juntas de Revisión Ética Institucionales tras obtener los consentimientos informados por escrito de los individuos sanos y los pacientes participantes en los estudios. También se analizaron muestras adquiridas en Central Biohub® GmbH, el mayor mercado en línea de bioespecímenes humanos para investigación científica, obtenidos de donantes con el correspondiente informe consentido, mediante protocolos aprobados por comités éticos independientes en cumplimiento de la Declaración de Helsinki y la Declaración de Taipéi de la Asociación Médica Mundial, y la Convención de Oviedo del Consejo de Europa, entre otros, [Central Biohub® GmbH].

Cultivo celular y producción de extractos

Las bioplataformas desarrolladas también se aplicaron a la determinación de biomarcadores proteicos en lisados de diferentes líneas celulares cultivadas en el laboratorio y adquiridas del repositorio celular *American Type Culture Collection* (ATCC) y del laboratorio del Dr. Isaiah J. Fidler del Centro Oncológico MD Anderson en Houston, Texas. El crecimiento y la preparación de los extractos de estas células se realizó en los laboratorios del grupo de investigación ProteoFun (UFIEC-ISCIII). Las líneas celulares utilizadas presentaban distintas características según la enfermedad diagnosticada y la procedencia:

- Línea celular MDA-MB-436 (ATCC, No.: HTB-130), procedente de una mujer blanca de 43 años diagnosticada con cáncer de mama triple negativo. Las células pleomórficas presentaban multinúcleos de adenocarcinoma con metástasis con derrame pleural, tratándose de una línea con alta capacidad metastásica con mutación en los genes *BRCA1* y *RB1*.
- Línea celular SW480 (ATCC, No.: CCL-228), procedente de un hombre blanco de 50 años diagnosticado con adenocarcinoma primario de colon. Son células aisladas del intestino grueso.

- Línea celular SW620 (ATCC, No.: CCL-227), procedente de un hombre blanco de 51 años diagnosticado con adenocarcinoma primario de colon. Las células fueron aisladas del mismo tumor metastásico del que se derivó la línea SW480.
- Línea celular KM12C (MD Anderson, No.: CVCL_9547), procedente de un paciente diagnosticado con carcinoma colorrectal derivado de un tumor primario clasificado en el estadio B2 de Dukes.
- Línea celular KM12SM (MD Anderson, No.: CVCL_9548), procedente de un paciente diagnosticado con carcinoma colorrectal derivado de un tumor primario clasificado en el estadio B2 de Dukes. Se inyectaron células del cultivo parental KM12C en el bazo de ratones desnudos consiguiendo la línea celular de metástasis hepática espontánea [Morikawa et al., 1988].
- Línea celular KM12L4a (MD Anderson, No.: CVCL_W220), procedente de un paciente diagnosticado con carcinoma colorrectal derivado de un tumor primario clasificado como estadio B2 de Dukes. Se inyectaron células del cultivo parental KM12C en el bazo de ratones desnudos consiguiendo línea celular de metástasis hepática experimental KM12L1. A estas células se les repitió el ciclo tres veces, dando lugar a la línea KM12L4 [Morikawa et al., 1988].

Estas líneas celulares se crecieron a 37 ºC en atmósfera húmeda con un 5% de CO_2 según los protocolos establecidos por el medio de cultivo de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* suplementado con el 10% de suero bovino fetal, 100 U mL^{-1} de penicilina, 100 µg mL^{-1} de estreptomicina y 2.5 mmol L^{-1} de L-glutamina (DMEM, GIBCO-Thermo Scientific™-Invitrogen). Para la preparación de sus extractos, se lavaron con PBS frío, incubándolas durante 5 minutos con PBS suplementado con 4 mmol L^{-1} de AEDT para levantarlas de las placas y posterior centrifugación a 1200 rpm durante 4 minutos para retirar el sobrenadante. Para realizar la lisis celular, las células se resuspendieron en 1 mL de disolución reguladora de lisis fría (Tris-HCl 25 mM de pH 7.6, NaCl 150 mM, 1% de NP-40, tensoactivo polioxietileno no iónico, 1% de desoxicolato sódico y 0.1% de SDS, dodecilsulfato sódico) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas 1×, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y *o*-vanadato de sodio activado 1 mM. A continuación, las células lisadas se incubaron durante 10 minutos en hielo y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga con ayuda de una aguja de calibre 25 acoplada a una jeringuilla de 1 mL para ser centrifugadas a 13200 rpm a 4 ºC durante 15 minutos. Los lisados celulares resultantes se almacenaron a –80 ºC hasta su análisis [Torrente-Rodríguez et al., 2017].

La bioplataforma de MMP-9 se aplicó a su determinación en extractos de células MDA-MB-436 crecidas en ausencia y presencia de 10 ng mL^{-1} de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck), 10 ng mL^{-1} de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich) o 10 ng mL^{-1} de PMA y 3 µg mL^{-1} de Brefeldina A (BFA, Abcam) con el fin de activar la expresión de la proteína diana [Roomi et al., 2009].

La bioplataforma para la determinación dual de BAFF y APRIL se aplicó al análisis de extractos de células SW480, SW620, KM12C, KM12SM y KM12L4a.

Suero

Todas las bioplataformas electroquímicas desarrolladas en esta Tesis Doctoral se han aplicado a la determinación del contenido del biomarcador diana en muestras de suero. Para ello, se han analizado un total de 50 muestras procedentes de individuos sanos (CT) y de pacientes con cáncer de mama (BC) (MMP-9), cáncer colorrectal (CRC) (BAFF y APRIL), lupus eritematoso sistémico (SLE) (BAFF y APRIL, AQP4-Abs, dsDNA-Abs, ENAs-Abs), Alzheimer (AD) (AQP4-Abs, dsDNA-Abs), Síndrome de Sjögren (SS) (ENAs-Abs), enfermedad autoinmune no específica (CENPB-Abs) y Síndrome de CREST (SSc) (determinación dual de CENPA-Abs y CENPB-Abs).

Las muestras de suero de pacientes con BC procedían del Hospital Universitari de Sant Joan (Tarragona, España) y siete muestras de suero de individuos sanos, las de pacientes con CRC y con AD fueron proporcionadas por el Hospital Clínico San Carlos y el Instituto de Salud Carlos III. Todas estas muestras se almacenaron a –80 °C hasta su uso.

Todos los sueros procedentes de pacientes diagnosticados con alguna enfermedad autoinmune y cuatro de los sujetos sanos fueron adquiridos en Central BioHub® GmbH y almacenados a –40 °C.

2.5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

En este apartado se describen los protocolos optimizados para el desarrollo de las diferentes plataformas biosensoras y para llevar a cabo la determinación individual o múltiple de los biomarcadores de interés.

2.5.1. BIOPLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS EN FORMATO INTEGRADO

La metodología experimental empleada a lo largo de esta Tesis Doctoral para desarrollar biosensores en formato integrado consistió en la modificación directa de la superficie electródica de los electrodos serigrafiados con uno (SPCE) o dos (SP_2CE) electrodos de trabajo (WE) funcionalizados en condiciones húmedas, previamente colocados en una cámara de humedad. Así, cada etapa de incubación se llevó a cabo a través de la deposición de una gota del volumen requerido de cada disolución preparada (***figura 2.5***).

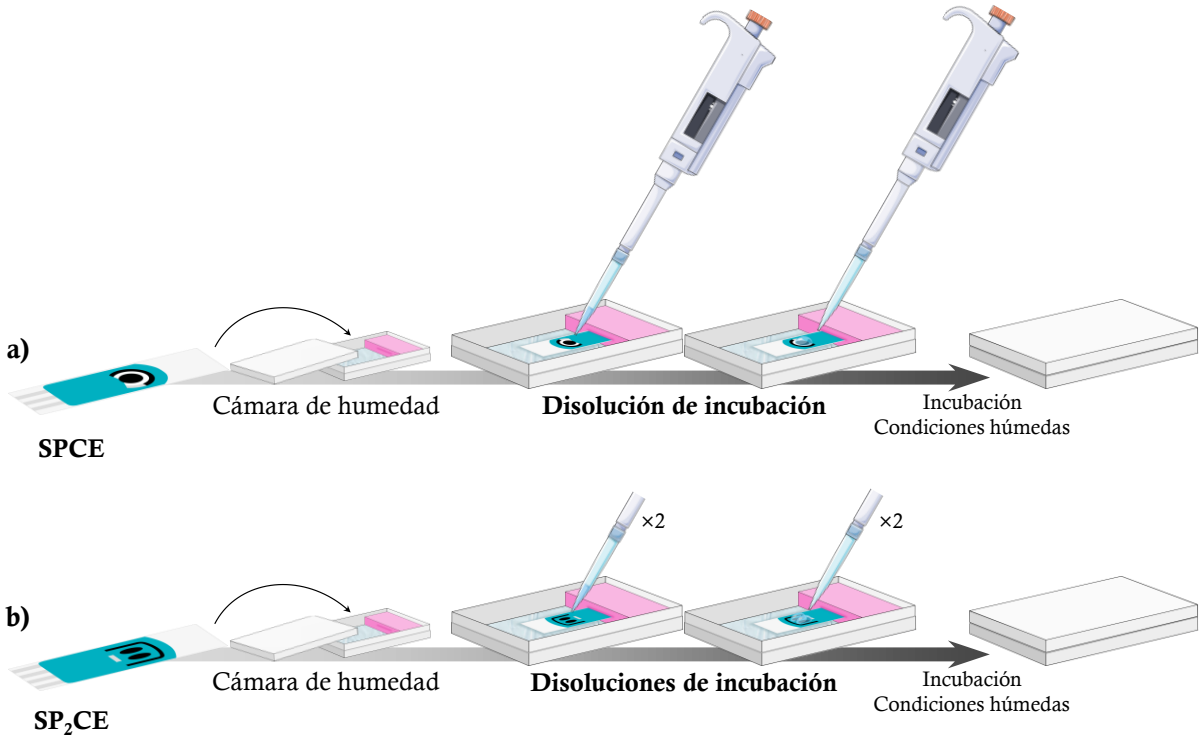


Figura 2.5. *Protocolo de incubación sobre WE/s de* ***a)*** *SPCE y* ***b)*** *SP_2CE en condiciones húmedas para el desarrollo de bioplataformas electroquímicas en formato integrado.*

Bioplataformas para la determinación de autoanticuerpos: Bioplataforma para la determinación de CENPB-Ab

Para poner a punto la bioplataforma para la determinación de CENPB-Ab se hizo uso de la denominada "química His-tag", inmovilizando la proteína CENPB expresada con tag de His sobre la superficie del WE del SPCE, previamente modificada con un derivado del ácido nitrilotriacético (HS-NTA) y el catión Co^{+2}. De este modo, el autoanticuerpo fue selectivamente capturado y marcado enzimáticamente con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima HRP.

El uso de estrategia His-Tag se realizó modificando primero el electrodo con un derivado del NTA y un complejo de Co(II). Las etapas de incubación en este proceso de modificación se llevaron a cabo en condiciones húmedas y a temperatura ambiente, realizando los lavados con agua Milli-Q y el secado con una corriente de N_2.

Para comenzar, se depositaron 5 µL de la disolución de HS-NTA 1 mM sobre la superficie del WE del SPCE durante 2.5 horas. Transcurrido este tiempo, y tras una etapa de lavado y secado, se depositaron 5 µL de una disolución de $CoCl_2$ 7.5 mM sobre dicha superficie durante 30 minutos (***figura 2.6***). Finalmente, se lavó el SPCE, se secó y se almacenó hasta su uso a temperatura ambiente.

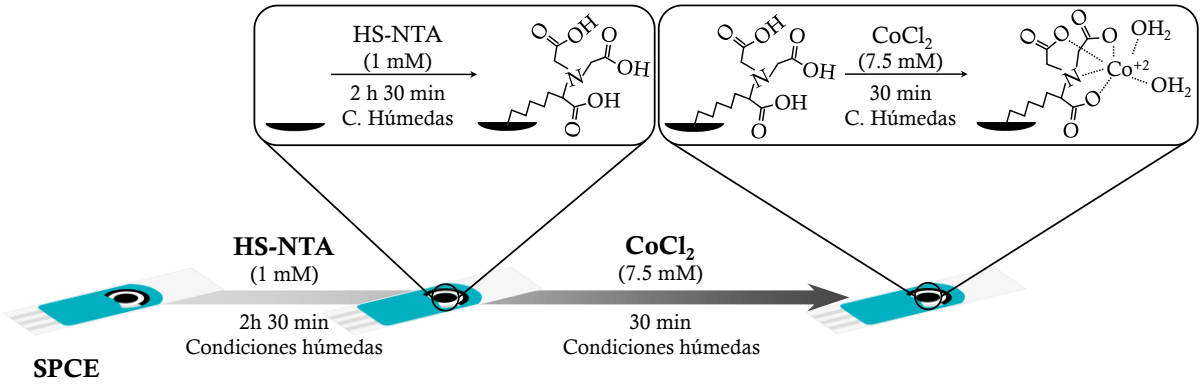


Figura 2.6. *Protocolo para la modificación del WE del SPCE con el complejo Co^{+2}-NTA.*

Tras la modificación de la superficie de trabajo (WE) del SPCE con Co^{+2}-NTA, se incubaron 5 µL de una disolución de 10 µg mL^{-1} de proteína CENPB expresada con tag de His, preparada en PBS 10 mM de pH 7.4 durante 15 minutos. Tras dos etapas de lavado con la misma disolución reguladora, se depositó sobre la superficie CENPB-Co^{+2}-NTA-WE del SPCE una gota de 25 µL de PBS 10 mM de pH 7.4, de manera que cubriese los tres electrodos, para su almacenamiento en condiciones húmedas a 4 ºC hasta su posterior uso.

A continuación, y después de secar el WE bajo corriente de N_2, se depositaron 5 µL de la disolución estándar de concentración adecuada de CENPB-Abs o de las muestras a analizar preparadas en BB y se incubaron durante 15 minutos. Tras lavar el SPCE dos veces con BB y secarlo, los CENPB-Abs selectivamente capturados se marcaron enzimáticamente depositando

sobre la superficie del WE 5 µL de la disolución comercial HRP-anti-IgG humana (HRP-anti-hIgG) del kit durante 30 minutos. La plataforma biosensora resultante HRP-anti-hIgG-CENPB-Abs-CENPB-Co^{+2}-NTA-WE se lavó dos veces con BB y se depositó sobre su superficie una gota de 25 µL de PBS 10 mM de pH 7.4 cubriendo los tres electrodos hasta llevar a cabo la medida electroquímica (***figura 2.7***).

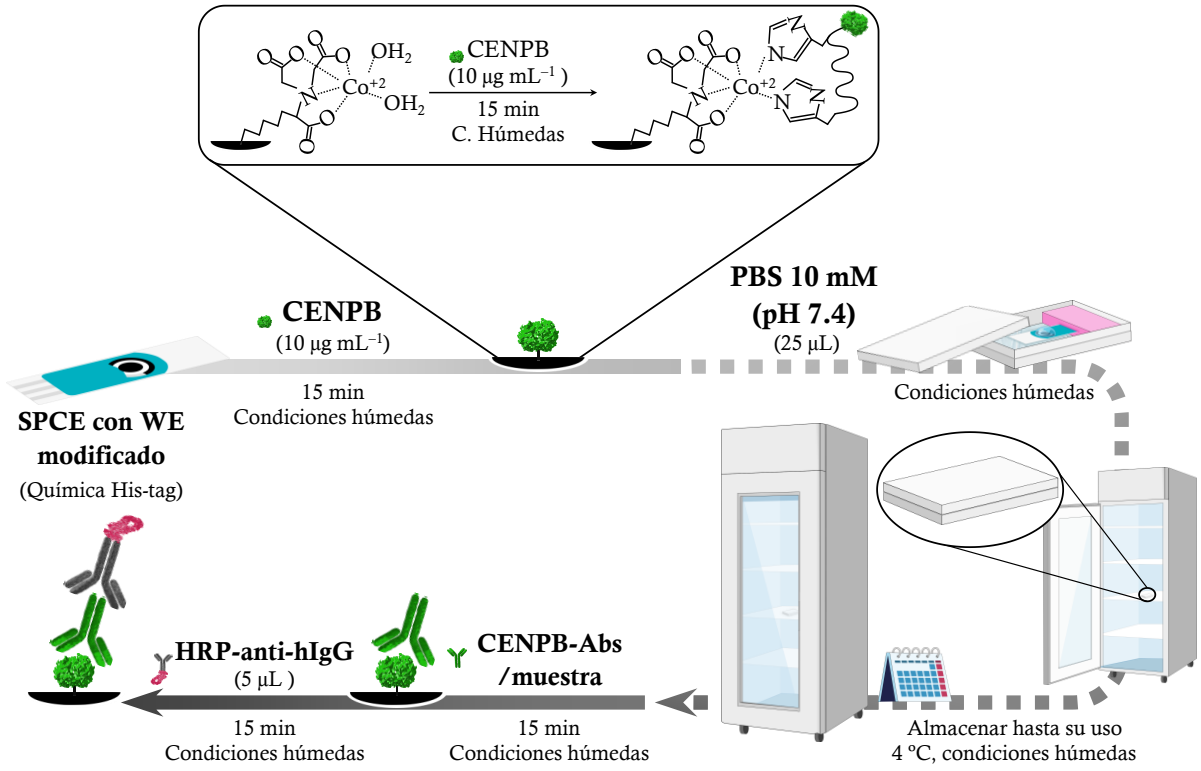


Figura 2.7. *Protocolo experimental para la preparación de la bioplataforma electroquímica en formato integrado para la determinación de CENPB-Abs.*

Bioplataformas para la determinación de biomarcadores proteínicos: Bioplataforma dual para BAFF y APRIL

En el desarrollo de la bioplataforma para la determinación simultánea de las citoquinas BAFF y APRIL se emplearon electrodos duales (SP_2CE) y formatos de inmunoensayo tipo sándwich, donde los analitos son capturados selectivamente por sus correspondientes anticuerpos de captura, y se utiliza una estrategia de detección basada en la amplificación de la respuesta electroquímica mediante el empleo de nanoestructuras híbridas de nanotubos de carbono y MoS_2 (MoS_2/MWCNTs) sintetizadas en el laboratorio y utilizadas como transportadores de elementos de señalización y reconocimiento (anticuerpo de detección correspondiente y moléculas de HRP).

La síntesis de las nanoestructuras binarias de MoS_2/MWCNTs se fundamenta en un procedimiento hidrotermal siguiendo el protocolo descrito por Sun y cols. [Sun, Y. et al., 2018]. Para ello, 2.5 mg de MWCNTs carboxilados (c-MWCNTs, previamente tratados según el procedimiento establecido por Serafín y cols. [Serafín et al., 2019b]) se suspendieron en agua Milli-Q y se agitaron en el baño de ultrasonidos durante 30 minutos para conseguir una dispersión homogénea. Sobre esta dispersión se añadieron 33 mg de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$ y 60 mg de tiourea, se agitaron durante 30 minutos a 800 rpm y, una vez concluido el tiempo de agitación, se transfirió la disolución a un reactor de acero inoxidable revestido de teflón para llevar a cabo la síntesis en estufa a 200 ºC durante 24 horas. Finalizado el tiempo de síntesis, y enfriando el reactor hasta alcanzar la temperatura ambiente (aproximadamente 1 hora), la disolución resultante se trasladó a un tubo de centrífuga para recolectar el precipitado por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos. Este precipitado se lavó por sextuplicado mediante centrifugación 10 minutos a 4000 rpm con 10 mL de etanol las tres primeras veces y con agua Milli-Q las tres restantes. Por último, el precipitado se secó en estufa a 37 ºC durante 24 horas (***figura 2.8.a***).

Con el fin de comparar la nanoestructura binaria resultante (MoS_2/MWCNTs) con otros nanomateriales basados en MoS_2: MoS_2, MoS_2/rGO y MoS_2/rGO/MWCNTs, se empleó el mismo protocolo de síntesis sin c-MWCNTs, añadiendo 3 mg de GO o 3 mg de GO junto con 2.5 mg c-MWCNTs, respectivamente. En cada caso se prepararon disoluciones homogéneas de 1 mg mL^{-1} del nanomaterial suspendido en PBS 10 mM de pH 7.4 conseguidas por dispersión en el baño de ultrasonidos. Se almacenaron en la oscuridad y a temperatura ambiente hasta su uso (***figura 2.8.b***).

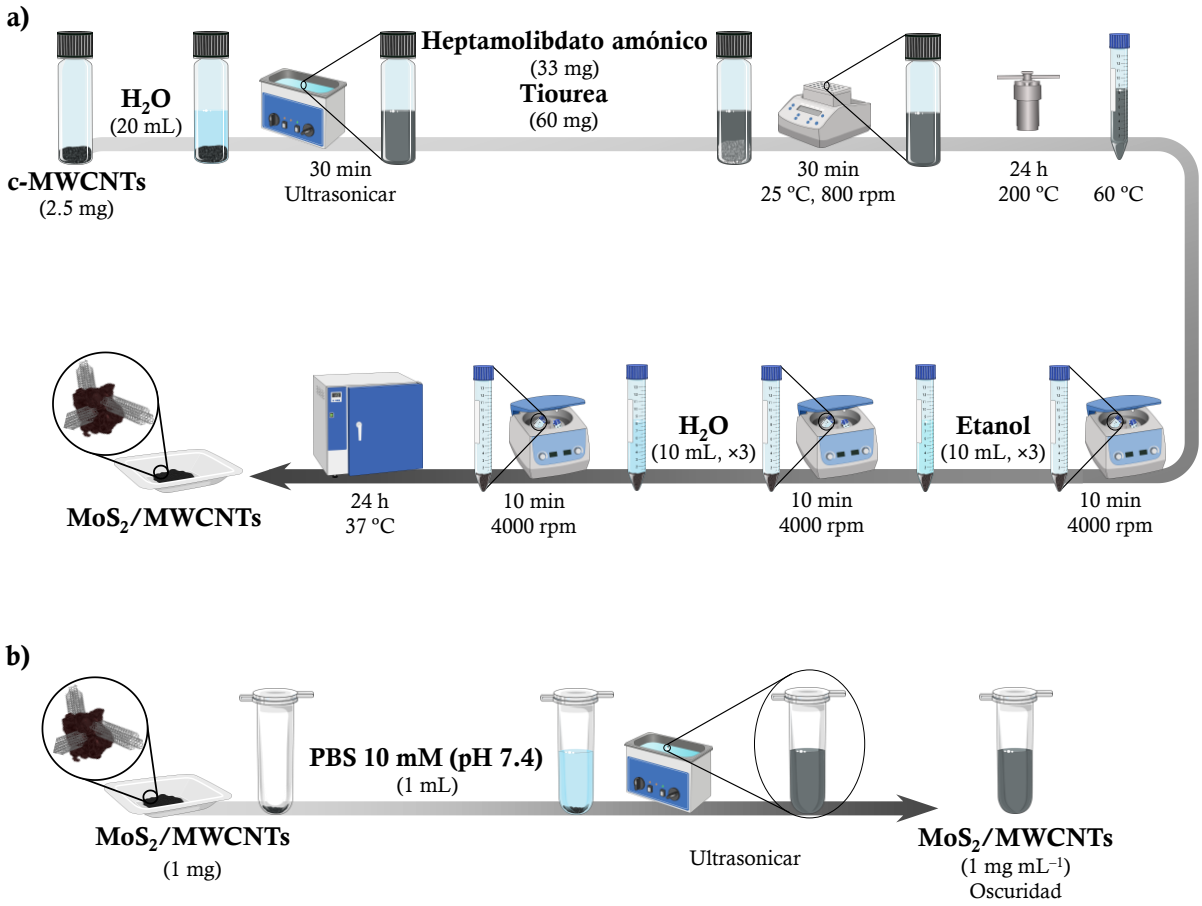


Figura 2.8. *Protocolos de* ***a)*** *síntesis de MoS_2/MWCNTs y* ***b)*** *preparación de 1 mg mL^{-1} de MoS_2/MWCNTs para su almacenamiento.*

Siendo el objetivo final la obtención de un nano-transportador de moléculas de reconocimiento y señalización, el nanomaterial de MoS_2/MWCNTs se conjugó con el anticuerpo de detección selectivo a la proteína diana y con HRP (***figura 2.9***) haciendo uso de protocolos previamente desarrollados en nuestro Grupo de Investigación [Sánchez-Tirado et al., 2018; Valverde et al., 2020]. La suspensión de MoS_2/MWCNTs de 1 mg mL^{-1} se diluyó en agua Milli-Q hasta conseguir una concentración final de 0.1 mg mL^{-1}. Se tomaron 500 µL de la misma y se centrifugaron durante 10 minutos a 14000 rpm para retirar el sobrenadante. Sobre el residuo sólido se añadieron 200 µL de una disolución mezcla de EDC/NHSS 400:100 mM preparada en PBS 100 mM de pH 7.4 para activar los grupos carboxilo de los c-MWCNTs, y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente bajo agitación continua a 300 rpm durante 6 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, la dispersión activada resultante se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos y el producto obtenido se lavó tres veces, empleando las mismas condiciones de centrifugación, con 300 µL de PBS 10 mM de pH 7.4. El nanomaterial MoS_2/MWCNTs con los grupos carboxilo activados se conjugó incubándolo, durante 24 horas a 4 °C bajo agitación continua a 300 rpm, con una disolución mezcla preparada en PBS 100 mM de

pH 7.4 que contenía 10 mg mL^{-1} de HRP y 6 µg mL^{-1} de dAb_{BAFF} o 5 µg mL^{-1} de dAb_{APRIL} para preparar los conjugados MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb_{BAFF} o MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb_{APRIL}, respectivamente. Por último, los nanotransportadores se centrifugaron durante 5 minutos a 14000 rpm y se lavaron tres veces en las mismas condiciones con PBS 10 mM de pH 7.4 para, finalmente, resuspender el sólido obtenido en 500 µL de PBST 100 mM de pH 7.4.

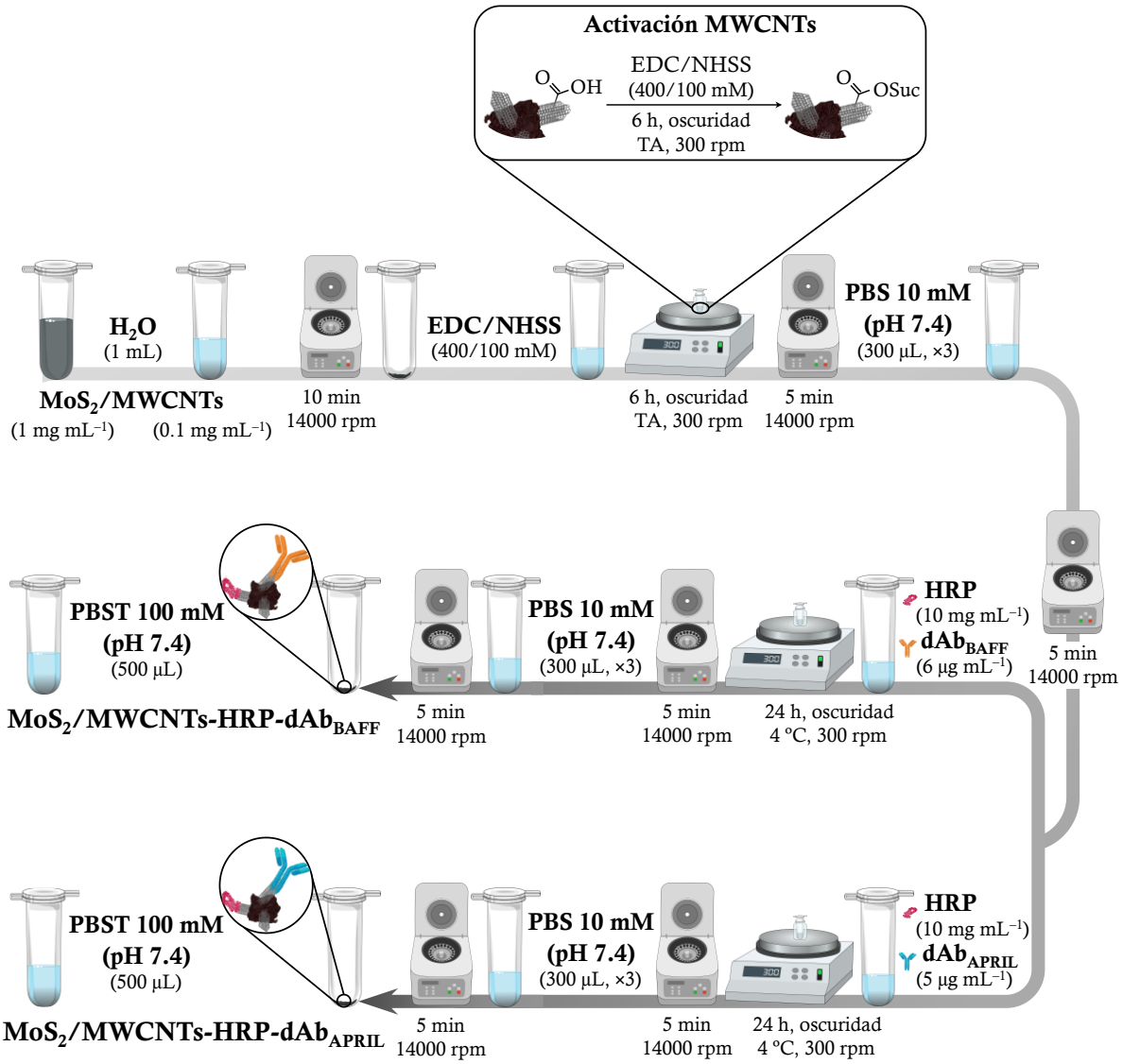


Figura 2.9. *Protocolo de conjugación de MoS_2/MWCNTs con HRP y dAb_{BAFF} o dAb_{APRIL} para preparar MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb_{BAFF} y MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb_{APRIL}, respectivamente.*

Con fines comparativos, los otros materiales sintetizados en este trabajo: MoS_2/rGO y MoS_2/rGO/MWCNTs se decoraron con moléculas del anticuerpo de detección y HRP empleando el mismo procedimiento.

Los bionanoconjugados obtenidos resuspendidos en PBST 100 mM de pH 7.4 se almacenaron en tubos de microcentrífuga, bajo agitación continua, a 4 °C hasta su uso (***figura 2.10***).

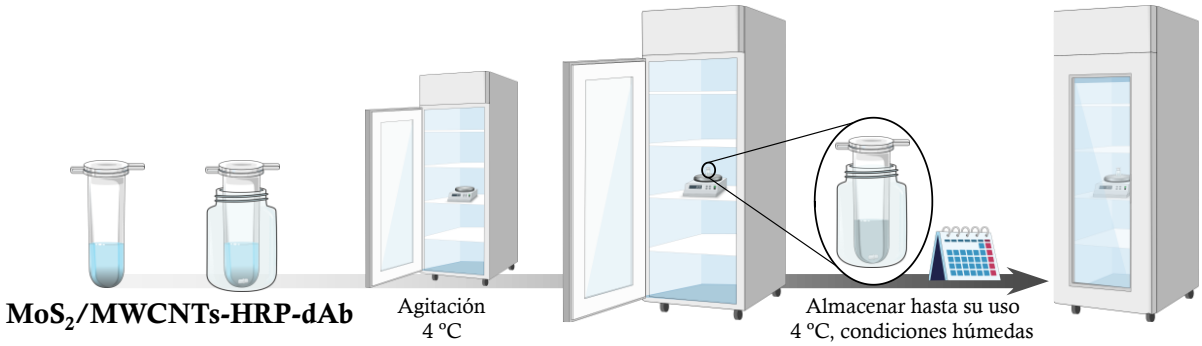


Figura 2.10. *Protocolo para almacenar los bionanoconjugados MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb$_{BAFF}$ y MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb$_{APRIL}$ bajo agitación continua a 4 ºC.*

Es importante destacar que estos bionanoconjugados, almacenados en estas condiciones, demostraron ser estables durante aproximadamente 4 meses, por lo que era posible tenerlos preparados y almacenados con antelación.

La preparación de la bioplataforma en formato integrado se llevó a cabo realizando las etapas de incubación a temperatura ambiente y en condiciones húmedas para evitar la evaporación de las gotas, tal y como se muestra en la ***figura 2.5***. Después de cada una de ellas, los electrodos se aclararon con el regulador empleado para preparar la siguiente disolución a incubar y secaron a temperatura ambiente.

En primer lugar, se procedió a funcionalizar la superficie electródica de los WEs del electrodo serigrafiado mediante *grafting* o injertado electroquímico de una sal de diazonio seguido de unión covalente. Se obtuvo la sal de diazonio del ácido 4-aminobenzoico (*p*-ABA) añadiendo gota a gota durante 7 minutos, bajo agitación constante y en baño de hielo, el volumen necesario de una disolución acuosa de $NaNO_2$ 2 mM sobre una disolución de *p*-ABA de 1 mg mL^{-1} preparada en HCl 1 M manteniendo la relación 38 µL de $NaNO_2$ por cada 2 mg de *p*-ABA. Seguidamente, el *grafting* electroquímico se llevó a cabo sumergiendo el electrodo en 1 mL de la disolución de la sal de diazonio y aplicando mediante CV 10 ciclos de potencial sucesivos entre 0.0 y –1.0 V frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag, a una velocidad de barrido (ν) de 200 mV s^{-1} [Martínez-García et al., 2016a; Moreno-Guzmán et al., 2012] (***figura 2.11***). Finalmente, el electrodo modificado se lavó con agua Milli-Q, se secó y se guardó hasta su uso a temperatura ambiente.

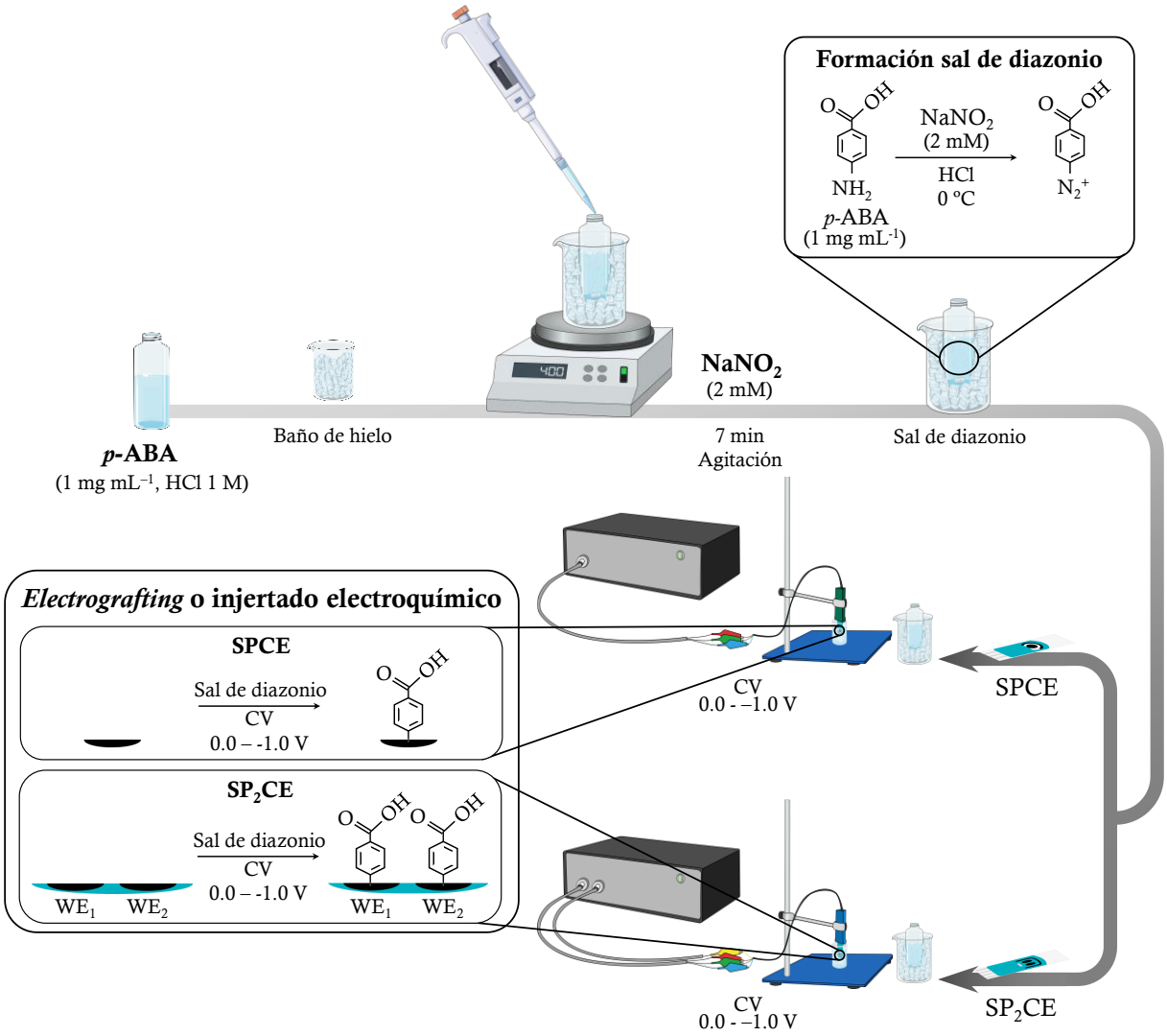


Figura 2.11. *Protocolo para la modificación de la superficie de los WEs de SPCEs o SP_2CEs mediante grafting o injertado electroquímico.*

A continuación, se activaron los grupos fenilcarboxilo injertados sobre la superficie de los WEs depositando e incubando durante 30 minutos sobre cada WE del SP_2CE 10 µL de una disolución fresca mezcla de EDC y NHSS 100:100 mM preparada en MES 25 mM de pH 5.0. Después de enjuagar dos veces con el mismo regulador y secar, en cada WE se depositaron e incubaron durante 30 minutos 3 µL de una disolución de NA de 600 o 400 µg mL^{-1} preparadas en el mismo regulador MES para elaborar los inmunosensores de BAFF o APRIL, respectivamente. Tras dos etapas de lavado con PBS 10 mM de pH 7.4, los anticuerpos de captura biotinilados b-cAb_{BAFF} y b-cAb_{APRIL} se inmovilizaron durante 30 minutos sobre las moléculas de NA añadiendo en el correspondiente WE 3 µL de disoluciones de 100 ng mL^{-1} o 5 µg mL^{-1} respectivamente, preparadas en PBS 10 mM de pH 7.4. Tras lavar con el mismo regulador, se bloquearon las moléculas libres de NA depositando sobre cada WE 10 µL de una disolución de biotina de 2 mg mL^{-1} preparada en PBS, durante 15 minutos. Concluida la etapa de bloqueo, los electrodos se

aclararon dos veces con BB y se almacenaron, con una gota de 25 µL de PBS 10 mM de pH 7.4 que cubría todo el sistema de electrodos, a 4 ºC en condiciones húmedas hasta su posterior uso.

Para llevar a cabo la determinación de BAFF y APRIL, sobre los b-cAb$_{BAFF}$-NA-*p*-ABA-WE$_1$ y b-cAb$_{APRIL}$-NA-*p*-ABA-WE$_2$ se depositaron 3 µL de las disoluciones estándar de BAFF o APRIL o de las muestras a analizar preparadas en BB y se incubaron durante 30 minutos. Concluida la captura selectiva de cada proteína diana, se enjuagaron los electrodos con BB y se incubaron durante 30 minutos con 3 µL de la suspensión correspondiente de los nanobioconjugados de MoS$_2$/MWCNTs-HRP-dAb$_{BAFF}$ o MoS$_2$/MWCNTs-HRP-dAb$_{APRIL}$. La plataforma inmunosensora dual MoS$_2$/MWCNTs-HRP-dAb$_{BAFF}$-BAFF-cAb$_{BAFF}$-NA-*p*-ABA-WE$_1$ y MoS$_2$/MWCNTs-HRP-dAb$_{APRIL}$-APRIL-cAb$_{APRIL}$-NA-*p*-ABA-WE$_2$ resultante se lavó con PBS 10 mM de pH 7.4 dos veces y se depositó una gota de 25 µL de este regulador cubriendo el sistema de electrodos hasta realizar las medidas electroquímicas (***figura 2.12***).

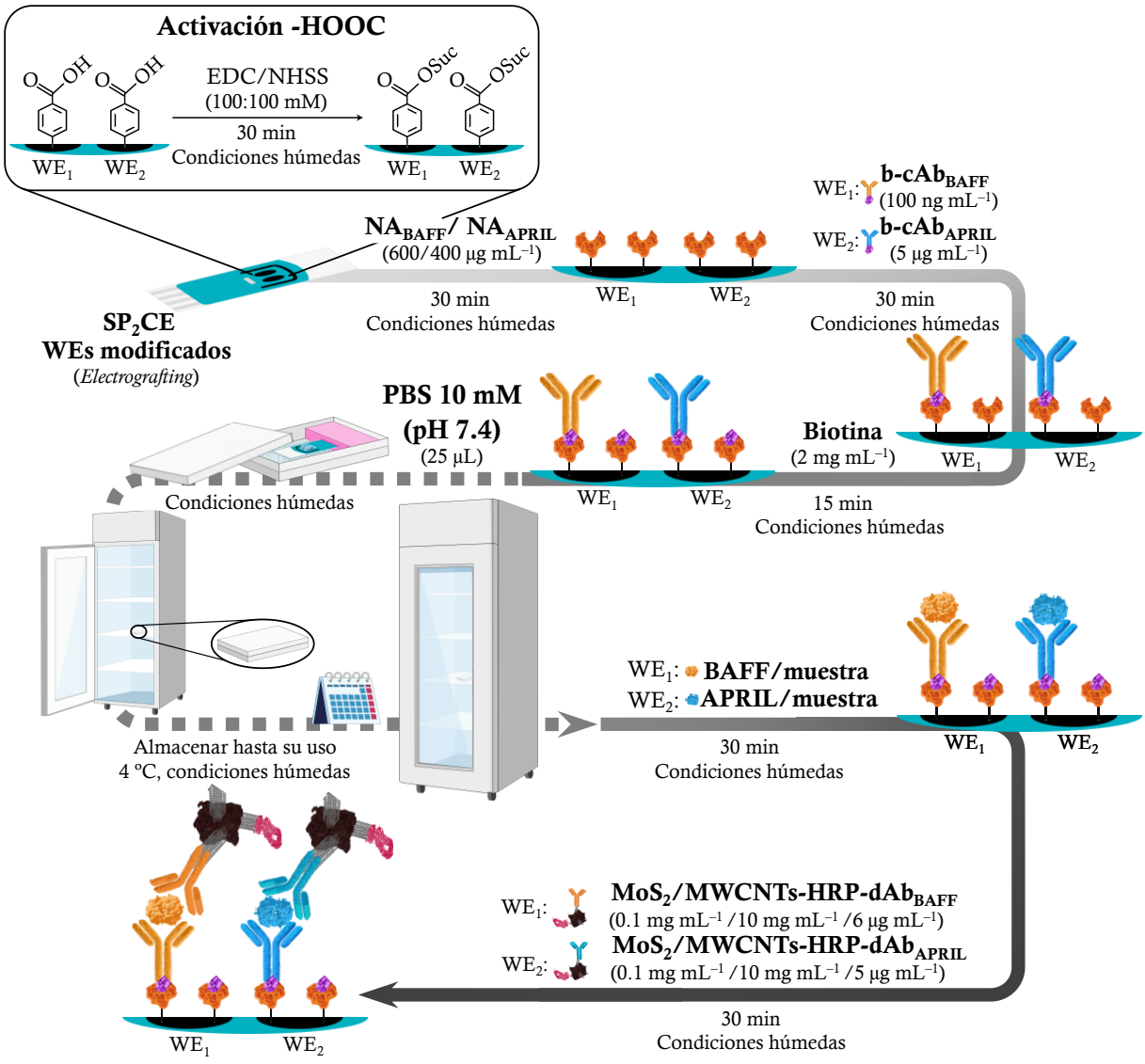


Figura 2.12. *Protocolo experimental para la preparación de la bioplataforma dual en formato integrado para la determinación de BAFF y APRIL.*

2.5.2. BIOPLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS ASISTIDAS POR MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado bioplataformas basadas en el empleo de micropartículas magnéticas con formato de inmunoensayo tipo sándwich donde los diferentes tipos de MBs, especificados en la sección 2.3., se emplean para inmovilizar por enlace covalente, por afinidad con la biotina o por la inmovilización de His sobre un complejo de Co^{+2}-NTA, los distintos bioelementos de reconocimiento: anticuerpos de captura, proteínas de captura o cadenas dobles de DNA, para la captura eficiente y selectiva del biomarcador diana, que posteriormente era reconocido y marcado enzimáticamente. Este reconocimiento y marcaje se realizaba con anticuerpos de detección biotinilados marcados con Estrep-HRP o anticuerpos secundarios marcados con HRP. Los distintos protocolos de ensayo se esquematizan en la ***figura 2.13***:

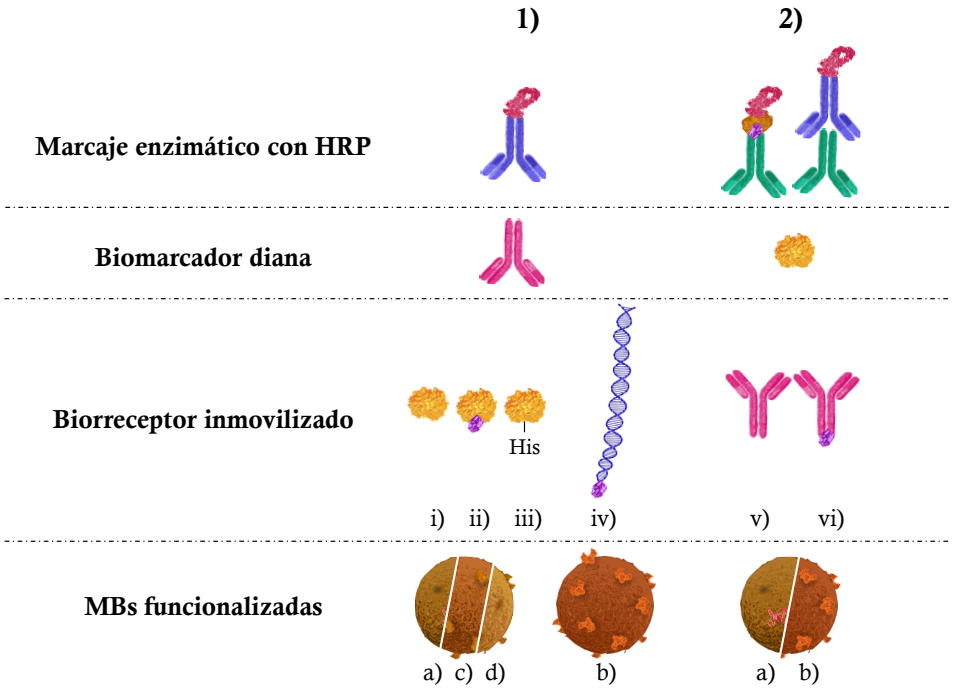


Figura 2.13. *Esquemas de bioensayo para la determinación de* ***1)*** *autoanticuerpos y* ***2)*** *biomarcadores proteínicos, basados en el empleo de a) HOOC-MBs activadas con EDC/NHSS y bloqueadas con etanolamina, b) NA-MB, c) Estrep-MBs o d) His-tag isolation-MBs para la inmovilización de proteínas i) sin conjugar, ii) biotinilados o iii) conjugadas con His o iv) DNA de cadena doble biotinilado o anticuerpos v) sin conjugar o vi) biotiniladas.*

Protocolos para el empleo de micropartículas magnéticas

A pesar de que cada tipo de MBs requiere unos procedimientos específicos, todos ellos comparten etapas clave para la formación de los bioconjugados llevadas a cabo en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL:

1. Dos etapas de lavado de la alícuota de la suspensión comercial de MBs antes de comenzar el bioensayo.
2. Etapas de incubación con volúmenes comprendidos entre 25–100 µL de la disolución requerida, bajo agitación constante (950 rpm), a la temperatura y durante el tiempo necesarios para: i) la inmovilización del bioelemento de reconocimiento, ii) captura del biomarcador diana y iii) reconocimiento y marcaje enzimático con HRP.
3. Etapas de lavado con 50 µL de la disolución de lavado específica, tras cada una de las etapas de incubación, imantando las MBs modificadas durante 2 minutos en un concentrador magnético.
4. Resuspensión de los bioconjugados resultantes en disolución reguladora de PB 50 mM de pH 6.0 para llevar a cabo la transducción amperométrica.

Micropartículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxilo (HOOC-MBs).

Las HOOC-MBs se han empleado en esta Tesis Doctoral para la formación de los bioconjugados base de las bioplataformas para la determinación smRNP-Abs, como autoanticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles, y de MMP-9 y APRIL, como biomarcadores proteicos. Las condiciones de incubación óptimas para la formación de los bioconjugados de las tres bioplataformas se consiguieron a 25 ºC y bajo agitación constante a 950 rpm en un incubador termo-regulador.

El procedimiento experimental general para la preparación de estos bioconjugados (***figura 2.14***) comenzaba con la deposición de 3 µL de una alícuota de la suspensión comercial de HOOC-MBs en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL para llevar a cabo dos etapas de lavado consecutivas con 50 µL de disolución MES 25 mM de pH 5.0 bajo agitación constante, durante 10 minutos. Tras retirar el sobrenadante en cada una de estas etapas mediante la captura magnética de las MBs con el concentrador magnético, las micropartículas se activaban durante 35 minutos por incubación de 25 µL de una disolución mezcla de EDC/NHSS 50:50 mg mL^{-1} preparada en esta misma disolución MES. Una vez activados los grupos carboxilo, se procedía a la inmovilización covalente de la proteína, para el biosensor de smRNP-Abs, o de los anticuerpos de captura, en el caso de los biosensores para MMP-9 y APRIL, por formación de un enlace amida a través de los grupos amino primarios de estos bioelementos de reconocimiento. Los correspondientes bioelementos de reconocimiento se prepararon en MES 25 mM de pH 5.0, y se aplicaron protocolos específicos para cada bioconjugado según se describe más adelante.

En la siguiente etapa, los posibles grupos carboxilo activados residuales que no habían reaccionado con el biorreceptor, se bloquearon por incubación durante 60 minutos de 25 µL de una disolución de etanolamina 1.0 M preparada en PB 100 mM de pH 8.0. De este modo, se prevenían las posibles inmovilizaciones inespecíficas de los analitos o moléculas empleadas para el marcaje enzimático en ausencia del bioelemento de reconocimiento. Después de la etapa de bloqueo se llevaron a cabo un lavado con disolución Tris-HCl 100 mM de pH 7.2 y dos lavados con disolución PBS 10 mM de pH 7.4. En este punto, las MBs resultantes se resuspendían en 50 µL de disolución PBS 10 mM de pH 7.4 y almacenaban en los tubos de microcentrífuga a 4 °C hasta su uso.

Por último, se aplicaron las etapas de incubación de las disoluciones que contenían el biomarcador o las muestras, preparadas en la disolución correspondiente y, finalmente, los marcajes enzimáticos.

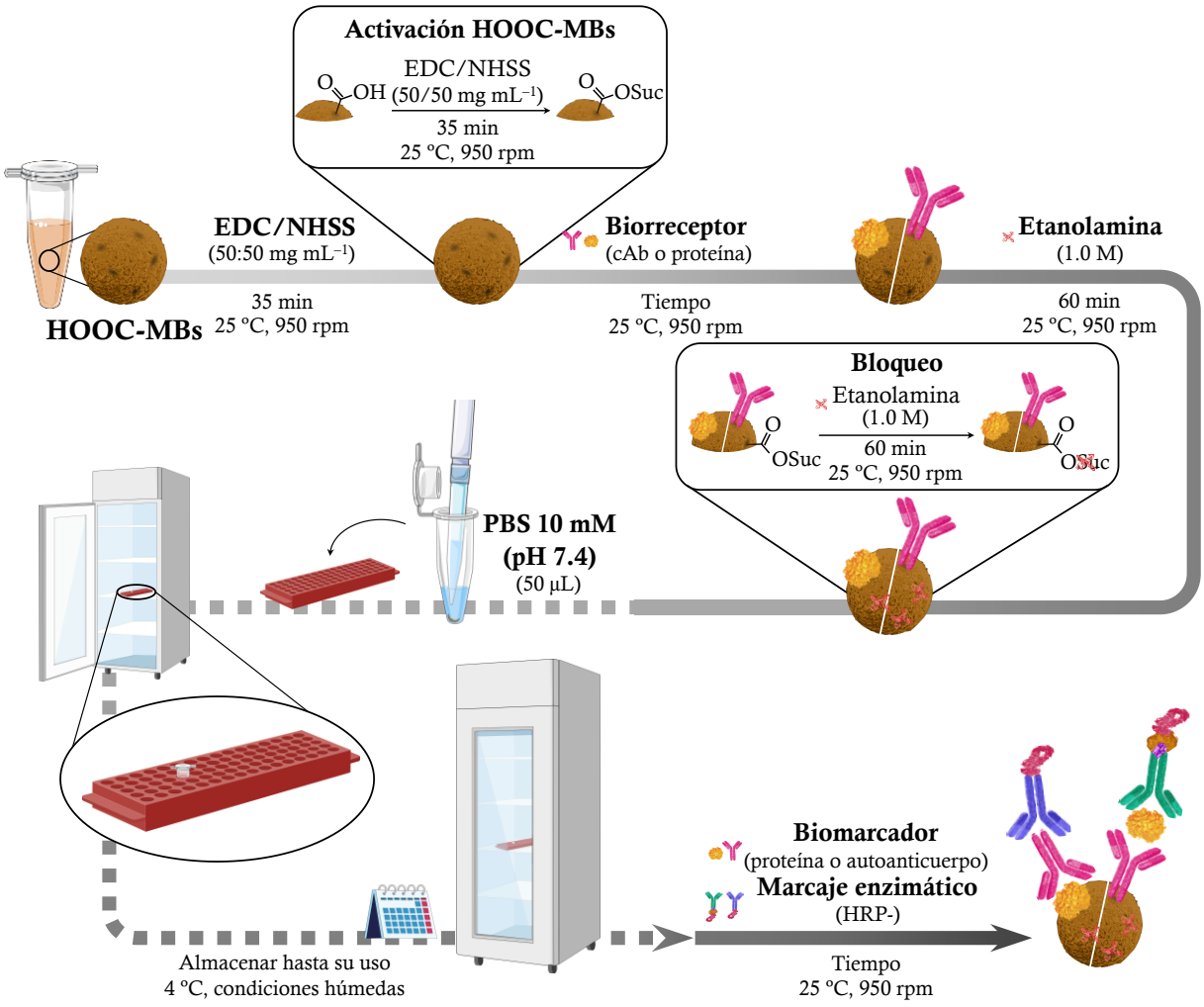


Figura 2.14. *Procedimiento general para la formación de los bioconjugados basados en la modificación de HOOC-MBs.*

A continuación, se detallan los protocolos experimentales específicos para la formación de los bioconjugados asistidos por HOOC-MBs desarrollados en esta Tesis Doctoral, a partir de la etapa de activación de los grupos carboxilo.

Formación de bioconjugados para la determinación de autoanticuerpos: bioconjugados para la determinación de smRNP-Abs

En la ***figura 2.15*** se ha representado el procedimiento seguido para la determinación de smRNP-Abs. Como puede apreciarse, sobre los grupos carboxilo activados de las HOOC-MBs lavadas, se inmovilizó la proteína smRNP mediante incubación durante 15 minutos de 25 µL de una disolución de 10 µg mL^{-1} preparada en MES 25 mM de pH 5.0. Las smRNP-HOOC-MBs se lavaron con la misma disolución reguladora para su posterior bloqueo con la disolución 1.0 M de etanolamina preparada en disolución PB 100 mM de pH 8.0, durante 60 minutos. Las MBs resultantes se almacenaron hasta su uso a 4 ºC en 50 µL de disolución PBS 10 mM de pH 7.4, tras lavarlas una vez con Tris-HCl 100 mM de pH 7.2 y dos con PBS 10 mM de pH 7.4.

La captura eficiente y selectiva de los autoanticuerpos sobre la proteína inmovilizada se llevó a cabo por incubación de 25 µL de una disolución estándar de smRNP-Abs o de las muestras a analizar, preparada en BB, durante 15 minutos. Finalmente, tras la etapa de lavado con $WB_{smRNP\text{-}Abs}$, el marcaje enzimático del biomarcador se consiguió incubando 25 µL de la disolución comercial del kit que contenía HRP-anti-IgG humana (HRP-anti-hIgG).

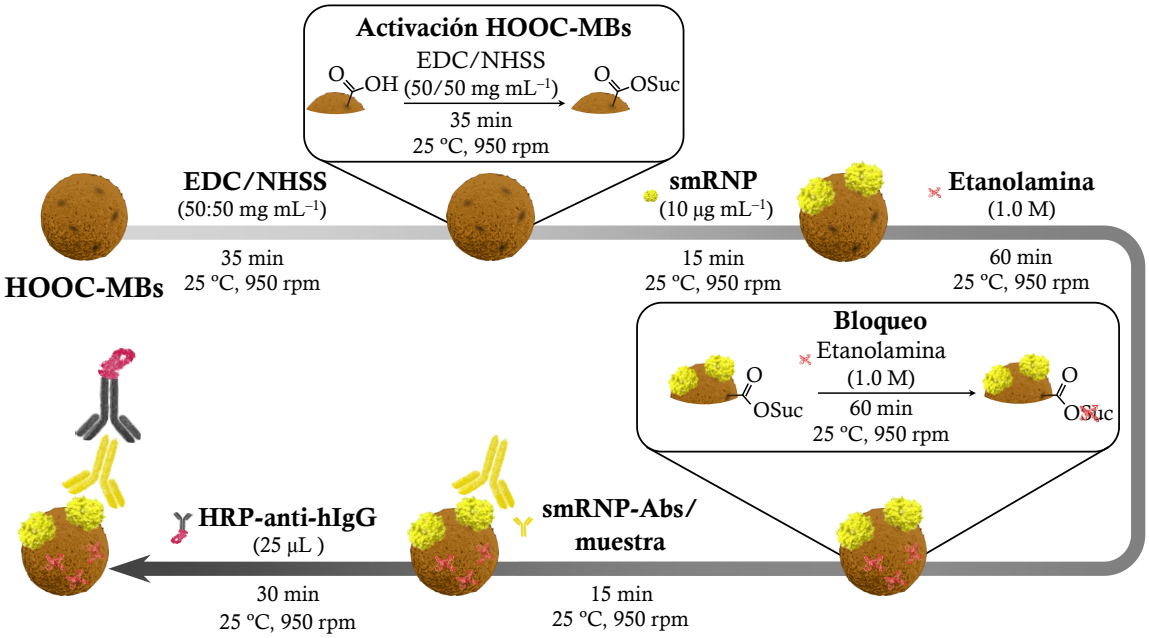


Figura 2.15. *Protocolo experimental para la formación de los bioconjugados magnéticos para la determinación de smRNP-Abs.*

Formación de bioconjugados para la determinación de biomarcadores proteínicos

En esta Tesis Doctoral, las HOOC-MBs activadas se han utilizado también para preparar bioconjugados para la determinación de MMP-9, en un biosensor electroquímico individual, y de APRIL, en este caso formando parte de un biosensor electroquímico dual. A continuación, se detallan ambas estrategias:

- *Bioconjugados para la determinación de MMP-9* (***figura 2.16***): Una vez activados los grupos carboxilo de las HOOC-MBs y lavadas con disolución reguladora MES 25 mM de pH 5.0, se inmovilizó el anticuerpo de captura $cAb_{MMP\text{-}9}$ covalentemente incubando 25 µL de una disolución de $cAb_{MMP\text{-}9}$ 25 µg mL^{-1} preparada en la misma disolución MES durante 15 minutos. Las $cAb_{MMP\text{-}9}$-HOOC-MBs se lavaron dos veces con este mismo regulador y se bloquearon con la disolución 1.0 M de etanolamina preparada en PB 100 mM de pH 8.0 durante 60 minutos. Posteriormente, las MB modificadas y con los posibles grupos activados residuales bloqueados, se lavaron una vez con Tris-HCl 100 mM de pH 7.2 y dos veces con PBS 10 mM de pH 7.4, se resuspendieron en 50 µL de disolución PBS 10 mM de pH 7.4 filtrada y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

  Las MBs modificadas se incubaron durante 30 minutos con una disolución mezcla preparada en regulador comercial PFBB que contenía el estándar de concentración adecuada de la proteína MMP-9 o la muestra a analizar, 1 µg mL^{-1} de b-$dAb_{MMP\text{-}9}$ y Estrep-HRP en dilución 1/2500. El bioconjugado resultante Estrep-HRP-b-$dAb_{MMP\text{-}9}$-MMP-9-$cAb_{MMP\text{-}9}$-HOOC-MBs se lavó dos veces con la disolución comercial PFBB y se resuspendió en 50 µL de disolución reguladora PB 50 mM de pH 6.0 para la medida electroquímica individual.

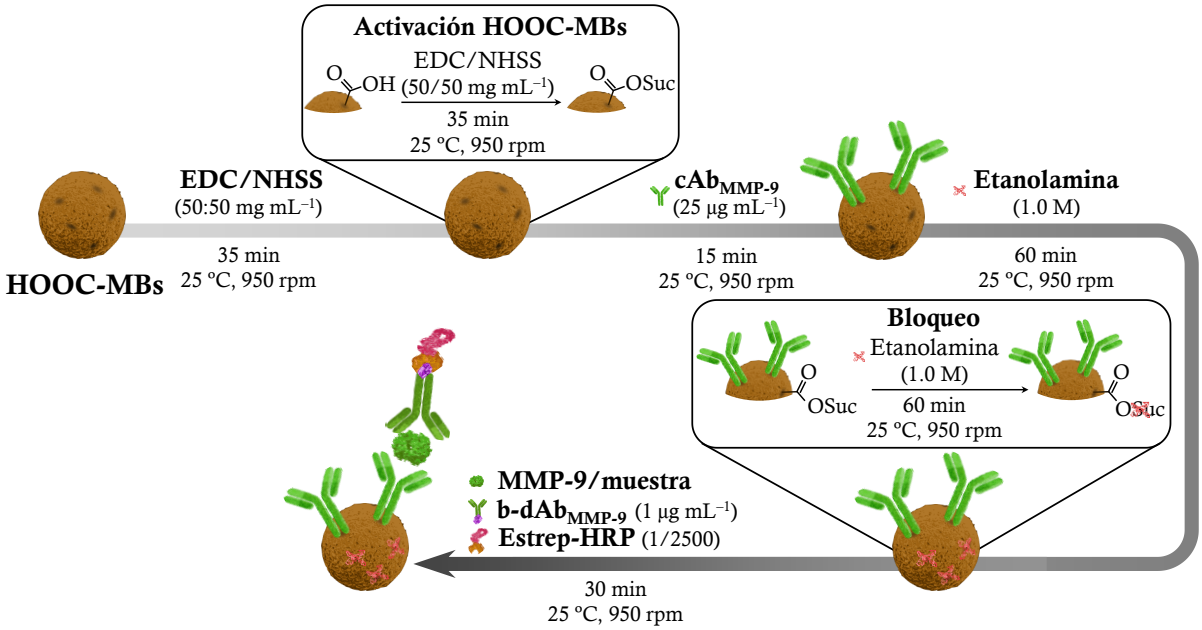


Figura 2.16. *Protocolo experimental para la formación de los bioconjugados magnéticos para la determinación de MMP-9.*

- *Bioconjugados para la determinación de APRIL* (***figura 2.17***): Las HOOC-MBs con los grupos carboxilo activados y lavadas con disolución MES 25 mM de pH 5.0, se incubaron con la disolución de 7.5 µg mL^{-1} del anticuerpo de captura cAb_{APRIL} preparada en la disolución reguladora MES durante 30 minutos para proceder a la inmovilización covalente del biorreceptor. Tras dos lavados con la misma disolución reguladora, las cAb_{APRIL}-HOOC-MBs se bloquearon incubándolas con la disolución 1.0 M de etanolamina preparada en PB 100 mM de pH 8.0 durante 60 minutos, para continuar con un lavado con Tris-HCl 100 mM de pH 7.2 y dos con PBS 10 mM de pH 7.4. Finalmente, se resuspendieron en 50 µL de PBS 10 mM de pH 7.4 filtrada y almacenaron a 4 ºC hasta su uso.

  Para la determinación de APRIL, las MBs modificadas se incubaron durante 30 minutos con una disolución mezcla preparada en disolución comercial BB que contenía el estándar de concentración adecuada de la proteína APRIL o la muestra a analizar, 0.5 µg mL^{-1} de b-dAb_{APRIL} y Estrep-HRP en dilución 1/1000. Los bioconjugados resultantes Estrep-HRP-b-dAb_{APRIL}-APRIL-cAb_{APRIL}-HOOC-MBs se lavaron dos veces con la disolución BB y se resuspendieron en 5 µL de disolución reguladora PB 50 mM de pH 6.0 para llevar a cabo la posterior medida electroquímica de la bioplataforma dual para la determinación de BAFF y APRIL.

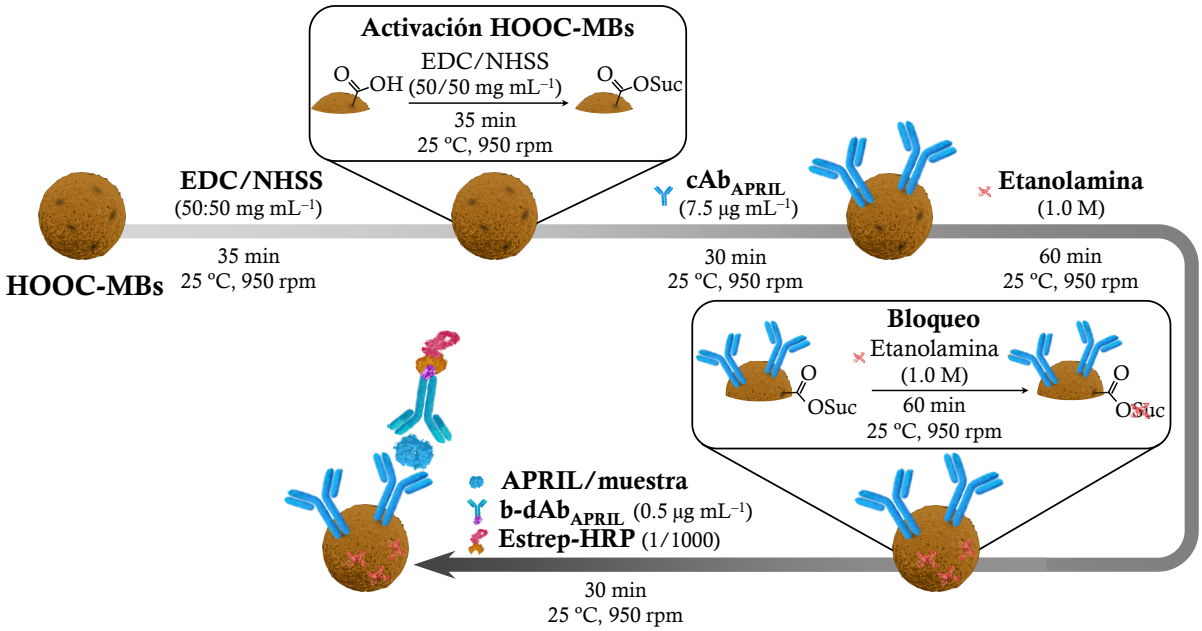


Figura 2.17. *Protocolo experimental para la formación de los bioconjugados magnéticos para la determinación de APRIL.*

Micropartículas magnéticas funcionalizadas con neutravidina (NA-MBs) o estreptavidina (Estrep-MBs).

Las NA-MBs o Estrep-MBs se han utilizado en esta Tesis Doctoral para la inmovilización de bioelementos de reconocimiento biotinilados, aprovechando la fuerte afinidad de la NA y Estrep con la biotina.

Las NA-MBs se han utilizado para la determinación de los anticuerpos dsDNA-Abs y la proteína BAFF, mientras que las Estrep-MBs se han usado en la determinación de los autoanticuerpos AQP4-Abs. Las condiciones de incubación para la formación de los bioconjugados de las bioplataformas basadas en el empleo de estas MBs se llevaron a cabo bajo agitación constante de 950 rpm y, en el caso de NA-MBs a 25 ºC, mientras que para Estrep-MBs la temperatura óptima, según las especificaciones recomendadas por el fabricante, fue de 37 ºC.

El protocolo experimental general para el desarrollo de estos bioconjugados (***figura 2.18***) comienza con la deposición de 3 o 5 µL de una alícuota de las suspensiones comerciales de las NA-MBs o Estrep-MBs en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL para realizar dos etapas de lavado con 50 µL de disolución PBS 10 mM de pH 7.4 o B&W, en función del bioelemento de reconocimiento, imantando durante 2 minutos y retirando el sobrenadante.

Las MBs lavadas se incubaron con 25 µL de la disolución del biorreceptor biotinilado, preparado en la misma disolución empleada para la etapa de lavado. Finalizado el tiempo de incubación y lavado de las MBs modificadas, se llevó a cabo la captura eficiente y selectiva del biomarcador diana y su marcaje enzimático posterior con los biorreactivos correspondientes.

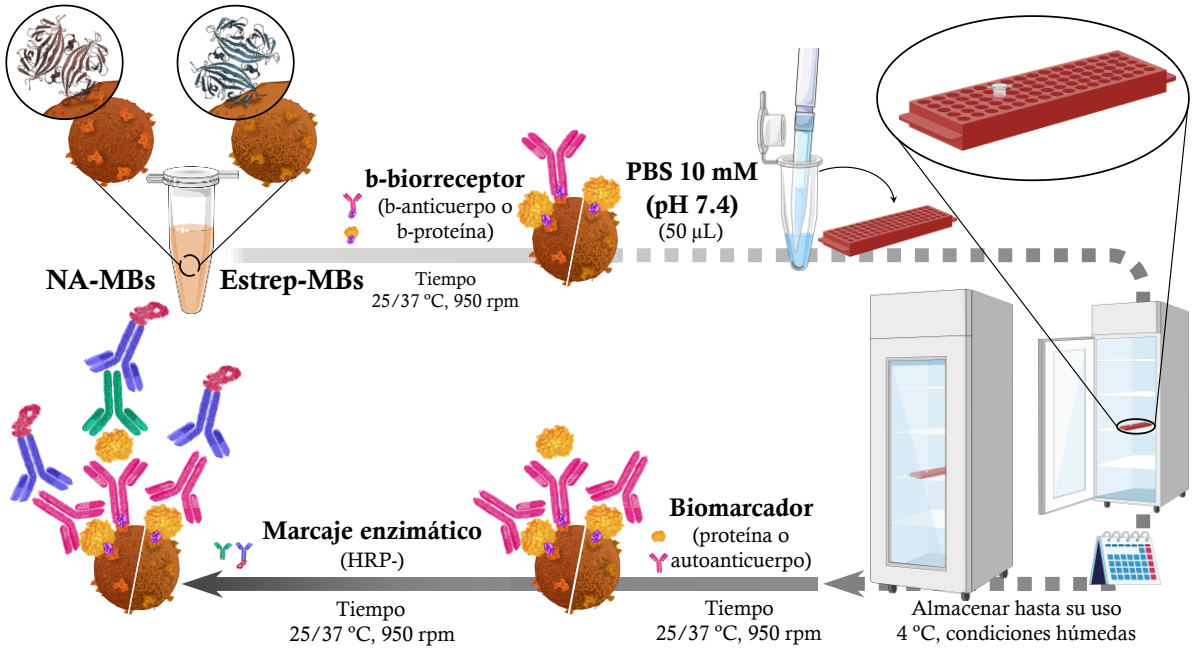


Figura 2.18. *Procedimiento general para la formación de los bioconjugados basados en la modificación de NA-MBs o Estrep-MBs.*

A continuación, se detallan los protocolos experimentales puestos a punto en esta Tesis Doctoral para la formación de los bioconjugados por inmovilización del bioelemento de reconocimiento mediante afinidad entre la biotina y Estrep o NA.

Formación de bioconjugados para la determinación de autoanticuerpos.

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado dos plataformas biosensoras electroquímicas, una individual y otra cuádruple, asistidas por el empleo de Estrep-MBs y NA-MBs para la formación de bioconjugados con el fin de capturar de forma eficiente y selectiva autoanticuerpos frente a AQP4, así como el contenido individual y total de los tres isotipos más comunes de inmunoglobulinas frente a dsDNA, respectivamente.

- *Bioconjugados para la determinación de AQP4-Abs* (***figura 2.19***): Siguiendo las especificaciones recomendadas por el fabricante de trabajar a 37 ºC, el ensayo comenzó tomando una alícuota de 5 µL de la suspensión comercial de Estrep-MBs, que se lavó dos veces con la disolución B&W para la inmovilización por afinidad de la proteína biotinilada b-AQP4. Con este fin, 25 µL de una disolución de b-AQP4 diluida 100 veces en el mismo tampón B&W se incubó durante 30 minutos. A continuación, las MBs modificadas se lavaron con disolución PBS 10 mM de pH 7.4 y se resuspendieron en 50 µL de la disolución PBS 10 mM de pH 7.4 filtrada para almacenarlas a 4 ºC hasta su uso.

  El reconocimiento del antígeno por los AQP4-Abs se consiguió mediante la incubación de las b-AQP4-Estrep-MBs con 25 µL de una disolución del estándar o muestra a analizar preparada en $SD_{AQP4\text{-}Abs}$ durante 60 minutos. Después de lavar las MBs modificadas, los AQP4-Abs capturados se marcaron enzimáticamente incubando 30 minutos con 25 µL de una disolución de HRP-anti-hIgG diluido 1/2500 en $HD_{AQP4\text{-}Abs}$.

  Finalmente, los bioconjugados HRP-anti-hIgG-AQP4-Abs-b-AQP4-Estrep-MBs se lavaron con PBS 10 mM de pH 7.4 y se resuspendieron en 50 µL de la disolución reguladora PB 50 mM de pH 6.0 para su posterior detección individual.

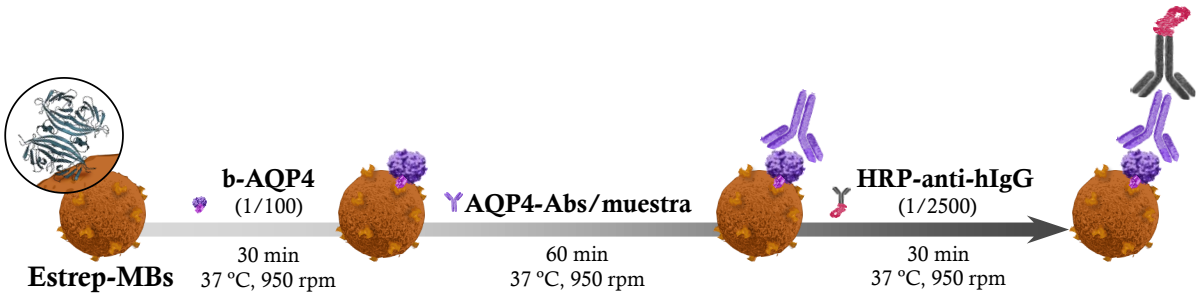


Figura 2.19. *Protocolo experimental para la formación de los bioconjugados magnéticos para la determinación de AQP4-Abs.*

- *Bioconjugados para la determinación de dsDNA-Abs* (***figura 2.20***): 5 µL de NA-MBs se lavaron dos veces con disolución B&W para, seguidamente, incubar con 25 µL de una disolución de 100 ng de DNA de cadena doble biotinilado (b-dsDNA), preparada en el mismo regulador B&W, durante 30 minutos. Tras una etapa de lavado con $WB_{dsDNA\text{-}Abs}$, las b-dsDNA-NA-MBs se resuspendieron en 50 µL de la disolución PBS 10 mM de pH 7.4 filtrada para almacenarlas a 4 ºC hasta su uso.

  A continuación, la disolución que contiene el estándar de isotipos de inmunoglobulinas frente a dsDNA o la muestra a analizar, preparada en $SD_{dsDNA\text{-}Abs}$, se incubó durante 30 minutos con las b-dsDNA-NA-MBs. Tras la etapa de lavado de las MBs modificadas, se llevó a cabo el marcaje enzimático del total de dsDNA-Abs (bioplataforma electroquímica individual, ***figura 2.20***) o marcaje individual de cada isotipo y del total de dsDNA-Abs (bioplataforma electroquímica cuádruple, ***figura 2.21***) mediante la incubación de 25 µL de cada disolución de 1 µg mL^{-1} de HRP-anti-hIgG (***figura 2.21.a***), dilución 1/1000 de HRP-anti-IgA humana (HRP-anti-hIgA) (***figura 2.21.b***) o dilución 1/1000 de HRP-anti-IgM humana (HRP-anti-hIgM) (***figura 2.21.c***) o 75 µL de una disolución comercial mezcla que contiene HRP-anti-IgG/IgA/IgM humanas (HRP-anti-h(IgG/IgA/IgM)) (***figura 2.21.d***), durante 15 (HRP-anti-hIgG), 45 (HRP-anti-hIgA y HRP-anti-hIgM) o 30 (HRP-anti-h(IgG/IgA/IgM)) minutos.

  Por último, los bioconjugados se lavaron con PBS 10 mM de pH 7.4 y se resuspendieron en 5 µL de disolución reguladora de PB 50 mM de pH 6.0 para su posterior detección cuádruple.

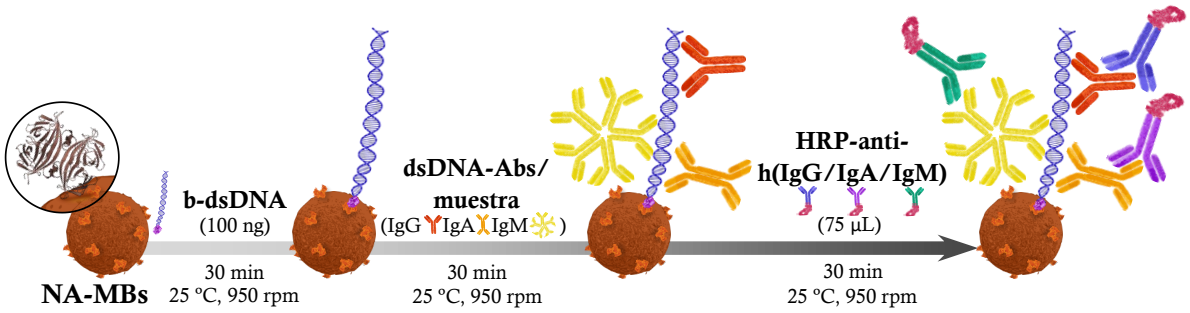


Figura 2.20. *Protocolo experimental para la formación de los bioconjugados magnéticos para la determinación individual del total de los isotipos dsDNA-Abs.*

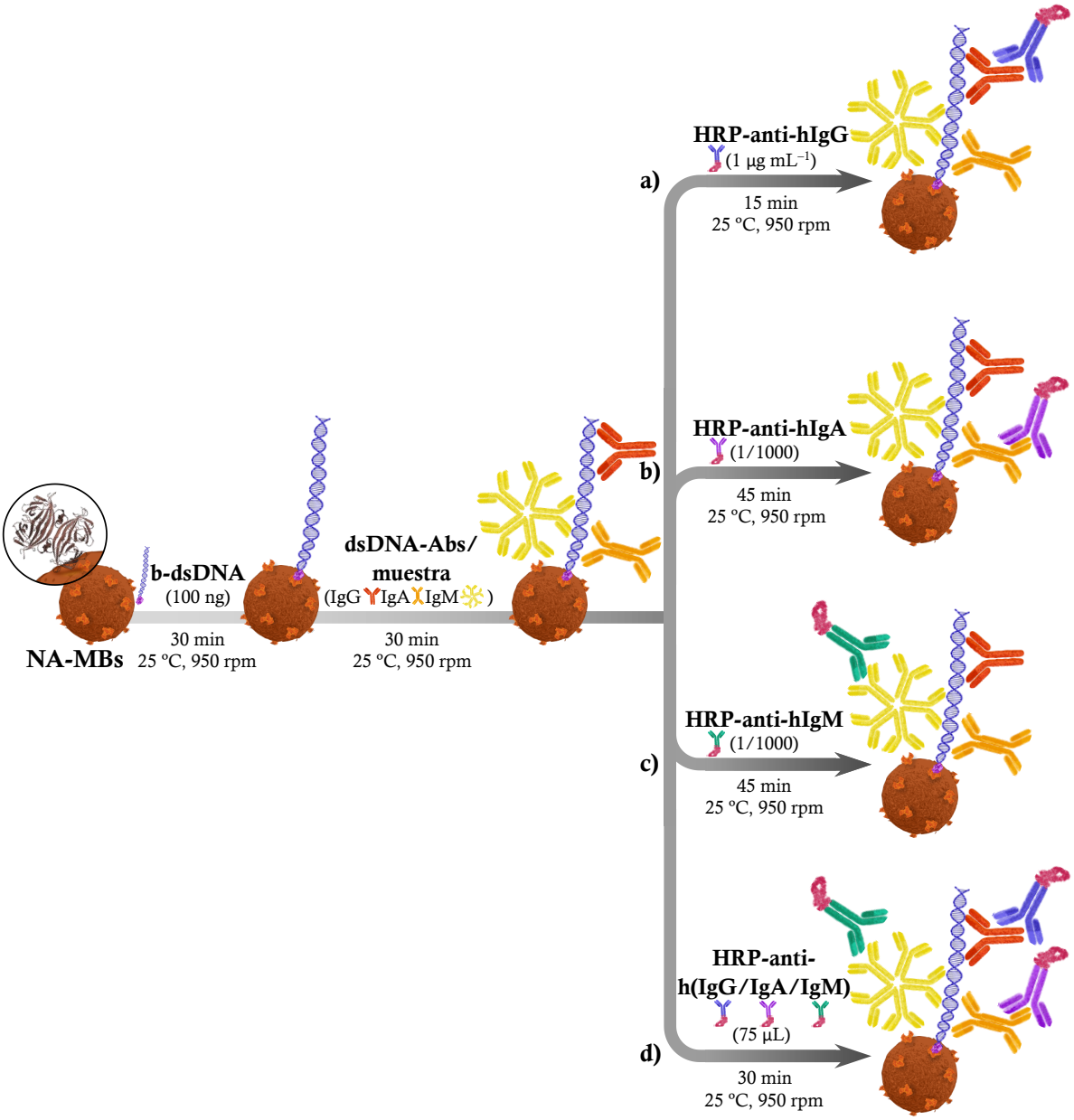


Figura 2.21. *Protocolo experimental para la formación de los bioconjugados magnéticos para la determinación cuádruple de* ***a)*** *hIgG,* ***b)*** *hIgA,* ***c)*** *hIgM o* ***d)*** *total de los isotipos dsDNA-Abs.*

Formación de bioconjugados para la determinación de biomarcadores proteínicos: bioconjugados para la determinación de BAFF.

Se tomó una alícuota de 3 µL de NA-MBs para su modificación según se esquematiza en la ***figura 2.22*** incubándolas a 25 ºC bajo agitación constante. Después de lavar dos veces con la disolución PBS 10 mM de pH 7.4, se inmovilizó el anticuerpo de captura biotinilado b-cAb$_{BAFF}$ mediante la incubación de 25 µL de una disolución de b-cAb$_{BAFF}$ de 100 ng mL^{-1} preparada en PBS 10 mM de pH 7.4. Las b-cAb$_{BAFF}$-NA-MBs se lavaron dos veces con la disolución comercial BB, se resuspendieron en 50 µL de PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado y se almacenaron a 4 ºC hasta su uso.

Para la captura eficiente y selectiva del biomarcador diana, se incubaron 25 µL de una disolución estándar de BAFF o de la muestra a analizar preparada en BB durante 45 minutos con las MBs modificadas. Tras dos lavados con BB, las BAFF-b-cAb$_{BAFF}$-NA-MBs se incubaron durante 30 minutos con 25 µL de una disolución preparada en BB de 1 µg mL^{-1} dAb$_{BAFF}$ para la detección, y posterior marcaje enzimático de la proteína durante 15 minutos con 25 µL de una disolución 1 µg mL^{-1} HRP-anti-IgG de ratón (HRP-anti-rIgG) también preparada en la disolución comercial. El bioconjugado resultante, HRP-anti-rIgG-dAb$_{BAFF}$-BAFF-b-cAb$_{BAFF}$-NA-MBs se lavó dos veces con BB y se resuspendió en 5 µL de disolución reguladora de medida PB 50 mM de pH 6.0 para realizar la transducción amperométrica dual, junto con los bioconjugados para la determinación de APRIL.

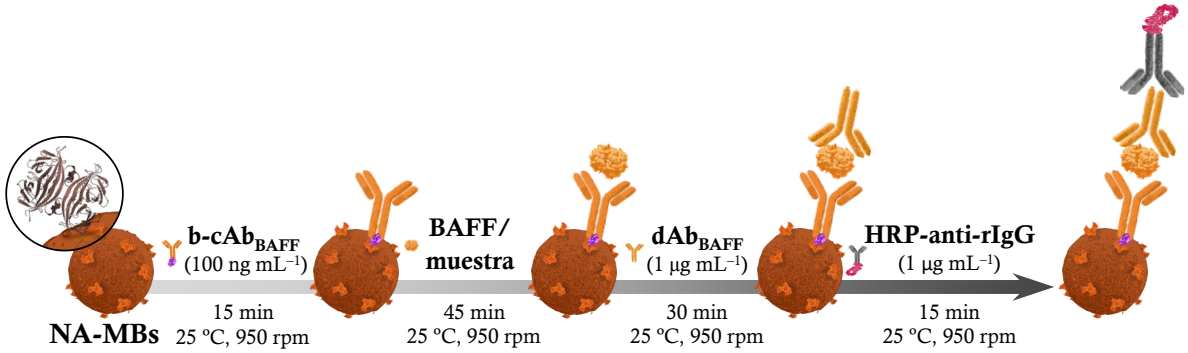


Figura 2.22. *Protocolo experimental para la formación de los bioconjugados magnéticos para la determinación de BAFF.*

Micropartículas magnéticas funcionalizadas con Co^{+2}-NTA (His-tag isolation-MBs).

Las His-tag *isolation*-MBs se han utilizado en esta Tesis Doctoral para la inmovilización de las proteínas producidas con tag de His, aprovechando las ventajas de la denominada "química His-tag". Haciendo uso de esta metodología se han desarrollado plataformas biosensoras para la determinación de los autoanticuerpos CENPB-Abs, CENPA-Abs y ENAs-Abs, incubando las His-tag *isolation*-MBs para su modificación a 25 ºC y bajo agitación constante de 950 rpm.

El procedimiento experimental general para la preparación de estos bioconjugados, esquematizado en la ***figura 2.23*** comenzó con la deposición de 2 µL de una alícuota de la suspensión comercial de las His-tag *isolation*-MBs en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL para llevar a cabo dos etapas de lavado sucesivas con 50 µL de disolución PBS 10 mM de pH 7.4, imantando durante 2 minutos y posterior retirada del sobrenadante.

Tras estas etapas, las MBs lavadas se incubaron durante 15 minutos con 25 µL de la disolución de la proteína antígeno producida con tag de His, preparada en PBS 10 mM de pH 7.4.

A continuación, las His-tag *isolation*-MBs modificadas con la proteína antígeno correspondiente se lavaron con disolución PBS 10 mM de pH 7.4 o con la disolución de lavado del kit comercial (WB), dependiendo de la bioplataforma, y se incubaron con 25 µL de la disolución estándar del autoanticuerpo diana de concentración requerida o de las muestras preparadas en BB durante 15 minutos.

Por último, se llevó a cabo el marcaje enzimático de los autoanticuerpos capturados con las biomoléculas correspondientes.

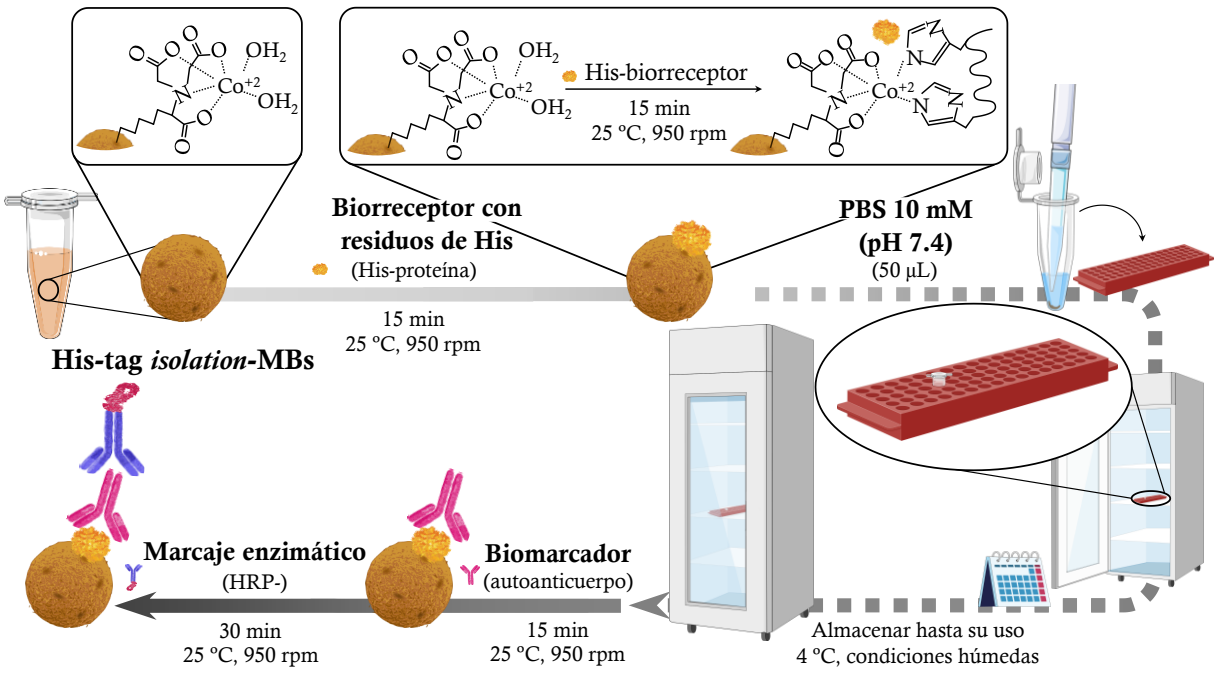


Figura 2.23. *Procedimiento general para la formación de los bioconjugados basados en la modificación de His-tag isolation-MBs.*

Formación de bioconjugados para la determinación de autoanticuerpos.

Siguiendo el procedimiento previamente descrito para este tipo de MBs, se formaron los bioconjugados magnéticos para la determinación de CENPB-Abs (***figura 2.24***), CENPA-Abs (***figura 2.25***) o cuádruple de La/SSB-Abs (***figura 2.26.a***), Ro/SSA-Abs (***figura 2.26.b***) y U1RNP70 (***figura 2.26.c***), junto con smRNP-Abs, protocolo anteriormente detallado.

- *Bioconjugados para la determinación CENPB-Abs* (***figura 2.24***): Se tomó una alícuota de 2 µL de His-tag *isolation*-MBs y se lavó dos veces con PBS 10 mM de pH 7.4. Se incubaron 25 µL de una disolución de 1 µg mL^{-1} CENPB, en la determinación individual (***figura 2.24.a***) o de 10 ng mL^{-1} CENPB, en la determinación dual (***figura 2.24.b***), preparadas en PBS 10 mM de pH 7.4 durante 15 minutos con las His-tag *isolation*-MBs, para la inmovilización de la proteína antígeno a través de su tag de His. Después de lavar dos veces las CENPB-His-tag *isolation*-MBs con el $WB_{CENPB\text{-}Abs}$ comercial, en el biosensor individual, o disolución PBS 10 mM de pH 7.4 en el dual, se almacenaron a 4 ºC en esta última disolución filtrada hasta el momento de realizar la determinación.

  A continuación, 25 µL de disolución estándar de CENPB-Abs o la muestra a analizar, preparadas en BB, se incubaron con las MBs modificadas durante 15 minutos para el reconocimiento eficiente y selectivo de la proteína antígeno por sus autoanticuerpos. Tras dos lavados con BB, éstos son marcados enzimáticamente incubando las CENPB-Abs-CENPB-His-tag *isolation*-MBs con 25 µL de la disolución comercial del kit que contiene HRP-anti-hIgG durante 30 minutos. Los bioconjugados resultantes se lavaron dos veces con BB y resuspendieron en 50 o 5 µL de disolución reguladora de PB 50 mM de pH 6.0 para la determinación individual o dual, respectivamente.

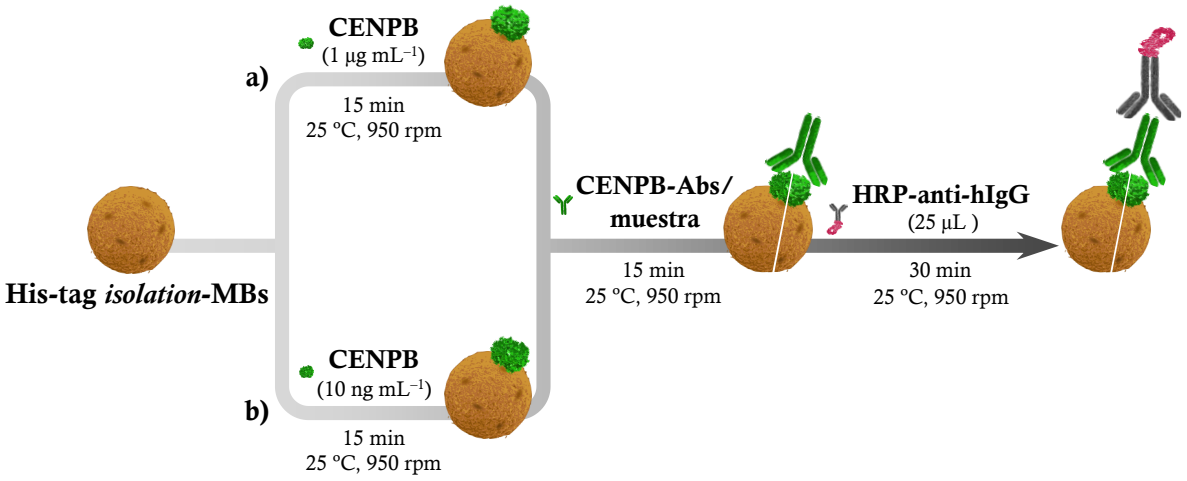


Figura 2.24. *Protocolo experimental para la formación de los bioconjugados magnéticos para la determinación* ***a)*** *individual o* ***b)*** *dual de CENPB-Abs.*

- *Bioconjugados para la determinación CENPA-Abs* (***figura 2.25***): La alícuota de 2 µL de His-tag *isolation*-MBs se lavó dos veces con PBS 10 mM de pH 7.4 para su incubación con 25 µL de una disolución de 10 ng mL^{-1} de CENPA preparada en PBS 10 mM de pH 7.4 durante 15 minutos. Las CENPA-His-tag *isolation*-MBs se lavaron dos veces con la disolución PBS 10 mM de pH 7.4 para el almacenamiento a 4 ºC en esta disolución reguladora filtrada hasta su uso.

  Seguidamente, las MBs modificadas se incubaron con 25 µL de disolución estándar de CENPA-Abs o la muestra a analizar, preparadas en disolución comercial BB, durante 15 minutos. Después de dos lavados de las CENPA-Abs-CENPA-His-tag *isolation*-MBs, los CENPA-Abs se marcaron enzimáticamente incubando las MBs modificadas con 25 µL de una disolución HRP-anti-IgG de conejo (HRP-anti-cIgG) en dilución 1/1000 cuando se empleaba el estándar de CENPA-Abs producidos en conejo o con 1 µg mL^{-1} HRP-anti-IgG humana para las determinaciones en muestras de suero humano. Los bioconjugados resultantes se lavaron dos veces con la disolución comercial y se resuspendieron en 5 µL de disolución reguladora de PB 50 mM de pH 6.0 para la determinación dual.

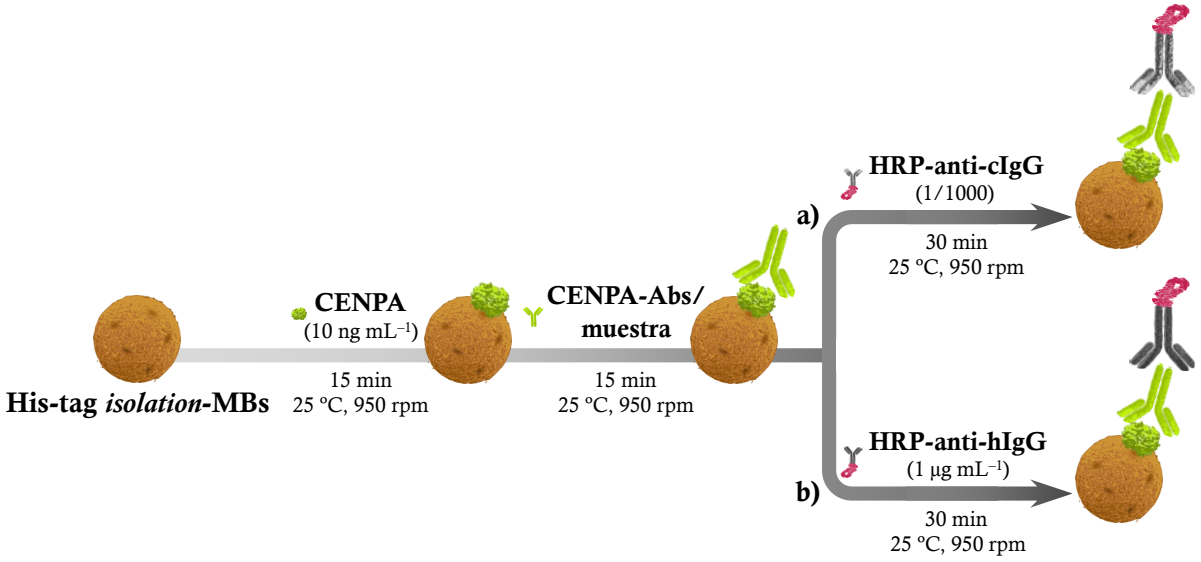


Figura 2.25. *Protocolo experimental para la formación de los bioconjugados magnéticos para la determinación de CENPA-Abs en* ***a)*** *disoluciones estándar* ***b)*** *muestras de suero humano.*

- *Bioconjugados para la determinación ENAs-Abs* (***figura 2.26***): 2 µL de His-tag *isolation*-MBs se lavaron dos veces con PBS 10 mM de pH 7.4 para la inmovilización de las proteínas antígeno producidas con tag de His, incubando individualmente con 25 µL disoluciones de 10 µg mL^{-1}, 2.5 µg mL^{-1} o 5 µg mL^{-1} de La/SSB, Ro/SSA o U1RNP70 respectivamente, preparadas en PBS 10 mM de pH 7.4, durante 15 minutos. Tras dos lavados con esta disolución reguladora, las MBs modificadas se almacenaron a 4 ºC hasta su posterior uso en la misma disolución reguladora filtrada.

  A continuación, 25 µL de disoluciones estándar de los correspondientes autoanticuerpos o la muestra a analizar, preparadas en disolución comercial BB, se incubaron con sus respectivas MBs modificadas durante 15 minutos. Finalmente, los ENAs-Abs se marcaron enzimáticamente incubando las antígeno-Abs-antígeno-His-tag *isolation*-MBs con 25 µL de la disolución comercial del kit pertinente que contiene HRP-anti-hIgG durante 30 minutos. Los bioconjugados resultantes, HRP-anti-hIgG-La/SSB-Abs-La/SSB-His-tag *isolation*-MBs (***figura 2.26.a***), HRP-anti-hIgG-Ro/SSA-Abs-Ro/SSA-His-tag *isolation*-MBs (***figura 2.26.b***) y HRP-anti-hIgG-U1RNP70-Abs-U1RNP70-His-tag *isolation*-MBs (***figura 2.26.c***), se lavaron dos veces con la disolución comercial y se resuspendieron en 5 µL de disolución reguladora de medida PB 50 mM de pH 6.0 para la determinación multiplexada.

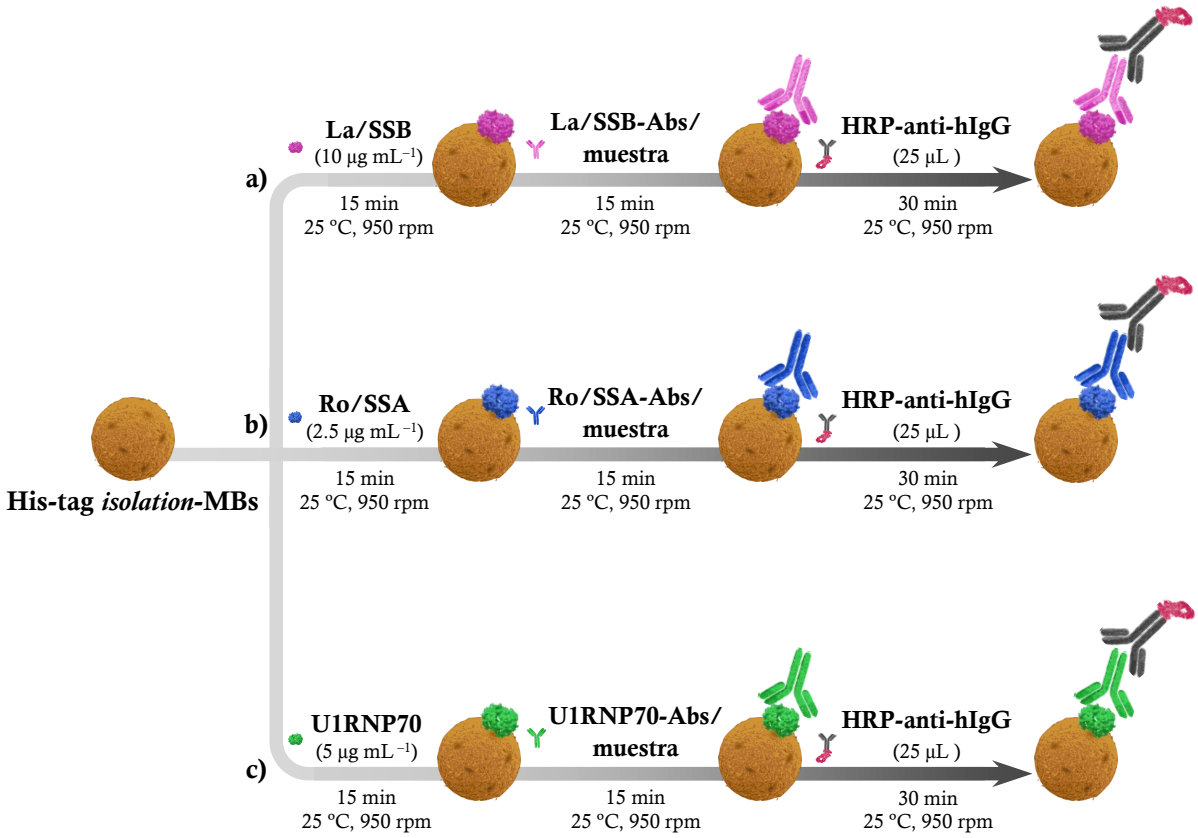


Figura 2.26. *Protocolo experimental para la formación de los bioconjugados magnéticos para la determinación de* ***a)*** *La/SSB-Abs,* ***b)*** *Ro/SSA-Abs y* ***c)*** *U1RNP70-Abs.*

2.5.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS CLÍNICAS

El objetivo final del desarrollo de las bioplataformas electroquímicas preparadas en esta Tesis Doctoral fue su aplicación a la determinación del contenido endógeno de cada biomarcador estudiado en muestras de relevancia clínica. Con este fin, y siguiendo los protocolos previamente descritos para cada diana, se analizó el contenido de cada proteína o autoanticuerpo en las muestras reales de suero y/o en los lisados celulares detallados en la sección 2.4.

Previo a la determinación del contenido del biomarcador diana en la muestra específica a la dilución/cantidad anteriormente optimizada, se evaluó la posible existencia de efecto matriz mediante la comparación estadística de las pendientes resultantes de las rectas de calibrado externo obtenido con disoluciones estándar del biomarcador y del calibrado de adiciones estándar preparado añadiendo concentraciones crecientes conocidas del estándar correspondiente sobre la muestra.

Una vez concluida la existencia o no de efecto matriz, los niveles del biomarcador diana se obtenían por interpolación, en ausencia de efecto matriz, o extrapolación, en su presencia, de las señales registradas para cada muestra diluida, en los calibrados correspondientes.

2.6. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICAS

En este apartado se discuten brevemente las técnicas electroquímicas y protocolos empleados en esta Tesis Doctoral para la optimización, caracterización, detección y comparación de los resultados que proporcionan los biosensores desarrollados.

2.6.1. AMPEROMETRÍA

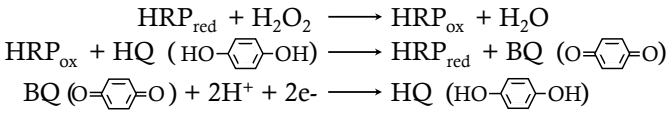
Como es bien conocido, la técnica electroquímica de (crono)amperometría ha sido ampliamente utilizada para la obtención de respuestas empleando bioplataformas electroquímicas. En ella se registra la corriente resultante de la oxidación o reducción de una sustancia electroactiva relacionada con una reacción bioquímica en la que está implicado el analito. Esta corriente se mide aplicando una diferencia de potencial constante entre el electrodo de trabajo y el de (pseudo)referencia durante un determinado periodo de tiempo [Grieshaber et al., 2008].

En esta Tesis Doctoral, el desarrollo de bioplataformas electroquímicas para la determinación de biomarcadores proteínicos y autoanticuerpos se llevó a cabo empleando como transductores electroquímicos electrodos serigrafiados de carbono comerciales para la detección individual (SPCE) o multiplexada (SP_2CE, SP_4CE o SP_8CE) directamente modificados, dando lugar a bioplataformas integradas o asistidas por el empleo de MBs. La transducción electroquímica para la detección del biomarcador diana mediante amperometría se realizó midiendo la corriente generada por el sustrato enzimático, H_2O_2, en el proceso de oxidación-reducción catalizado por la enzima HRP en presencia de HQ como mediador redox.

El sistema enzima/sustrato utilizado, HRP/H_2O_2, ha demostrado a lo largo de varias décadas su gran utilidad para la preparación de biosensores electroquímicos debido a la sencillez, rapidez y bajo coste de la detección de H_2O_2 sobre diferentes superficies electródicas [Kang et al., 2012]. Sin embargo, es conocido que, en general, las reacciones de reducción catalizadas por macromoléculas biológicas como la HRP suelen presentar transferencia electrónica lenta [Bard & Faulkner, 2001]. Es por ello por lo que en la práctica suelen utilizarse pequeñas moléculas electroactivas que actúan como mediadores de transferencia electrónica, capaces de reaccionar electroquímicamente de forma rápida y reversible, mediando la reacción enzimática y aumentando la velocidad del proceso [Feyzizarnagh et al., 2016]. Entre la variedad de mediadores electroquímicos posibles para este sistema, la hidroquinona (HQ) es generalmente la más utilizada ya que se ha demostrado que facilita la transferencia electrónica en la reacción redox entre el centro activo de la enzima HRP y el electrodo, generándose la forma oxidada del mediador a través de la cadena de reacciones esquematizada en la ***figura 2.27***. Como puede verse, la enzima HRP en su forma reducida (HRP_{red}) cataliza la reducción del sustrato enzimático H_2O_2, convirtiéndose al instante en su forma oxidada (HRP_{ox}). Seguidamente, la forma reducida se regenera al oxidar la hidroquinona (HQ) a benzoquinona (BQ), reduciéndose electroquímicamente esta última sobre la

superficie electródica, lo que proporciona la variación de corriente que se registra amperométricamente, y que se calcula como la diferencia entre la respuesta en el estado estacionario (2) y la de fondo (1). Esta diferencia es proporcional a la cantidad de HRP enlazada en los bioconjugados y, por consiguiente, teniendo en cuenta las configuraciones empleadas en los protocolos de esta Tesis Doctoral, directamente proporcional a la concentración de biomarcador capturado.

a)



b)

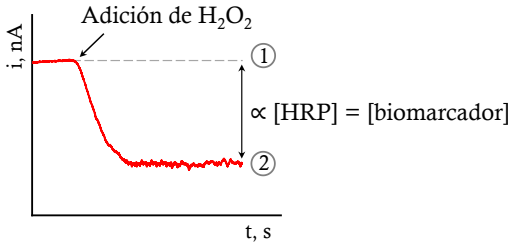


Figura 2.27. a) *Reacciones implicadas en el sistema redox HRP/H_2O_2/HQ empleado.* ***b)*** *Registro amperométrico real típico obtenido durante la detección electroquímica.*

Debido a las excelentes propiedades redox de los mediadores de transferencia electrónica, su empleo mejora las características analíticas de la detección en términos de sensibilidad, reproducibilidad y selectividad, en este caso por disminuir el potencial de medida aplicable a potenciales menos extremos [Lyon & Stevenson, 2006], de esta forma, en presencia de HQ la respuesta electroquímica que se obtiene corresponde a una corriente catódica menos susceptible de interferencias. Para realizar la transducción amperométrica de las bioplataformas electroquímicas desarrolladas en esta Tesis Doctoral se emplearon las condiciones óptimas de potencial, concentración de H_2O_2 e HQ y pH y composición de la disolución reguladora de medida previamente optimizados en trabajos previos del Grupo de Investigación [Eguílaz et al., 2010; Conzuelo et al., 2012]. Además, todas las medidas amperométricas se llevaron a cabo a temperatura ambiente, realizándose en disoluciones agitadas cuando se empleaban SPCEs, SP_2CEs o SP_4CEs o en gota sobre los SP_8CEs.

Captura magnética de las MBs para las medidas electroquímicas

En las bioplataformas electroquímicas asistidas por micropartículas magnéticas, los electrodos serigrafiados se colocaron en carcasas de fabricación casera de PMMA (SPCE, SP_2CE o SP_4CE) o comercial de teflón (SP_8CE) con imanes de Nd embutidos en su interior, tal y como se ha descrito en la sección 2.1.2.

Las medidas electroquímicas individuales, duales y cuádruples de los bioconjugados magnéticos se llevaron a cabo en disolución bajo agitación constante. Para ello, las MBs modificadas resuspendidas en 50 o 5 µL de la disolución reguladora de medida PB 50 mM de pH 6.0 para la detección individual o multiplexada, respectivamente, se depositaron sobre la superficie del electrodo de trabajo (WE) de los electrodos serigrafiados de carbono colocados sobre las carcasas caseras con sus respectivos imanes de Nd (***figura 2.28.a***).

La detección óctuple de bioconjugados magnéticos se realizó en gota. Por ello, las MBs resultantes se resuspendieron directamente en 22.5 µL de una disolución 1 mM hidroquinona (HQ) preparada en la disolución reguladora de medida PB 50 mM de pH 6.0, y se depositaron sobre cada WE del SP_8CE, previamente colocado sobre la carcasa comercial con ocho imanes de Nd, cubriendo completamente el sistema de tres electrodos (***figura 2.28.b***).

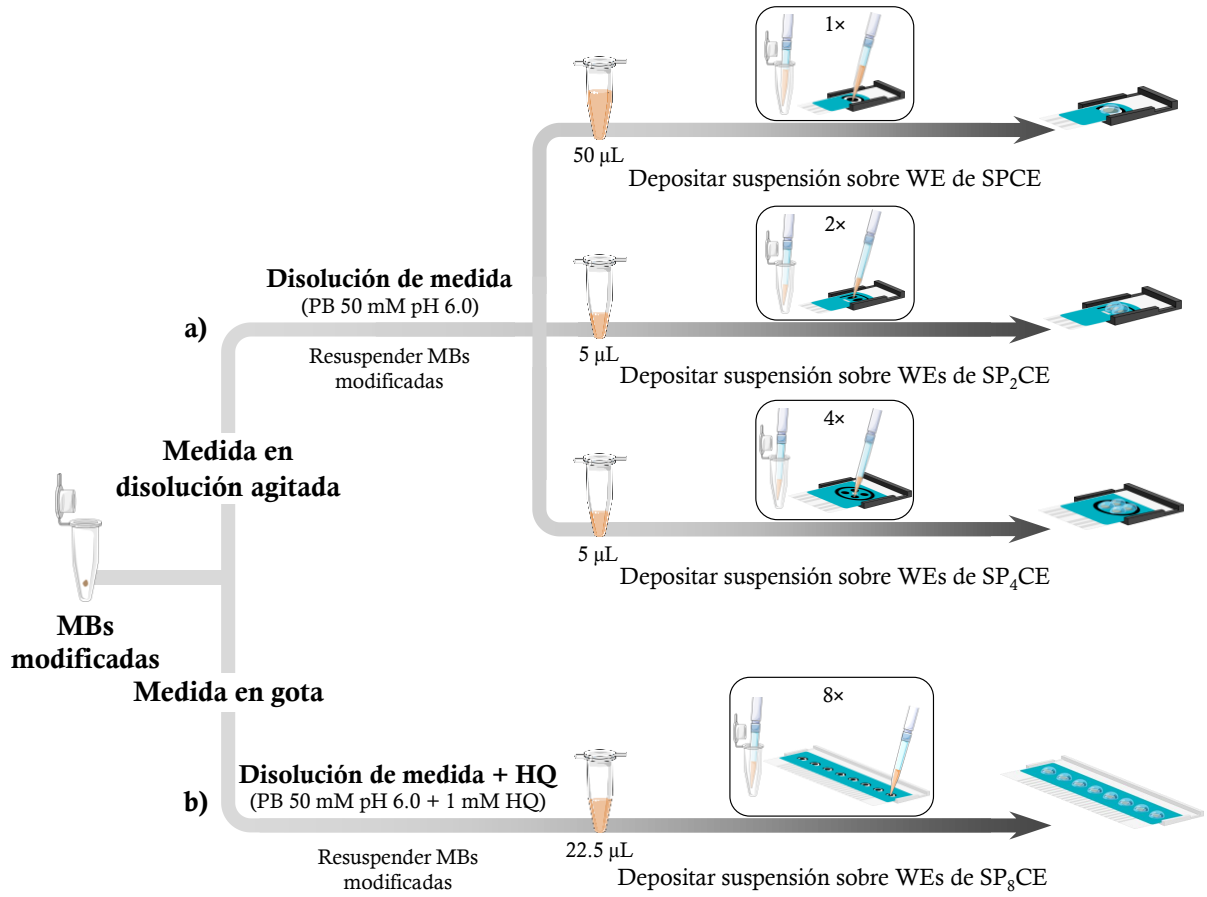


Figura 2.28. *Captura magnética de los bioconjugados magnéticos sobre WEs de electrodos serigrafiados de carbono para medidas en* ***a)*** *disolución agitada o* ***b)*** *gota.*

Medidas en disolución bajo agitación constante

Las medidas en disolución bajo agitación constante se hicieron tanto en las bioplataformas en formato integrado como en las asistidas por micropartículas magnéticas cuando se emplearon como transductores electroquímicos electrodos serigrafiados de carbono comerciales para la determinación individual (SPCE) o multiplexada (SP_2CE y SP_4CE). Tanto los electrodos directamente modificados como el conjunto de bioconjugados magnéticos capturados sobre los WEs/electrodo/carcasa con imanes de Nd se conectaron al potenciostato a través de su cable conector específico y se sumergieron en una célula de medida que contenía 10 o 20 mL de la disolución reguladora de PB 50 mM de pH 6.0 suplementada con 100 o 200 µL de HQ 100 mM para la determinación individual (***figura 2.29.a***), dual (***figura 2.29.b***) o cuádruple (***figura 2.30***), respectivamente, aplicando agitación constante de 400 rpm. El potencial de detección utilizado fue de –0.20 V frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag. En esas condiciones se comienza a registrar la corriente y, una vez estabilizada, se adicionan 50 o 100 µL de una disolución H_2O_2 100 mM para obtener la variación de la respuesta catódica.

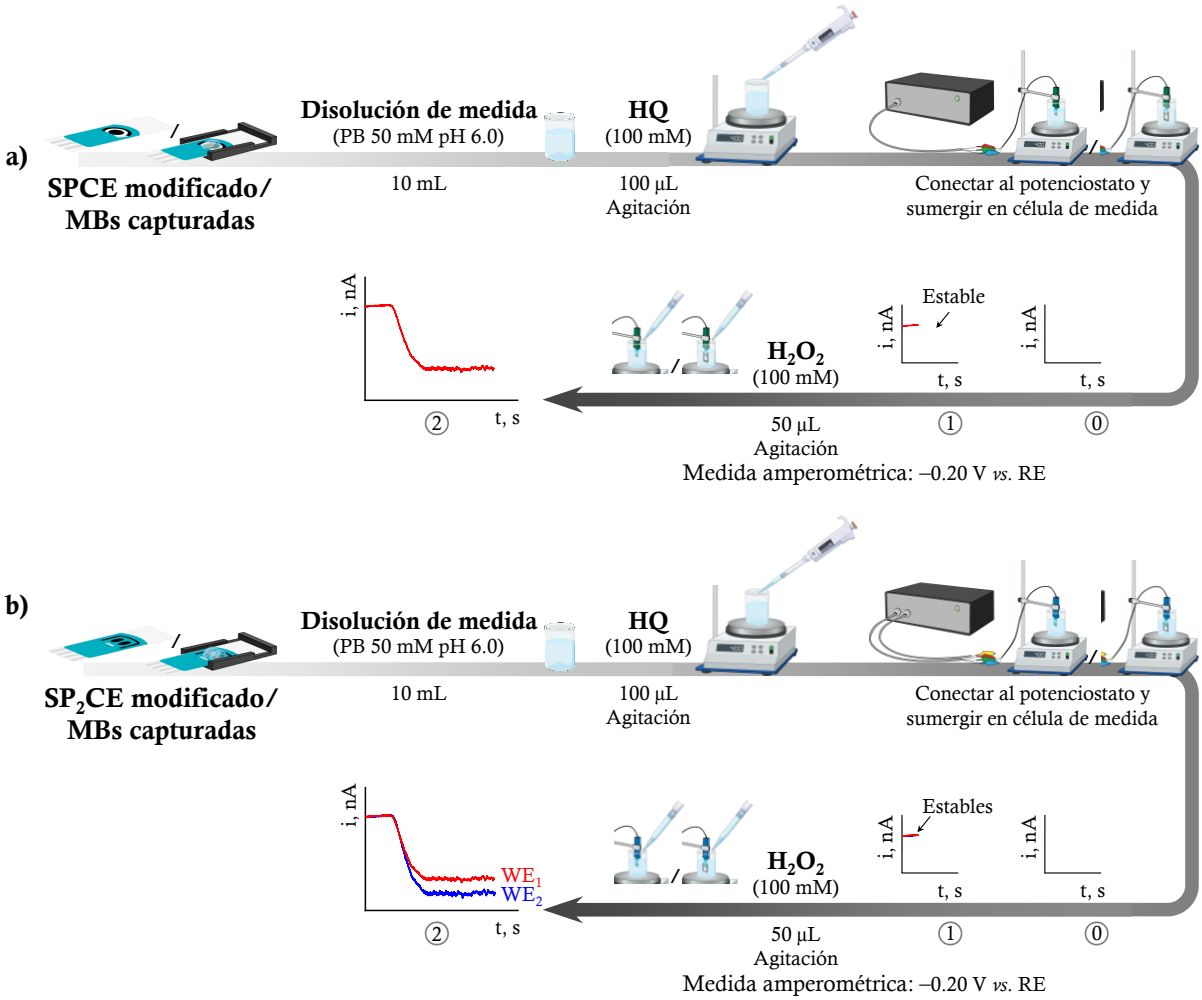


Figura 2.29. *Esquema para la medida amperométrica* ***a)*** *individual (SPCE) o* ***b)*** *dual (SP_2CE) en disolución bajo agitación constante de las bioplataformas electroquímicas desarrolladas.*

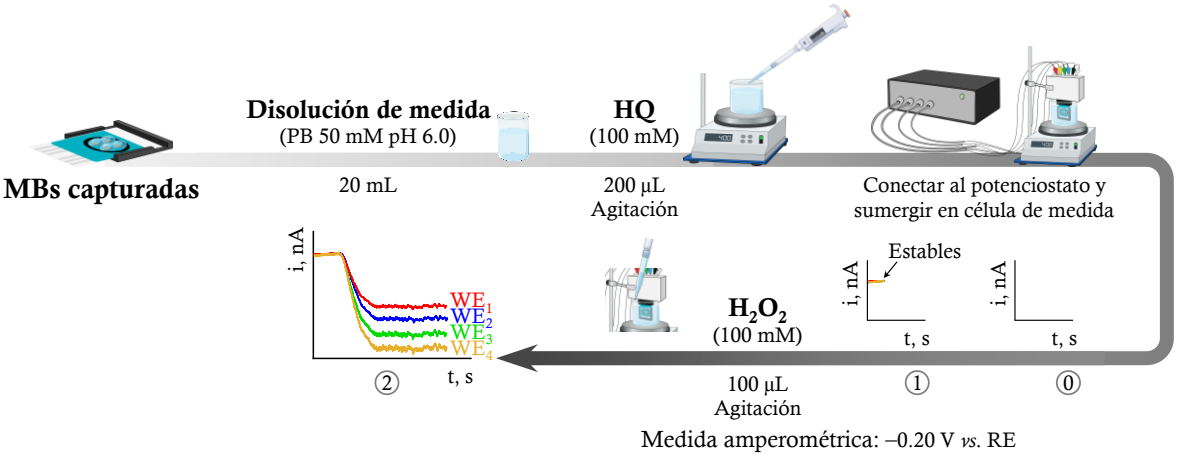


Figura 2.30. *Esquema para la medida amperométrica cuádruple (SP_4CE) en disolución bajo agitación constante de las bioplataformas electroquímicas desarrolladas.*

Medidas en gota

En la determinación óctuple de autoanticuerpos se emplearon como transductores electroquímicos SP_8CE. La medida amperométrica en este caso (***figura 2.31***) se llevó resuspendiendo las MBs modificadas en 22.5 µL de una disolución de HQ 1 mM preparada en la disolución reguladora PB 50 mM de pH 6.0 y depositándolas sobre la superficie de cada WE del SP_8CE, previamente colocado sobre la carcasa de teflón comercial con ocho imanes de Nd, y cubriendo completamente el sistema de tres electrodos. Una vez capturadas las MBs, el electrodo se conectó al potenciostato para aplicar un potencial de –0.20 V frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag. Al igual que anteriormente, se espera a que se estabilice la corriente, añadiendo después 2.5 µL de una disolución H_2O_2 100 mM sobre cada una de las ocho células electroquímicas. De esta manera, se obtiene la variación de corriente directamente proporcional a la concentración de los autoanticuerpos diana en cada superficie electródica de la bioplataforma múltiple.

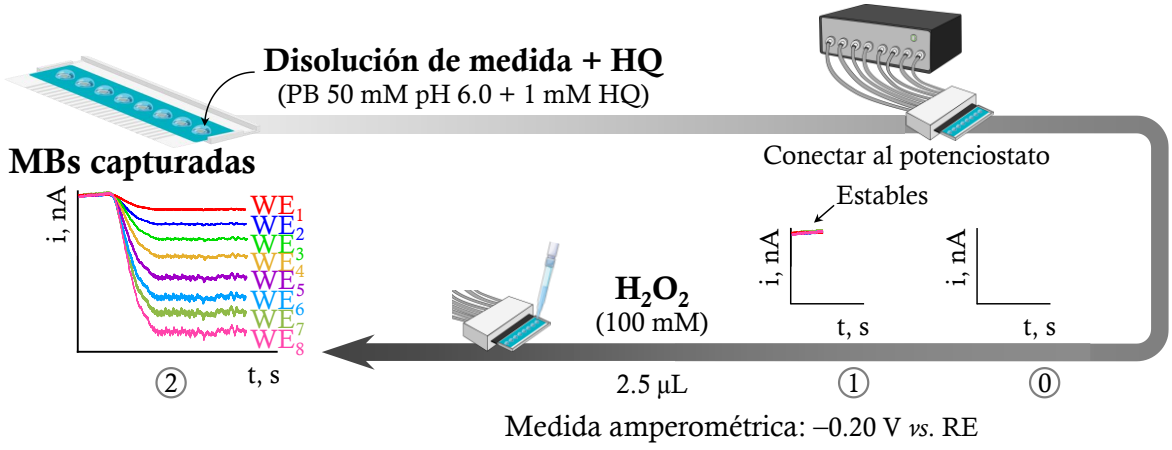


Figura 2.31. *Esquema para la medida amperométrica en gota de las bioplataformas electroquímicas empleando SP_8CE como transductor.*

2.6.2. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

La voltamperometría cíclica (CV) es una técnica electroquímica ampliamente utilizada para la caracterización y el estudio electroquímico de especies electroactivas mediante la medida de la corriente resultante al hacer un barrido de potencial sobre un electrodo sumergido en una disolución no agitada de la especie a estudiar, a una velocidad de barrido (ν) establecida [Kissinger & Heineman, 1983].

En esta Tesis Doctoral, la CV se utilizó para caracterizar electroquímicamente, por un lado, las diferentes nanoestructuras de MoS_2 sintetizadas para la preparación del biosensor integrado dual para la determinación de las citoquinas BAFF y APRIL, y, por otro lado, las etapas de modificación de las superficies electródicas implicadas en dicho biosensor.

Igualmente, esta técnica electroquímica también se utilizó para la funcionalización de la superficie electródica (WE) de los SPCEs y SP_2CEs mediante *grafting* o injertado electroquímico.

Caracterización electroquímica

La caracterización electroquímica se llevó a cabo investigando el comportamiento del par redox comúnmente utilizado para estudiar la cinética de transferencia de electrones, $[Fe(CN)_6]^{-3}$/ $[Fe(CN)_6]^{-4}$, sobre los diferentes electrodos modificados.

Para ello, por un lado, en el caso de evaluar las características de las diferentes nanoestructuras de MoS_2: MoS_2, MoS_2/rGO, MoS_2/MWCNTs y MoS_2/rGO/MWCNTs, se depositaron 5 µL de cada una de las suspensiones de 0.1 mg mL^{-1} de los mismos sobre el WE del SPCE dejando secar bajo radiación IR. Por otro lado, se investigó cómo afectaba electroquímicamente la modificación de la superficie electródica con los inmunoensayos en formato integrado tras cada etapa de incubación, según el protocolo descrito en la sección 2.5.1.

De esta manera, el SP(d)CE con los WEs modificados, una vez lavados con agua Milli-Q y secados bajo una corriente de aire, se conectó al potenciostato y se sumergió en 10 mL de una disolución $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ 5 mM suplementada con KCl 100 mM preparada en agua Milli-Q. Se registró un ciclo voltamperométrico aplicando un barrido de potencial entre –0.3 y 0.8 V frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag, a una velocidad de barrido (ν) de 50 mV s^{-1}.

Electrografting o injertado electroquímico

La técnica de voltamperometría cíclica se utilizó también para la modificación de la superficie electródica de los SPCE y SP_2CE mediante *electrografting* o injertado electroquímico de la sal de diazonio del ácido *p*-aminobenzoico (*p*-ABA) en la determinación dual de BAFF y APRIL. Para ello, una vez obtenida dicha sal, el electrodo se conectó al potenciostato a través de su cable específico y se sumergió en 1 mL de esta misma disolución, aplicando 10 ciclos sucesivos de

potencial en voltamperometría cíclica entre 0.0 y –1.0 V frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag, a una velocidad de barrido (ν) de 200 mV s^{-1}.

2.6.3. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA

En los procesos de modificación electródica para la preparación de biosensores o bioplataformas electroquímicas, la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) tiene una gran utilidad gracias a que permite controlar los cambios en las propiedades eléctricas de las superficies conductoras en función de las características de las especies inmovilizadas. Esta técnica se emplea para confirmar las diferentes etapas implicadas en la modificación de una bioplataforma, monitorizando la variación de la resistencia a la transferencia de carga (R_{CT}). Mediante EIS se mide la relación entre la corriente y la diferencia de potencial aplicado en el dominio de frecuencia. Se aplica una perturbación sinusoidal de voltaje para un conjunto de frecuencias y, al mismo tiempo, se registra la respuesta sinusoidal de la corriente resultante. La relación de amplitud entre la tensión y corriente, y el desfase entre la entrada y salida, da lugar a Z, que depende de la frecuencia de perturbación [Ciucci, 2019]. De este modo, la impedancia electroquímica (Z) global es la suma de la parte real (Z') y la parte imaginaria (Z'') [Mei et al., 2018].

En esta Tesis Doctoral se ha empleado esta técnica junto con la CV para caracterizar electroquímicamente tanto de las nanoestructuras de MoS_2 como cada etapa de modificación de los SP($_2$)CEs en las bioplataformas desarrolladas en formato integrado. Siguiendo el mismo procedimiento que en CV para cada experimento, los electrodos se sumergieron en 10 mL de la disolución $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ 5 mM suplementada con KCl 100 mM preparada en agua Milli-Q y se aplicó el potencial de equilibrio del sistema redox, a una amplitud de excitación de 10 mV en el intervalo de frecuencias 10^5–0.04 Hz.

2.7. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN NO ELECTROQUÍMICAS

En este apartado se discuten brevemente las técnicas de caracterización no electroquímicas y sus protocolos experimentales utilizados aplicados en el estudio de las nanoestructuras de MoS_2 sintetizadas empleadas para el desarrollo de la bioplataforma dual en formato integrado para la determinación dual de BAFF y APRIL.

2.7.1. ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

La espectroscopia de absorción molecular en el UV-visible, que ha sido la utilizada en esta Tesis Doctoral, es una técnica óptica aplicable en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 200 y 800 nm que se fundamenta en la medida de la absorción de radiación cuando un haz de luz monocromática atraviesa una disolución absorbente [Perkampus, 1992; Penner, 2017].

En esta Tesis Doctoral se empleó para caracterizar los materiales basados en MoS_2 sintetizados en el laboratorio, así como los nanomateriales individuales. Para su aplicación se empleó un espectrofotómetro UV-Visible Agilent HP 8453 y células de cuarzo, y se registraron los espectros de suspensiones de 30 μg mL^{-1} preparadas en agua Milli-Q en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 200 y 800 nm.

2.7.2. ESPECTROSCOPIA RAMAN

La espectroscopia Raman es una técnica fundamentada en la dispersión inelástica de la radiación incidente mediante su interacción con moléculas vibrantes. Se hace incidir sobre la muestra a analizar un láser monocromático, el cual interactúa con las moléculas dando lugar a una luz dispersa que tiene una frecuencia diferente a la luz incidente, generando el espectro Raman que es, por tanto, el resultado de la colisión inelástica entre la radiación monocromática incidente y las moléculas de la muestra [Bumbrah & Sharma, 2016].

La obtención de los espectros Raman de los nanomateriales en estado sólido: nanoestructuras de MoS_2 sintetizadas (MoS_2/MWCNTs y MoS_2/rGO/MWCNTs) y MWCNTs, se llevó a cabo en la Unidad de Espectroscopia y Correlación de los Centros de Asistencia a la Investigación (CAI) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) empleando un espectrómetro micro-Raman confocal dispersivo NT-MDT NTegra Spectra midiendo a una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 532 nm.

2.7.3. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La microscopía electrónica de barrido (SEM) examina los fenómenos superficiales de los materiales. La técnica se basa en el bombardeo de la muestra con electrones de alta energía y el análisis de los electrones o rayos X salientes. Los electrones primarios generados por la fuente son acelerados mediante calentamiento con alta energía y se enfocan y confinan en un haz monocromático con el fin de incidir sobre la superficie de la muestra. Esta incidencia proporciona energía a los electrones atómicos de la superficie, los cuales se liberan como electrones secundarios, electrones retrodispersados, fotones o rayos X y luz visible, y son recogidos para formar una imagen tridimensional [Akhtar et al., 2018].

Las nanoestructuras de MoS_2 sintetizadas y los nanomateriales híbridos en lo que se empleados se caracterizaron mediante esta técnica, realizándose en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) empleando un microscopio electrónico JEOL JSM 7600F operando a 5 kV.

2.7.4. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) genera imágenes en blanco y negro en 2D que permiten elucidar la estructura interna de muchas moléculas y materiales. La técnica se fundamenta en que un haz de electrones emitido desde un cátodo por calentamiento eléctrico es dirigido a un ánodo pasando por una rendija, atravesando la fina capa de muestra a analizar, cuyas dimensiones deben ser inferiores a 100 nm debido a la baja permeabilidad de los electrones. La parte del haz absorbido es dispersada y transmitida, proyectándose en la lente y generando una imagen por contraste como resultado de la interacción entre los átomos de la muestra y los electrones del haz por repulsión entre las cargas negativas de los electrodos y los núcleos atómicos. De este modo, cuanto mayor sea el núcleo de la muestra, mayor será la dispersión [Kannan, 2018].

Las nanoestructuras de MoS_2 sintetizadas fueron analizadas en el mismo CNME que para SEM, pero empleando un microscopio JEOL JEM 1400 operado a 100 kV.

2.8. TECNOLOGÍAS CONVENCIONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DIANA

Para alcanzar el fin último del desarrollo de las bioplataformas electroquímicas en esta Tesis Doctoral en cuanto a su utilidad para determinar el contenido endógeno en muestras reales de los biomarcadores diana elegidos, es necesario demostrar la fiabilidad de los resultados alcanzados por comparación estadística de los mismos con los valores resultantes del empleo de metodologías convencionales de aplicabilidad analítica contrastada.

Para llevar a cabo esta comparación, se utilizó mayoritariamente la metodología ELISA, de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación.

2.8.1. ELISA

La metodología ELISA, de sus siglas del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*, es una técnica de ensayo inmunológico ampliamente utilizada para detectar y cuantificar biomoléculas como anticuerpos, antígenos o proteínas empleando enzimas conjugadas a uno de los reactivos del inmunoensayo y medida colorimétrica tras la adición de un sustrato cromogénico [Wiederschain, 2009]. Se usan microplacas sólidas de poliestireno, polivinilo o polipropileno, generalmente de 96 pocillos, capaces de inmovilizar al antígeno o al anticuerpo, pero no a los reactivos de las demás etapas [Aydin, S., 2015].

En esta Tesis Doctoral se han empleado microplacas sin y con recubrimiento. Las microplacas sin recubrir son de poliestireno transparentes (R&D Systems, Cat. No.: DY990, tiras de 12×8), permitiendo la inmovilización de los anticuerpos o analitos de interés en función del protocolo experimental. Las recubiertas se adquirieron comercialmente con cada kit comercial y contenían diferentes biomoléculas como anticuerpos, proteínas o ácidos nucleicos para la captura selectiva del analito de interés (***figura 2.32.a***). Los diferentes tipos de inmunoensayo en función de la inmovilización y el sistema de detección empleado en la metodología ELISA se han esquematizado en la ***figura 2.32.b***. A continuación, estas configuraciones se describen brevemente:

- Inmunoensayo directo. Es el más sencillo, donde el analito se inmoviliza en el pocillo y es marcado enzimáticamente por un anticuerpo conjugado con la enzima.
- Inmunoensayo indirecto. El antígeno inmovilizado se detecta primero por un anticuerpo que posteriormente es marcado enzimáticamente con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima.
- Inmunoensayo tipo sándwich. Se inmoviliza el anticuerpo de captura sobre el pocillo y, una vez capturado el analito de interés, se añade un anticuerpo de detección que después se marca enzimáticamente con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima. Comúnmente este es el tipo de inmunoensayo más sensible y selectivo de todos, aunque por lo general es el que requiere más tiempo.

- Inmunoensayo competitivo. Consiste en la competición del analito de interés y del conjugado con la enzima por un anticuerpo inmovilizado sobre el pocillo.

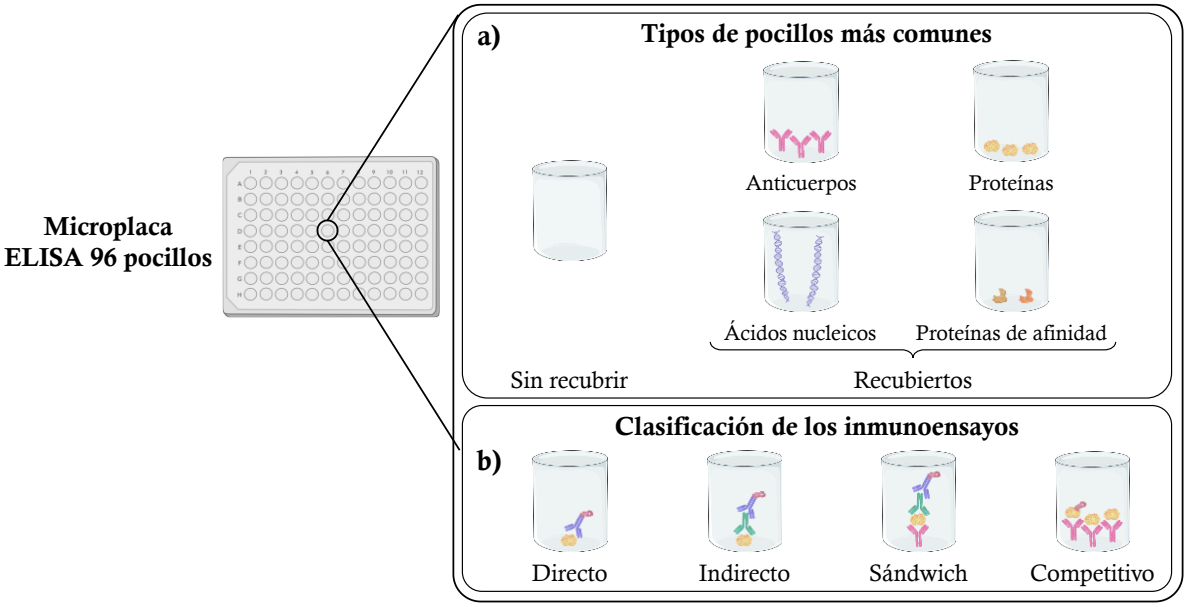


Figura 2.32. a) *Tipos de pocillos sin recubrir y recubiertos más comunes de las microplacas y* ***b)*** *clasificación de los inmunoensayos.*

Los protocolos ELISA constan de cuatro etapas principales: en primer lugar, el antígeno o el anticuerpo se inmovilizan sobre el pocillo de la microplaca, seguidamente se realiza una etapa de bloqueo, generalmente con BSA, para la posterior detección del analito y marcaje enzimático. Finalmente, se adiciona el sustrato cromogénico para llevar a cabo la medida colorimétrica a la longitud de onda específica del color resultante. Durante cada etapa de incubación, las microplacas con los inmunorreactivos son colocadas en un agitador orbital (ELMI ltd., Sky Line S-4) con velocidad regulable para llevar a cabo la incubación con agitación continua, y los pocillos son cubiertos con un film adhesivo sellador de placas (R&D Systems, Cat. No.: DY992) para evitar contaminaciones o derrames de los reactivos. Entre cada una de las etapas de incubación se realizan tres lavados con 300 µL de las disoluciones tampón correspondientes para eliminar los reactivos no enlazados.

Como se verá, la metodología ELISA se ha aplicado a la determinación de cada biomarcador diana en muestras de suero. Los protocolos empleados, esquematizados de forma general en la ***figura 2.33.a***, fueron los descritos en cada kit comercial, pudiendo diferenciar cuatro tipos de protocolos diferentes:

Metodología ELISA para la determinación de autoanticuerpos

La determinación de los autoanticuerpos CENPB-Abs, dsDNA-Abs y ENAs-Abs se llevó a cabo individualmente empleando los kits ELISA comerciales de Creative Diagnostics. En este caso, cada pocillo de la microplaca comercial ya estaba tapizado con el antígeno específico al autoanticuerpo a determinar. El procedimiento comenzó con la incubación de 100 µL del estándar de cada autoanticuerpo o la muestra a analizar preparados en la disolución reguladora correspondiente, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con 300 µL del regulador de lavado específico para cada antígeno diana, sin necesidad de bloqueo, se adicionaron 100 µL del conjugado enzimático que fueron incubados durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron de nuevo 3 lavados con 300 µL de disolución de lavado.

Para la determinación de AQP4-Abs, se utilizó el kit ELISA comercial de Cusabio, en el que los pocillos de la microplaca están tapizados con la proteína AQP4. Se incubaron 100 µL de AQP4-Abs o la muestra a analizar preparados en el $SD_{AQP4\text{-}Abs}$, durante 2 horas a 37 ºC. Sin lavar los pocillos, pero eliminando el líquido después de la incubación, 100 µL de b-AQP4 1/100 preparada en su diluyente, se incubaron durante 1 hora a la misma temperatura. Por último, después de esta etapa de incubación y tras lavar tres veces los pocillos con 200 µL de $WB_{AQP4\text{-}Abs}$, 100 µL de HRP-avidin en dilución 1/100 preparado en $HD_{AQP4\text{-}Abs}$ se incubaron durante 1 hora y se realizó la correspondiente etapa de lavado.

La determinación de CENPA-Abs se realizó empleando microplacas con pocillos sin recubrir. Para ello, 100 µL de CENPA preparada en CB 50 mM de pH 9.6 se incubaron toda la noche a 4 ºC. Finalizado el tiempo, los pocillos se lavaron tres veces con PBS 10 mM de pH 7.4 y se siguió con la etapa de bloqueo, incubando 300 µL de una disolución PBS 10 mM de pH 7.4 suplementada con BSA al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de los sucesivos lavados, 100 µL de CENPA-Abs o la muestra a analizar preparados en BB se incubaron durante 30 minutos. Finalmente, se marcaron enzimáticamente con 100 µL de HRP-anti-cIgG 1/1000 o con HRP-anti-hIgG 1 µg mL^{-1} preparadas en BB, durante 30 minutos, y lavado posteriormente con BB.

Metodología ELISA para la determinación de biomarcadores proteínicos

La determinación de las proteínas MMP-9, BAFF y APRIL empleando los kits ELISA comerciales de R&D Systems basados en formato de inmunoensayo tipo sándwich, se llevó a cabo individualmente inmovilizando durante toda la noche a temperatura ambiente los anticuerpos de captura $cAb_{MMP\text{-}9}$ de 1 µg mL^{-1}, cAb_{BAFF} de 1 µg mL^{-1} o cAb_{APRIL} de 2 µg mL^{-1} preparados en disolución PBS 10 mM de pH 7.4 en sus correspondientes pocillos de las microplacas ELISA sin recubrir. Tras el proceso de inmovilización, los pocillos se lavaron y se bloquearon con BSA

incubando 300 µL del diluyente *reagent diluent* del kit durante 60 minutos. Finalizada la etapa de bloqueo y posteriores lavados, 100 µL de estándares de cada proteína o de las muestras a analizar se incubaron durante 2 horas. Después de esta etapa y de los respectivos lavados, se detectaron los analitos incubando el anticuerpo de detección biotinilado específico: b-dAb$_{MMP-9}$ de 150 ng mL^{-1}, b-dAb$_{BAFF}$ de 10 ng mL^{-1} o b-dAb$_{APRIL}$ de 1 µg mL^{-1}, preparados en el mismo diluyente de bloqueo, durante 2 horas. Por último, el marcaje enzimático se llevó a cabo incubando Estrep-HRP diluida 40 veces, en la determinación de MMP-9 y BAFF o 200 veces, en la determinación de APRIL, preparadas en el diluyente de bloqueo, durante 20 minutos, finalizando con los lavados para eliminar posibles restos no enlazados.

La detección colorimétrica (***figura 2.33.b***) se llevó a cabo en todos los casos incubando durante 15–20 minutos 100 µL de TMB comercial, y añadiendo posteriormente 50 µL de una disolución de parada (*stop*) de H_2SO_4 1 M. Para realizar las medidas espectrofotométricas se empleó el lector de microplacas Sunrise™ (Tecan) con el software Magellan V 7.1. midiendo a 450 nm.

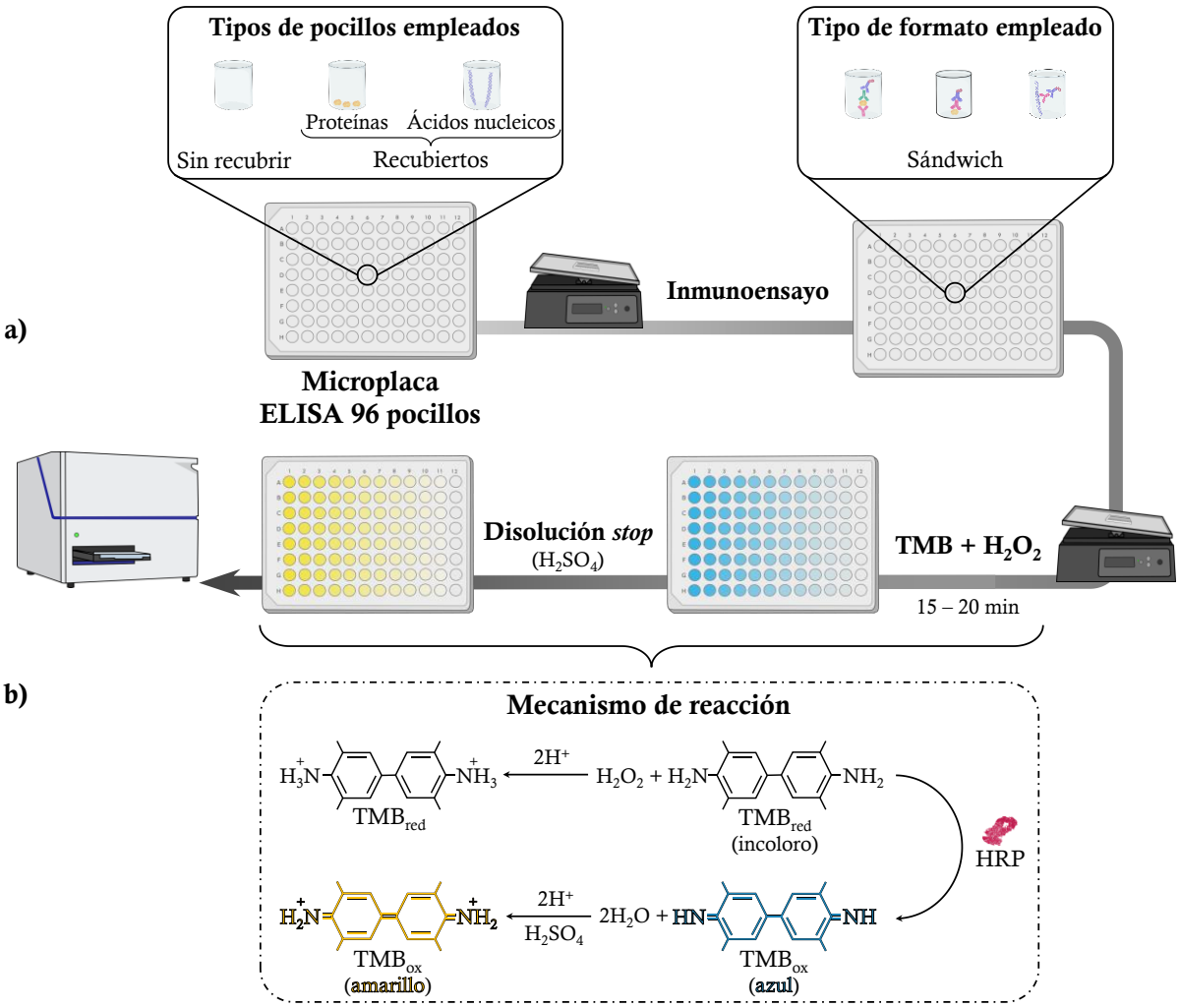


Figura 2.33. a) *Esquema de protocolo experimental ELISA y* ***b)*** *mecanismo de reacción de la detección empleando el sistema HRP/H_2O_2/TMB.*

2.8.2. WESTERN BLOT

La técnica semicuantitativa *western blot* (WB) permite la detección y caracterización por el peso molecular de proteínas presentes en una muestra compleja gracias a su separación a través de un gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato sódico (SDS) conocido como gel de electroforesis (SDS-PAGE). La muestra para analizar se trata con colorante indicador y el tensioactivo (SDS) con el fin de desnaturalizar las proteínas, neutralizando las cargas negativas para favorecer la migración al polo positivo en el PAGE. También se pueden añadir a la muestra agentes químico-reductores para romper enlaces disulfuro y desplegar las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas. Las proteínas separadas únicamente en función de su tamaño se transfieren a una membrana adsorbente de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF) y se detectan por inmunodetección con anticuerpos específicos [Kurien & Scofield, 2006; Hnasko, T. S. & Hnasko, R. M., 2015].

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral para la evaluación de la expresión de MMP-9 en lisados celulares de cáncer de mama de la línea MDA-MB-436 crecidos en DMSO, PMA o PMA con BFA, los realizaron en el grupo ProteoFun del UFIEC-ISCIII. Para ello, 10 µg de cada lisado se separaron con SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para posteriormente analizarse con los anticuerpos selectivos al biomarcador diana.

2.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

A continuación, se describen los programas empleados para el análisis estadístico de los datos proporcionados en la Tesis Doctoral, así como las ecuaciones utilizadas para la obtención de los parámetros analíticos y llevar a cabo las comparaciones estadísticas para validar los métodos desarrollados [Skoog et al., 2005].

En primera instancia, todos los datos registrados en esta Tesis Doctoral se analizaron empleando el programa Microsoft Excel (Microsoft Office). Los datos proporcionados en la Memoria son el resultado del valor medio de tres réplicas (n = 3) medidas como la diferencia entre la corriente del estado estacionario y la corriente de fondo, y las barras de error que se incluyen son la estimación del triple de la desviación estándar (± 3s) de cada medida registrada por triplicado, a un nivel de confianza de 95 % (α = 0.05).

Una vez estudiadas y optimizadas todas las variables experimentales involucradas en la fabricación de los biosensores desarrollados, se obtuvieron las características analíticas de los métodos empleando el programa Origin (OriginLab®). Para ello, en primer lugar, se construyeron los calibrados externos para estándares de concentración conocida del biomarcador diana, y se ajustaron siguiendo la regresión lineal de mínimos cuadrados (***ecuación 2.1***):

$$y = a + bx \qquad \textit{Ecuación 2.1}$$

donde "y" es la señal amperométrica, "x" es la concentración de biomarcador, "b" es la pendiente del intervalo lineal del calibrado y "a" es la ordenada en el origen.

Partiendo de la ecuación de la recta de calibrado obtenida, se calcularon los parámetros analíticos principales: límite de detección (LOD, ***ecuación 2.2***) y límite de cuantificación (LOQ, ***ecuación 2.3***) para diez medidas (n = 10) en ausencia del biomarcador, y desviación estándar relativa (RSD, ***ecuación 2.4***) para diez medidas (n = 10) en presencia de una concentración conocida de biomarcador:

$$\mathrm{LOD} = \frac{3 \times s_b}{b} \qquad \textit{Ecuación 2.2}$$

$$\mathrm{LOQ} = \frac{10 \times s_b}{b} \qquad \textit{Ecuación 2.3}$$

$$\mathrm{RSD}\ (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \qquad \textit{Ecuación 2.4}$$

donde "s_b" es la desviación estándar de las diez medidas registradas en ausencia de biomarcador, "s" es la desviación estándar de las diez medidas registradas en presencia de una concentración conocida de biomarcador, y "$\bar{x}$" es el valor medio de estas diez medidas.

El análisis estadístico para el estudio del efecto matriz se llevó a cabo mediante la comparación de las pendientes obtenidas para el calibrado externo y el calibrado de adiciones estándar mediante la prueba *t de Student*. El valor obtenido para t_{exp} (***ecuación 2.5***) se comparó con la t_{tab} a un nivel de confianza del 95 % para $N_1 + N_2 - 4$ grados de libertad, siendo "N" los puntos

del calibrado, o con t' (***ecuación 2.6***) cuando no o sí existen diferencias entre las desviaciones estándar de los calibrados, respectivamente, según el test *F de Snedecor* (***ecuación 2.7***).

$$t_{exp} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{s_{b1}^2 + s_{b2}^2}} \qquad \textbf{\textit{Ecuación 2.5}}$$

$$t' = \frac{t_1 \times s_{b1}^2 + t_2 \times s_{b2}^2}{s_{b1}^2 + s_{b2}^2} \qquad \textbf{\textit{Ecuación 2.6}}$$

$$F_{exp} = \frac{s^2_{(y/x)_1}}{s^2_{(y/x)_2}}; \text{siendo } s_{(y/x)_1} > s_{(y/x)_2} \qquad \textbf{\textit{Ecuación 2.7}}$$

donde "b_1" y "b_2" son las pendientes de cada recta de calibrado y "s_{b1}" y "s_{b2}" son los errores de las pendientes, "t_1" y "t_2" son los valores teóricos de la distribución *t de Student* para $N_1 - 2$ y $N_2 - 2$ y "$s_{(y/x)_1}$" y "$s_{(y/x)_2}$" son los errores típicos de cada calibrado.

Cuando se cumple que $F_{exp} < F_{tab}$, no hay diferencias significativas entre las desviaciones estándar de los calibrado. Asimismo, cuando $t_{exp} < t_{tab}$ se puede confirmar que no hay diferencias significativas entre las pendientes, y por tanto no hay efecto matriz.

Habiéndose establecido la existencia o no de efecto matriz, el contenido endógeno del biomarcador analizado se expresó como el valor medio ($\bar{x}$) de tres réplicas (n = 3) con un intervalo de confianza al 95 % según la ***ecuación 2.8***:

$$\bar{x} \pm t_{\alpha,\upsilon} \times \frac{s}{\sqrt{n}} \qquad \textbf{\textit{Ecuación 2.8}}$$

donde "$t_{\alpha,\nu}$" es el valor teórico de la distribución *t de Student* para "ν" grados de libertad (N – 2) y $\alpha = 0.05$.

Por último, la validación de los resultados obtenidos con la bioplataforma desarrollada se realizó por comparación estadística con los resultantes aplicando la metodología ELISA mediante el test *t de Student* para dos muestras independientes. Después de comparar las varianzas según la ***ecuación 2.7***, en esta Tesis Doctoral han resultado todas comparables, por lo que la t_{exp} calculada según la ***ecuación 2.9*** se comparó con la t_{tab} para $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

$$t_{exp} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \qquad \textbf{\textit{Ecuación 2.9}}$$

donde "$\bar{x}_1$" y "$\bar{x}_2$" son los valores medios de las muestras, "n_1" y "n_2" el número de réplicas y "s^2" la varianza de las muestras calculada según la ***ecuación 2.10***:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \qquad \textbf{\textit{Ecuación 2.10}}$$

Cuando $t_{exp} < t_{tab}$, no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos por cada método, siendo estadísticamente comparables al nivel de confianza del 95%.

Como complemento al análisis comparativo entre el contenido endógeno del biomarcador diana determinado las muestras biológicas reales empleando las bioplataformas desarrolladas y la tecnología ELISA convencional, se realizaron estudios de correlación representando en el eje de ordenada los niveles obtenidos por la determinación con la bioplataforma electroquímica y en el eje de abscisas aquellos resultantes con la metodología ELISA convencional. Los puntos representados en la gráfica se ajustaron por regresión de mínimos cuadrados (***ecuación 2.1***). Si el ajuste deriva en una ordenada en el origen y una pendiente con valores de 0 y 1, respectivamente, se confirma que los resultados obtenidos son similares usando ambas metodologías.

CAPÍTULO 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se discuten los resultados más relevantes obtenidos en el diseño, optimización, caracterización y aplicación de las plataformas biosensoras electroquímicas en formato integrado o asistidas por el empleo de micropartículas magnéticas (MBs) desarrolladas en esta Tesis Doctoral para la determinación individual o multiplexada de biomarcadores de gran relevancia clínica utilizando para la transducción amperométrica electrodos serigrafiados de carbono para detección individual (SPCEs) o múltiple (SP_2CEs, SP_4CEs y SP_8CEs).

El esquema empleado para desarrollar todas las bioplataformas integradas o asistidas por el empleo de MBs comprende cinco fases comunes, y una adicional en el caso del formato integrado:

1. Diseño y viabilidad del bioensayo. El formato de ensayo seleccionado para la fabricación de las bioplataformas está condicionado al tipo de marcador y a la disponibilidad/conjugación de los reactivos para su determinación. En función de lo anterior, se han empleado distintas estrategias para la inmovilización del biorreceptor (reacciones de afinidad, químicas de carbodiimida/succinimida o His-tag), y para el marcaje enzimático. La viabilidad del bioensayo se evaluó realizando los controles adecuados.
2. Optimización de las variables experimentales. Con el fin de obtener el mejor comportamiento analítico y operacional de las bioplataformas desarrolladas se han optimizado las variables clave implicadas en su fabricación y funcionamiento, tomando como criterio de selección la mayor relación entre la señal obtenida en presencia (S) y ausencia (B) de disoluciones estándar de biomarcador diana (S/B). Los resultados mostrados para todos los experimentos evaluados se expresaron considerando el valor medio de tres réplicas (n = 3) y sus barras de error estimadas como la desviación estándar (s) de dichas réplicas.

   En esta Memoria se muestran los estudios de optimización de todas las variables experimentales involucradas en la preparación de la bioplataforma, utilizando para la transducción amperométrica las variables experimentales (potencial de medida, concentraciones de H_2O_2 e HQ y composición y pH de la disolución reguladora de medida) optimizadas previamente en otros trabajos del Grupo de Investigación [Eguílaz et al., 2010; Conzuelo et al., 2012].
3. Etapa exclusiva de las bioplataformas en formato integrado: Caracterización electroquímica por CV y EIS de las etapas implicadas en la preparación y determinación de las bioplataformas.
4. Evaluación de las características analíticas y operacionales. En las condiciones experimentales optimizadas se evaluaron las características analíticas y operacionales para la determinación de estándares de cada biomarcador, estableciendo los rangos lineales, los valores para los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) y la reproducibilidad (RSD), de acuerdo las ecuaciones descritas en el apartado 2.9 así como

también la estabilidad de almacenamiento de los sustratos electródicos o los microsoportes magnéticos modificados con los elementos de reconocimiento.

5. Estudio de la selectividad frente a biomoléculas y compuestos potencialmente interferentes presentes en las muestras a analizar.
6. Aplicabilidad. Se demostró la aplicabilidad práctica de las bioplataformas desarrolladas determinando el contenido endógeno del biomarcador diana en muestras biológicas reales, realizando previamente un estudio de comparación de pendientes siguiendo los cálculos descritos en el apartado 2.9 para la evaluación de la posible existencia de efecto matriz. Los niveles encontrados para tres réplicas de cada muestra analizada, expresados según la ***ecuación 2.8***, se compararon estadísticamente con los resultantes al emplear la metodología convencional ELISA.

Como confirmarán los resultados que se describen y analizan críticamente en las próximas secciones, todas las bioplataformas desarrolladas en esta Tesis Doctoral demuestran características analíticas competitivas frente a las metodologías convencionales en términos de simplicidad, tiempos de ensayo, coste y compatibilidad de empleo en el punto de atención.

PARTE I. PLATAFORMAS BIOSENSORAS ELECTROQUÍMICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS

La inminente necesidad de buscar herramientas alternativas a las disponibles responde al propósito de proporcionar una medicina personalizada igualitaria y sostenible adaptada a las necesidades de cada paciente, de manera que cada individuo pueda ser diagnosticado y, por tanto, tratado en el momento oportuno y con la mayor eficiencia. Con este fin, en los últimos años se ha investigado en el avance de nuevas tecnologías compatibles con su empleo en el punto de atención, de fácil manejo y menor coste que las existentes. Es por ello por lo que el desarrollo de bioplataformas electroquímicas ha crecido exponencialmente en vista de las atractivas ventajas y oportunidades que éstas ofrecen frente a las metodologías convencionales, proporcionando excelentes características analíticas, incluso en el análisis de muestras clínicas de elevada complejidad, y potencial para simplificar, abaratar y realizar determinaciones individuales o multiplexadas (incluso a distinto nivel ómico) en menor tiempo y en cualquier entorno.

Con todo esto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido el **desarrollo de bioplataformas electroquímicas competitivas que permitan la determinación fiable y exacta de biomarcadores clínicamente relevantes en muestras reales de diversa naturaleza, para evaluar su potencial en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades crónicas**. Así, se han propuesto bioplataformas electroquímicas de vanguardia, explorando biorreceptores, formatos de ensayo y estrategias de inmovilización y marcaje enzimático novedosas para el análisis de biomarcadores candidatos potencialmente vinculados con el desarrollo y la progresión de enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas o cáncer.

En esta primera parte de la Memoria se analizan los resultados más relevantes obtenidos en el diseño, optimización, caracterización y aplicación de las plataformas biosensoras electroquímicas en formato integrado o asistidas por el empleo de micropartículas magnéticas (MBs) para la determinación individual o múltiple de autoanticuerpos, utilizando para su transducción amperométrica electrodos serigrafiados de carbono para detección individual (SPCEs), dual (SP_2CEs), cuádruple (SP_4CEs) y óctuple (SP_8CEs).

A continuación, se presentan y discuten los resultados más relevantes obtenidos en el desarrollo de un biosensor electroquímico en formato integrado para la determinación individual de CENPB-Abs y de bioplataformas electroquímicas asistidas por MBs para la determinación individual de AQP4-Abs, dsDNA-Abs, CENPB-Abs; dual de CENPA-Abs y CENPB-Abs; cuádruple de dsDNA-Abs y ENAs-Abs; y óctuple para dsDNA-Abs y ENAs-Abs. Estos resultados han sido publicados en los artículos aportados en el apartado de Publicaciones – *published papers* del Anexo:

- [Arévalo et al., 2020] *Fast and sensitive diagnosis of autoimmune disorders through amperometric biosensing of serum anti-dsDNA antibodies*, Biosensors and Bioelectronics 160 (2020) 112233. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112233.
- [Arévalo et al., 2021]: *Unraveling autoimmune and neurodegenerative diseases by amperometric serological detection of antibodies against aquaporin-4*, Bioelectrochemistry 144 (2022) 108041. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2021.108041.
- [Arévalo et al., 2023a]: *First electrochemical bioplatforms to determine anti-centromere B antibodies: critical comparison between integrated and magnetic beads-assisted strategies using His-tag chemistry*, Sensors & Diagnostics 2 (2023) 256–261.
- [Arévalo et al., 2023b]: *Anti-double stranded DNA antibodies: Electrochemical isotyping in autoimmune and neurological diseases*, Analytica Chimica Acta 1257 (2023) 341153. DOI: 10.1016/j.aca.2023.341153.
- [Arévalo et al., 2023c]: *Early and differential autoimmune diseases diagnosis by interrogating specific autoantibody signatures with multiplexed electrochemical bioplatforms*, Biosensors and Bioelectronics: X 13 (2023) 100325. DOI: 10.1016/j.biosx.2023.100325.

Todas estas las bioplataformas se basan en formatos de inmunoensayo de tipo indirecto, detallados en la sección 2.5, que se preparan inmovilizando sobre el sustrato electródico o sobre las MBs el antígeno (proteínas o ácidos nucleicos) para la captura eficiente y selectiva de sus correspondientes autoanticuerpos, que posteriormente se marcan enzimáticamente con un anticuerpo secundario o mezcla de anticuerpos secundarios conjugados con la enzima HRP en función de que interese determinar un isotipo particular (IgG, IgM, IgA) o el contenido total de los tres, respectivamente. La transducción amperométrica se llevó a cabo empleando el sistema HRP/H_2O_2/HQ tal y como se detalla en la sección 2.6.1.

3.1. DESARROLLO DE BIOPLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS INDIVIDUALES

En este apartado se describen las bioplataformas electroquímicas desarrolladas en formato integrado y las asistidas por MBs empleando SPCEs como transductores electroquímicos, para la determinación de autoanticuerpos frente a las proteínas CENPB (CENPB-Abs) y AQP4 (AQP4-Abs).

3.1.1. BIOPLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS EN FORMATO INTEGRADO

Tal y como se ha detallado anteriormente, la puesta a punto de la bioplataforma en formato integrado comprende el diseño del bioensayo, la optimización de las variables experimentales, la caracterización electroquímica de las etapas implicadas en su fabricación y determinación, el establecimiento de las características analíticas y operacionales, la evaluación de la selectividad y su aplicabilidad.

Bioplataforma electroquímica para la determinación de autoanticuerpos frente a la proteína centromérica B (CENPB-Abs)

La importancia de los autoanticuerpos frente al centrómero (ACAs) en general y, en particular, la de aquellos frente a la proteína centromérica B (CENPB-Abs), debido a su mayor relevancia y presencia clínica, ha llevado a considerar a estos últimos como un biomarcador de gran relevancia en el diagnóstico temprano y mínimamente invasivo de enfermedades autoinmunes sistémicas, como el SSc o el SLE, o reumáticas, como la RA o el SS. Atendiendo a esta relevancia y a la falta de tecnologías con las características que demanda la sociedad para su determinación, en el marco de esta Tesis Doctoral se han desarrollado en paralelo dos bioplataformas electroquímicas, una en formato integrado y otra asistida por MBs, para la determinación de CENPB-Abs explotando la química His-tag frente a la más convencional de la carbodiimida/succinimida (EDC/NHSS) para la inmovilización de la proteína antígeno (CENPB). Los resultados más relevantes de estas investigaciones derivaron en el artículo [Arévalo et al., 2023a], aportado en el Anexo.

El esquema del diseño de la bioplataforma desarrollada en formato integrado, representado en la ***figura 3.1***, se basa en la modificación de la superficie del electrodo de trabajo (WE) del SPCE con HS-NTA y $CoCl_2$ formando el complejo derivado de Co^{+2}-NTA, capaz de inmovilizar a la proteína CENPB a través de su tag de His. A continuación, los autoanticuerpos CENPB-Abs se capturaron selectiva y eficientemente y, por último, los de isotipo IgG se marcaron enzimáticamente con HRP-anti-hIgG. La detección electroquímica se llevó a cabo por amperometría, empleando el sistema redox HRP/H_2O_2/HQ, midiendo la variación de corriente catódica obtenida al adicionar el sustrato enzimático sobre la disolución que contenía el mediador redox al aplicar un potencial constante de –0.20 V frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag.

Debido al formato de inmunoensayo empleado, esta corriente era directamente proporcional a la concentración de CENPB-Abs en la muestra analizada.

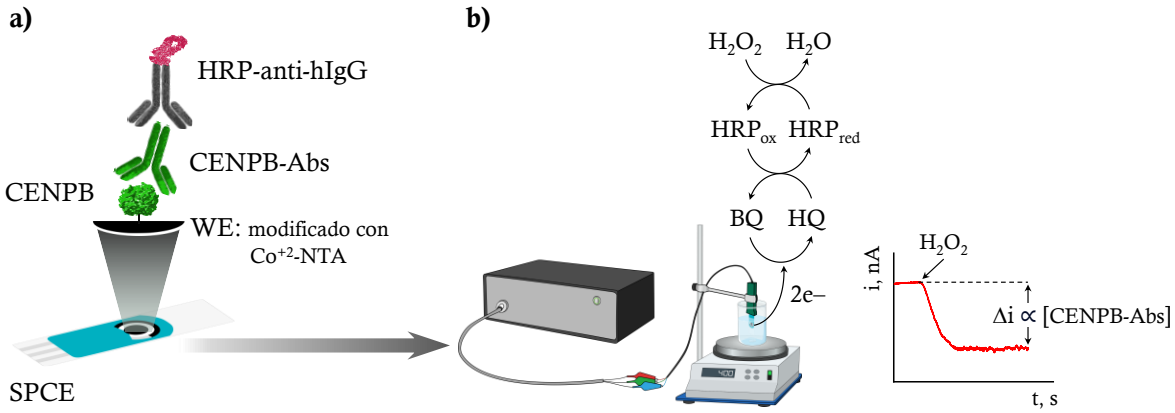


Figura 3.1. a) *Esquema del inmunoensayo indirecto de la bioplataforma electroquímica implementada en formato integrado para la determinación de CENPB-Abs.* ***b)*** *Transducción amperométrica en disolución bajo agitación constante.*

Optimización de las variables experimentales

Con el objetivo de explotar la química His-tag para la inmovilización de biorreactivos y demostrar sus ventajas frente a la química covalente asistida por la EDC/NHSS, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma electroquímica preparada explotando la química His-tag, según el protocolo descrito en la sección 2.5.1, o la química de la EDC/NHSS sobre *grafting* electroquímico con *p*-ABA según el protocolo descrito en [Martínez-García et al., 2016b] para 0.0 U mL^{-1} (B) y 10 U mL^{-1} (S), del estándar de CENPB-Abs. Es importante destacar que las respuestas amperométricas (Δi) se calcularon, de acuerdo con la ***ecuación 3.1***, como la diferencia en las respuestas amperométricas obtenidas con (bio)plataformas con (10 µg mL^{-1}, i_S) o sin (0 µg mL^{-1}, i_B) CENPB inmovilizada,

$$\Delta i\ (nA) = i_S\ (nA) - i_B\ (nA) \qquad \textbf{\textit{Ecuación 3.1}}$$

Los resultados del estudio, representados en la ***figura 3.2***, demostraron que la inmovilización de la proteína CENPB empleando la química del His-tag proporcionaba una mayor respuesta en presencia del estándar de CENPB-Abs, lo que se atribuye a una orientación y espaciado más adecuado de la proteína inmovilizada para el reconocimiento [Ley et al., 2011] en comparación con la inmovilización covalente, requiriendo esta última además la activación de los grupos carboxilo y el posterior bloqueo de los grupos residuales, aumentando la complejidad y el tiempo de ensayo.

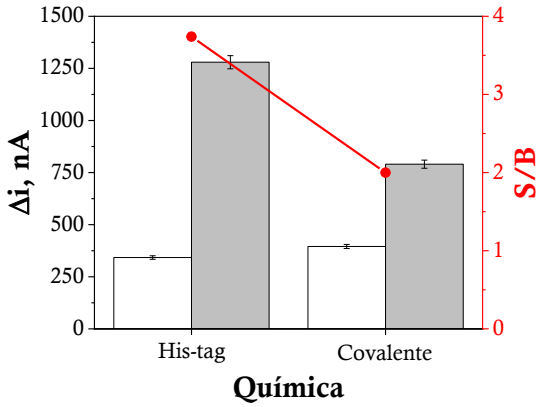


Figura 3.2. *Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas con bioplataformas preparadas inmovilizando la proteína antígeno (CENPB) empleando la química del His-tag o de la EDC/NHSS (covalente) en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 10 U mL^{-1} de disolución estándar de CENPB-Abs (S, barras grises) y las resultantes relaciones S/B (puntos y línea rojos).*

Además, es importante destacar que los experimentos control, representados en la ***figura 3.3,*** y en los que se compararon las respuestas amperométricas obtenidas con bioplataformas preparadas en presencia de HS-NTA y Co^{+2}, sin Co^{+2} y sin HS-NTA ni Co^{+2} en ausencia (0.0 U mL^{-1}, B) y presencia (10 U mL^{-1}, S) de estándar de CENPB-Abs demostraron la imposibilidad de determinar CENPB-Abs si la superficie electródica no se modificaba con HS-NTA y $CoCl_2$.

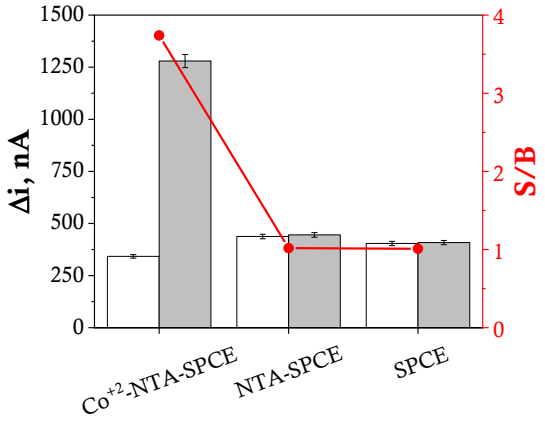


Figura 3.3. *Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y en presencia de 10 U mL^{-1} de estándar de CENPB-Abs (S, barras grises) y la relación S/B resultante (puntos y línea rojos) sobre bioplataformas preparadas con Co^{+2}-NTA-SPCE, NTA-SPCE o SPCE.*

Tras confirmar la viabilidad de la estrategia que implicaba la química del His-tag y con el fin de desarrollar una metodología competitiva frente a las existentes capaz de determinar CENPB-Abs a los niveles clínicamente relevantes, mediante un protocolo sencillo y con tiempos reducidos de ensayo, se optimizaron las variables experimentales clave implicadas en la preparación y funcionamiento de la bioplataforma. Para ello, se realizaron estudios univariantes que compararon

las respuestas amperométricas obtenidas, a –0.20 V frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag, en ausencia (0.0 U mL^{-1}, blanco (B)) y presencia (10 U mL^{-1}, señal (S)) del estándar de CENPB-Abs, tomando como criterio de selección de los valores óptimos la mayor relación S/B obtenida. Los resultados de estas optimizaciones se muestran en las ***figuras 3.4–3.6*** y se resumen en la **tabla 3.1**.

Las condiciones experimentales empleadas para la formación del complejo Co^{+2}-NTA sobre la superficie del electrodo de trabajo (WE) (concentración y tiempo de incubación de HS-NTA (1 mM, 2.5 horas) y $CoCl_2$ (7.5 mM, 30 minutos) [Conzuelo et al., 2013]) y para la medida amperométrica (potencial aplicado (–0.20 V *vs.* electrodo de pseudoreferencia de Ag); composición y pH de la disolución reguladora de medida (disolución PB 50 mM de pH 6.0); concentración de HQ (100 mM) y de H_2O_2 (100 mM) [Eguílaz et al., 2010; Conzuelo et al., 2012]) se optimizaron en investigaciones previas del Grupo.

La ***figura 3.4*** representa los resultados obtenidos en la optimización de la concentración (***figura 3.4.a***) y el tiempo de incubación (***figura 3.4.b***) de la disolución de proteína CENPB para su inmovilización. Los resultados demostraron un aumento gradual en la relación S/B con la concentración y tiempo de incubación hasta valores de 10 µg mL^{-1} y 15 minutos, respectivamente, valores a partir de los cuales la relación S/B disminuía progresivamente. Estos resultados, que se atribuyeron a un peor reconocimiento del biomarcador diana CENPB-Abs por impedimento estérico cuando se inmovilizaban elevadas concentraciones de proteína [Eletxigerra et al., 2014], nos llevaron a seleccionar una concentración de 10 µg mL^{-1} y un tiempo de incubación de 15 minutos en la disolución de CENPB para su inmovilización sobre los Co^{+2}-NTA-SPCEs.

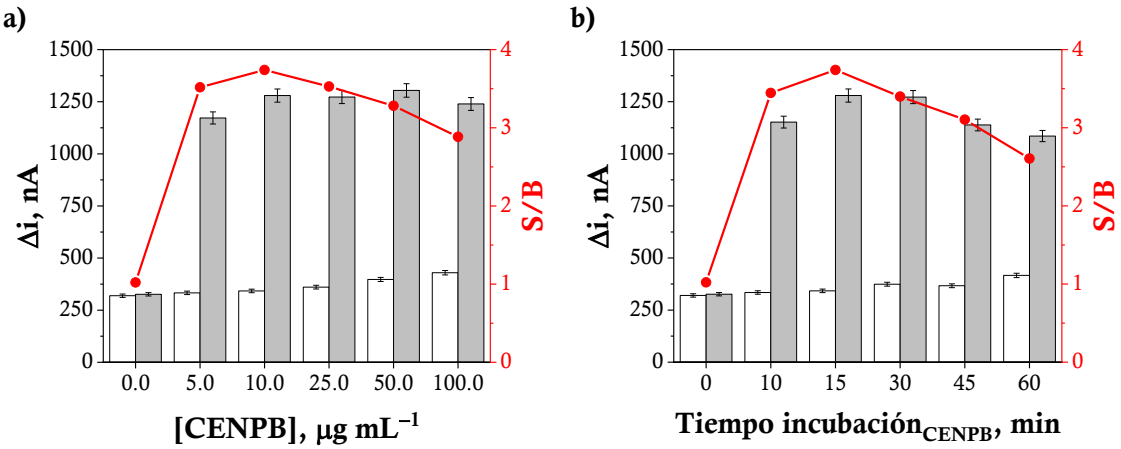


Figura 3.4. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma desarrollada en formato integrado explotando la química del His-tag para la determinación de CENPB-Abs en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 10 U mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de CENPB-Abs, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con* ***a)*** *la concentración y* ***b)*** *el tiempo de incubación de la disolución de CENPB para su inmovilización.*

Cabe destacar también que los resultados de estos estudios (barras "0" en paneles ***a)*** y ***b)*** de ***figura 3.4***) confirmaron que no era posible discriminar entre la ausencia y presencia de biomarcador diana en ausencia de proteína CENPB inmovilizada, lo que corroboraba la ausencia de adsorciones inespecíficas de CENPB-Abs y/o HRP-anti-hIgG sobre los Co^{+2}-NTA-SPCEs.

Los resultados de la ***figura 3.5*** demuestran que 15 minutos eran suficientes para asegurar la captura eficiente de los CENPB-Abs sobre la superficie de los CENPB-Co^{+2}-NTA-SPCEs, por lo que fue el tiempo seleccionado.

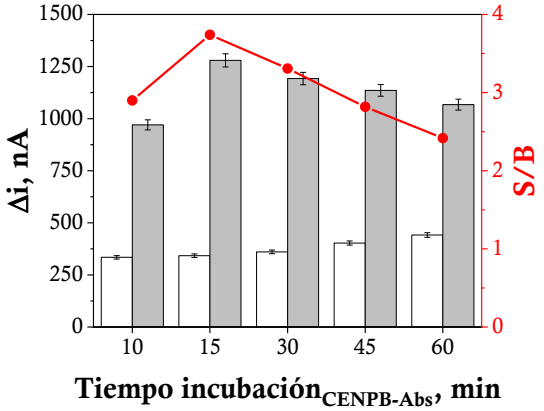


Figura 3.5. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma desarrollada en formato integrado explotando la química del His-tag para la determinación de CENPB-Abs en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 10 U mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de CENPB-Abs, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con el tiempo de incubación del estándar de CENPB-Abs sobre los CENPB-Co^{+2}-NTA-SPCEs.*

Por último, se optimizaron las mejores condiciones para el marcaje enzimático de los CENPB-Abs: volumen (***figura 3.6.a***) y tiempo de incubación (***figura 3.6.b***) con la disolución comercial de HRP-anti-hIgG. Como puede observarse en la figura, en ambos casos y tras alcanzar los valores óptimos, aunque las respuestas inespecíficas no variaban significativamente, sí disminuían progresivamente las respuestas específicas (y con ello las relaciones S/B), lo que se atribuyó a una pérdida en la eficiencia de las reacciones de inmunorreconocimiento por posibles fenómenos de agregación.

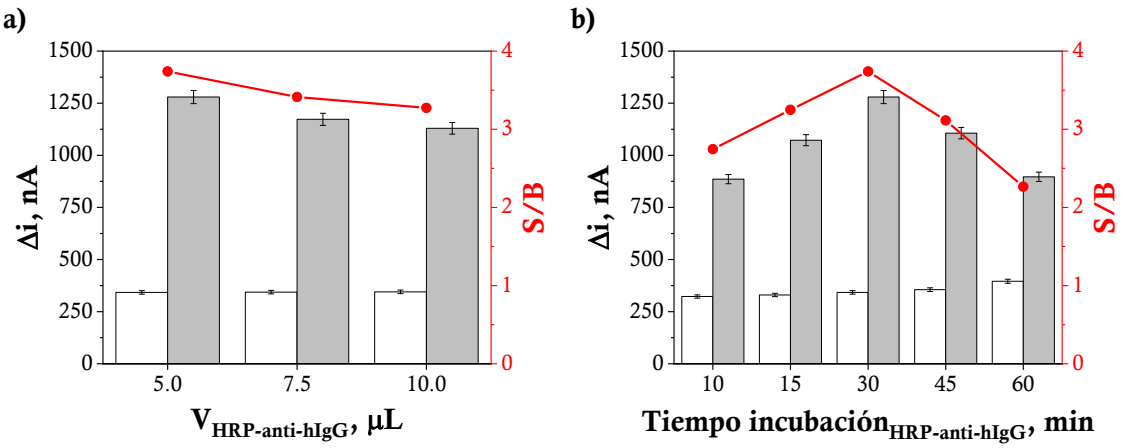


Figura 3.6. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma desarrollada en formato integrado explotando la química del His-tag para la determinación de CENPB-Abs en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 10 U mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de CENPB-Abs, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con el* ***a)*** *volumen y* ***b)*** *tiempo de incubación de la disolución de HRP-anti-hIgG para el marcaje enzimático de los CENPB-Abs capturados.*

Tabla 3.1. Variables experimentales evaluadas, rangos estudiados y valores seleccionados para el desarrollo de la bioplataforma electroquímica desarrollada en formato integrado y explotando la química del His-tag para la determinación de CENPB-Abs.

Variable experimental	*Rango estudiado*	*Valor seleccionado*
[CENPB], µg mL^{-1}	0.0–100.0	10.0
Tiempo de incubación CENPB, min	0–60	15
Tiempo de incubación CENPB-Abs, min	10–60	15
Volumen HRP-anti-hIgG, µL	5.0–10.0	5.0
Tiempo de incubación HRP-anti-hIgG, min	10–60	30

Caracterización electroquímica

Con el fin de estudiar la fiabilidad de la plataforma integrada desarrollada, se caracterizó mediante EIS y CV en presencia de $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, siguiendo los protocolos descritos en las secciones 2.6.2 y 2.6.3, respectivamente, el comportamiento electroquímico (***figura 3.7***) de las superficies resultantes tras cada una de las etapas que requiere la preparación de la bioplataforma.

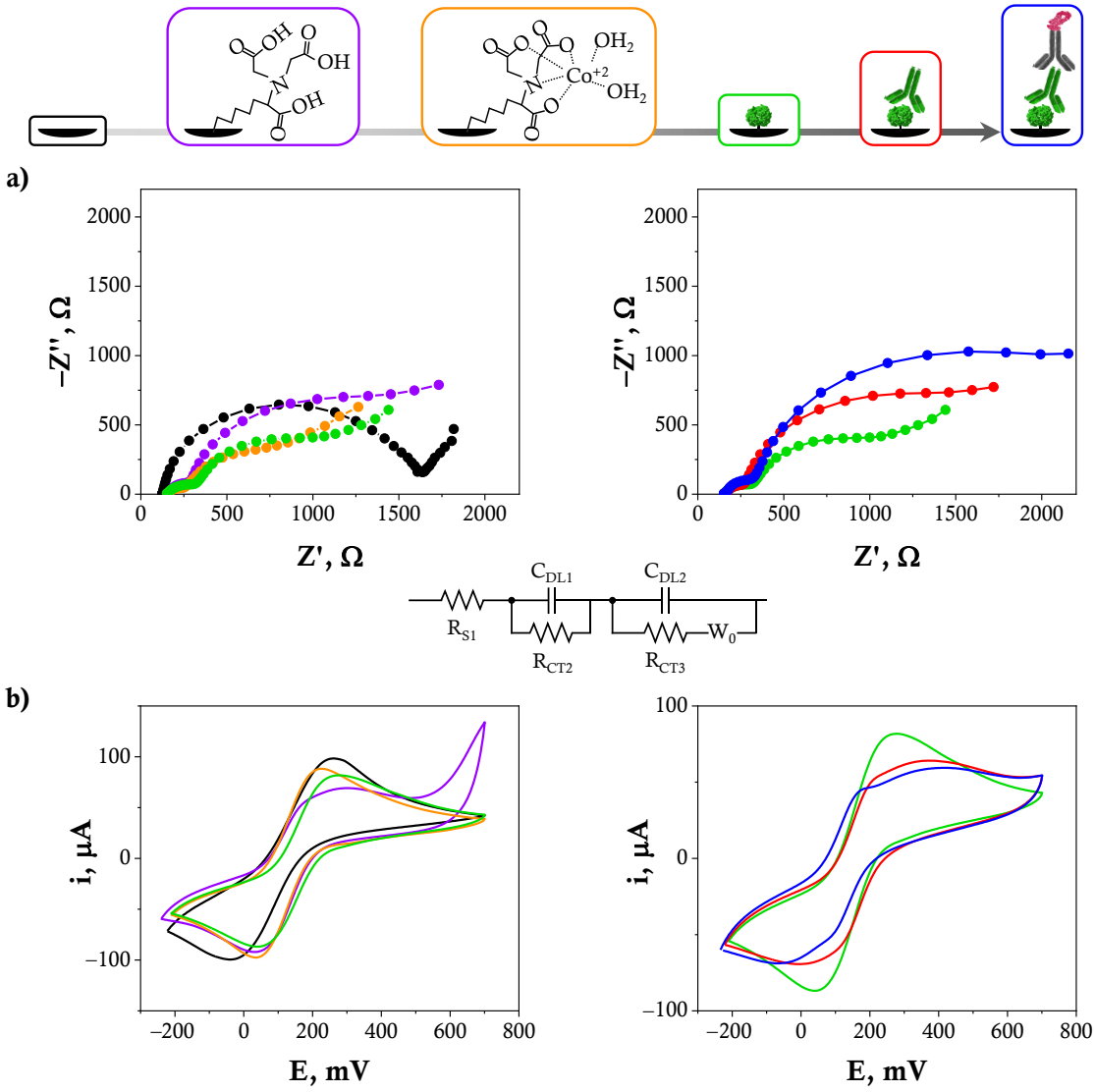


Figura 3.7. a) *Gráficos de Nyquist y circuito equivalente de Randles-Ershler al que se ajustan los resultados experimentales obtenidos por EIS y* ***b)*** *voltamperogramas cíclicos, registrados por EIS y por CV, respectivamente, en disoluciones de* $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ *sobre las superficies resultantes tras las diferentes etapas de preparación de la bioplataforma integrada para la determinación de CENPB-Abs: sobre SPCE (línea negra), NTA-SPCE (línea morada),* Co^{+2}*-NTA-SPCE (línea naranja), CENPB-*Co^{+2}*-NTA-SPCE (línea verde), CENPB-Abs-CENPB-*Co^{+2}*-NTA-SPCE (línea roja) y HRP-anti-hIgG-CENPB-Abs-CENPB-*Co^{+2}*-NTA-SPCE (línea azul). .*

Como puede observarse, la modificación de la superficie electródica de trabajo (WE) con el HS-NTA se traducía en la formación de dos capas [Uygun & Ertuğrul Uygun, 2014], apareciendo como resultado dos semicírculos en los gráficos de Nyquist, con un valor de R_{CT} de 1624 Ω para el semicírculo a elevadas frecuencias. Este aumento en la resistencia de transferencia de carga, producida por la repulsión electrostática entre el par redox y los grupos carboxilo (R-COO-) del NTA, se recuperó tras la etapa de formación del complejo con Co^{+2}, con valor de R_{CT} del

semicírculo de elevadas frecuencias de 944 Ω, al cargarse positivamente la superficie con los iones de Co^{+2} [Giess et al., 2004]. En cambio, y como se espera tras la formación de capas de material biológico no conductor que impiden el acceso del par redox a la superficie electródica, la inmovilización de los elementos biológicos supuso un progresivo aumento de la resistencia en la transferencia de carga con valores de R_{CT} a elevadas frecuencias de 1067, 1683 y 2330 Ω para las etapas de inmovilización de la proteína CENPB, captura selectiva de los CENPB-Abs y marcaje enzimático, respectivamente (***figura 3.7.a)***. Estos resultados experimentales se ajustan al circuito equivalente $R_{S1}(R_{CT2}C_{DL1})(C_{DL2}[R_{CT3}W_0]$ (***figura 3.7.a)***.

Los estudios de caracterización por EIS estaban de acuerdo con los obtenidos mediante CV (***figura 3.7.b***). Al modificar la superficie de trabajo con HS-NTA se producía una disminución en la intensidad de corriente de los picos voltamperométricos, que aumentaba de nuevo tras la formación del complejo de Co^{+2}. Finalmente, a medida que se inmovilizaron las moléculas biológicas, se producía una disminución progresiva de la intensidad de los picos concordante con el aumento en los valores de R_{CT} obtenidos por EIS.

Calibrado y características analíticas

Una vez optimizadas las condiciones experimentales para la fabricación de la bioplataforma HRP-anti-hIgG-CENPB-Abs-CENPB-Co^{+2}-NTA-SPCE, resumidas en la **tabla 3.1**, se caracterizó su comportamiento analítico construyendo el calibrado que se muestra en la ***figura 3.8*** para la determinación amperométrica de estándares de CENPB-Abs. En dicho calibrado se representa la diferencia de intensidad de corriente catódica obtenida entre las medidas para las disoluciones de diferente concentración de estándares de CENPB-Abs que proporcionan (bio)plataformas con (i_S) o sin (i_B) CENPB inmovilizada (***ecuación 3.1***), frente al logaritmo de la concentración de CENPB-Abs (log([CENPB-Abs])).

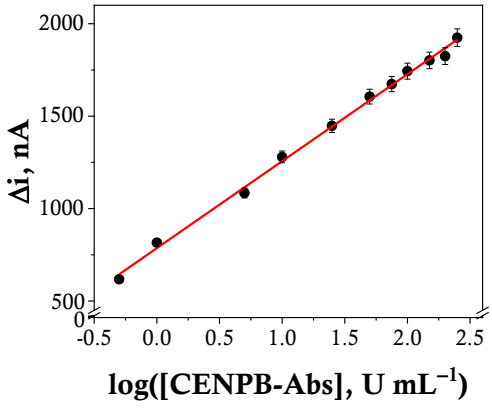


Figura 3.8. *Ajuste lineal de la curva de calibrado obtenida con la bioplataforma integrada para la determinación de estándares de CENPB-Abs.*

El calibrado obtenido se ajustó (R^2 = 0.997) a la ecuación: Δi (nA) = (470 ± 9) × log([CENPB], U mL^{-1}) + (786 ± 14), en el intervalo lineal comprendido entre 0.35 y 250 U mL^{-1}.

Siguiendo los criterios descritos en la sección 2.9 para el tratamiento de datos, los valores de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) obtenidos para la determinación de CENPB-Abs fueron de 0.11 y 0.35 U mL^{-1}, respectivamente. Cabe destacar que el límite de detección que demostró la bioplataforma integrada es inferior a los ofrecidos por los kits ELISA comerciales que emplean los mismos inmunorreactivos que la bioplataforma (*Centromere B Antibody* IgG ELISA kit (Creative Diagnostics, Cat. No.: DEIA1684), LOD = 1.0 U mL^{-1}) u otros diferentes (CENP-B IgG ELISA (Steffens biotechnische Analysen GmbH, Ref. 1511FE00), LOD = 0.2 U mL^{-1}; *Anti-centromere B* (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Cat. No.: ORG 633), LOD = 1 U mL^{-1}). Esto confirmó la buena sensibilidad de la bioplataforma desarrollada, cuyo LOQ era considerablemente inferior a los valores de corte séricos establecidos para este biomarcador en pacientes diagnosticados con enfermedades autoinmunes (7 U mL^{-1} en esclerosis sistémica [Van Leeuwen et al., 2021]) o reumáticas (10 U mL^{-1} en el SSc [Orgentec Diagnostika GmbH]), lo que demostró su utilidad para su aplicación en el ámbito clínico.

Además, la bioplataforma ofrecía una reproducibilidad mejorada frente a las metodologías ELISA convencionales (RSD ≈ 5–6 %). Este aspecto se evaluó comparando las respuestas amperométricas obtenidas para diez bioplataformas preparadas de la misma manera el mismo día y días distintos para 10 U mL^{-1} de estándar de CENPB-Abs, con valores de RSD de 2.5 y 2.9 %, respectivamente, lo que confirmó la robustez de los procedimientos experimentales empleados para la fabricación de la inmunoplataforma y la transducción electroquímica.

Estabilidad de almacenamiento

Se evaluó la estabilidad de almacenamiento de las biosuperficies CENPB-Co^{+2}-NTA-SPCE preparando un lote de electrodos modificados y almacenándolos a 4 ºC, tal y como se especifica en la sección 2.5.1. Cada día control, se realizaron medidas amperométricas en ausencia y presencia de 25 U mL^{-1} de estándar de CENPB-Abs.

Los resultados obtenidos, representados en la ***figura 3.9***, demostraron que las biosuperficies se mantenían dentro de los límites de control sin pérdida significativa de sensibilidad durante los 25 días posteriores a su preparación.

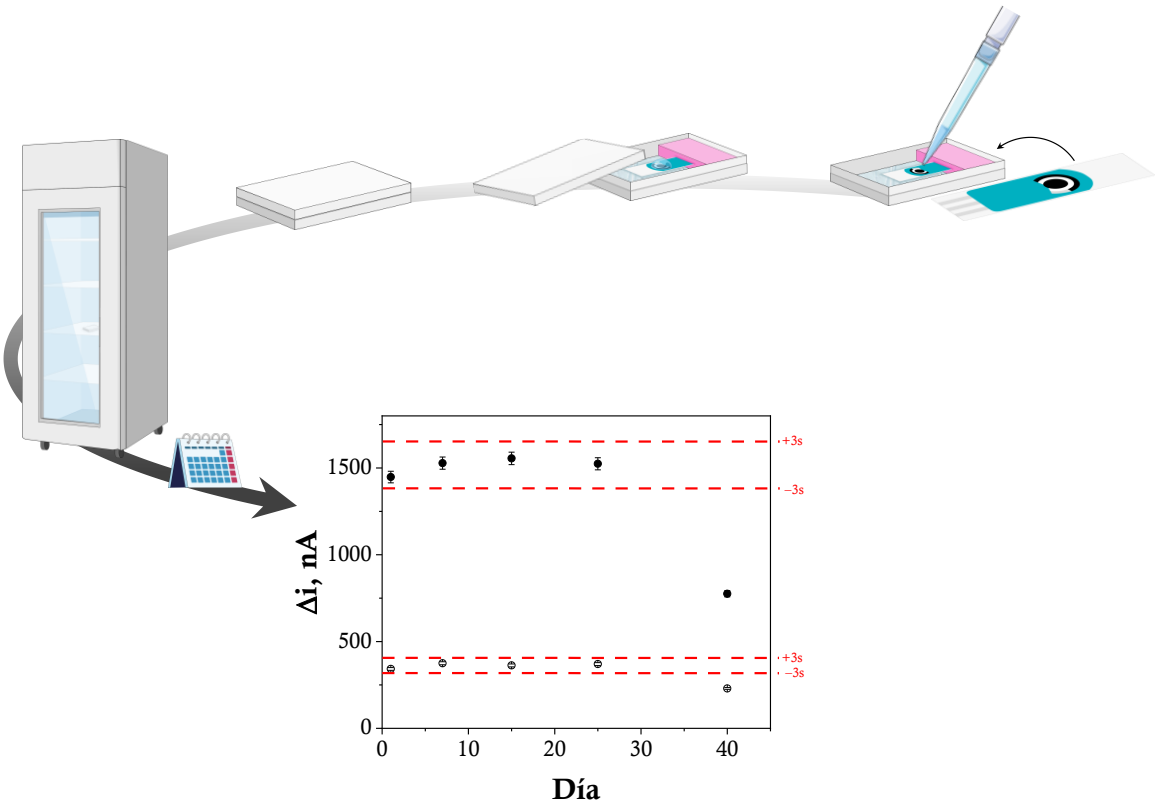


Figura 3.9. *Gráfica de control obtenida en el estudio de la estabilidad de almacenamiento de las biosuperficies CENPB-Co^{+2}-NTA-SPCE a 4 ºC en condiciones húmedas. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (puntos blancos) y presencia (puntos negros) de 25 U mL^{-1} de estándar de CENPB-Abs. Los límites de control (líneas discontinuas rojas) se establecieron como ± 3s del valor promedio obtenido de tres replicas realizadas el día de preparación de la biosuperficie (día 0).*

Estudios de regeneración y reutilización del biosensor

Basándose en la competencia entre el imidazol y las histidinas por el complejo Co^{+2}-NTA [Li et al., 2016; Qu et al., 2021] se evaluó la posibilidad de regenerar la superficie de la bioplataforma con el fin de poder reutilizar los soportes modificados con el derivado de NTA mediante la incubación, en primer lugar, durante 3 horas de una disolución que contenía imidazol 300 mM, NaCl 300 mM y 0.01 % de Tween 20®, preparada en disolución reguladora PB 50 mM de pH 8.0, y en segundo lugar, durante 40 minutos con agua desionizada. De esta manera se conseguía desplazar la proteína inmovilizada a través de su tag de His.

Los resultados, representados en la ***figura 3.10***, demostraron que siguiendo este protocolo la superficie electródica se podía regenerar al menos cinco veces sin pérdida de sensibilidad.

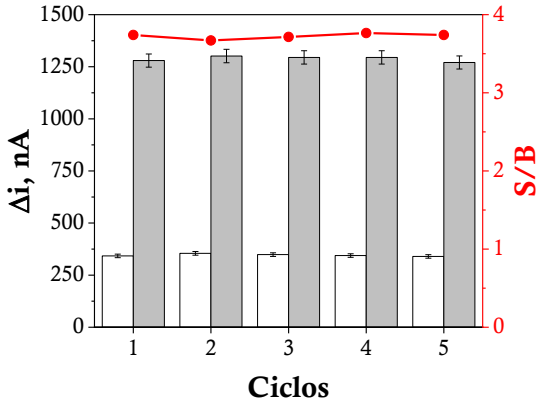


Figura 3.10. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 10 U mL^{-1} de estándar de CENPB-Abs (S, barras grises), y relaciones S/B resultantes (puntos y línea rojos) después de sucesivos procesos de regeneración de la superficie electródica modificada con imidazol.*

Estudio de selectividad

Se evaluó la selectividad de la bioplataforma comparando las respuestas amperométricas proporcionadas para disoluciones estándares de CENPB-Abs de 0 o 10 U mL^{-1} preparadas en ausencia y presencia de otras proteínas y autoanticuerpos que pueden encontrarse en fluidos biológicos, como en las muestras de suero. Estos potenciales interferentes se ensayaron a las concentraciones que se indican en la ***figura 3.11*** y que son las descritas para individuos sanos en este tipo de muestras.

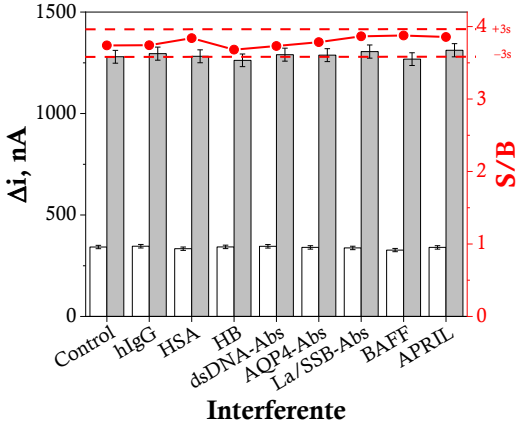


Figura 3.11. *Respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma integrada para disoluciones estándar de 0 (B, barras blancas) y 10 U mL^{-1} (S, barras grises) de CENPB-Abs, preparadas en ausencia (control) y presencia de 1 mg mL^{-1} hIgG; 50 mg mL^{-1} HSA; 5 mg mL^{-1} HB; 25 U mL^{-1} dsDNA-Abs; 1 ng mL AQP4-Abs; 5 U mL^{-1} La/SSB-Abs; 1 ng mL^{-1} BAFF; 1 ng mL^{-1} APRIL, y las correspondientes relaciones S/B (puntos y líneas rojos).*

Los resultados obtenidos mostraron relaciones S/B similares en todos los casos, por lo que puede concluirse que ninguno de los biomarcadores estudiados interfería significativamente en la determinación de CENPB-Abs y que la bioplataforma integrada desarrollada es selectiva al biomarcador diana.

Aplicación al análisis de muestras de suero

Antes de enfrentar la bioplataforma desarrollada al análisis de muestras reales se aplicó al análisis de los controles negativo (3 U mL^{-1}) y positivo (35 U mL^{-1}) incluidos en el kit ELISA comercial (Cat. No.: DEIA1684).

Los resultados obtenidos, empleando el protocolo descrito en la sección 2.5.1 y presentados de acuerdo con la ***ecuación 2.8*** (n = 3, α = 0.05), fueron: 3.2 ± 0.2 U mL^{-1} y 34 ± 2 U mL^{-1} de CENPB-Abs, respectivamente, confirmándose la excelente precisión y exactitud de los resultados que proporcionó la bioplataforma desarrollada.

A continuación, el método se aplicó a la determinación del biomarcador en muestras de suero de individuos sanos y pacientes diagnosticados con enfermedades autoinmunes considerados positivos a CENPB-Abs.

En primer lugar, se evaluó la posible existencia de efecto matriz en las muestras. Para ello, se compararon las pendientes obtenidas de los calibrados construidos a partir de disoluciones estándar de CENPB-Abs preparadas en disolución comercial BB o en suero de un individuo sano diluido 50 veces (***figura 3.12***). El estudio estadístico de los valores de las pendientes del calibrado externo (470 ± 9 nA por década de concentración (U mL^{-1})) y del calibrado de adiciones estándar (456 ± 11 nA por década de concentración (U mL^{-1})), a través de la comparación de los resultados de F_{exp} (***ecuación 2.7***, 8.72) y t_{exp} (***ecuación 2.5***, 1.052) frente a los valores tabulados ($F_{tab,\,3,\,3}$ = 15.44; $t_{tab,\,6,\,0.05}$ = 2.447) permitió descartar la presencia de efecto matriz.

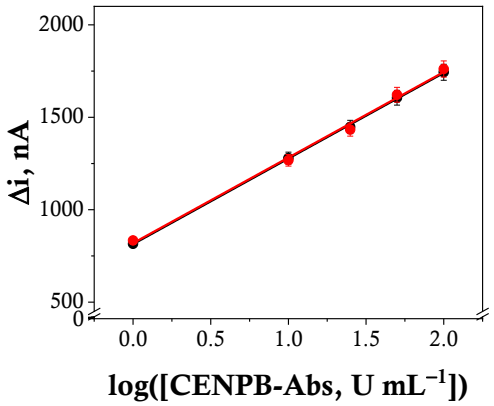


Figura 3.12. *Calibrados construidos con la bioplataforma integrada con disoluciones estándar de CENPB-Abs preparadas en BB (puntos negros) y en suero de un individuo sano diluido 50 veces (puntos rojos) y sus ajustes por regresión lineal (línea negra y roja respectivamente).*

De esta manera, las concentraciones de CENPB-Abs en las muestras de suero se obtuvieron por simple interpolación de las respuestas amperométricas que proporcionó la bioplataforma para cada muestra diluida 50 veces en la recta de calibrado construida con disoluciones estándar de CENPB-Abs preparadas en disolución comercial BB (***figura 3.8***).

Los resultados obtenidos para el análisis de tres réplicas de cada muestra, según los cálculos de la sección 2.9, se resumen en la **tabla 3.2** y se representan gráficamente en la ***figura 3.13***. En la tabla se incluyen también los resultados obtenidos analizando las mismas muestras con el kit ELISA comercial (Creative Diagnostics, Cat. No.: DEIA1684) que emplea los mismos inmunorreactivos que la bioplataforma. También se incluyen en la misma tabla los valores indicados en las especificaciones de las muestras suministradas por Central BioHub® GmbH.

Tabla 3.2. Niveles séricos de CENPB-Abs determinados con la bioplataforma electroquímica desarrollada y con el kit ELISA comercial en muestras de suero de individuos sanos y pacientes diagnosticados con enfermedades autoinmunes positivos al biomarcador diana y los indicados en las especificaciones del proveedor de estas.

Sujetos	***Muestra***	***[CENPB-Abs], U mL^{-1}***			t_{exp}
		Bioplataforma	*ELISA*	*Especificaciones*	
Sanos	1	3.4 ± 0.2 (2.9)	3.5 ± 0.6 (6.6)	*< 7*	0.084
	2	6.0 ± 0.5 (3.2)	5.1 ± 0.9 (7.0)		1.095
	3	5.9 ± 0.5 (3.5)	5.4 ± 0.6 (4.3)		0.704
	4	5.8 ± 0.5 (4.3)	5.4 ± 0.9 (6.5)		0.487
Pacientes	5	282 ± 12 (2.2)	285 ± 35 (5.5)	*> 240*	0.346
	6	29 ± 1 (3.5)	28 ± 5 (7.2)	*27*	0.803
	7	153 ± 14 (3.6)	153 ± 22 (5.7)	*157*	0.480

**Los valores de RSD (%) se indican entre paréntesis.*

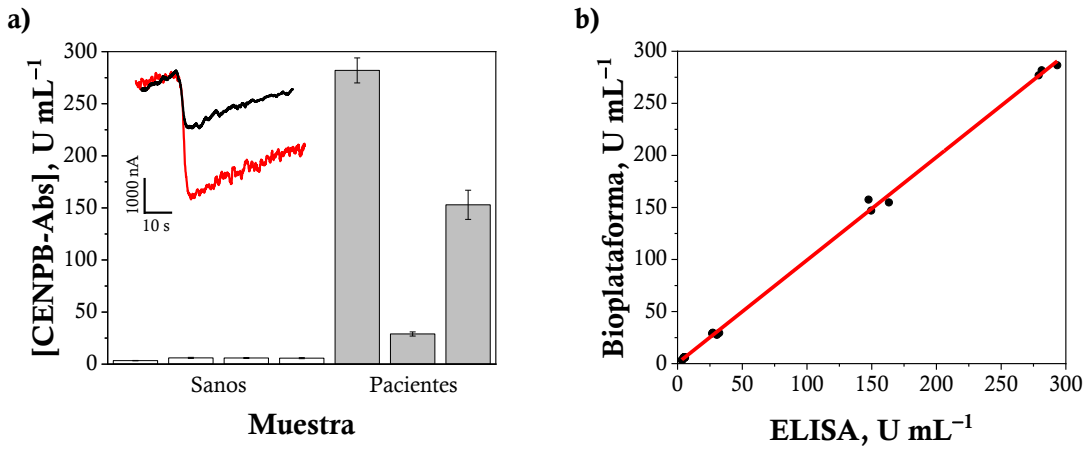


Figura 3.13. a) *Niveles séricos de CENPB-Abs proporcionados por la bioplataforma desarrollada en muestras de suero de individuos sanos y pacientes diagnosticados con enfermedades autoinmunes considerados positivos al biomarcador diana y amperogramas representativos obtenidos para la muestra de un individuo sano (línea negra) y un paciente (línea roja).* ***b)*** *Gráfica de correlación obtenida al comparar los niveles séricos de CENPB-Abs proporcionados por la bioplataforma y por la metodología ELISA convencional, empleando los mismos inmunorreactivos.*

Los resultados obtenidos demostraron una sobreexpresión de los niveles de CENPB-Abs en los pacientes considerados positivos respecto a los individuos sanos, siendo estas concentraciones notablemente mayores al valor de corte sérico establecido para este biomarcador en pacientes diagnosticados con enfermedades autoinmunes y reumáticas (7–10 U mL^{-1}).

Además, el contenido endógeno proporcionado por la bioplataforma desarrollada concordaba perfectamente con el indicado por el mercado de especímenes, Central Biohub® GmbH, en el que se adquirieron las muestras analizadas.

Finalmente, en el estudio estadístico de los niveles resultantes del análisis de las muestras empleando la bioplataforma desarrollada y el kit ELISA comercial, se encontró que todos los valores de t_{exp} eran inferiores al valor $t_{tab,4,0.05}$ (2.776), lo que permitió confirmar la ausencia de diferencias significativas entre ambos resultados. Los valores de la ordenada en el origen (0.5 ± 0.8) y la pendiente (0.989 ± 0.007) de la gráfica de correlación mostrada en la ***figura 3.13.b***, que incluían el 0 y el 1, respectivamente, también confirmaron la exactitud y fiabilidad de los resultados que proporcionaba la bioplataforma en este tipo de muestras.

Los resultados de esta investigación han demostrado las ventajas que ofrece la química del His-tag frente a la más convencional de la EDC/NHSS para la fabricación de bioplataformas en formato integrado en términos de sensibilidad, tiempo de preparación, cantidad de proteína a inmovilizar y posibilidad de generación. Empleando esta metodología se ha desarrollado la primera bioplataforma electroquímica para la determinación de CENPB-Abs, que se ofrece competitiva frente a la metodología ELISA comúnmente empleada para la determinación de este

biomarcador en términos de sensibilidad, reproducibilidad y, por el tipo de transducción que emplea, compatible con determinaciones multiplexadas y con aplicabilidad en el punto de atención.

Asimismo, la bioplataforma desarrollada ha demostrado ser adecuada para la determinación precisa, exacta y sin efecto matriz del contenido endógeno de CENPB-Abs en muestras de suero de individuos sanos y de pacientes diagnosticados con enfermedades autoinmunes tras una simple dilución, lo que la convierte en una herramienta muy atractiva para el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes.

3.1.2. BIOPLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS ASISTIDAS POR MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

En esta sección se discutirán los resultados más relevantes obtenidos en el diseño, caracterización y aplicación de bioplataformas electroquímicas asistidas por MBs para la determinación individual de los autoanticuerpos frente a AQP4 (AQP4-Abs), dsDNA (dsDNA-Abs) y CENPB (CENPB-Abs).

Bioplataforma electroquímica para la determinación de autoanticuerpos frente a AQP4 (AQP4-Abs)

Considerando el papel cada vez más determinante que presentan los autoanticuerpos para la detección, diagnóstico, seguimiento y clasificación de múltiples enfermedades, incluyendo las autoinmunes, en esta Tesis Doctoral también se ha desarrollado una bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación de autoanticuerpos frente a la proteína AQP4 (AQP4-Abs), biomarcador de relevancia en neuromielitis óptica (NMO) y también asociado con otras enfermedades autoinmunes como el SLE y con displasias neurodegenerativas como la AD. Los resultados más relevantes de esta investigación derivaron en el artículo [Arévalo et al., 2021], incluido en el Anexo de esta Memoria.

Los fundamentos de la preparación y medida amperométrica, esquematizados en la ***figura 3.14*** y detallados en la sección 2.5.2, implican la inmovilización de la proteína APQ4 adquirida ya biotinilada sobre el microsoporte magnético comercial funcionalizado con estreptavidina (Estrep-MBs) para la captura eficiente y selectiva del biomarcador diana, y su posterior marcaje enzimático con el anticuerpo secundario (HRP-anti-hIgG), para llevar a cabo la transducción amperométrica empleando el sistema redox HRP/H_2O_2/HQ en disoluciones agitadas.

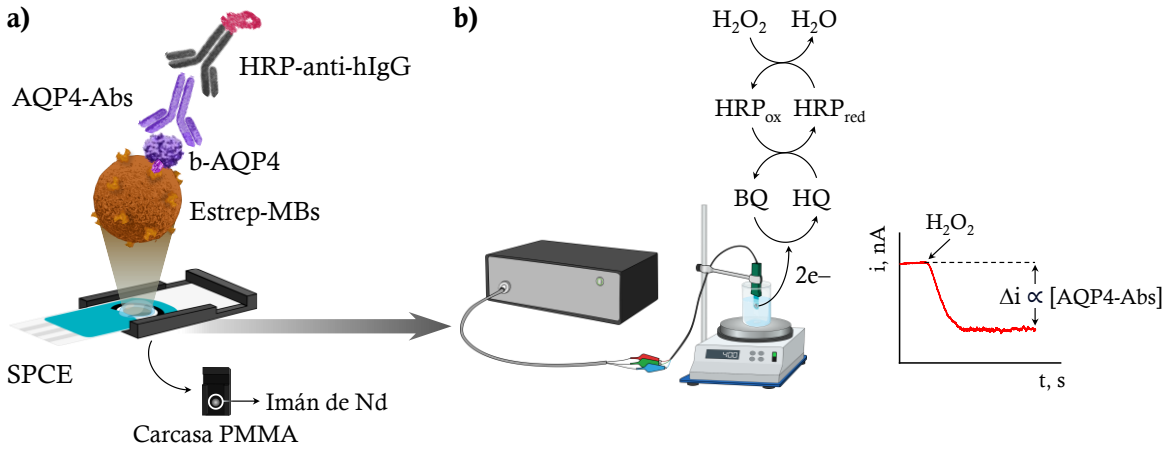


Figura 3.14. a) *Esquema del inmunoensayo indirecto que explota la bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación de AQP4-Abs.* ***b)*** *Transducción amperométrica en disolución bajo agitación constante.*

Optimización de las variables experimentales

La influencia de las variables experimentales implicadas en la preparación de la bioplataforma se evaluó, siguiendo el criterio de optimización explicado anteriormente, con el objetivo de conseguir el mayor rendimiento analítico. Se seleccionaron como valores óptimos los que proporcionaban la mayor relación S/B al comparar las señales amperométricas obtenidas en presencia (2.5 ng mL^{-1}, señal (S)) y ausencia (0.0 ng mL^{-1}, blanco (B)) de estándar de AQP4-Abs. Los resultados obtenidos en todos estos estudios se resumen en la **tabla 3.3** y se muestran en la ***figura 3.15***.

Como se puede observar en las ***figuras 3.15.a***,***b***,***d***,***e***,***f*** los valores de la relación S/B aumentaban por incremento de las señales específicas con la carga de proteína y marcaje enzimático (disminución del factor de dilución) o con el tiempo de incubación, hasta alcanzar el valor considerado como óptimo (mayor S/B), y a partir de estos valores máximos se producía un descenso acusado en los valores de la relación S/B. Estos resultados se atribuyeron tanto a la disminución de las respuestas específicas (***figuras 3.15.a***,***b***,***f)***, por impedimentos estéricos y/o fenómenos de agregación que dificultaban los procesos de inmunorreconocimiento, como al aumento de las adsorciones inespecíficas (***figura 3.15.f)*** cuando se inmovilizaban/empleaban grandes cantidades de proteína y/o anticuerpo secundario.

Por otro lado, se compararon los resultados que se obtenían realizando la captura de la proteína por parte de los AQP4-Abs y su marcaje enzimático en una única etapa o en dos etapas independientes consecutivas. Los resultados, mostrados en la ***figura 3.15.c***, demostraron la ausencia de discriminación significativa cuando la captura y el marcaje de los AQP4-Abs se realizaba simultáneamente, lo que se atribuyó a una captura impedida de los AQP4-Abs cuando éstos estaban marcados con el anticuerpo secundario. Teniendo en cuenta estos resultados, el inmunoensayo debía implementarse en dos etapas partiendo de las b-AQP4-Estrep-MBs.

Es importante destacar también que la falta de discriminación en ausencia de proteína inmovilizada (barras "0" en ***figuras 3.15.a***,***b***) confirmaba que, de acuerdo con el esquema de ensayo, la determinación del biomarcador diana ocurría únicamente a través de su reconocimiento por la AQP4 inmovilizada sobre las MBs.

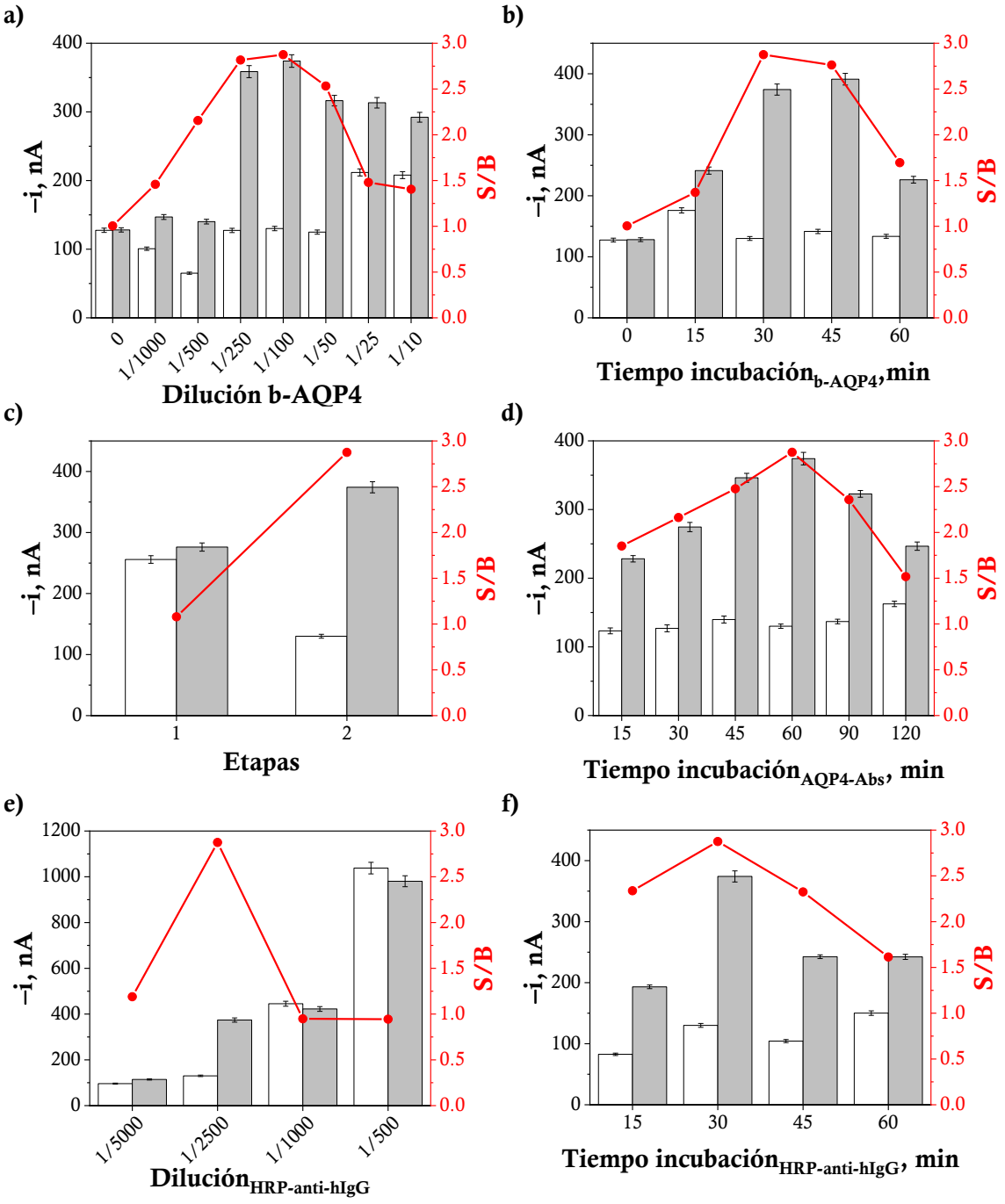


Figura 3.15. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de AQP4-Abs, en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 2.5 ng mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de AQP4-Abs, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con* ***a)*** *la dilución y* ***b)*** *tiempo de incubación de b-AQP4,* ***c)*** *el número de etapas en las que se realiza el inmunoensayo,* ***d)*** *el tiempo de incubación de los AQP4-Abs y* ***e)*** *la dilución y* ***e)*** *tiempo de incubación de HRP-anti-hIgG.*

Tabla 3.3. Variables experimentales evaluadas, rango estudiado y valor seleccionado, para la optimización de la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de AQP4-Abs.

Variable experimental	*Rango estudiado*	*Valor seleccionado*
Dilución b-AQP4	0–1/10	1/100
Tiempo de incubación b-AQP4, min	0–60	30
Nº etapas realización de inmunoensayo	1, 2	2
Tiempo de incubación AQP4-Abs, min	15–120	60
Dilución HRP-anti-hIgG	1/5000–1/500	1/2500
Tiempo de incubación HRP-anti-hIgG, min	15–60	30

Calibrados y características analíticas

En las condiciones experimentales seleccionadas se obtuvo la curva de calibrado representada en la ***figura 3.16*** para disoluciones estándar de AQP4-Abs. Se obtuvo una dependencia lineal (R^2 = 0.993) entre la corriente catódica y el logaritmo de la concentración de estándar de AQP4-Abs en el intervalo comprendido entre 0.03 y 2.5 ng mL^{-1} de acuerdo con la ecuación: –i (nA) = (332 ± 4) nA + (96 ± 4) (nA por década de concentración) × log([APQ4-Abs], ng mL^{-1}). Se observó que a concentraciones superiores a 2.5 ng mL^{-1} se producía un descenso drástico en la respuesta amperométrica atribuido al efecto Hook por saturación de la b-AQP4 y el HRP-anti-hIgG con las altas concentraciones de analito [Park & Kricka, 2013].

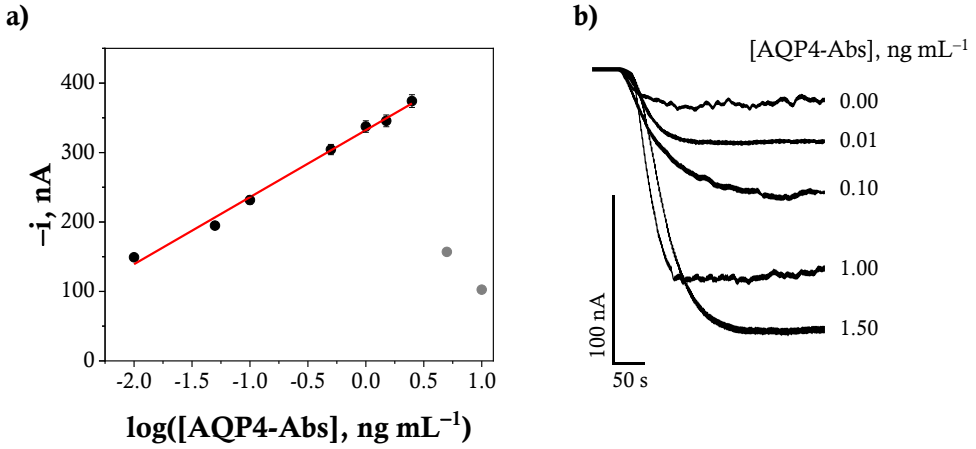


Figura 3.16. a) *Curva de calibrado ajustada y* ***b)*** *registros amperométricos reales obtenidos con la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de AQP4-Abs.*

Los valores de los límites de detección y cuantificación, y la reproducibilidad, se estimaron del modo descrito en el apartado 2.9 y de acuerdo con las ***ecuaciones 2.2***, ***2.3*** y ***2.4***, a partir de las medidas que proporcionaban diez bioplataformas para disoluciones estándar de 0.0 y 0.5 ng mL^{-1} de AQP4-Abs, obteniéndose 8.8 y 29.2 pg mL^{-1} y 2.4%, respectivamente. La ausencia de otros

biosensores descritos para la determinación de AQP4-Abs limitaron la comparación de los resultados que proporcionaba la bioplataforma a los de la tecnología ELISA. El valor del LOD, más de 100 veces menor (8.8 pg mL^{-1} *vs.* 1 ng mL^{-1}), la mejor reproducibilidad (2.4 % *vs.* 8–10 %) y la reducción de los tiempos de ensayo (90 *vs.* 120 minutos, desde la inmovilización de la proteína sobre las MBs o la placa ELISA, respectivamente) confirmaron las ventajas competitivas de la bioplataforma desarrollada en comparación con el kit ELISA comercial que empleaba los mismos inmunorreactivos (Cusabio, Cat. No.: CSB-E13568h).

Estabilidad de almacenamiento

La estabilidad de las b-AQP4-Estrep-MBs, almacenadas en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado a 4 ºC, se evaluó comparando las respuestas amperométricas proporcionadas por las bioplataformas preparadas a partir de éstas en ausencia y presencia de 2.5 ng mL^{-1} de estándar de AQP4-Abs cada día de estudio. Los resultados obtenidos (***figura 3.17***) permitieron concluir que las b-AQP4-Estrep-MBs podían almacenarse durante 20 días sin pérdida de señal.

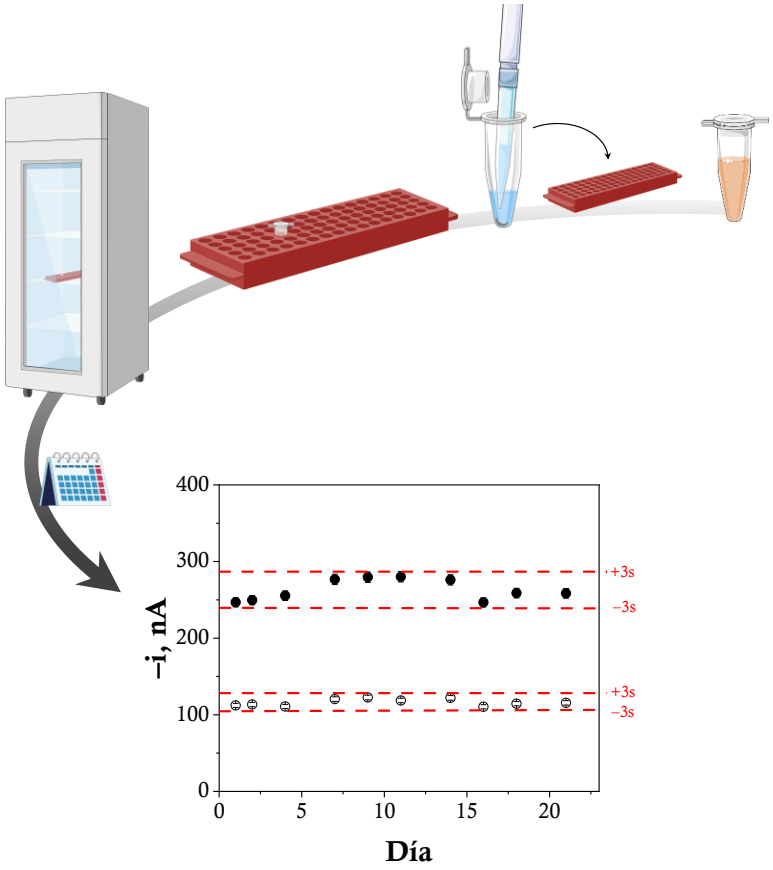


Figura 3.17. *Gráfica de control obtenida en el estudio de estabilidad de almacenamiento de las b-AQP4-Estrep-MBs en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado a 4 ºC. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas cada día de control con bioplataformas preparadas a partir de ellas en ausencia (puntos blancos) y presencia (puntos negros) de 2.5 ng mL^{-1} de estándar de AQP4-Abs. Los límites de control (líneas discontinuas rojas) se establecieron como ± 3s del valor promedio obtenido de tres réplicas realizadas el día de preparación de las b-AQP4-Estrep-MBs.*

Estudio de selectividad

Con el fin de asegurar la selectividad de la bioplataforma hacia los AQP4-Abs, se evaluó la influencia de la presencia de otras biomoléculas coexistentes en las muestras de suero a analizar, comparando las respuestas amperométricas obtenidas en el análisis de disoluciones estándar de 0.0 y 2.5 ng mL^{-1} de AQP4-Abs preparadas en ausencia (control) y en presencia de cada interferente a la concentración esperable en muestras de individuos sanos.

Como se observa en la ***figura 3.18***, tanto la inmunoglobulina G humana (hIgG) como la albúmina de suero humano (HSA) sí representaban una interferencia significativa en la determinación de AQP4-Abs. Esto se atribuyó, por un lado, a las adsorciones inespecíficas de las hIgGs sobre el sustrato magnético y, por otro lado, a las posibles impurezas de anticuerpos humanos circulantes reactivos en la HSA no demasiado purificada [Muñoz-San Martín et al., 2022], hecho confirmado por la ausencia de interferencia en presencia de albúmina de suero bovino (BSA). No obstante, es importante destacar que las interferencias significativas observadas se minimizaban cuando la hIgG y la HSA se ensayaban 2500 y 100 veces menos concentradas, respectivamente.

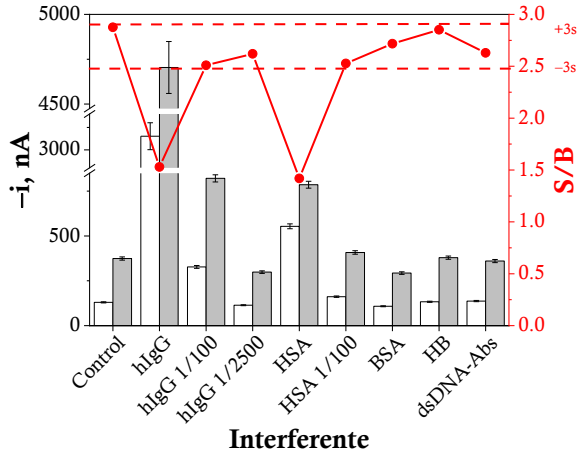


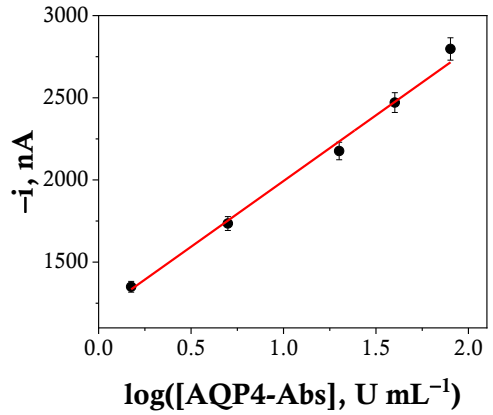
Figura 3.18. *Respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma asistida por MBs para disoluciones estándar de 0.0 (B, barras blancas) y 2.5 (S, barras grises) ng mL^{-1} de AQP4-Abs, preparadas en ausencia (control) y presencia de 1 mg mL^{-1} hIgG; 0.01 mg mL^{-1} hIgG (1/100); 0.0004 mg mL^{-1} hIgG (1/2500); 50 mg mL^{-1} HSA; 0.5 mg mL^{-1} HSA (1/100); 5 mg mL^{-1} BSA; 5 mg mL^{-1} HB; 25 U mL^{-1} dsDNA-Abs, y sus correspondientes relaciones S/B (puntos y líneas rojos).*

Aplicación al análisis de muestras de suero

La bioplataforma desarrollada se aplicó al análisis de AQP4-Abs en muestras de suero de individuos sanos y de pacientes con SLE o AD, ante la imposibilidad de disponer de muestras de pacientes con NMO.

En primer lugar, se analizaron los controles negativo y positivos (control I y II) proporcionados por el kit ELISA comercial (RSR Limited). Teniendo en cuenta que los estándares proporcionados en este kit comercial eran diferentes a los empleados durante la caracterización analítica de la bioplataforma, y cuyas unidades de medida eran distintas (U mL^{-1} *vs.* ng mL^{-1}), se realizó un calibrado externo preparado con estos nuevos estándares comerciales (***figura 3.19***) para interpolar las respuestas amperométricas obtenidas para cada control sin diluir en él.

a)



b)

Parámetro analítico	***Valor***
R^2	0.996
Pendiente, nA por década de concentración (U mL^{-1})	822 ± 40
Ordenada en el origen, nA	1171 ± 50

Figura 3.19. a) *Curva de calibrado ajustada y* ***b)*** *resumen de los parámetros analíticos resultantes del ajuste lineal obtenidos con la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de estándares de AQP4-Abs proporcionados por el kit comercial (RSR Limited).*

Los niveles obtenidos en el análisis de tres réplicas del control negativo y los controles positivos (control I y II) a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con la bioplataforma desarrollada, resumidos en la **tabla 3.4**, se compararon con los especificados en el kit comercial, también incluidos en la tabla. Estos resultados confirmaron la excelente exactitud de los resultados que proporcionó la bioplataforma desarrollada.

Tabla 3.4. Niveles de AQP4-Abs determinados con la bioplataforma electroquímica asistida por MBs desarrollada en los controles suplementados por el kit comercial (RSR Limited).

Control	***[AQP4-Abs], U mL^{-1}***	
	Bioplataforma	*Especificaciones*
Negativo	0.15 ± 0.02 (5.62)	-
I	12.0 ± 0.9 (4.28)	*12.1; 12.0*
II	28 ± 3 (5.59)	*28; 28*

**Los valores de RSD (%) se indican entre paréntesis.*

Tras confirmar la exactitud en el análisis de los controles comerciales, la bioplataforma se aplicó a la determinación de AQP4-Abs en muestras de suero de individuos sanos y pacientes con SLE y con AD. Para ello primero se evaluó la posible existencia de efecto matriz mediante la

comparación de las pendientes del calibrado externo obtenido a partir de disoluciones estándar de AQP4-Abs preparadas en $SD_{AQP4\text{-}Abs}$ y el calibrado de adiciones estándar preparado en una muestra de suero de un individuo sano diluida 2500 veces. El estudio estadístico confirmó que al 95% de probabilidad no había efecto matriz ($t_{exp} = 0.446 < t_{tab,4,0.05} = 2.776$) siendo comparables las varianzas obtenidas ($F_{exp} = 2.43 < F_{tab,2,2} = 39.00$) para las pendientes del calibrado preparado en disoluciones estándar ((96 ± 4) nA por década de concentración) y en la muestra de suero diluida 2500 veces ((91 ± 12) nA por década de concentración), por lo que la determinación en las muestras de suero se llevó a cabo por simple interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para cada muestra diluida 2500 veces en el calibrado externo preparado en $SD_{AQP4\text{-}Abs}$.

Para demostrar la fiabilidad de los resultados obtenidos con la bioplataforma electroquímica desarrollada, también se analizaron las mismas muestras con el kit ELISA comercial que empleaba los mismos inmunorreactivos que la bioplataforma. En la **tabla 3.5** se resumen y comparan estadísticamente para $t_{tab,4,0.05} = 2.776$ los niveles obtenidos por cada método, y su representación gráfica y correlación se muestran en la ***figura 3.20***.

Tabla 3.5. Niveles séricos de AQP4-Abs determinados empleando la bioplataforma electroquímica asistida por MBs y la metodología ELISA en muestras de individuos sanos y pacientes con SLE y AD.

Sujetos	***Muestra***	***[AQP4-Abs], ng mL^{-1}***		t_{exp}	$t_{tab,4,0.05}$
		Bioplataforma	*ELISA*		
Sanos	1	156 ± 7 (2.6)	168 ± 19 (6.1)	1.815	2.776
	2	168 ± 11 (3.6)	162 ± 18 (6.1)	0.804	
	3	191 ± 12 (3.5)	197 ± 22 (6.1)	0.686	
	4	91 ± 9 (4.2)	92 ± 19 (8.2)	0.284	
	5	129 ± 10 (3.2)	130 ± 27 (8.4)	0.057	
	6	108 ± 9 (3.5)	112 ± 24 (8.7)	0.572	
	7	168 ± 10 (2.4)	162 ± 25 (6.2)	0.989	
Pacientes SLE	8	6073 ± 597 (3.9)	5866 ± 872 (6.0)	0.758	
	9	5462 ± 526 (3.9)	5272 ± 763 (5.8)	0.791	
	10	8001 ± 516 (2.6)	7716 ± 1412 (7.4)	0.729	
	11	6489 ± 509 (3.2)	6194 ± 822 (5.3)	1.176	
Pacientes AD	12	1584 ± 134 (4.6)	1541 ± 160 (5.7)	0.589	
	13	3294 ± 278 (4.6)	3208 ± 344 (5.8)	0.556	
	14	1300 ± 95 (4.0)	1278 ± 162 (6.9)	0.326	

**Los valores de RSD (%) se indican entre paréntesis.*

La comparación estadística de los niveles obtenidos por cada metodología (en todos los casos $t_{exp} < t_{tab}$), y los valores de la ordenadas en el origen (4 ± 8), incluyendo el 0, y de la pendiente (1.000 ± 0.002), incluyendo el 1, resultantes del estudio de correlación, confirmaron la ausencia de diferencias significativas entre los resultados proporcionados por ambas metodologías, así como la fiabilidad y exactitud de los resultados que proporcionó la bioplataforma electroquímica desarrollada en muestras de suero.

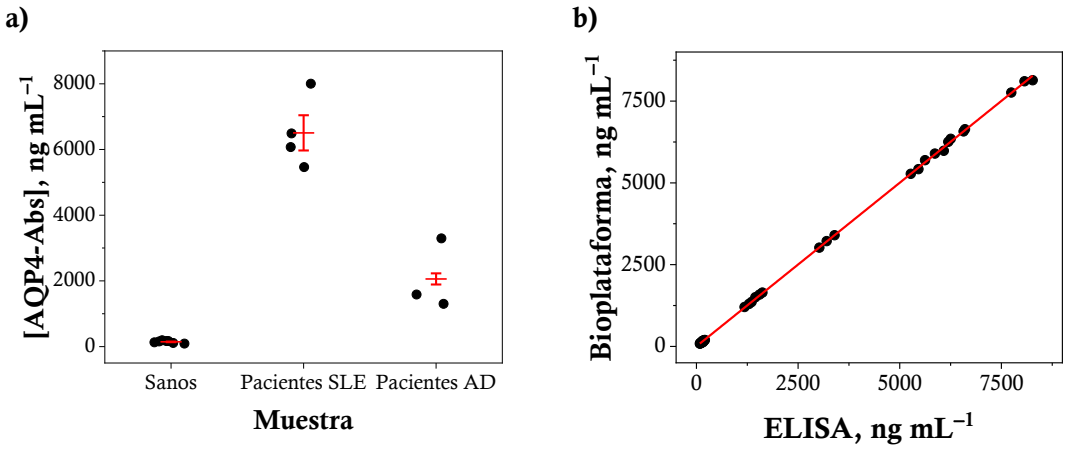


Figura 3.20. a) *Niveles séricos de AQP4-Abs proporcionados por la bioplataforma asistida por MBs en muestras de individuos sanos y de pacientes con SLE y AD.* ***b)*** *Gráfica de correlación resultante de la comparación de los niveles séricos de AQP4-Abs proporcionados por la bioplataforma electroquímica y por la metodología ELISA convencional, empleando los mismos inmunorreactivos.*

Los resultados obtenidos con la bioplataforma electroquímica demostraron la posibilidad de determinar los niveles de AQP4-Abs y discriminar inequívocamente entre individuos sanos y pacientes con enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, así como entre ambos tipos de pacientes, puesto que los niveles del biomarcador diana fueron notablemente superiores en los pacientes con SLE. Esta investigación arroja luz al potencial de los AQP4-Abs como biomarcadores también de enfermedades sistémicas, como el SLE, y neurodegenerativas, como la AD, entre las que de hecho se ha descrito cierta relación. Es importante destacar además que la aplicabilidad satisfactoria demostrada en el análisis de las muestras de estos pacientes hace prever el potencial de esta bioplataforma para el análisis de muestras de pacientes con NMO donde se esperan niveles muy superiores de AQP4-Abs [Chen et al., 2014; Gahlen et al., 2017; Hillebrand. et al., 2019; Tampoia et al., 2019].

Los resultados de esta investigación confirman la competitividad de la bioherramienta electroquímica desarrollada frente a la tecnología ELISA convencional, ofreciéndose como una alternativa versátil y muy interesante tanto para investigar biomarcadores como para contribuir al diagnóstico y seguimiento de cierto tipo de enfermedades de forma rápida, sencilla, asequible, fiable y en el punto de necesidad.

Bioplataforma electroquímica para la determinación de autoanticuerpos frente a DNA de cadena doble (dsDNA-Abs)

Teniendo en cuenta que la presencia de los distintos isotipos de inmunoglobulinas, determinados por la parte constante (Fc) de su estructura, en el torrente sanguíneo fluctúan en función del estadio de la enfermedad, en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado una bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación del contenido total de los tres isotipos más comunes de inmunoglobulinas frente a DNA de cadena doble (dsDNA-Abs), relevantes en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o enfermedades neurodegenerativas como la AD. Los resultados más relevantes de esta investigación se publicaron en el artículo [Arévalo et al., 2020], incluido en el Anexo de esta Memoria.

El protocolo empleado para la preparación de la bioplataforma para la determinación individual de dsDNA-Abs (***figura 3.21***) se basó en la inmovilización de una cadena doble de DNA biotinilada (b-dsDNA) preparada en el laboratorio por el Grupo ProteoFun a partir de un plásmido humano sobre las micropartículas magnéticas comerciales funcionalizadas con neutravidina (NA-MBs) para la captura selectiva de los dsDNA-Abs y el marcaje enzimático de los tres isotipos más comunes con un cóctel comercial de anticuerpos secundarios conjugados con enzima HRP. La transducción amperométrica se llevó a cabo en disolución agitada aplicando un potencial de –0.20 V *vs.* electrodo de pseudoreferencia de Ag y empleando el sistema redox HRP/H_2O_2/HQ.

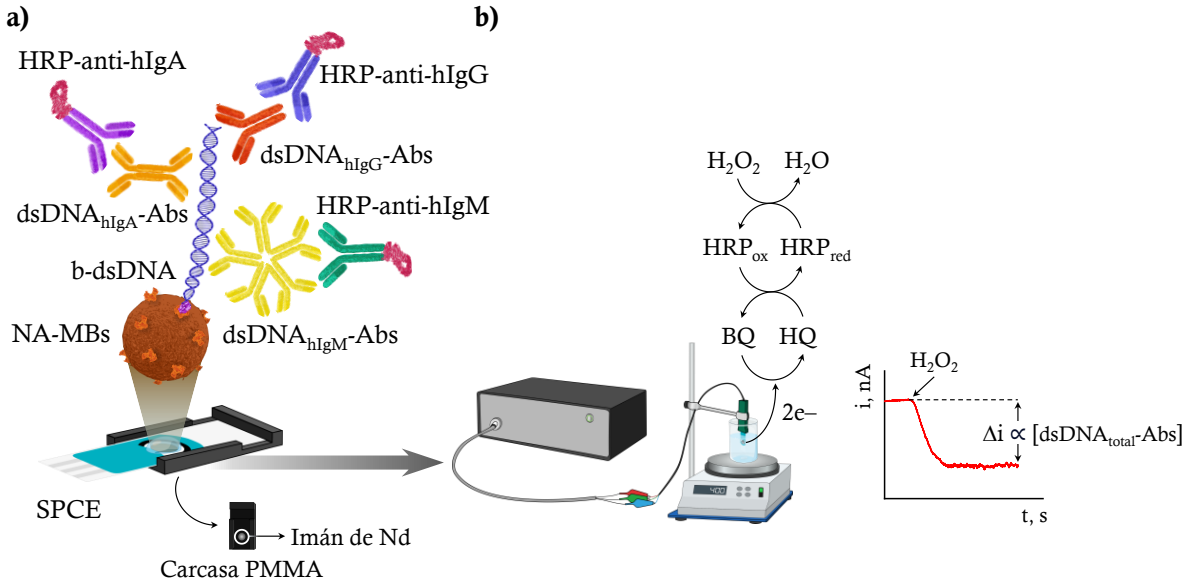


Figura 3.21. a) *Esquema de la bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación total de las inmunoglobulinas más comunes (hIgG+hIgA+hIgM) frente a dsDNA (dsDNA-Abs).* ***b)*** *Transducción amperométrica en disolución bajo agitación constante.*

Optimización de las variables experimentales

Con el fin de conseguir el mejor rendimiento analítico se optimizaron las variables experimentales involucradas en la preparación de los bioconjugados siguiendo el criterio S/B (**tabla 3.6**), midiendo las respuestas amperométricas ofrecidas con la bioplataforma electroquímica individual en ausencia (blanco, B) y presencia de 50 U mL^{-1} (señal, S) de estándar de dsDNA-Abs (***figura 3.22–3.23***).

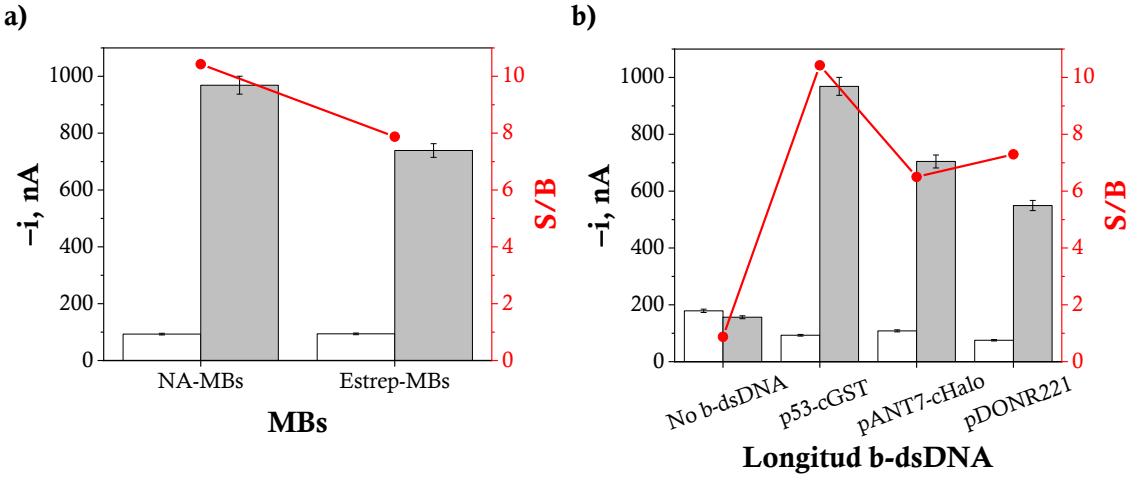


Figura 3.22. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de dsDNA-Abs en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 50 U mL^{-1} de estándar de dsDNA-Abs (S, barras grises), y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con* ***a)*** *tipo de MBs empleadas como soporte magnético y* ***b)*** *longitud del b-dsDNA preparado.*

En primer lugar, los resultados de la optimización confirmaron que se obtenían mejores relaciones S/B trabajando sobre MBs modificadas con neutravidina (NA-) que con estreptavidina (Estrep-) (***figura 3.22.a***). Esto se atribuyó tanto a que la neutravidina minimiza las interacciones no específicas de las proteínas y de las lectinas por ser la forma deglicosilada de la avidina [Zhao, S. et al., 1993; Nguyen, T. et al., 2012; Serafín et al., 2019a] como a la máxima afinidad de la neutravidina (14 µg de biotina/mg de proteína). Por ello, se seleccionaron las NA-MBs para la implementación de la bioplataforma.

También se evaluó la influencia del tamaño del fragmento de b-dsDNA preparado a partir de diferentes plásmidos (***figura 3.22.a***). De acuerdo con nuestros resultados, una longitud mayor del fragmento dificultaba el reconocimiento por parte de los dsDNA-Abs, posiblemente por su enrollamiento. Por tanto, se decidió continuar trabajando con el fragmento más corto (2.5 kb).

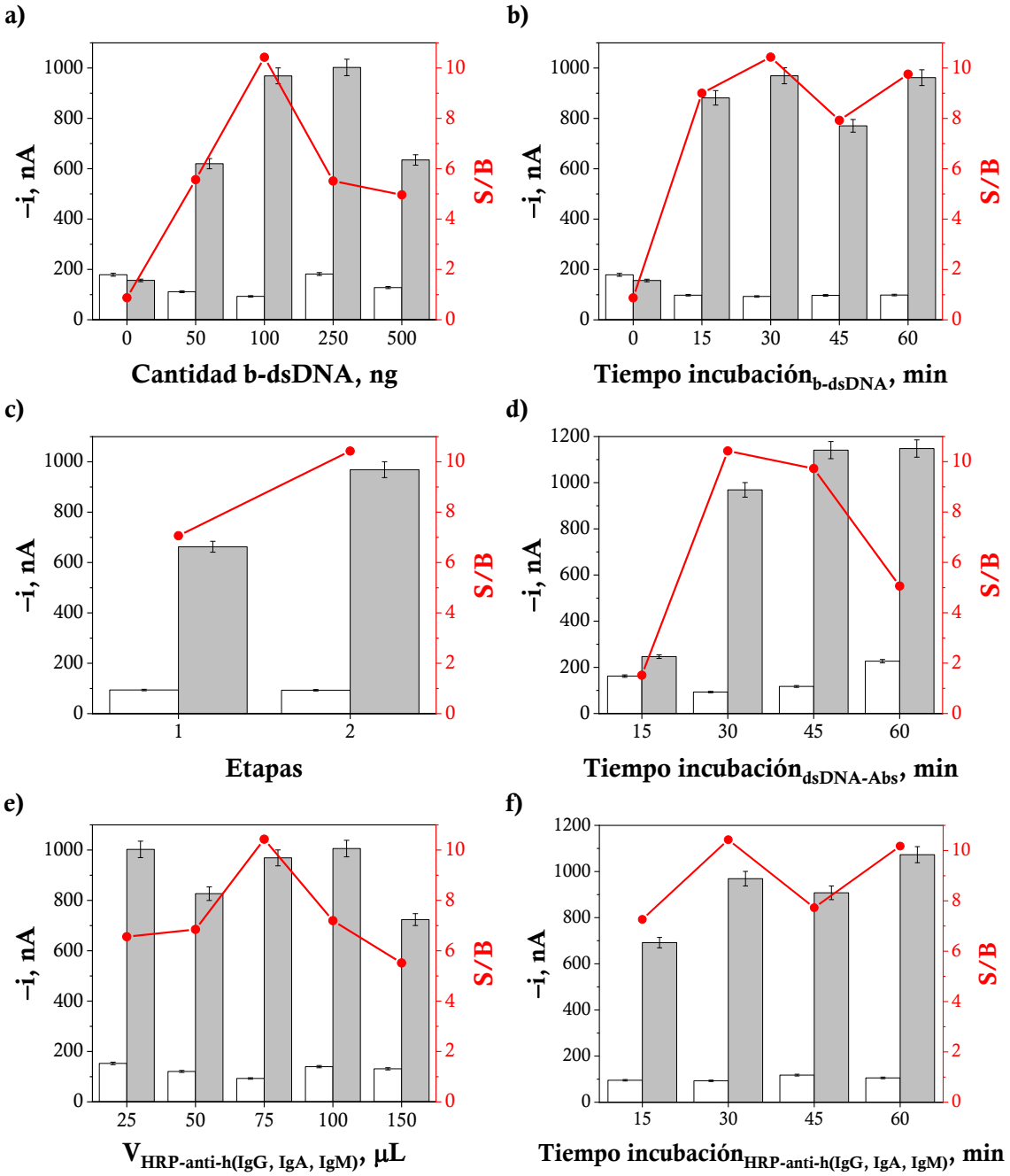


Figura 3.23. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de dsDNA-Abs en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 50 U mL^{-1} de estándar de dsDNA-Abs (S, barras grises), y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con* ***a)*** *cantidad y* ***b)*** *tiempo de incubación del b-dsDNA,* ***c)*** *etapas de incubación,* ***d)*** *tiempo de incubación de dsDNA-Abs y* ***e)*** *volumen y* ***f)*** *tiempo de incubación de HRP-anti-h(IgG, IgA, IgM).*

Los estudios de optimización de la cantidad y tiempo de incubación de b-dsDNA para su inmovilización sobre NA-MBs demostraron valores de S/B crecientes hasta un máximo, elegido como optimo, y decrecientes a partir de éste como consecuencia de un reconocimiento menos favorable de los dsDNA-Abs cuando se inmovilizaba demasiado b-dsDNA sobre las NA-MBs.

También se compararon los resultados obtenidos realizando la captura de los dsDNA-Abs y su marcaje enzimático con la mezcla de los anticuerpos secundarios en una única etapa (con preincubación o sin ella) o en dos etapas independientes. Estos estudios demostraron una mejor relación S/B cuando los procesos de captura y marcaje se realizaban en etapas de incubación independientes. No obstante, es importante destacar que, en caso necesario, y sacrificando ligeramente la sensibilidad de la plataforma (S/B = 10.4 *vs*. 7.1), sí sería posible determinar los dsDNA-Abs en una única etapa incubándolos previamente con la mezcla de los anticuerpos secundarios. Así, se optimizó el tiempo de incubación con el estándar de dsDNA-Abs y el volumen y el tiempo de incubación de la mezcla de anticuerpos secundarios (HRP-anti-h(IgG, IgA, IgM)), estudios que nos llevaron a seleccionar tiempos de 30 minutos y un volumen de 75 µL.

Tabla 3.6. Variables experimentales evaluadas, rango estudiado y valor seleccionado para la optimización de la bioplataforma electroquímica individual asistida por MBs para la determinación total de dsDNA-Abs.

Variable experimental	***Rango estudiado***	***Valor seleccionado***
Tipo de MBs comerciales	NA/Estrep-MBs	NA-MBs
Longitud de b-dsDNA, Kb	0–6	2.5
Cantidad de b-dsDNA, ng	0–500	100
Tiempo de incubación b-dsDNA, min	15–60	30
Nº etapas realización ensayo	1, 2	2
Tiempo de incubación dsDNA-Abs, min	15–60	30
Volumen HRP-anti-h(IgG,IgA,IgM), µL	25–150	75
Tiempo de incubación HRP-anti-h(IgG,IgA,IgM), min	15–60	30

Calibrado y características analíticas

El calibrado obtenido con la bioplataforma desarrollada para la determinación total de dsDNA-Abs en las condiciones experimentales optimizadas se muestra en la ***figura 3.24***. Los parámetros del ajuste lineal se resumen en la **tabla 3.7**, junto con los valores estimados para el LOD y el LOQ (n = 10, 0 U mL^{-1} estándar dsDNA-Abs) y la RSD (n = 5, 50 U mL^{-1} estándar dsDNA-Abs).

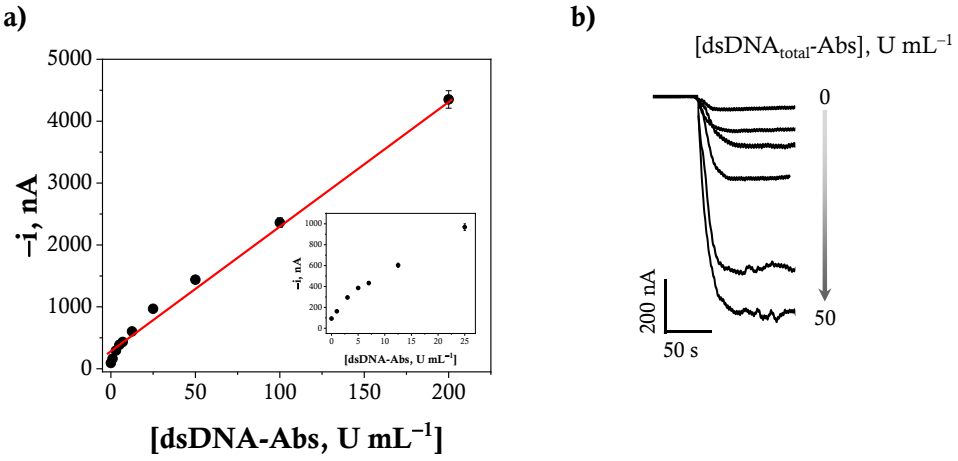


Figura 3.24. a) *Curva de calibrado ajustada y* ***b)*** *registros amperométricos reales obtenidos con la bioplataforma electroquímica individual asistida por MBs para la determinación total de dsDNA-Abs.*

Tabla 3.7. Características analíticas de la bioplataforma electroquímica individual asistida por MBs para la determinación total de dsDNA-Abs.

Parámetro analítico	***Valor***
R^2	0.993
Rango lineal, U mL^{-1}	1–200
Pendiente, nA mL U^{-1}	17.6 ± 0.3
Ordenada en el origen, nA	273 ± 44
LOD (n = 10), U mL^{-1}	0.3
LOQ (n = 10), U mL^{-1}	1.0
RSD (n = 5), %	3.2*; 4.3**
Tiempo de ensayo$_{b\text{-}dsDNA\text{-}NA\text{-}MBs}$, min	60

**Bioplataformas preparadas el mismo día.*

*** Bioplataformas preparadas distintos días.*

Aunque la sensibilidad alcanzada con la bioplataforma desarrollada no mejoró la del único biosensor descrito para la determinación de dsDNA-Abs [Rubin et al., 2014], la cantidad de material genético requerida era 900 veces inferior. En la misma línea, el valor del LOD, inferior a los valores de corte establecidos en muestras de suero (25 U mL^{-1}), confirmaron que la bioplataforma desarrollada era aplicable al análisis del contenido endógeno de dsDNA-Abs en muestras de suero. Además, la sensibilidad y la reproducibilidad tanto en los procesos de fabricación como de transducción proporcionadas con la bioplataforma electroquímica mejoraron las características ofrecidas por el kit ELISA comercial (LOD = 1 U mL^{-1}, RSDs entre 3.0–6.8 y 7.7–8.1 % medidas el mismo día o cinco días diferentes, respectivamente), que junto con el menor volumen de muestra empleado y la compatibilidad con la posible determinación multiplexada y en

el punto de atención se consideran ventajas que convierten a la bioplataforma desarrollada en una herramienta atractiva respecto a las metodologías convencionales existentes en el mercado para la determinación de dsDNA-Abs, generalmente kits ELISA.

Estudio de selectividad

La selectividad de la bioplataforma se estudió comparando las respuestas amperométricas que proporcionaba ésta para estándares de 0 y 50 U mL^{-1} de dsDNA-Abs preparados en ausencia (control) y en presencia de otras proteínas séricas a los niveles a los que se encuentran en individuos sanos (***figura 3.25***).

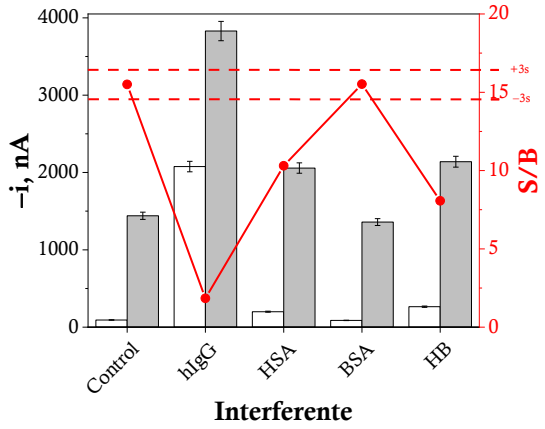


Figura 3.25. *Respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma individual asistida por MBs para disoluciones estándar de 0 (barras blancas, B) y 50 (barras grises, S) U mL^{-1} de dsDNA-Abs preparadas en ausencia (control) y presencia de 1 mg mL^{-1} hIgG; 50 mg mL^{-1} HSA; 5 mg mL^{-1} BSA; 5 mg mL^{-1} HB y sus correspondientes relaciones S/B (puntos y líneas rojos).*

La presencia de hIgG, HSA y HB sí afectaba a la relación S/B. Como se había observado ya con otras bioplataformas en el marco de esta Tesis Doctoral, la interferencia de la hIgG se asoció con su adsorción inespecífica sobre las MBs y la de la HSA a la posible presencia de anticuerpos humanos en el reactivo comercial [Muñoz-San Martín et al., 2022]. La interferencia de la HB se atribuyó a su actividad peroxidasa. No obstante, la presencia de HSA y HB no suponía un problema en la determinación cuando se diluían 100 veces y, por los resultados de aplicabilidad que se presentarán a continuación, la interferencia de la hIgG en las muestras podía corregirse de forma reproducible.

Estabilidad de almacenamiento

Finalmente, se examinó la estabilidad de las b-dsDNA-NA-MBs almacenadas a 4 °C en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado. Para ello, se midió la respuesta amperométrica que proporcionaban las bioplataformas preparadas a partir de ellas en ausencia y presencia de 25 U mL^{-1} de estándar de dsDNA-Abs. Los resultados obtenidos (***figura 3.26***), demostraron que las b-dsDNA-NA-MBs proporcionaban respuestas dentro de los límites de control durante casi 40 días.

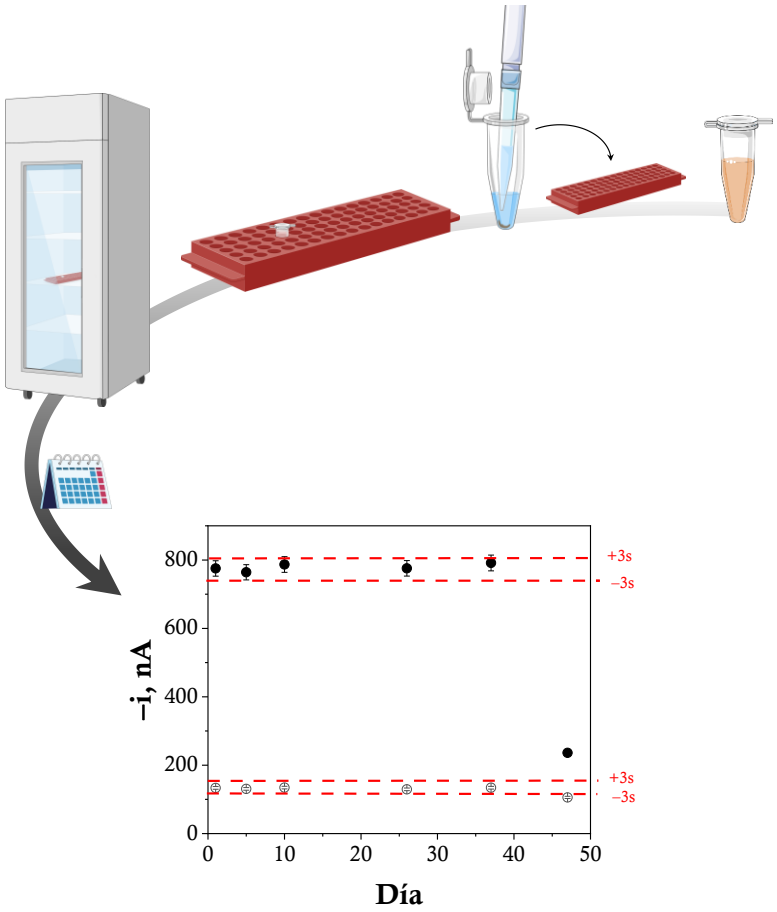


Figura 3.26. *Gráfica de control obtenida en el estudio de estabilidad de almacenamiento de b-dsDNA-NA-MBs en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado a 4 ºC. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas con bioplataformas preparadas a partir de ellas cada día de control en ausencia (puntos blancos) y presencia (puntos negros) de 25 U mL^{-1} de estándar de dsDNA-Abs. Los límites de control (líneas discontinuas rojas) se establecieron como ± 3s del valor promedio obtenido de tres medidas realizadas el día de su preparación (día 0).*

Aplicabilidad al análisis de muestras de suero

La bioplataforma individual desarrollada se aplicó al análisis total de los isotipos de dsDNA-Abs en muestras de suero de individuos sanos y pacientes con RA tras confirmar la ausencia de efecto matriz en este tipo de muestras cuando se diluían al menos 100 veces. Para estudiar este efecto, se compararon las pendientes resultantes del ajuste lineal para el calibrado de estándares de dsDNA-Abs preparado en disolución reguladora $SD_{dsDNA\text{-}Abs}$ ((17.6 ± 0.3) nA mL U^{-1}) o en la muestra de suero de un individuo sano diluida 100 veces ((17 ± 2) nA mL U^{-1}) mediante el estudio *t-Student*, resultando un valor de t_{exp} = 0.07 *vs.* $t_{tab,4,0.05}$ = 2.776.

De esta manera, el contenido de las muestras de suero se cuantificó por interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para cada réplica correspondiente diluida 100 veces, sustrayendo previamente el valor de intensidad de corriente obtenida en suero sintético.

Los resultados obtenidos para la determinación de dsDNA-Abs con la bioplataforma desarrollada para 3 muestras de suero de individuos sanos y 3 de pacientes con RA se representan en la ***figura 3.27*** y resumen en la **tabla 3.8** junto con los resultantes de la determinación empleando la metodología ELISA involucrando los mismos inmunorreactivos.

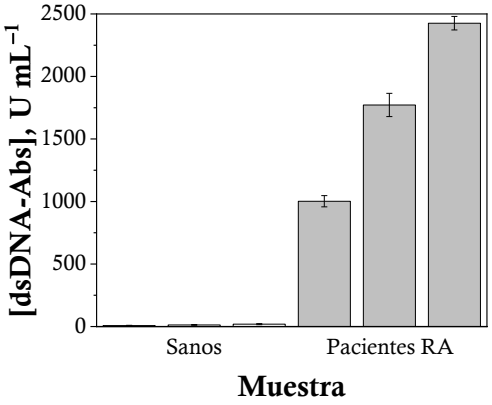


Figura 3.27. *Niveles séricos de dsDNA-Abs proporcionados por la bioplataforma asistida por MBs en muestras de suero de individuos sanos y pacientes con RA.*

Como se muestra en la ***figura 3.27***, los niveles resultantes de dsDNA-Abs para los pacientes con RA fueron muy superiores a los obtenidos para individuos sanos y estaban de acuerdo con los niveles de corte establecidos de 25 U mL^{-1}, posibilitando la clara discriminación entre ambos tipos de sujetos. Así, estos resultados permitieron confirmar el elevado potencial que los dsDNA-Abs presentan como biomarcadores de enfermedades autoinmunes, de acuerdo con investigaciones previas [Cabiedes & Núñez-Álvarez, 2010; Bai et al., 2017; Infantino et al., 2018; Wang, X. & Xia, 2019], que asocian niveles séricos totales con la gravedad y el progreso de la enfermedad.

Tabla 3.8. Niveles séricos de dsDNA-Abs determinados con la bioplataforma electroquímica asistida por MBs y con el kit ELISA comercial en muestras de suero de individuos sanos y pacientes con RA.

Sujetos	***Muestra***	***[dsDNA-Abs], U mL⁻¹***		t_{exp}*
		Bioplataforma	*ELISA*	
Sanos	1	8 ± 2 (1.1)	8 ± 1 (4.4)	0.542
	2	13 ± 3 (3.8)	15 ± 3 (3.2)	1.000
	3	19 ± 4 (3.4)	16 ± 6 (5.4)	1.108
Pacientes RA	4	1002 ± 45 (4.4)	1105 ± 59 (5.3)	2.404
	5	1772 ± 93 (5.3)	1739 ± 75 (4.3)	0.478
	6	2426 ± 54 (2.2)	2311 ± 135 (5.8)	1.370

*$t_{exp} < t_{tab,4,0.05} = 2.776$.

[a]*Los valores de RSD se muestran entre paréntesis.*

La comparación estadística de los resultados proporcionados con ambas metodologías a través del estudio *t-Student* demostró que éstos eran comparables a un nivel de significancia del 95%, confirmando la exactitud de los valores obtenidos con la bioplataforma desarrollada, que también quedó probada en el estudio de correlación (R^2 = 0.999; pendiente = 1.03 ± 0.03; y ordenada en el origen = –21 ± 38 U mL^{-1}).

Bioplataforma electroquímica para la determinación de autoanticuerpos frente a la proteína centromérica B (CENPB-Abs)

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con la bioplataforma electroquímica propuesta en formato integrado para la determinación de CENPB-Abs y explotar las ventajas ofrecidas por la "química His-tag" frente a la comúnmente empleada basada en EDC/NHSS, en esta Tesis Doctoral también se ha desarrollado la primera bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación de estos autoanticuerpos de elevado interés clínico en el ámbito de las enfermedades autoinmunes. Los resultados más relevantes y las conclusiones de esta investigación derivaron en el artículo publicado y anexado al final de esta Memoria [Arévalo et al., 2023a].

La nueva estrategia, esquematizada en la ***figura 3.28***, se basa en la formación del mismo biocomplejo que el descrito en la sección anterior (3.1.1), donde los CENPB-Abs se capturan selectivamente sobre la proteína centromérica B inmovilizada a través de su tag de His en este caso sobre la superficie de His-tag *isolation*-MBs comerciales y se marcan enzimáticamente con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (HRP-anti-hIgG), para la posterior transducción amperométrica empleando el sistema HRP/H_2O_2/HQ. Para ello se capturan magnéticamente las His-tag *isolation*-MBs modificadas sobre la superficie del electrodo de trabajo (WE) del SPCE, previamente colocado en una carcasa de PMMA con un imán de Nd embutido que se sitúa justo debajo de dicho electrodo.

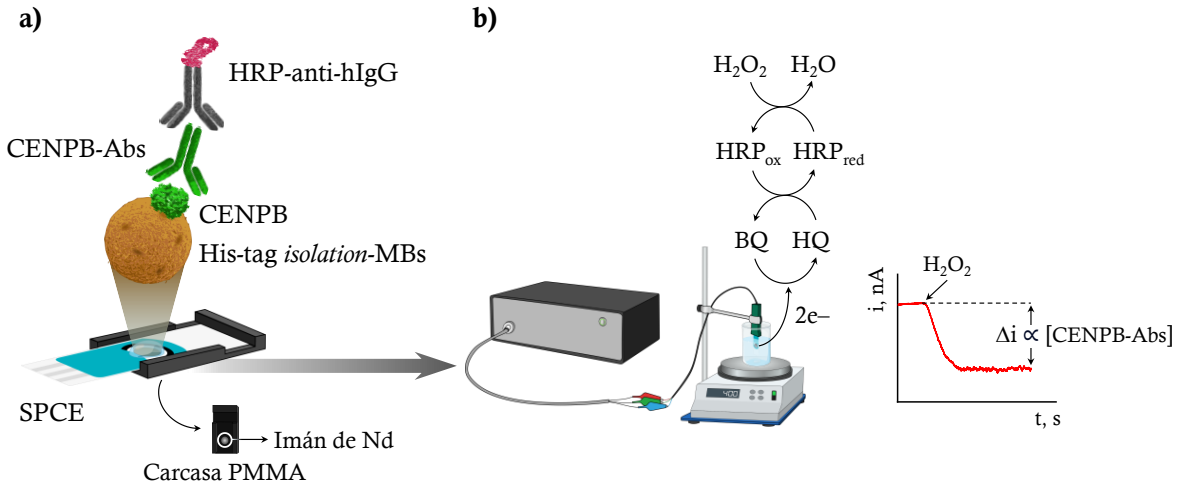


Figura 3.28. a) *Esquema de la bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación de CENPB-Abs.* ***b)*** *Transducción amperométrica en disolución bajo agitación constante.*

Optimización de las variables experimentales

Antes de optimizar las variables experimentales clave implicadas en la fabricación y el funcionamiento de la bioplataforma, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (0.0 U mL^{-1}, blanco (B)) y en presencia (5 U mL^{-1}, señal (S)) de CENPB-Abs empleando la estrategia de inmovilización basada en la química His-tag sobre la superficie de His-tag *isolation*-MBs y la covalente asistida por EDC/NHSS utilizando HOOC-MBs. Los resultados de esta comparación (***figura 3.29***), análogos a los obtenidos con la bioplataforma desarrollada en formato integrado para este mismo biomarcador (***figura 3.2***), demostraron que la química His-tag proporcionaba una mejor eficiencia en el biorreconocimiento de los autoanticuerpos diana gracias a la inmovilización del antígeno proteico con la orientación y el espaciado adecuados [Zhou et al., 2021].

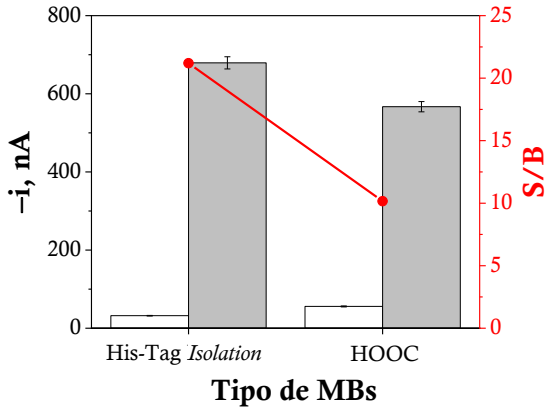


Figura 3.29. *Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y presencia (S, barras grises) de 5 U mL^{-1} de disolución estándar de CENPB-Abs y las relaciones S/B (puntos y línea rojos) tras la inmovilización de CENPB en la superficie de His-tag isolation-MBs o de HOOC-MBs activadas con EDC/NHSS.*

La evaluación de las variables experimentales se realizó comparando los valores de las respuestas amperométricas proporcionadas por la bioplataforma en ausencia (0.0 U mL^{-1}, blanco (B)) y presencia de 5 U mL^{-1} de disolución estándar de CENPB-Abs (señal (S)) y seleccionando como valores óptimos aquellos que daban lugar a la mayor relación S/B. Los resultados se muestran en la ***figura 3.30*** y se resumen en la **tabla 3.9**.

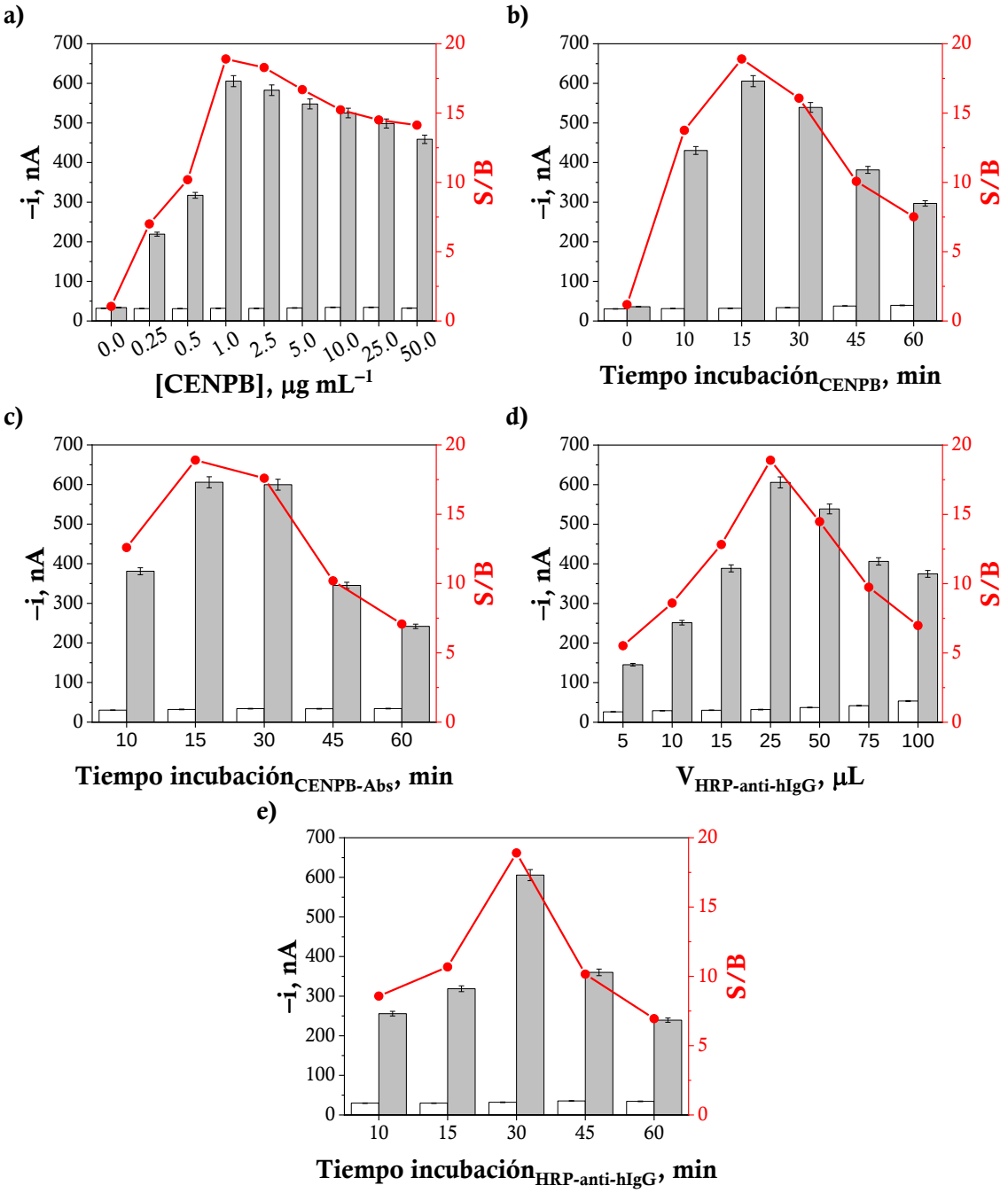


Figura 3.30. *Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de CENPB-Abs, en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 5 U mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de CENPB-Abs, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con* ***a)*** *la concentración y* ***b)*** *tiempo de incubación de CENPB,* ***c)*** *el tiempo de incubación de los CENPB-Abs y* ***d)*** *el volumen y* ***e)*** *tiempo de incubación de HRP-anti-hIgG.*

Como muestran los resultados de la ***figura 3.30.a***, al igual que sucedía con la bioplataforma en formato integrado (***figura 3.4.a***), la relación S/B aumentaba con la cantidad de CENPB hasta 1 µg mL^{-1}. Para concentraciones superiores disminuían las respuestas específicas, y con ellas la relación S/B, al producirse un empeoramiento en el reconocimiento de los CENPB-Abs por

impedimento estérico. Es importante destacar en este punto que la bioplataforma asistida por MBs requiere la mitad de concentración de CENPB (0.025 *vs.* 0.05 µg) pero un mayor volumen de incubación (25 *vs.* 5 µL) que la propuesta en formato integrado. Además, al trabajar con soportes magnéticos basados en la química His-tag que ofrecen mayor afinidad y orientación en la inmovilización, la concentración de proteína necesaria para alcanzar las condiciones óptimas de ensayo es 20 veces menor que la reportada usando la inmovilización covalente asistida por EDC/NHSS [Guerrero et al., 2022].

Cabe resaltar también que en ausencia de proteína inmovilizada no era posible discriminar entre 0.0 y 5.0 U mL^{-1} de estándar de CENPB-Abs (S/B ~ 1), confirmando tanto que la captura de los CENPB-Abs sobre las MBs solo tiene lugar a través de la CENPB como la inexistencia de adsorciones inespecíficas del anticuerpo secundario sobre las MBs en ausencia de CENPB-Abs.

El volumen de incubación del marcaje enzimático (HRP-anti-hIgG) óptimo fue de 25 µL (***figura 3.30.d***), que coincide con el utilizado comúnmente para las etapas de incubación sobre los microsoportes magnéticos.

Los tiempos de incubación para la inmovilización de la proteína (15 minutos, ***figura 3.30.b***), para la captura selectiva y eficiente de los CENPB-Abs (15 minutos, ***figura 3.30.c***) y el marcaje enzimático (30 minutos, ***figura 3.30.e***) coinciden con los valores seleccionados para la bioplataforma en formato integrado, y muestran la misma tendencia de disminución drástica de la relación S/B para valores superiores relacionada con la peor eficacia de las reacciones de inmunorreconocimiento y/o la posible existencia de fenómenos de agregación.

Tabla 3.9. Variables experimentales evaluadas, rango estudiado y valor seleccionado, para la optimización de la bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación de CENPB-Abs.

Variable experimental	*Rango estudiado*	*Valor seleccionado*
[CENPB], µg mL^{-1}	0.0–50.0	1.0
Tiempo de incubación CENPB, min	0–60	15
Tiempo de incubación CENPB-Abs, min	10–60	15
Volumen HRP-anti-hIgG, µL	5–100	25
Tiempo de incubación HRP-anti-hIgG, min	10–60	30

Calibrados y características analíticas

El calibrado para disoluciones estándar de CENPB-Abs obtenido con la bioplataforma asistida por MBs (***figura 3.31***) mostró una dependencia lineal semilogarítmica (de la intensidad de corriente con el logaritmo de la concentración de CENPB-Abs), como ocurría con la bioplataforma en formato integrado, pero en un rango lineal mayor comprendido entre 0.02 y 200 U mL^{-1} (R^2 =

0.999), con valores de ordenada en el origen y pendiente de (364 ± 7) nA y (346 ± 5) nA por década de concentración, respectivamente. Los valores del límite de detección (LOD, 0.006 U mL^{-1}) y de cuantificación (LOQ, 0.02 U mL^{-1}), estimados siguiendo los cálculos descritos en la sección 2.9 a partir de las respuestas amperométricas obtenidas con 10 bioplataformas en ausencia de biomarcador, demostraron que la bioplataforma asistida por MBs ofrecía características analíticas y operacionales mejores que la bioplataforma desarrollada en formato integrado. Estos resultados podrían atribuirse a una mayor carga de proteína inmovilizada y/o a una mejor eficacia en el biorreconocimiento de los CENPB-Abs por cinéticas más favorables al trabajar en suspensión bajo agitación constante. No obstante, ambas bioplataformas desarrolladas presentan sensibilidad suficiente, con límites de cuantificación por debajo de los valores de corte establecidos, y notablemente superior a la que ofrecen los kits comerciales, para la discriminación entre individuos sanos y pacientes con enfermedades autoinmunes y reumáticas, así como para la determinación del contenido endógeno de los autoanticuerpos en muestras de suero reales, siendo además los tiempos de ensayo ligeramente inferiores a la metodología ELISA convencional, empleando instrumentación de coste asequible y con aplicabilidad en el punto de atención.

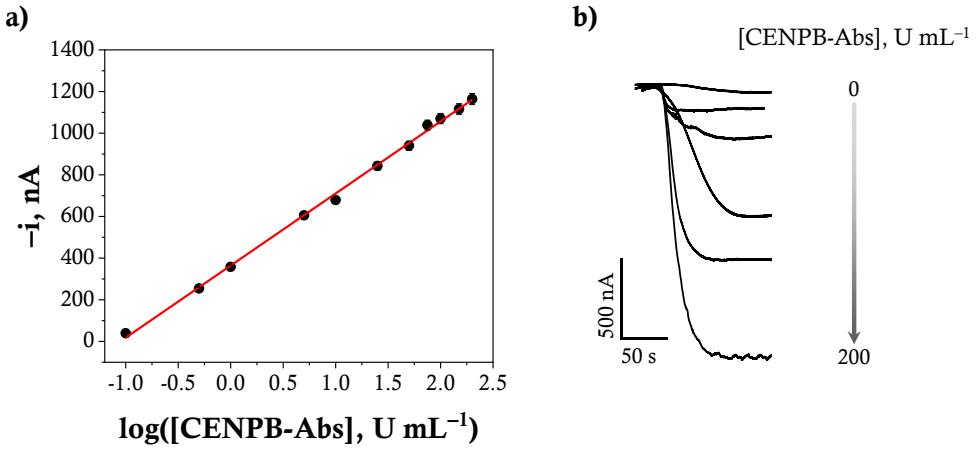


Figura 3.31. a) *Curva de calibrado ajustada y* ***b)*** *registros amperométricos reales obtenidos con la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de CENPB-Abs.*

La reproducibilidad se estudió comparando las respuestas amperométricas obtenidas para 10 U mL^{-1} de estándar de CENPB-Abs con 10 bioplataformas diferentes preparadas de la misma manera el mismo o distintos días. Los valores de RSD, obtenidos según la ***ecuación 2.4***, de 2.3 y 2.5 %, respectivamente, confirmaron la precisión de todos los procedimientos experimentales empleados.

De esta manera, las dos bioplataformas electroquímicas desarrolladas, descritas por primera vez, para la determinación de CENPB-Abs demostraron ser competitivas frente a la metodología ELISA convencional, poniendo en valor la química del His-tag frente a la inmovilización covalente asistida por EDC/NHSS, tanto en formato integrado como asistida por el empleo de MBs.

Estabilidad de almacenamiento

La estabilidad de las CENPB-His tag *isolation*-MBs (almacenadas tras su preparación en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado a 4 ºC) se estudió comparando las respuestas amperométricas que proporcionaban las bioplataformas preparadas a partir de ellas cada día control en ausencia y presencia de 10 U mL^{-1} de estándar de CENPB-Abs. Los resultados del estudio (***figura 3.32***) confirmaron que dichos magnetoconjugados podrían prepararse y almacenarse en las condiciones indicadas durante más de un mes ofreciendo la misma respuesta amperométrica que el primer día.

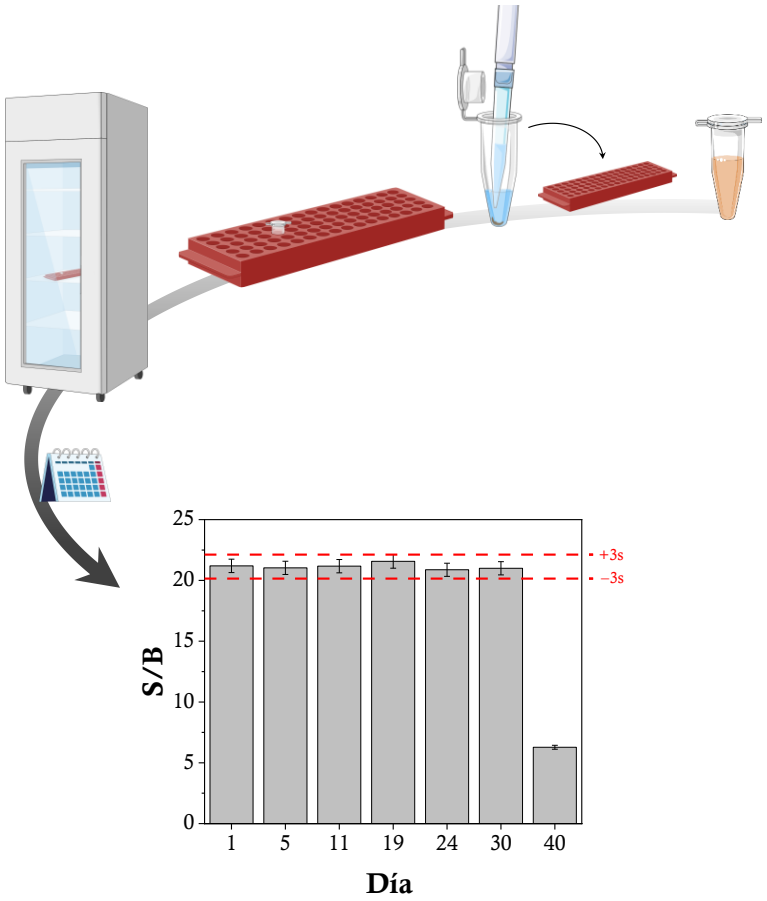


Figura 3.32. *Gráfica de control obtenida en el estudio de estabilidad de almacenamiento de las CENPB-His-tag isolation-MBs en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado a 4 ºC. Comparación de las relaciones S/B obtenidas al estudiar las bioplataformas preparadas cada día control en ausencia y presencia de 10 U mL^{-1} de estándar de CENPB-Abs. Los límites de control (líneas discontinuas rojas) se establecieron como ± 3s del valor promedio de tres réplicas realizadas el día de preparación de las CENPB-His-tag isolation-MBs.*

Estudios de regeneración y reutilización de la bioplataforma

Considerando los resultados obtenidos en la regeneración de la bioplataforma electroquímica desarrollada en formato integrado, también se evaluó la posibilidad de regenerar y reutilizar los HRP-anti-hIgG-CENPB-Abs-CENPB-His-tag *isolation*-MBs en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos (***figura 3.33***) mostraron que los bioconjugados magnéticos también se podían reutilizar durante, al menos, cinco ciclos sin pérdida de sensibilidad. Esto confirma de nuevo el atractivo de la química del His-tag para desarrollar bioplataformas reutilizables tanto en formatos integrados como asistidos por el empleo de MBs.

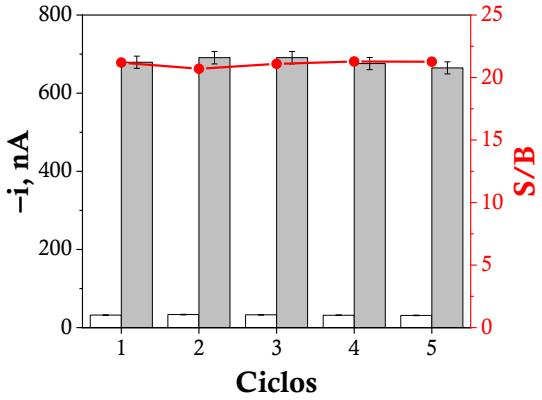


Figura 3.33. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 10 U mL^{-1} de estándar CENPB-Abs (S, barras grises), y las resultantes relaciones S/B (puntos y línea rojos) tras ciclos sucesivos de regeneración de las MBs modificadas con imidazol.*

Estudio de selectividad

Antes de aplicar la bioplataforma desarrollada al análisis de muestras reales se evaluó el efecto que la presencia de diferentes biomarcadores proteicos y anticuerpos presentes en las muestras de suero podía ejercer sobre las respuestas amperométrica obtenidas para 0 y 10 U mL^{-1} de estándares de CENPB-Abs preparados en ausencia y presencia de estos potenciales interferentes a las concentraciones esperadas en individuos sanos (***figura 3.34***).

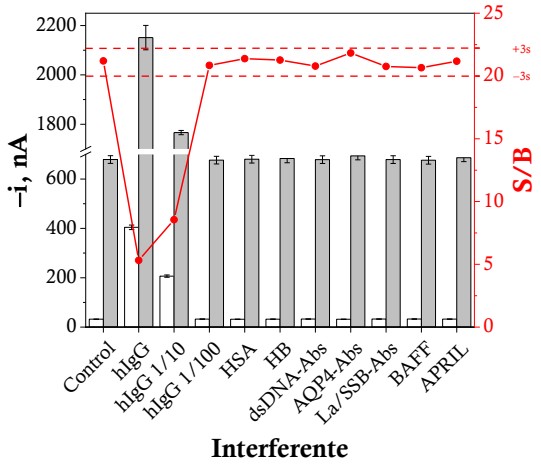


Figura 3.34. *Respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma asistida por MBs para disoluciones estándar de 0 (B, barras blancas) y 10 (S, barras grises) U mL^{-1} de CENPB-Abs, preparadas en ausencia (control) y presencia de 1 mg mL^{-1} hIgG; 0.1 mg mL^{-1} hIgG (1/10); 0.01 mg mL^{-1} hIgG (1/100); 50 mg mL^{-1} HSA; 5 mg mL^{-1} HB; 25 U mL^{-1} dsDNA-Abs; 1 ng mL^{-1} AQP4-Abs; 5 U mL^{-1} La/SSB-Abs; 1 ng mL^{-1}BAFF; 1 ng mL^{-1} APRIL, y sus correspondientes relaciones S/B (puntos y líneas rojos).*

En este caso, y a diferencia de los resultados obtenidos con la bioplataforma en formato integrado, la inmunoglobulina G humana (hIgG) supuso una interferencia significativa para la determinación de CENPB-Abs, lo que se atribuyó, por un lado, a la adsorción inespecífica de las hIgGs sobre los sustratos magnéticos [Arévalo et al., 2020] y, por otro lado, a la presencia de múltiples histidinas en su región Fc [Arévalo et al., 2023a] que a elevadas concentraciones podrían inmovilizarse sobre las His-tag *isolation*-MBs desplazando a la CENPB. Afortunadamente, esta interferencia se minimizó al diluirse la muestra, al menos, 100 veces, y no supuso ningún problema en la determinación del biomarcador diana.

Aplicación al análisis de muestras de suero

La bioplataforma electroquímica asistida por MBs se aplicó a la determinación de CENPB-Abs en muestras de suero de individuos sanos y pacientes positivos a estos autoanticuerpos.

En primer lugar, se analizaron los controles negativo y positivo suministrados en el kit ELISA comercial (Creative Diagnostics, Cat. No.: DEIA1684). Los valores obtenidos, calculados según la ***ecuación 2.8*** (n = 3, α = 0.05), 3.1 ± 0.2 U mL^{-1} para el control negativo y 35 ± 2 U mL^{-1} para el control positivo, estaban de acuerdo con los proporcionados por el fabricante de 3 U mL^{-1} y 35 U mL^{-1}, respectivamente, demostrándose la buena exactitud y precisión en las determinaciones.

Para el análisis de muestras reales de suero se estudió la posible existencia de efecto matriz comparando las pendientes obtenidas para los calibrados con estándares de CENPB-Abs preparados en disolución comercial BB, (346 ± 5) nA por década de concentración, o en una muestra de suero representativa de un individuo sano diluida 1000 veces, (360 ± 6) nA por década de concentración. El análisis estadístico, aplicando las ***ecuaciones 2.7*** y ***2.5***, confirmó la ausencia de efecto matriz (valores de F_{exp} y t_{exp} de 2.18 y 1.919, respectivamente, inferiores a los valores de $F_{tab, 3, 3}$ y $t_{tab, 6, 0.05}$ de 15.44 y 2.447, respectivamente).

Así, las muestras de suero de individuos sanos y pacientes con enfermedades autoinmunes considerados positivos a CENPB-Abs se diluyeron 1000 veces y las respuestas amperométricas obtenidas para las tres réplicas de cada muestra con la bioplataforma asistida por el empleo de MBs se interpolaron en el calibrado preparado para estándares de CENPB-Abs en BB ***(figura 3.31.a)***. Las concentraciones que proporcionó la bioplataforma (***figura 3.35.a***) se compararon con las obtenidas empleando el kit ELISA comercial (Creative Diagnostics, Cat. No.: DEIA1684) (**tabla 3.10** y ***figura 3.35.b)***.

Tabla 3.10. Niveles séricos de CENPB-Abs, obtenidos con la bioplataforma electroquímica asistida por MBs y la metodología ELISA en el análisis de muestras de suero de individuos sanos y pacientes con enfermedades autoinmunes positivos al biomarcador diana. También se incluyen los valores especificados por el proveedor de las muestras analizadas.

Sujetos	***Muestra***	***[CENPB-Abs], U mL^{-1}***			t_{exp}
		Bioplataforma	*ELISA*	*Especificaciones*	
Sanos	1	3.5 ± 0.3 (3.2)	3.5 ± 0.6 (6.6)	*< 7*	0.034
	2	5.8 ± 0.5 (3.4)	5.1 ± 0.9 (7.0)		0.948
	3	5.7 ± 0.5 (3.2)	5.4 ± 0.6 (4.3)		0.457
	4	5.8 ± 0.7 (4.6)	5.4 ± 0.9 (6.5)		0.473
Pacientes	5	283 ± 16 (2.3)	285 ± 35 (5.5)	*> 240*	0.502
	6	29 ± 2 (2.2)	28 ± 5 (7.2)	*27*	1.439
	7	153 ± 8 (2.1)	153 ± 22 (5.7)	*157*	0.576

**Los valores de RSD (%) se indican entre paréntesis.*

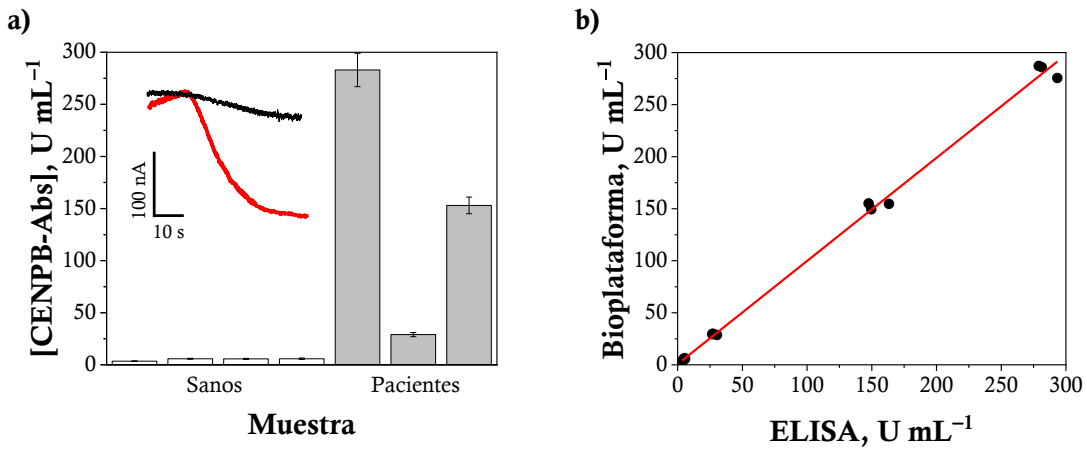


Figura 3.35. a) *Niveles séricos de CENPB-Abs proporcionados por la bioplataforma asistida por MBs en muestras de suero de individuos sanos y pacientes diagnosticados con enfermedades autoinmunes considerados positivos al biomarcador diana y amperogramas representativos obtenidos para las muestras de un individuo sano (línea negra) y de un paciente (línea roja).* ***b)*** *Gráfica de correlación resultante de la comparación de los niveles séricos de CENPB-Abs proporcionados por la bioplataforma electroquímica y por el kit ELISA comercial que emplea los mismos inmunorreactivos.*

La correlación entre los valores proporcionados por ambas metodologías, con valores de ordenada en el origen (1 ± 1) y de pendiente (0.99 ± 0.01), que incluyen el 0 y la unidad, respectivamente, así como la concordancia con los valores indicados por el proveedor de las muestras, demostraron que esta bioplataforma también era una herramienta fiable para la determinación precisa y exacta de los CENPB-Abs en muestras de suero.

Es importante resaltar también que las dos bioplataformas desarrolladas en esta Tesis Doctoral poner en valor el papel de los CENPB-Abs como biomarcadores de relevancia enfermedades autoinmunes sistémicas y reumáticas, en las que presentan niveles séricos notablemente superiores a los de los individuos sanos.

Aunque la bioplataforma asistida por MBs proporciona un valor del LOD 18 veces inferior al de la bioplataforma integrada, la selección entre ellas estará sujeta a la sensibilidad requerida, a la composición y a la viscosidad de la muestra a analizar, y también a la disponibilidad de un incubador con agitación constante, que es necesario para el empleo de la bioplataforma asistida por MBs, no habiendo diferencias significativas en los tiempos ni en los costes por ensayo con ambas bioplataformas.

El desarrollo de ambas bioplataformas confirma la idoneidad de la química del His-tag frente a la comúnmente empleada basada en la química EDC/NHSS para desarrollar bioherramientas competitivas en términos de sensibilidad, tiempo reducido de ensayo y posibilidad de reutilización.

3.2. DESARROLLO DE BIOPLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS MULTIPLEXADAS ASISTIDAS POR MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

En este Apartado se describen las bioplataformas electroquímicas asistidas por MBs para la determinación múltiple de autoanticuerpos frente a las proteínas centroméricas A (CENPA-Abs) y B (CENPB-Abs), DNA de cadena doble (hIgG/hIgA/hIgM dsDNA-Abs) y antígenos nucleares extraíbles (La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs y smRNP-Abs) empleando SP_2CE, SP_4CE o SP_8CE.

Bioplataforma electroquímica dual para la determinación de autoanticuerpos frente a las proteínas centroméricas A (CENPA-Abs) y B (CENPB-Abs)

En el diagnóstico fiable de las enfermedades autoinmunes es importante tener en cuenta que un único biomarcador no es específico de un solo trastorno y que muchos de ellos están involucrados en el desarrollo y avance de diferentes enfermedades. Por ello, y considerando que los autoanticuerpos frente al centrómero (ACAs) son los biomarcadores séricos más frecuentemente determinados y relacionados con las enfermedades autoinmunes sistémicas, y en particular, con el SSc, durante las investigaciones realizadas en esta Tesis Doctoral, y con el fin de contribuir al diagnóstico temprano y fiable de esta grave enfermedad, se han estudiado los autoanticuerpos frente a la proteína centromérica A (CENPA-Abs) y a la proteína centromérica B (CENPB-Abs), los ACAs más abundantes y de mayor relevancia clínica.

Teniendo en cuenta la falta de herramientas analíticas capaces de determinar estos biomarcadores de enfermedades autoinmunes, y considerando las ventajas analíticas y la versatilidad que ofrece la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de CENPB-Ab desarrollada en el marco de esta Tesis Doctoral [Arévalo et al., 2023a] se extrapoló para la determinación de CENPA-Abs. De esta manera, se ha desarrollado la primera bioplataforma electroquímica para la determinación simultánea de CENPA-Abs y CENPB-Abs asistida por el empleo de His-tag *isolation*-MBs.

Como se ilustra en la ***figura 3.36***, la implementación de los formatos indirectos de inmunoensayo sobre los sustratos magnéticos se realiza de forma independiente para cada biomarcador, depositando los bioconjugados resultantes en su correspondiente electrodo de trabajo del SP_2CE para la transducción amperométrica dual empleando el sistema $HRP/H_2O_2/HQ$.

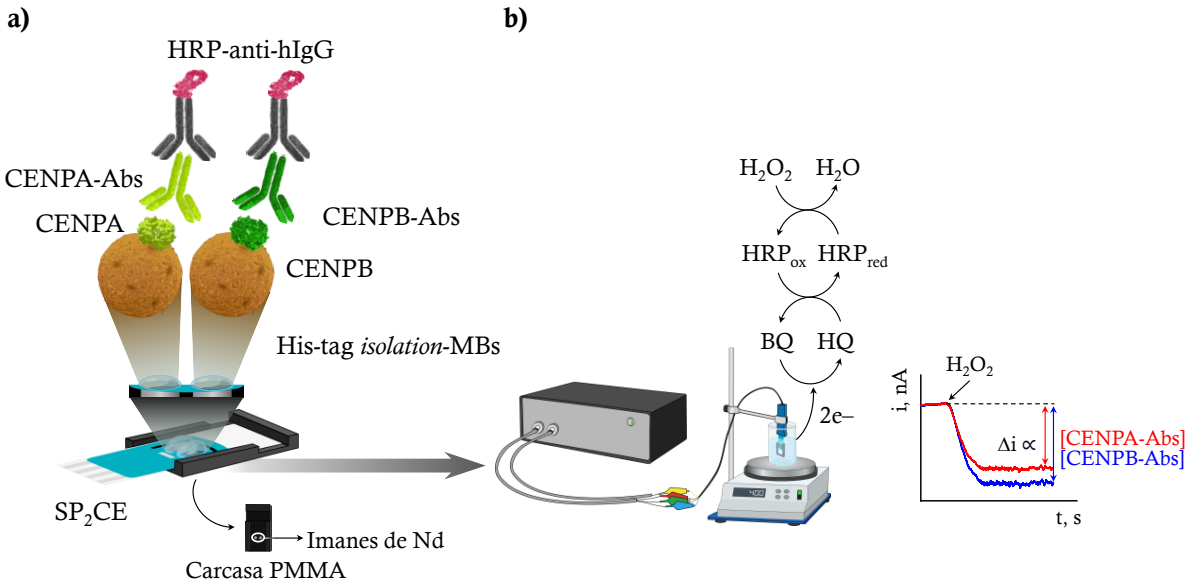


Figura 3.36. a) *Esquema de los inmunoensayos indirectos asistidos por MBs implicados en la bioplataforma electroquímica desarrollada para la determinación simultánea de CENPA-Abs y CENPB-Abs.* ***b)*** *Transducción amperométrica dual en disolución bajo agitación constante.*

Optimización de las variables experimentales

Puesto que la preparación de los bioconjugados se realizaba de forma independiente para cada marcador, las variables experimentales involucradas en dicha preparación también se optimizaron independientemente con el objetivo de alcanzar las mejores condiciones analíticas para la determinación individual de cada biomarcador. Siguiendo el criterio de mayor relación S/B para la selección de variables, las ***figuras 3.37–3.38*** representan y comparan las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (blanco, (B)) y en presencia de disoluciones estándar de 250 ng mL^{-1} o 50 U mL^{-1} de CENPA-Abs o CENPB-Abs, respectivamente (señal, (S)), para estudios univariantes de todas las variables experimentales evaluadas, que se resumen en la **tabla 3.11**.

Teniendo en cuenta que la bioplataforma individual asistida por MBs para la determinación de CENPB-Abs ya se había desarrollado previamente y que para el desarrollo de esta bioplataforma dual se decidió trabajar con dos proteínas de la misma casa comercial (y diferente a de la CENPB empleada en la bioplataforma individual), solo se optimizaron las variables relacionadas con ella.

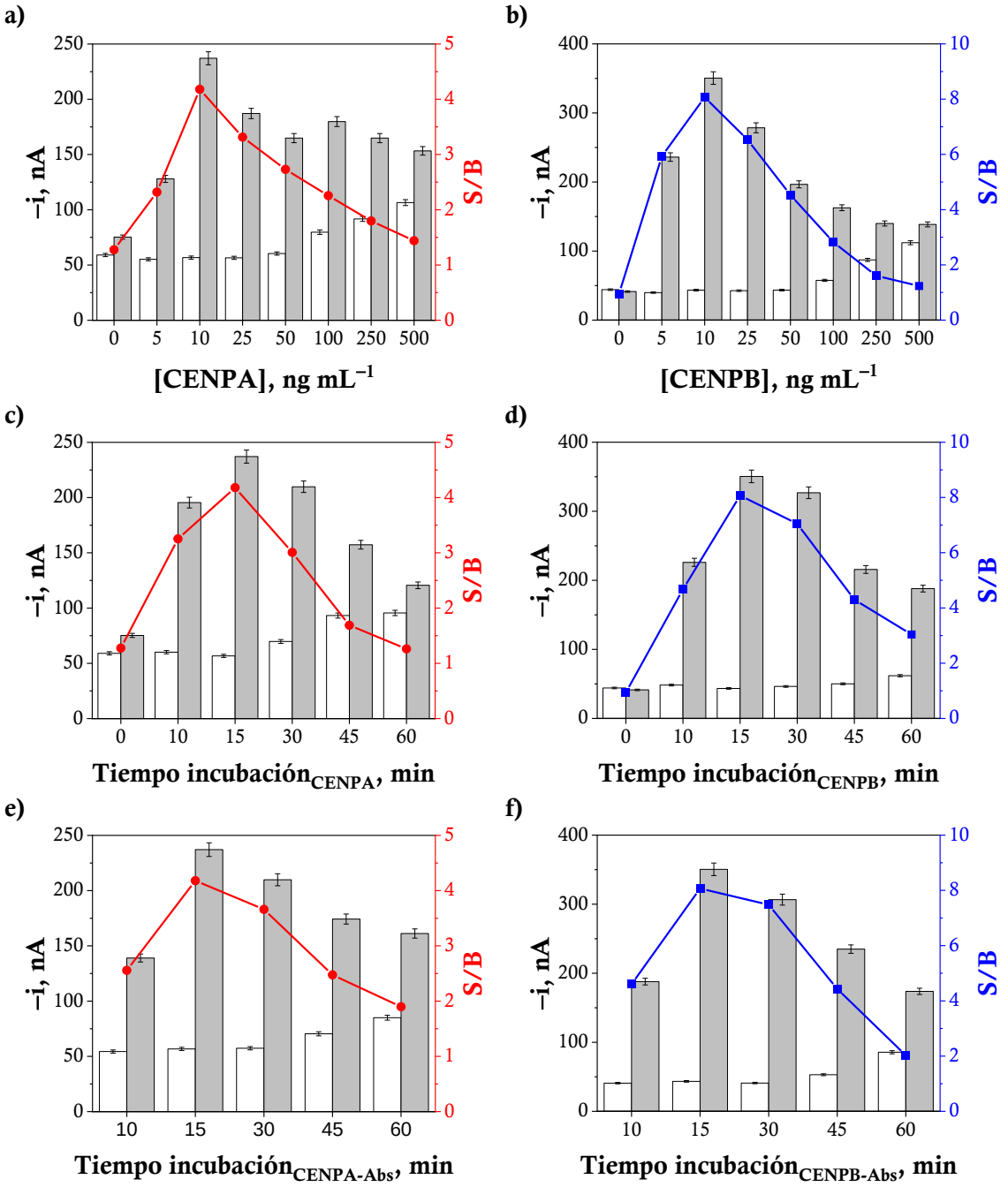


Figura 3.37. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma asistida por MBs para la determinación individual de CENPA-Abs y CENPB-Abs, en ausencia (B, barras blancas) y presencia (S, barras grises) de 250 ng mL^{-1} o 50 U mL^{-1} de estándar de CENPA-Abs o de CENPB-Abs, respectivamente, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos o cuadrados y líneas azules, respectivamente) con la concentración de* ***a)*** *CENPA o* ***b)*** *CENPB, el tiempo de incubación de* ***c)*** *CENPA o* ***d)*** *CENPB y el tiempo de incubación de los* ***e)*** *CENPA-Abs o* ***f)*** *CENPB-Abs.*

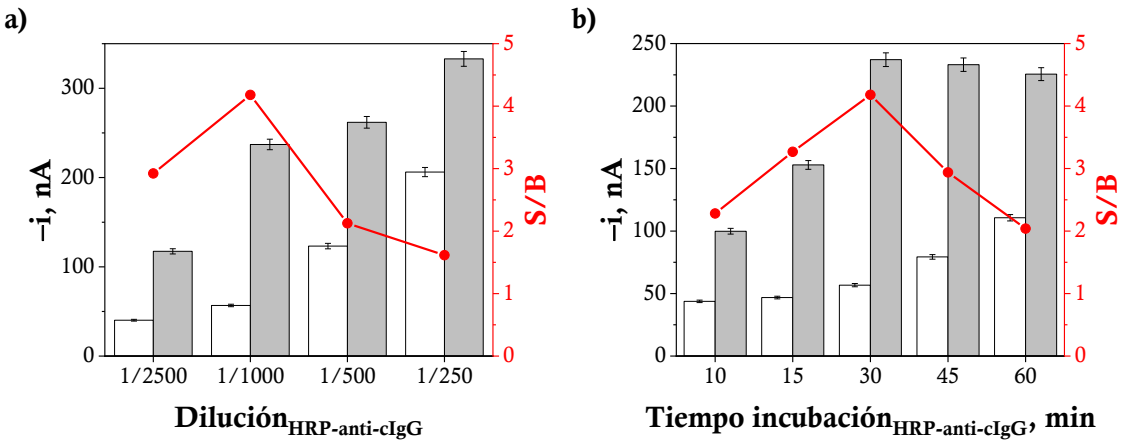


Figura 3.38. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma asistida por MBs para la determinación individual de CENPA-Abs, en ausencia (B, barras blancas) y presencia (S, barras grises) de 250 ng mL^{-1} de estándar de CENPA-Abs, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con la concentración de* ***a)*** *la dilución y* ***b)*** *tiempo de incubación de HRP-anti-cIgG para el marcaje enzimático de los CENPA-Abs.*

Como se puede apreciar en las ***figuras 3.37*** y ***3.38***, la tendencia encontrada para ambos biomarcadores fue similar para todas las variables estudiadas, observándose un aumento de la relación S/B hasta alcanzar un valor máximo por la ausencia de variación en las respuestas inespecíficas y un incremento significativo de las respuestas específicas. Alcanzado este máximo, los valores de las relaciones S/B disminuían drásticamente por un aumento significativo de las respuestas inespecíficas y, en términos generales, una disminución de las específicas (excepto en la optimización de la dilución de la HRP-anti-cIgG) debido al incremento de las adsorciones no específicas y la posible existencia de reacciones de inmunorreconocimiento menos favorables por impedimento estérico o fenómenos de agregación.

Los valores de las relaciones S/B próximos a la unidad obtenidos en ausencia de proteína inmovilizada (***figuras 3.37.a y 3.37.b)***, confirmaban tanto el formato de inmunoensayo empleado como la ausencia de adsorciones inespecíficas por parte de los autoanticuerpos diana y/o del anticuerpo secundario.

Por último, es importante resaltar que los valores óptimos resultantes del estudio, concordantes en términos de incubación para la inmovilización de la proteína antigénica, la captura del biomarcador y su marcaje enzimático, facilitaban la preparación simultánea de los bioconjugados para cada biomarcador y por tanto la implementación de la bioplataforma dual.

Tabla 3.11. Variables experimentales evaluadas, rango estudiado y valor seleccionado para la optimización de las bioplataformas electroquímicas asistidas por MBs para la determinación individual de CENPA-Abs y CENPB-Abs.

Variable experimental	*Rango estudiado*	*Valor seleccionado*
Concentración de proteína, ng mL^{-1}	0.0–500.0	10.0
Tiempo de incubación proteína, min	0–60	15
Tiempo de incubación biomarcador, min	10–60	15
Dilución HRP-anti-cIgG	1/2500–1/250	1/1000
Volumen HRP-anti-hIgG, µL*	5–100	25
Tiempo de incubación HRP-anti-cIgG, min*	10–60	30

**Los rangos estudiados y los valores seleccionados para estas variables coinciden con los de la bioplataforma electroquímica individual asistida por MBs para la determinación de CENPB-Ab presentada en la sección 3.1.*

Estudios de regeneración y reutilización de la bioplataforma individual para CENPA-Abs

Teniendo en cuenta la competición del imidazol con las histidinas por el complejo Co^{+2}-NTA [Li et al., 2016; Qu et al., 2021] demostrada con las bioplataformas electroquímicas para la determinación individual de CENPB-Abs [Arévalo et al., 2023a], se probó la posibilidad de regenerar y así reutilizar los bioconjugados HRP-anti-cIgG-CENPA-Abs-CENPA-His-tag *isolation*-MBs bajo las mismas condiciones previamente descritas.

Como cabía esperar, los resultados mostrados en la ***figura 3.39*** confirmaron nuevamente la posibilidad de reutilización como mínimo durante cinco ciclos manteniendo la respuesta amperométrica de la bioplataforma.

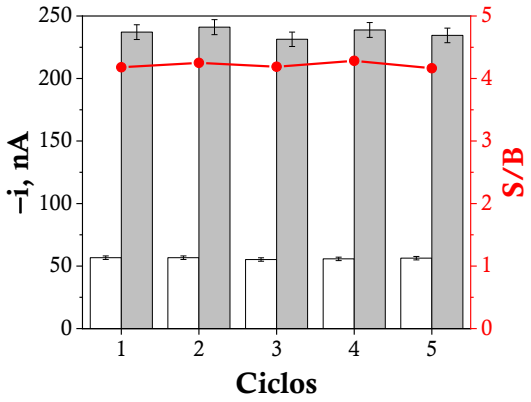


Figura 3.39. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 250 pg mL^{-1} de estándar de CENPA-Abs (S, barras grises), y las resultantes relaciones S/B (puntos y líneas rojos) después de sucesivos procesos de regeneración de las MBs modificadas, con imidazol.*

Evaluación de la reactividad cruzada en la detección

Con objeto de poner a punto la bioplataforma para la determinación simultánea de CENPA-Abs y CENPB-Abs, en primer lugar, se compararon las respuestas amperométricas proporcionadas por los bioconjugados preparados en ausencia (blanco, (B)) y presencia (señal, (S)) de 250 ng mL^{-1} y 50 U mL^{-1} de estándar de CENPA-Abs y CENPB-Abs, respectivamente, sobre SPCEs y SP_2CE. Los resultados (***figura 3.40.a***) demostraron que no había diferencias significativas en los valores de las relaciones S/B obtenidos para ambas plataformas, aunque las señales registradas con la bioplataforma dual se situaban entre el 80–90% de las obtenidas con las bioplataformas individuales, debido a la menor área superficial de los WEs en el SP_2CE frente al WE del SPCE (6.3 *vs.* 12.6 mm^2).

En segundo lugar, se evaluó la posible existencia de fenómenos de reactividad cruzada al medir los bioconjugados de los dos biomarcadores en las superficies electródicas adyacentes de los SP_2CE. Para ello, se compararon las respuestas amperométricas que proporcionaba la bioplataforma dual para disoluciones mezcla que contenían diferentes concentraciones de cada estándar. Los resultados (***figura 3.40.b***) demostraron que no existía reactividad cruzada entre las superficies electródicas adyacentes.

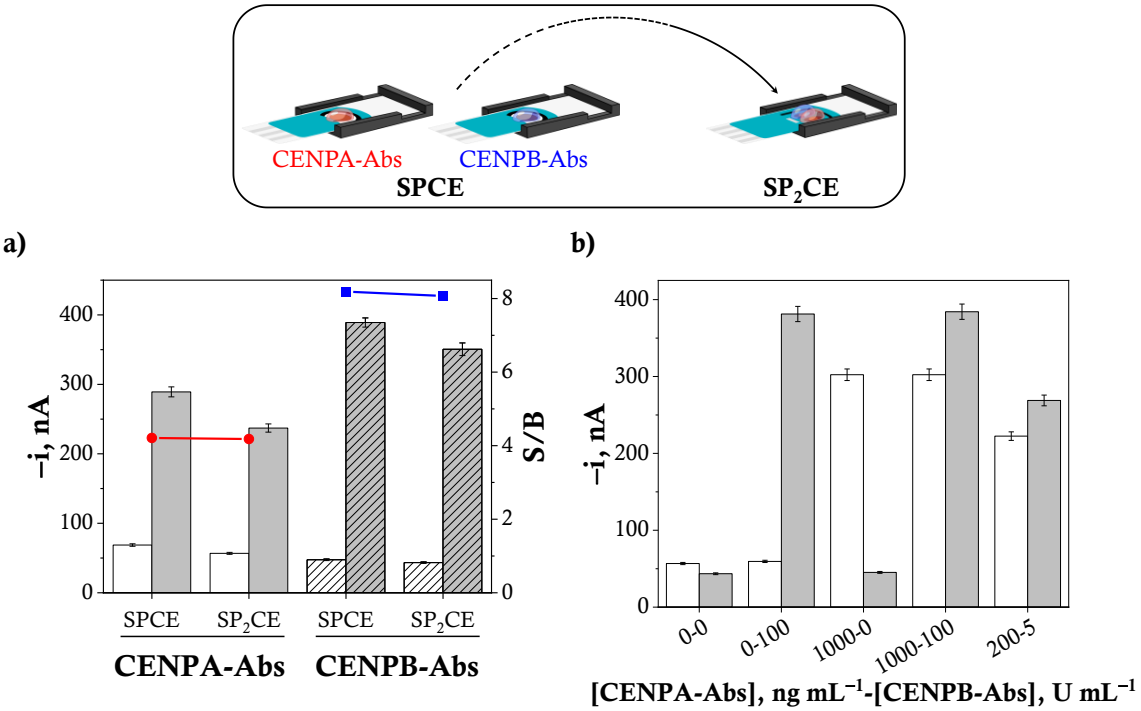


Figura 3.40. a) *Comparación de las respuestas amperométricas medidas en ausencia (barras blancas) y presencia (barras grises) de 250 ng mL^{-1} o 50 U mL^{-1} de estándar de CENPA-Abs (barras lisas) o de CENPB-Abs (barras rayadas), respectivamente, y las relaciones S/B (puntos y línea rojos, CENPA-Abs; cuadrados y línea azules, CENPB-Abs) obtenidas sobre SPCEs y* SP_2CE*s.* ***b)*** *Respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma dual para disoluciones mezcla preparadas con distintas concentraciones de estándares de CENPA-Abs (barras blancas) y de CENPB-Abs (barras grises).*

Calibrados y características analíticas

En las condiciones experimentales óptimas y tras confirmar la posibilidad de determinar los dos biomarcadores simultáneamente sobre SP_2CE, se evaluaron las características analíticas y operacionales de la bioplataforma dual obteniéndose los calibrados que se muestran en la ***figura 3.41*** y los parámetros que se resumen en la **tabla 3.12**.

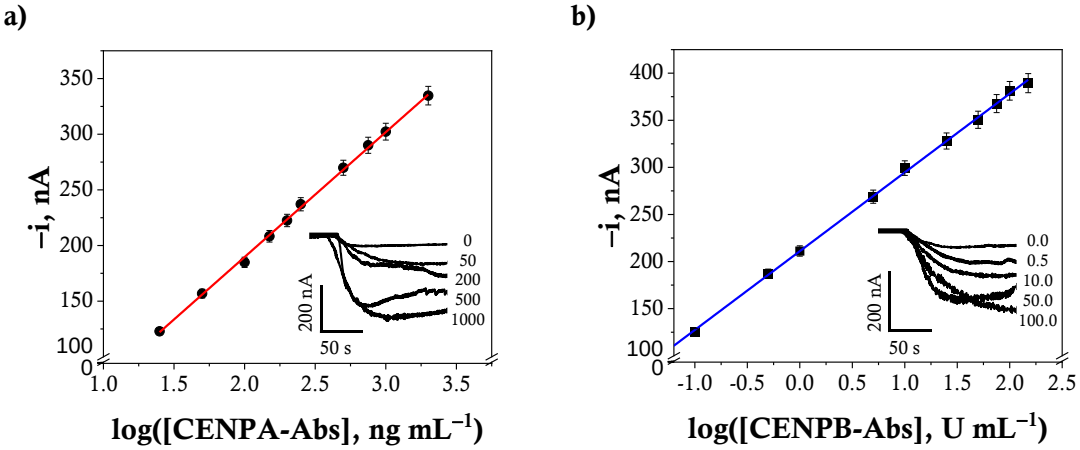


Figura 3.41. *Curvas de calibrado ajustadas y registros amperométricos reales obtenidos con la bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs para la determinación de* ***a)*** *CENPA-Abs y* ***b)*** *CENPB-Abs.*

Los calibrados resultantes mostraron una tendencia lineal ($R^2 > 0.99$) entre la corriente catódica y el logaritmo de la concentración de los estándares, ofreciendo amplios intervalos lineales para la determinación de ambos biomarcadores.

Los valores estimados para los LOD y LOQ, obtenidos del modo ya mencionado, y a partir de 10 medidas amperométricas registradas con la bioplataforma dual en ausencia de biomarcadores diana (**tabla 3.12**), confirman la idoneidad de esta bioplataforma para la determinación de los autoanticuerpos objetivo que, como se ha señalado, poseen una gran relevancia clínica en las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, en el caso del SSc, se consideran pacientes positivos a los ACAs aquellos que presentan niveles séricos superiores a 8 U mL^{-1} (o 642.4 µg mL^{-1} de hIgGs) [Humphrey & Batty, 1974; González-Buitrago et al., 2003].

El estudio de la reproducibilidad se llevó a cabo comparando las respuestas amperométricas de diez bioplataformas duales diferentes preparadas siguiendo el mismo protocolo para disoluciones estándar de 250 ng mL^{-1} y 5 U mL^{-1} de CENPA-Abs y CENPB-Abs, respectivamente. Los resultados obtenidos permitieron calcular valores de RSD, en todos los casos, inferiores al 3% para ambos biomarcadores, demostrando la precisión de los protocolos empleados para la preparación de los bioconjugados magnéticos y para su transducción amperométrica sobre los SP_2CE.

Tabla 3.12. Características analíticas ofrecidas por la bioplataforma electroquímica para la determinación amperométrica simultánea de CENPA-Abs y CENPB-Abs.

Parámetro analítico	***CENPA-Abs***	***CENPB-Abs***
Intervalo lineal	(0.08–2000) ng mL^{-1}	(0.06–150) U mL^{-1}
R^2	0.999	0.999
Pendiente, nA por década de concentración	112 ± 1	83.6 ± 0.6
Ordenada en el origen, nA	–35 ± 3	211.0 ± 0.8
LOD (n = 10)	0.02 ng mL^{-1}	0.02 U mL^{-1}
LOQ (n = 10)	0.08 ng mL^{-1}	0.06 U mL^{-1}
RSD* (n = 10), %	2.5	2.6

**Medida para 250 ng mL^{-1} y 5 U mL^{-1} de estándar de CENPA-Abs y CENPB-Abs, respectivamente.*

Teniendo en cuenta que, a diferencia de la determinación de CENPB-Abs, el trazador enzimático empleado para la detección de los estándares de CENPA-Abs es de conejo en lugar de humano (HRP-anti-cIgG) debido a la naturaleza del estándar, las unidades en las que se determina este biomarcador diana no son las internacionalmente consideradas para este tipo de inmunoglobulinas.

Es importante resaltar que la falta de herramientas analíticas para la determinación individual de CENPA-Abs o dual de ambos biomarcadores frente al centrómero convierte a la bioplataforma electroquímica desarrollada en un avance importante para el estudio y diagnóstico temprano de las enfermedades autoinmunes. A pesar de que la bioplataforma dual proporciona una sensibilidad ligeramente inferior a la de la bioplataforma individual descrita anteriormente para la determinación individual de CENPB-Abs, ofrece las ventajas de una determinación multiplexada y todavía límites de detección 10 veces inferiores a los de los kits ELISA comerciales para la determinación individual de los biomarcadores diana, y en tan solo 45 minutos partiendo de los conjugados magnéticos modificados con la proteína antígeno.

Estabilidad de almacenamiento

Se evaluó el tiempo durante el que era posible almacenar las His-tag *isolation*-MBs modificadas con cada proteína antígeno resuspendidas en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado a 4 ºC sin pérdida de sensibilidad midiendo las respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma dual en ausencia y presencia de estándar de 250 ng mL^{-1} o 25 U mL^{-1} de CENPA-Abs o CENPB-Abs, respectivamente, cada día control. Los resultados, representados en la ***figura 3.42***, demostraron que las MBs modificadas ofrecían sensibilidades similares a las del día de su preparación los 33 días posteriores. Es importante destacar que la estabilidad de almacenamiento

de las CENPB-His-tag *isolation*-MBs fue similar a la obtenida para las preparadas empleando la proteína de otra casa comercial en el desarrollo de la bioplataforma individual.

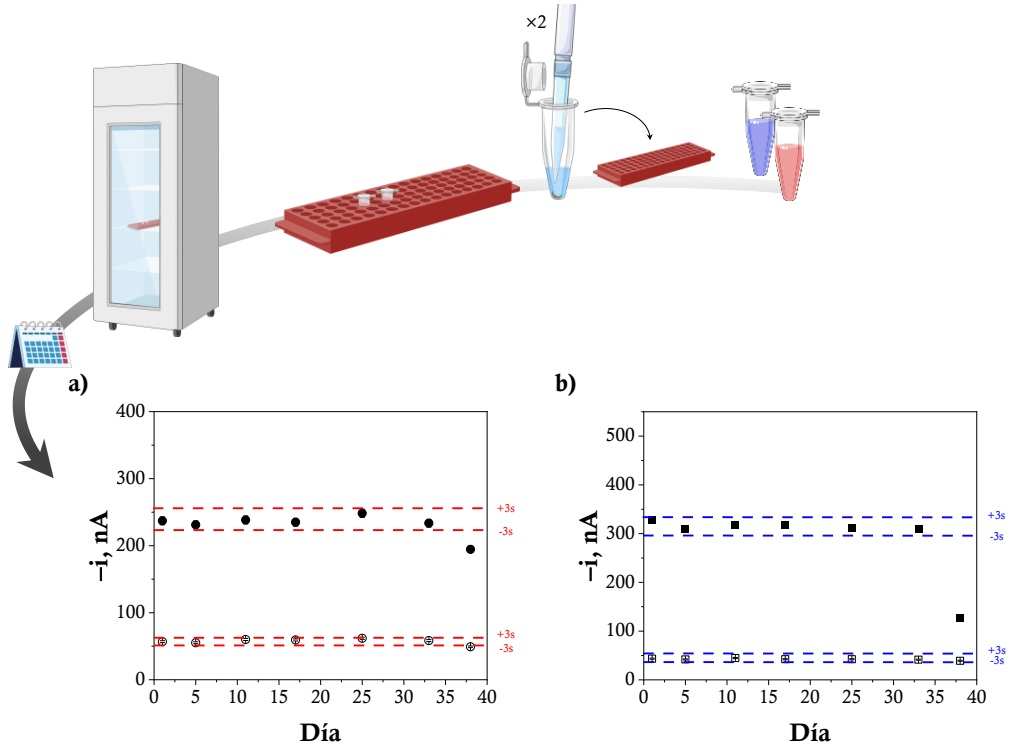


Figura 3.42. *Gráfica de control obtenida en el estudio de estabilidad de almacenamiento de las CENPA-His-tag isolation-MBs y CENPB-His-tag isolation-MBs en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado a 4 ºC. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas sobre bioplataformas duales preparadas a partir de ellas en* ***a)*** *ausencia (puntos blancos) y presencia (puntos negros) de 250 ng mL^{-1} de estándar de CENPA-Abs y* ***b)*** *ausencia (cuadrados blancos) y presencia (cuadrados negros) de 25 U mL^{-1} de estándar de CENPB-Abs. Los límites de control (líneas discontinuas rojas o azules respectivamente) se establecieron como ± 3s del valor promedio obtenido de tres réplicas realizadas el día de su preparación (día 0).*

Estudio de selectividad

Antes de evaluar el potencial de la bioplataforma electroquímica dual para la determinación de CENPA-Abs y CENPB-Abs en muestras de suero reales, se estudió si la presencia de otras proteínas y autoanticuerpos coexistentes en este tipo de muestras afectaba a las determinaciones de los biomarcadores diana con las bioplataformas duales. Para ello se compararon las respuestas amperométricas obtenidas para disoluciones que contenían 0 y 250 ng mL^{-1} de CENPA-Abs o 0 y 50 U mL^{-1} de CENPB-Abs preparadas en ausencia (controles) y en presencia de los potenciales interferentes a las concentraciones en las que suelen encontrarse en suero de individuos sanos.

La ***figura 3.43*** muestra que únicamente las hIgGs suponían una interferencia significativa en la determinación de ambos biomarcadores, y que como se ha descrito en otras bioplataformas, este efecto está relacionado con las adsorciones inespecíficas de estas proteínas sobre la superficie de las MBs. No obstante, esta interferencia resultaba insignificante para ambos biomarcadores cuando se ensayaba 100 veces más diluida.

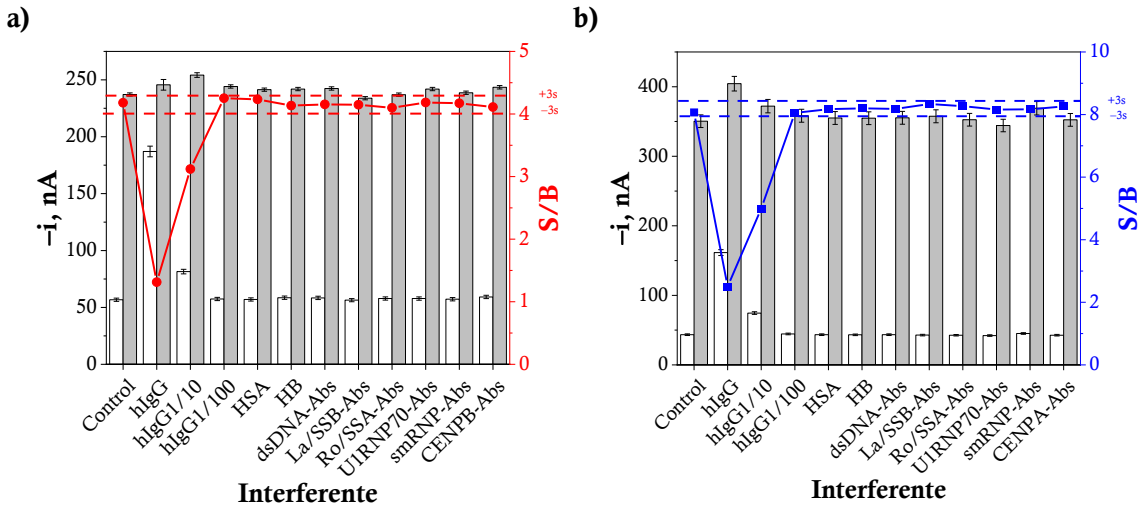


Figura 3.43. *Respuestas amperométricas obtenidas con las bioplataformas asistidas por MBs para la determinación dual de* ***a)*** *0 (B, barras blancas) y 250 (S, barras grises) ng mL^{-1} de estándares de CENPA-Abs o* ***b)*** *0 (B, barras blancas) y 50 U mL^{-1} (S, barras grises) U mL^{-1} de estándares de CENPB-Abs, preparados en ausencia (control) y presencia de 1 mg mL^{-1} hIgG; 0.1 mg mL^{-1} hIgG (1/10); 0.01 mg mL^{-1} hIgG (1/100); 50 mg mL^{-1} HSA; 5 mg mL^{-1} HB; 25 U mL^{-1}dsDNA-Abs; 12.5 U mL^{-1} La/SSB-Abs; 10 U mL^{-1} Ro/SSA-Abs; 10 U mL^{-1} U1RNP70-Abs; 10 U mL^{-1} smRNP-Abs; 10 U mL^{-1} CENPB-Abs o 25 ng mL^{-1} CENPA-Abs, y sus correspondientes relaciones S/B (puntos o cuadrados y líneas rojos o azules, respectivamente).*

Aplicación al análisis de muestras de suero

Con objeto de demostrar el potencial de la bioplataforma dual para la determinación de ambos biomarcadores en muestras de suero de individuos sanos, de pacientes considerados positivos a CENPB-Abs y de pacientes con SSc, se evaluó en primer lugar la posible existencia de efecto matriz comparando estadísticamente las pendientes de los calibrados obtenidos con disoluciones estándar de ambos biomarcadores preparadas en disolución comercial BB con las obtenidas en una muestra de suero de un individuo sano diluida 1000 veces. Como se resume en la **tabla 3.13**, las variables de los calibrados resultaron ser comparables ($F_{exp} < F_{tab,3,3} = 15.44$) y las pendientes no presentaron diferencias significativas a un nivel de confianza del 0.05 ($t_{exp} < t_{tab,6,0.05} = 2.447$), por lo que la determinación de ambos biomarcadores con la bioplataforma dual podía

realizarse por simple interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para cada muestra de suero diluida en los calibrados para estándares preparados en BB.

Tabla 3.13. Estudio estadístico resultante del análisis de las pendientes obtenidas con la bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs para la determinación de estándares de CENPA-Abs y CENPB-Abs preparados en BB o en una muestra representativa de suero de individuo sano diluida 1000 veces.

Biomarcador	***Calibrado***	***Pendiente, nA por década de concentración***	F_{exp}	t_{exp}
CENPA-Abs	Externo*	112 ± 1	11.06	1.344
	Adiciones**	118 ± 4		
CENPB-Abs	Externo*	83.6 ± 0.6	2.64	1.049
	Adiciones**	81 ± 3		

**Disoluciones estándar preparadas en BB.*

*** Disoluciones estándar preparadas en muestra de suero de individuo sano diluida 1000 veces.*

La determinación por triplicado de los dos biomarcadores con la bioplataforma dual en 4 muestras de suero de sujetos sanos, 3 de pacientes considerados positivos a CENPB-Abs y 4 de pacientes con SSc proporcionó los niveles séricos que se resumen en la **tabla 3.14** y aparecen representados en la ***figura 3.44***. Estos valores eran concordantes estadísticamente ($t_{tab,4,0.05}$ = 2.776) con los obtenidos, analizando las mismas muestras, con el kit ELISA que emplea los mismos inmunorreactivos, y que también se han incluido en la tabla.

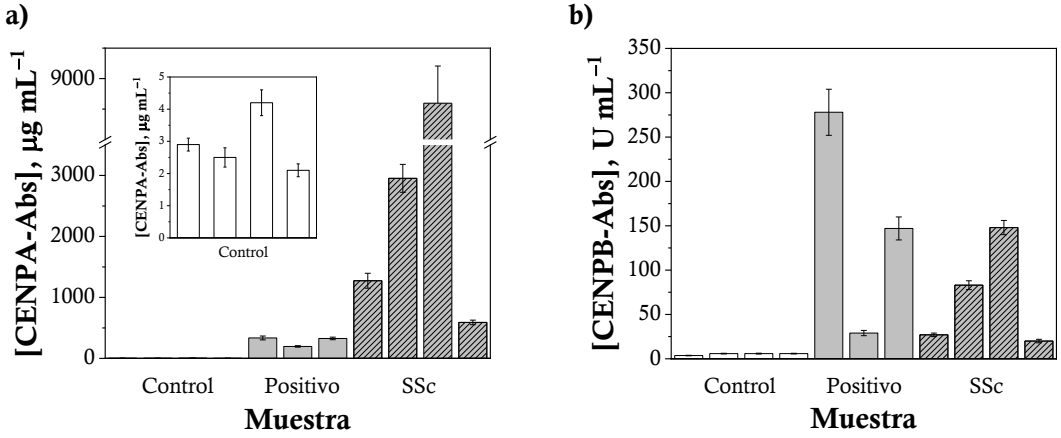


Figura 3.44. a) *Niveles séricos de CENPA-Abs y* ***b)*** *CENPB-Abs proporcionados por la bioplataforma dual asistida por MBs en muestras de individuos sanos y pacientes considerados positivos a CENPB-Abs y con SSc.*

Tabla 3.14. Niveles séricos de CENPA-Abs y CENPB-Abs determinados empleando la bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs y la metodología ELISA en muestras de individuos sanos y pacientes considerados positivos a CENPB-Abs y con SSc.

Sujeto	***Muestra***	***[CENPA-Abs], µg mL^{-1}***		t_{exp}	***[CENPB-Abs], U mL^{-1}***		t_{exp}
		Bioplataforma	*ELISA*		*Bioplataforma*	*ELISA*	
Sanos	1	2.9 ± 0.2 (2.7)	2.7 ± 0.4 (5.4)	2.229	3.7 ± 0.3 (3.2)	3.5 ± 0.6 (6.6)	1.315
	2	2.5 ± 0.3 (4.4)	2.2 ± 0.3 (6.0)	2.364	5.8 ± 0.4 (2.6)	5.1 ± 0.9 (7.0)	2.026
	3	4.2 ± 0.4 (4.3)	4.2 ± 0.5 (5.1)	0.055	5.8 ± 0.5 (3.7)	5.4 ± 0.6 (4.3)	2.215
	4	2.1 ± 0.2 (3.0)	2.2 ± 0.3 (6.1)	0.816	5.8 ± 0.4 (3.0)	5.4 ± 0.9 (6.5)	1.425
Pacientes positivos a CENPB-Abs	5	335 ± 32 (3.9)	331 ± 49 (6.0)	0.259	278 ± 26 (3.7)	266 ± 60 (9.1)	0.794
	6	196 ± 12 (2.6)	185 ± 24 (5.2)	1.699	29 ± 3 (3.7)	28 ± 5 (7.2)	0.619
	7	327 ± 21 (2.6)	322 ± 42 (5.2)	0.404	147 ± 13 (3.6)	138 ± 26 (7.7)	1.283
Pacientes SSc	8	1274 ± 122 (3.8)	1282 ± 162 (5.1)	0.187	27 ± 2 (3.1)	29 ± 6 (9.1)	1.204
	9	2953 ± 229 (3.1)	2978 ± 387 (5.3)	0.237	83 ± 5 (2.6)	88 ± 16 (7.7)	1.168
	10	8596 ± 610 (2.8)	8788 ± 1176 (5.4)	0.623	148 ± 8 (2.2)	149 ± 36 (9.6)	0.101
	11	590 ± 37 (2.6)	577 ± 86 (5.9)	0.615	20 ± 2 (3.8)	20 ± 4 (8.8)	0.236

**Los valores de RSD (%) se indican entre paréntesis.*

Estos resultados permitieron concluir que los niveles séricos de CENPA-Abs eran significativamente superiores a los de individuos sanos y de pacientes considerados positivos a CENPB-Abs y que la determinación dual de CENPA-Abs y CENPB-Abs añadía fiabilidad al diagnóstico inequívoco de los pacientes con SSc en comparación con la determinación únicamente de CENPB-Abs.

Es importante mencionar también que los niveles obtenidos con la bioplataforma dual para los individuos sanos y los pacientes considerados positivos a CENPB-Abs eran estadísticamente comparables con los que proporcionaban las dos bioplataformas electroquímicas desarrollas en esta Tesis Doctoral, tanto en formato integrado como asistida por MBs, para la determinación individual de CENPB-Abs (**tabla 3.15**).

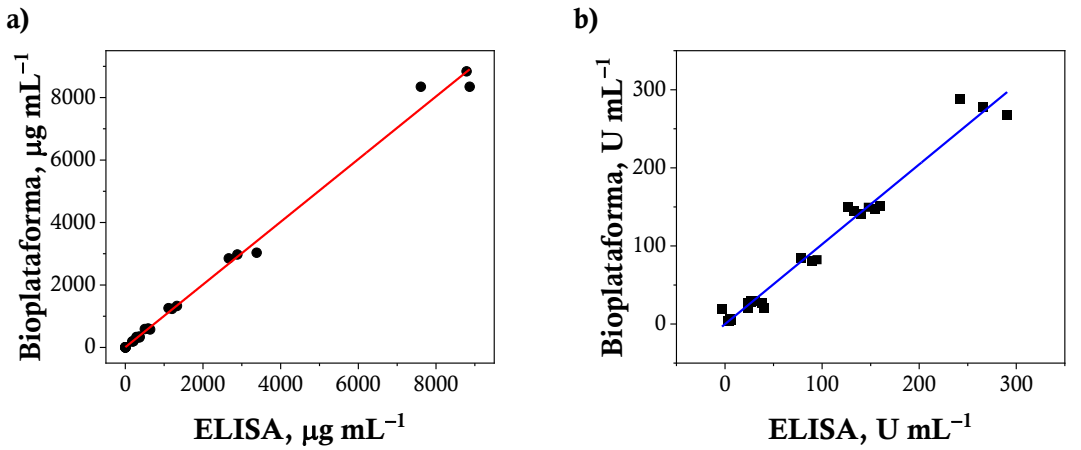
Tabla 3.15. Niveles séricos de CENPB-Abs determinados con las bioplataformas individual en formato integrado o asistida por MBs y dual asistida por MBs en muestras de individuos sanos y de pacientes considerados positivos al biomarcador diana.

Sujeto	***Muestra***	***[CENPB-Abs], U mL^{-1}***			t_{exp}*	t_{exp}**
		Integrado	*Individual MBs*	*Dual MBs*		
Sanos	1	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.7 ± 0.3	2.440	1.788
	2	6.0 ± 0.5	5.8 ± 0.5	5.8 ± 0.4	1.073	0.216
	3	5.9 ± 0.5	5.7 ± 0.5	5.8 ± 0.5	0.990	0.190
	4	5.8 ± 0.5	5.8 ± 0.7	5.8 ± 0.4	0.419	0.340
Pacientes positivos a CENPB-Abs	5	282 ± 12	283 ± 16	278 ± 26	0.739	0.694
	6	29 ± 1	29 ± 2	29 ± 3	0.188	0.502
	7	153 ± 14	153 ± 8	147 ± 13	1.401	1.698

**Comparación estadística usando el estudio t-Student entre los niveles obtenidos con la bioplataforma individual en formato integrado y la dual asistida por MBs.*

***Comparación estadística usando el estudio t-Student entre los niveles obtenidos con la bioplataforma individual y la dual asistidas por MBs.*

Por último, los estudios de correlación entre los niveles resultantes del empleo de la bioplataforma electroquímica dual desarrollada y la tecnología ELISA (***figura 3.45***), proporcionaron valores de ordenada en el origen y pendiente que incluían el 0 y el 1, respectivamente, confirmando la exactitud de los resultados que proporciona la bioplataforma dual en este tipo de muestras.



c)

Parámetro analítico	*CENPA-Abs, µg mL⁻¹*	*CENPB-Abs, U mL⁻¹*
R^2	0.997	0.99
Pendiente	1.00 ± 0.01	1.02 ± 0.02
Ordenada en el origen, concentración	9 ± 36	–0 ± 3

Figura 3.45. *Gráfica de correlación resultante de la comparación de los niveles séricos de* ***a)*** *CENPA-Abs y* ***b)*** *CENPB-Abs proporcionados por la bioplataforma electroquímica dual y por la metodología ELISA convencional, empleando los mismos inmunorreactivos.* ***c)*** *Parámetros analíticos del ajuste lineal.*

El potencial que demuestra esta bioplataforma para mejorar la fiabilidad en el diagnóstico diferencial de enfermedades autoinmunes, como el SSc, a través de la determinación simultánea de dos biomarcadores empleando menores tiempos de ensayo y menor cantidad de muestra, impulsó el desarrollo de otras bioplataformas multiplexadas para la determinación de un mayor número de biomarcadores que se presentarán en las próximas secciones.

Bioplataforma electroquímica cuádruple para la determinación de autoanticuerpos frente a DNA de doble cadena (dsDNA-Abs)

Teniendo en cuenta la importancia de realizar un isotipado preciso de los autoanticuerpos para poder llevar a cabo un diagnóstico completo y tener la posibilidad de estudiar la patogénesis de la enfermedad, así como su progreso y respuesta al tratamiento, en esta Tesis Doctoral, una vez demostrada la posibilidad de desarrollar una bioherramienta electroanalítica capaz de determinar el contenido total de los tres isotipos más comunes de inmunoglobulinas (hIgG, hIgA y hIgM) frente a cadenas dobles de DNA (dsDNA-Abs), se aprovechó la versatilidad del diseño para implementar una bioplataforma cuádruple capaz de proporcionar tanto el contenido total como el contenido individual de los tres isotipos de inmunoglobulinas de mayor relevancia clínica. Así, en esta sección se describen los resultados más relevantes obtenidos con la bioplataforma electroquímica cuádruple desarrollada para la determinación individual y total de los tres isotipos más comunes de inmunoglobulinas (hIgG, hIgA, hIgM) frente a DNA de doble cadena (dsDNA) [Arévalo et al., 2023b].

La nueva bioplataforma desarrollada explota el empleo de los mismos bioconjugados de b-dsDNA-NA-MBs para capturar todas las inmunoglobulinas y detectar contenidos totales o individuales simplemente recurriendo a su marcaje enzimático con anticuerpos secundarios específicos para cada isotipo o con una mezcla de ellos. Como se muestra en la ***figura 3.46***, en este caso los cuatro tipos de bioconjugados diferentes se preparan de forma independiente y simultánea, se capturan en cada uno de los WEs del SP_4CE y se realiza la transducción amperométrica cuádruple bajo agitación constante empleando el sistema HRP/H_2O_2/HQ.

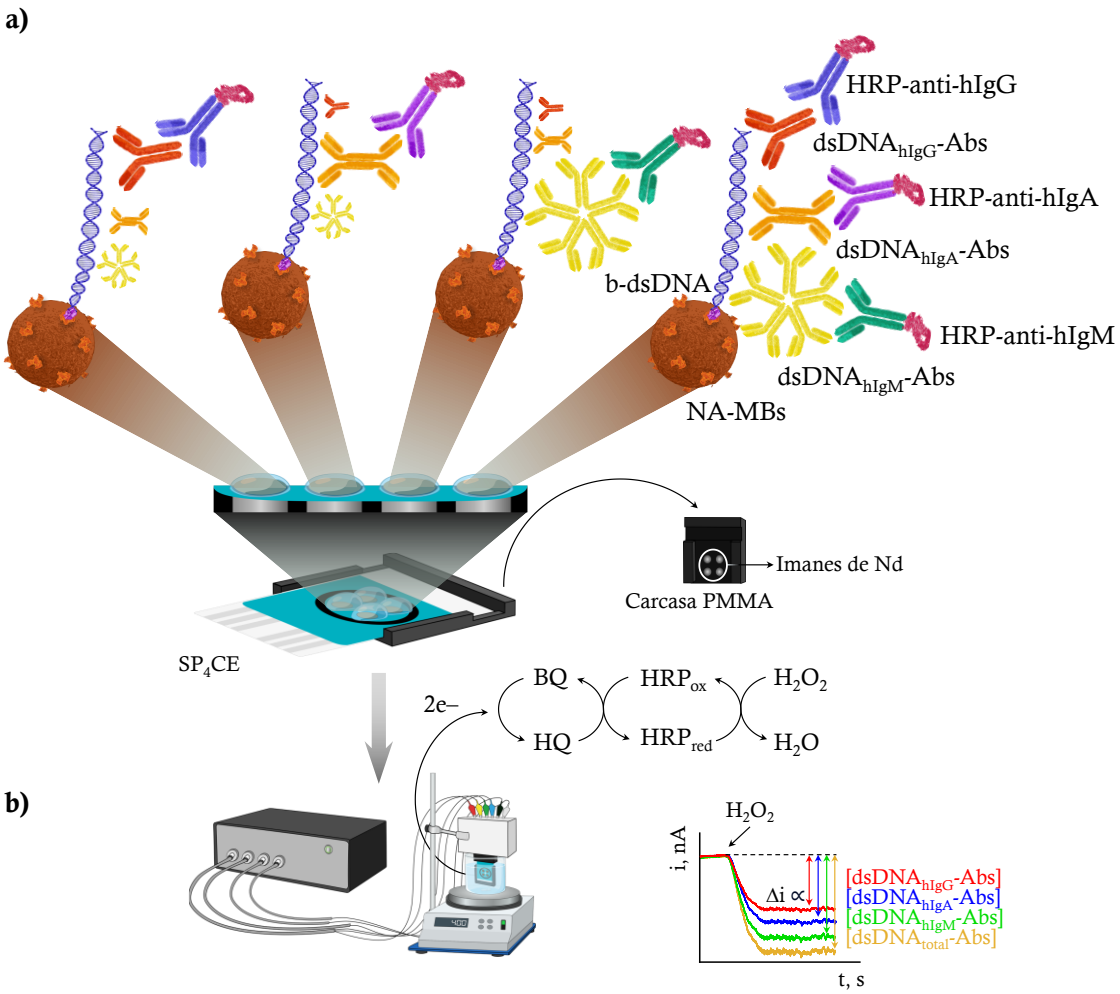


Figura 3.46. a) *Esquema de la bioplataforma electroquímica cuádruple asistida por MBs para la determinación individual y total de los isotipos de inmunoglobulinas más comunes hIgG, hIgA y hIgM frente a dsDNA (dsDNA-Abs).* ***b)*** *Transducción amperométrica cuádruple en disolución bajo agitación constante.*

Optimización de las variables experimentales

Puesto que las variables experimentales involucradas en la determinación del contenido total de dsDNA-Abs ya se optimizaron exhaustivamente (sección 3.1), únicamente se optimizaron las condiciones relativas al marcaje enzimático individual (concentración/dilución y tiempo de incubación con el anticuerpo secundario), comparando las respuestas amperométricas que proporcionaban las bioplataformas para la determinación individual de cada isotipo para 0 (blanco, B) y 25 U mL^{-1} (señal, S) de estándar de dsDNA-Abs.

Los resultados de estos estudios, representados en la ***figura 3.47*** y resumidos en la **tabla 3.16**, mostraron claros valores máximos de la relación S/B para determinadas concentraciones/diluciones y tiempos de incubación que disminuían para concentraciones y tiempos de incubación superiores debido a la menor eficiencia en los procesos de inmunorreconocimiento y la mayor relevancia de las adsorciones inespecíficas.

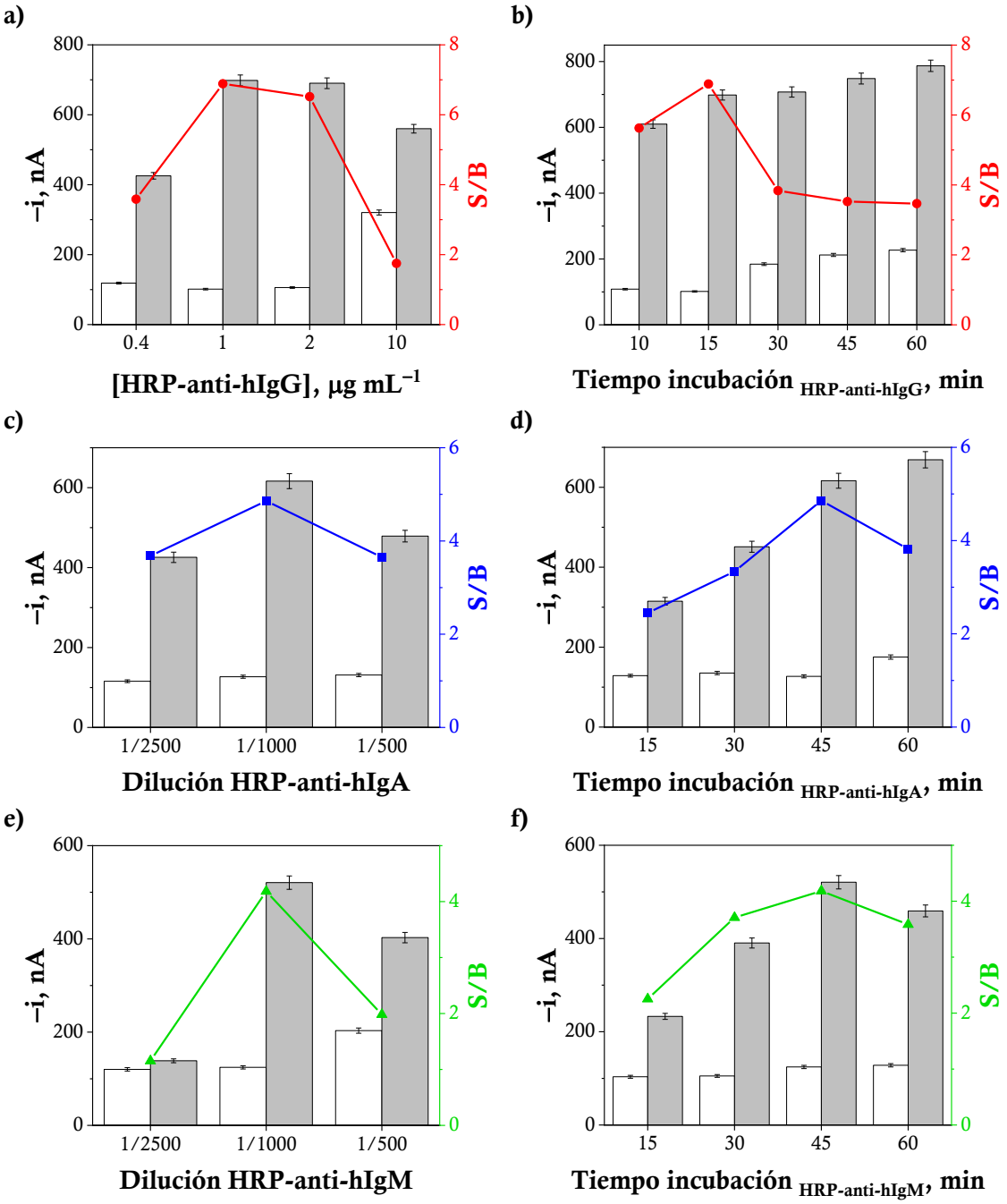


Figura 3.47. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma asistida por MBs para la determinación individual de hIgGs* ***(a, b)****, hIgAs* ***(c, d)*** *o hIgMs* ***(e, f)*** *frente a dsDNA, en ausencia (B, barras blancas) y presencia (S, barras grises) de 25 U mL⁻¹ de estándar de dsDNA-Abs, y las relaciones S/B obtenidas (puntos/cuadrados/triángulos y líneas rojos/azules/verdes, respectivamente) con* ***a, c, e)*** *la concentración/dilución y* ***b, d, f)*** *el tiempo de incubación del anticuerpo secundario correspondiente.*

Tabla 3.16. Variables experimentales evaluadas, rango estudiado y valor seleccionado para el desarrollo de las bioplataformas electroquímicas para la determinación de los isotipos individuales de dsDNA-Abs.

Variable experimental	*Isotipo dsDNA-Abs*	*Rango estudiado*	*Valor seleccionado*
Concentración/dilución HRP-anti-hIg	hIgG	0.5–10.0 μg mL^{-1}	1.0
	hIgA hIgM	1/2500–1/500	1/1000
Tiempo de incubación HRP-anti-hIg, min	hIgG	10–60	15
	hIgA hIgM	15–60	45

Evaluación de la viabilidad de multiplexado

Con el fin de demostrar la factibilidad del desarrollo de la bioplataforma cuádruple, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas con bioconjugados magnéticos preparados para la determinación de los isotipos individuales y totales en ausencia y presencia de 25 U mL^{-1} de estándar de dsDNA-Abs medidos sobre SPCEs y SP_4CEs. Los resultados obtenidos (***figura 3.48***) demostraron que, aunque las respuestas amperométricas eran un 70–80% inferiores sobre los SP_4CEs (comportamiento ya comentado anteriormente y atribuido al área de los WE/s del SP_4CE, menor que la del SPCE), la discriminación (relación S/B) era comparable sobre ambos sustratos. Estos resultados también confirmaron la ausencia de reactividad cruzada significativa entre los WEs adyacentes del SP_4CE.

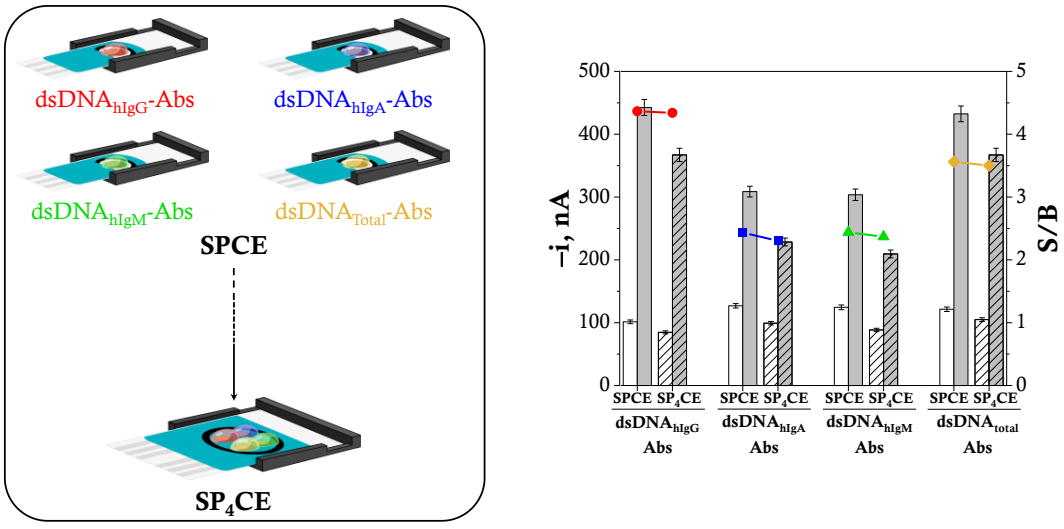


Figura 3.48. *Comparación entre las respuestas amperométricas obtenidas con bioconjugados magnéticos preparados para la determinación de los isotipos individuales y totales en ausencia (barras blancas) y presencia (barras grises) de 25 U mL^{-1} de estándar de dsDNA-Abs sobre SPCEs (barras lisas) y SP_4CEs (barras rayadas) y de las relaciones S/B (símbolos y líneas en color).*

Estudio de selectividad

Al igual que en la determinación total de dsDNA-Abs empleando la bioplataforma electroquímica individual (***figura 3.25***), se evaluó la selectividad de la bioplataforma para la determinación individual de $dsDNA_{hIgG}$-Abs, $dsDNA_{hIgA}$-Abs y $dsDNA_{hIgM}$-Abs en ausencia y en presencia de posibles interferentes a las concentraciones esperadas en suero de individuos sanos.

Como se muestra en la ***figura 3.49***, la presencia de HSA, atribuida a la posible existencia de anticuerpos humanos en el reactivo comercial, afectaba a la determinación de $dsDNA_{hIgG}$-Abs y $dsDNA_{hIgA}$-Abs, pero no de $dsDNA_{hIgM}$-Abs. Estos resultados se atribuyeron tanto al hecho de emplear distintos anticuerpos secundarios para el marcaje enzimático como a la estructura pentamérica de la hIgM, más diferente que la estructura monomérica y dimérica de las hIgG e hIgA, respectivamente. No obstante, cuando las muestras de suero se diluían al menos 100 veces, esta interferencia pasaba a ser poco significativa y no afectaba a la determinación de los biomarcadores.

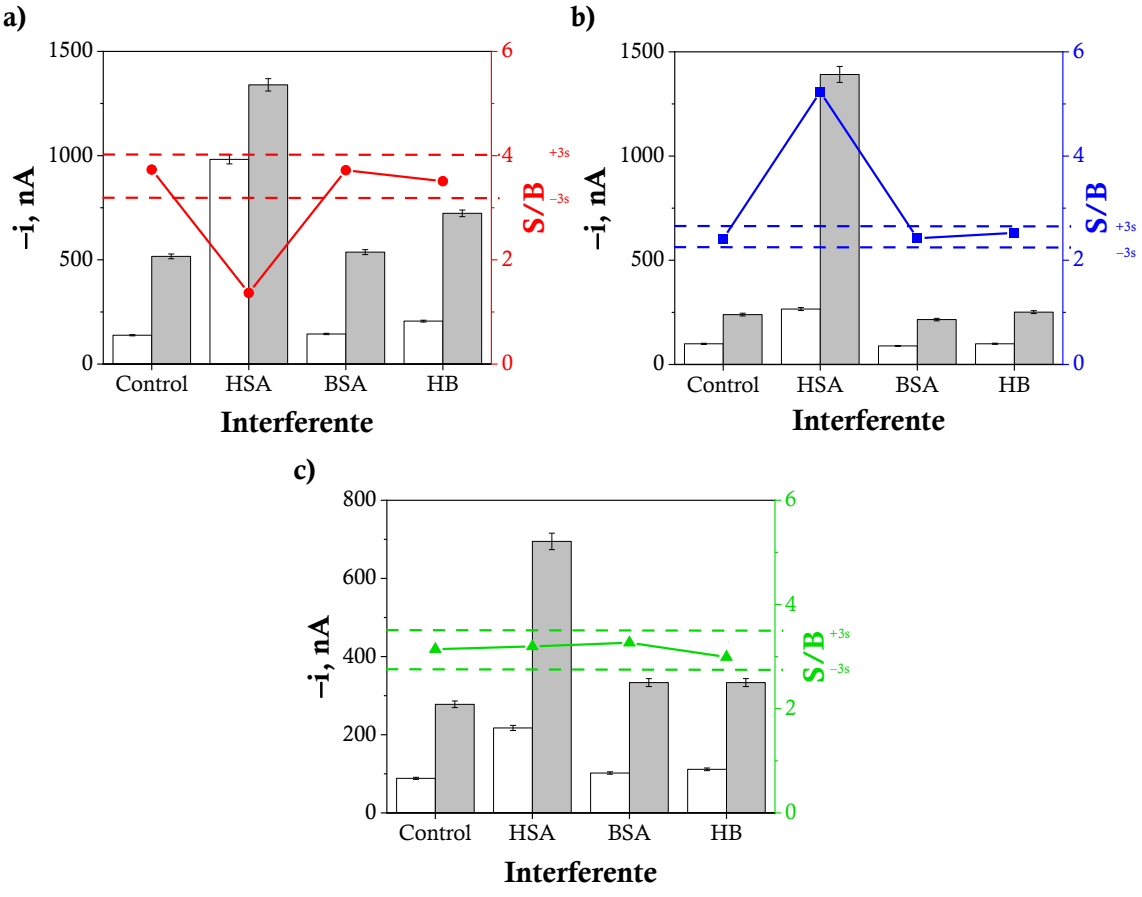


Figura 3.49. *Respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma individual asistida por MBs para la determinación de* ***a)*** *$dsDNA_{hIgG}$-Abs,* ***b)*** *$dsDNA_{hIgA}$-Abs y* ***c)*** *$dsDNA_{hIgM}$-Abs para disoluciones estándar de 0 (B, barras blancas) y 25 (S, barras grises) U mL^{-1} de dsDNA-Abs preparadas en ausencia (control) y presencia de 50 mg mL^{-1} HSA; 5 mg mL^{-1} BSA; 5 mg mL^{-1} HB y sus correspondientes relaciones S/B.*

Calibrados y características analíticas

En el estudio del comportamiento analítico de la bioplataforma cuádruple se obtuvieron los calibrados mostrados en la ***figura 3.50*** cuyo ajuste por mínimos cuadrados proporcionó los parámetros que se resumen en la **tabla 3.17**. Las características analíticas y operacionales que se resumen en la tabla confirman la compatibilidad de la bioplataforma cuádruple desarrollada para la determinación de los biomarcadores en muestras de suero de pacientes con enfermedades autoinmunes, como el SLE, para los que se ha establecido un valor de corte de 100 U mL^{-1} de $dsDNA_{total}$-Abs [Gargiulo et al., 2018], dos órdenes de magnitud superior a los valores de los LOD que ofrece la bioplataforma.

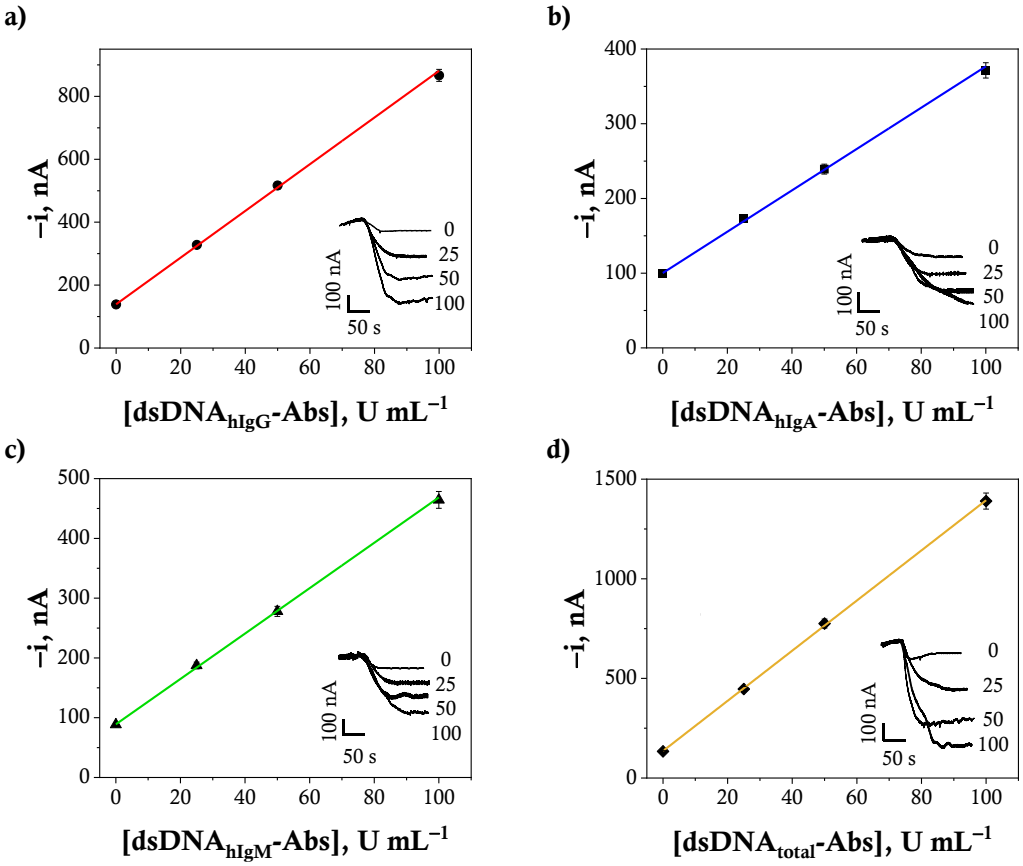


Figura 3.50. *Curvas de calibrado ajustadas y registros amperométricos reales obtenidos con la bioplataforma electroquímica cuádruple asistida por MBs para la determinación de* ***a)*** *$dsDNA_{hIgG}$-Abs,* ***b)*** *$dsDNA_{hIgA}$-Abs,* ***c)*** *$dsDNA_{hIgM}$-Abs y* ***d)*** *$dsDNA_{total}$-Abs.*

Tabla 3.17. Características analíticas ofrecidas por la bioplataforma electroquímica cuádruple desarrollada para la determinación amperométrica de $dsDNA_{hIgG}$-Abs, $dsDNA_{hIgA}$-Abs, $dsDNA_{hIgM}$-Abs y $dsDNA_{total}$-Abs.

Parámetro	***$dsDNA_{hIgG}$-Abs***	***$dsDNA_{hIgA}$-Abs***	***$dsDNA_{hIgM}$-Abs***	***$dsDNA_{total}$-Abs***
Intervalo lineal	3.4–100	5.0–100	5.9–100	1.9–100
R^2	0.999	0.999	0.999	0.999
Pendiente, nA mL U^{-1}	7.4 ± 0.1	3.80 ± 0.06	2.76 ± 0.06	12.6 ± 0.1
Ordenada en el origen, nA	139 ± 2	89 ± 1	100 ± 2	136 ± 7
LOD (n = 10), U mL^{-1}	1.01	1.49	1.77	0.56
LOQ (n = 10), U mL^{-1}	3.4	5.0	5.9	1.9
RSD (n = 5, 25 U mL^{-1}), %	2.2	3.0	2.8	2.9

Aplicación al análisis de muestras de suero

La bioplataforma electroquímica cuádruple desarrollada se aplicó al análisis de muestras de suero de individuos sanos y pacientes diagnosticados con SLE y AD, con objeto de evaluar el potencial clínico de estos autoanticuerpos nucleares tanto en enfermedades autoinmunes como neurodegenerativas.

Tras realizar el estudio estadístico comparando las pendientes obtenidas de los calibrados para estándares de dsDNA-Abs preparados en $SD_{dsDNA\text{-}Abs}$ o en una muestra representativa de un individuo sano diluida 100 veces (**tabla 3.18**) y demostrar la ausencia efecto matriz en la determinación individual y total de los tres isotipos; se analizaron tres réplicas de cada muestra diluida 100 veces y las respuestas se interpolaron en el calibrado de estándares preparados en la disolución reguladora, previo a la sustracción de la corriente medida para una muestra de suero sintético comercial preparado en las mismas condiciones de dilución, con objeto de eliminar la interferencia ya comentada de las hIgGs no específicas a dsDNA que se adsorben sobre las MBs.

Tabla 3.18. Valores de las pendientes (en nA mL U^{-1}) de los calibrados obtenidos con la bioplataforma electroquímica cuádruple desarrollada con estándares de dsDNA-Abs preparados en $SD_{dsDNA\text{-}Abs}$ o en una muestra de suero de un individuo sano diluida 100 veces.

dsDNA-Abs	***Calibrado***		t_{exp}***
	*Externo**	*Adiciones***	
$dsDNA_{hIgG}$-Abs	7.4 ± 0.1	7.2 ± 0.3	0.255
$dsDNA_{hIgA}$-Abs	3.80 ± 0.06	3.5 ± 0.2	1.126
$dsDNA_{hIgM}$-Abs	2.76 ± 0.06	2.67 ± 0.02	0.649
$dsDNA_{total}$-Abs	12.6 ± 0.1	12.3 ± 0.2	1.608

**Disoluciones estándar preparadas en $SD_{dsDNA\text{-}Abs}$.*

***Disoluciones estándar preparadas en muestra de suero diluía 100 veces.*

****Comparación estadística con $t_{tab,4,0.05} = 2.776$.*

Los contenidos individuales y totales de los isotipos obtenidos por la bioplataforma cuádruple en todas las muestras analizadas se representan en la ***figura 3.51*** y, con el fin de demostrar su fiabilidad y exactitud se comparan en la **tabla 3.19** con los resultados obtenidos empleando kits ELISA comerciales que involucraban los mismos inmunorreactivos.

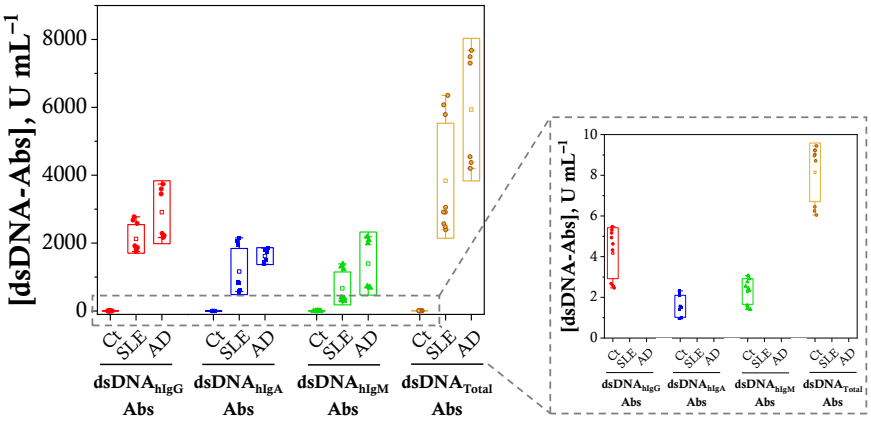


Figura 3.51. *Niveles séricos de $dsDNA_{hIgG}$-Abs (en rojo), $dsDNA_{hIgA}$-Abs (en azul), $dsDNA_{hIgM}$-Abs (en verde) y $dsDNA_{total}$-Abs (en amarillo) proporcionados por la bioplataforma cuádruple asistida por MBs en muestras de individuos sanos y pacientes con SLE y AD.*

Tabla 3.19. Niveles séricos de $dsDNA_{hIgG}$-Abs, $dsDNA_{hIgA}$-Abs, $dsDNA_{hIgM}$-Abs y $dsDNA_{total}$-Abs determinados con la bioplataforma electroquímica cuádruple asistida por MBs y con kits ELISA comerciales en muestras de individuos sanos y pacientes con SLE y AD.

Sujeto	***Muestra***	***[$dsDNA_{hIgG}$-Abs], U mL^{-1}***		***[$dsDNA_{hIgA}$-Abs], U mL^{-1}***		***[$dsDNA_{hIgM}$-Abs], U mL^{-1}***		***[$dsDNA_{Total}$-Abs], U mL^{-1}***	
		Bioplataforma	*ELISA*	*Bioplataforma*	*ELISA*	*Bioplataforma*	*ELISA*	*Bioplataforma*	*ELISA*
Sanos	1	5.3 ± 0.4	5.1 ± 0.4 (1.669)	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2 (1.436)	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.3 (0.925)	9.2 ± 0.5	8.7 ± 0.8 (2.230)
	2	2.6 ± 0.2	2.6 ± 0.3 (0.015)	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2 (0.489)	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.3 (0.409)	6.2 ± 0.5	6.0 ± 0.8 (0.888)
	3	4.6 ± 0.8	4.6 ± 0.8 (0.168)	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.2 (0.962)	2.9 ± 0.4	3.0 ± 0.5 (0.278)	9.0 ± 0.6	9.5 ± 0.8 (2.279)
Pacientes SLE	4	2677 ± 242	2614 ± 493 (0.498)	2056 ± 247	2060 ± 261 (0.048)	1308 ± 198	1324 ± 244 (0.215)	6070 ± 701	6035 ± 802 (0.143)
	5	1921 ± 137	1851 ± 240 (1.097)	862 ± 116	842 ± 141 (0.476)	312 ± 28	301 ± 33 (1.028)	3056 ± 356	3096 ± 520 (0.275)
	6	1808 ± 143	1735 ± 264 (1.052)	602 ± 72	614 ± 121 (0.361)	387 ± 40	384 ± 48 (0.189)	2843 ± 217	2636 ± 309 (1.743)
Pacientes AD	7	3594 ± 362	3316 ± 583 (1.742)	1796 ± 148	1707 ± 242 (1.351)	2088 ± 245	2128 ± 367 (0.383)	7490 ± 464	6763 ± 1344 (2.200)
	8	2224 ± 149	2119 ± 348 (1.202)	1439 ± 425	1485 ± 248 (0.671)	706 ± 57	664 ± 92 (1.655)	4373 ± 425	4180 ± 862 (0.866)

**Los valores de t_{exp} se indican entre paréntesis, comparando estadísticamente con $t_{tab,4,0.05} = 2.776$.*

Los resultados obtenidos demuestran el predominio del isotipo IgG y que el contenido total coindice con la suma de los contenidos individuales de los tres isotipos.

Es importante destacar que, como ocurre con otro tipo de biomarcadores, existe una falta de estandarización en los valores de corte y de referencia establecidos para dsDNA-Abs, siendo estos muy dependientes del método, el laboratorio de análisis y los biorreactivos empleados [González Rodríguez et al., 2021]. No obstante, la mayoría de los kits ELISA comerciales (Creative Diagnostics, Cat. No.: DEIA1681; ImmunoDiagnostics Limited, Cat. No.: 31A040; ELISAKITS.co.uk, Anti-dsDNA screen ELISA kit; ELISAKITS.co.uk, Anti-dsDNA IgG ELISA kit) para diagnosticar enfermedades autoinmunes como SLE a través del análisis de dsDNA-Abs o $dsDNA_{hIgG}$-Abs en muestras de suero han establecido valores de corte comprendidos entre 20 y 25 U mL^{-1}. Es importante destacar que los resultados obtenidos con la bioplataforma (**tabla 3.19**) están de acuerdo con estos valores de corte, obteniéndose en todos los casos concentraciones inferiores a 20–25 U mL^{-1} en individuos sanos y muy superiores en todos los pacientes analizados. Los resultados obtenidos también concuerdan con la clasificación establecida por Attar & Koshak [Attar & Koshak, 2010] empleando otros kits comerciales (INOVA Diagnostic Inc, Cat. No.: 3000200), de las muestras como negativas, equívocas, moderadamente positivas o totalmente positivas según el rango de valores indicado en la **tabla 3.20**.

Tabla 3.20. Clasificación de las muestras establecida por Attar & Koshak [Attar & Koshak, 2010] de acuerdo con el contenido de dsDNA-Abs.

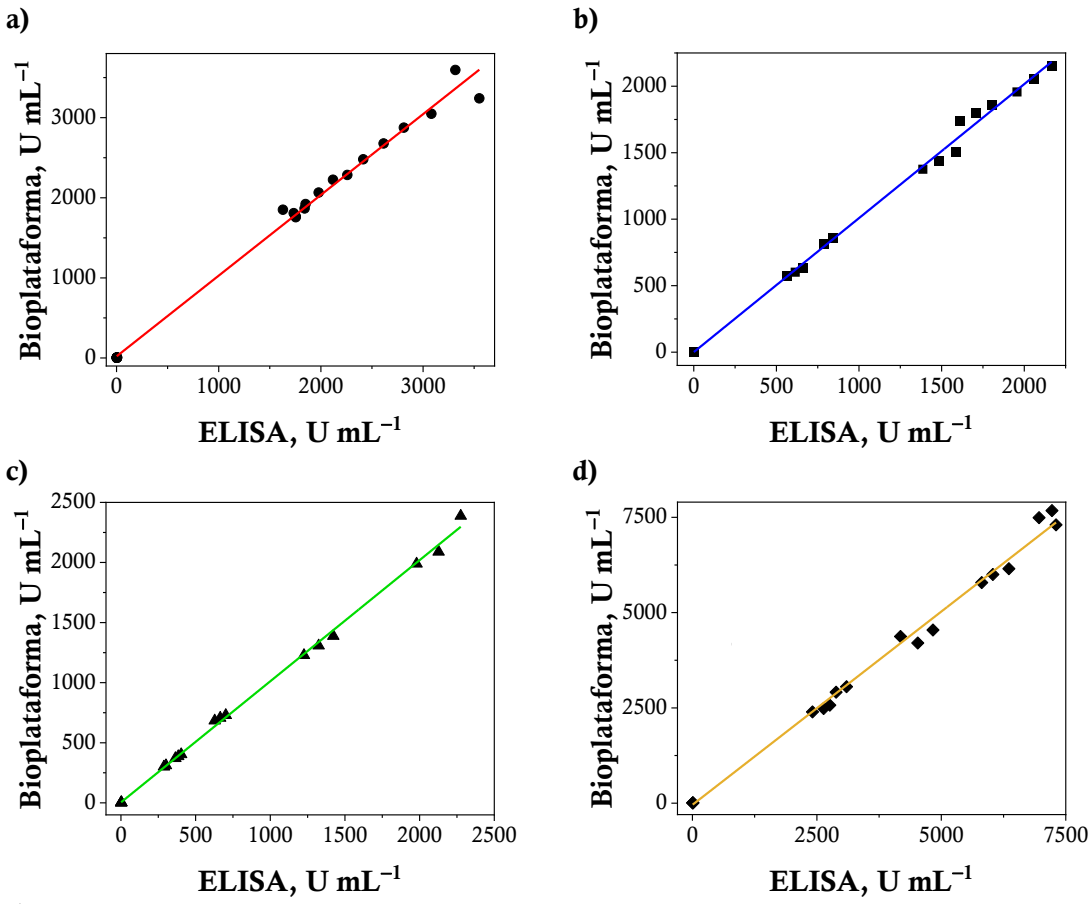
Muestra	***[dsDNA-Abs], U mL^{-1}***
Negativa	0–200
Equívoca	201–300
Moderadamente positiva	301–800
Totalmente positiva	> 801

Los niveles séricos obtenidos con la bioplataforma desarrollada también están de acuerdo con los valores de corte de 100 y 49 U mL^{-1} para $dsDNA_{total}$-Abs reportados por Gargiulo y cols. y Elsayed y cols. [Gargiulo et al., 2018; Elsayed et al., 2022], respectivamente, de 10–45 U mL^{-1} para $dsDNA_{hIgG}$-Abs descritos por González Rodríguez y cols. [González Rodríguez et al., 2021], y de 73.5, 28 y 69.5 U mL^{-1} para $dsDNA_{hIgG}$-Abs, $dsDNA_{hIgA}$-Abs y $dsDNA_{hIgM}$-Abs, respectivamente, notificados por Villalta y cols. [Villalta et al., 2013] para discriminar entre muestras de SLE negativas y positivas.

En cuanto a los pacientes diagnosticados con AD, aunque sí se han relacionado estos biomarcadores en la literatura con la enfermedad [Kavanaugh & Solomon, 2002; Attar & Koshak, 2010], no se han establecido valores de corte, siendo éstos los primeros contenidos descritos de estos biomarcadores en este tipo de muestras.

La comparación estadística entre los resultados proporcionados por la bioplataforma cuádruple desarrollada y los kits ELISA, y las correspondientes gráficas de correlación (***figura 3.52***) probaron la excelente concordancia entre ambas metodologías y la fiabilidad de la bioplataforma en la determinación múltiple de los biomarcadores, con valores de $t_{exp} < t_{tab}$ y de pendientes y ordenadas en el origen que incluían los valores de 1 y 0, respectivamente.

Finalmente, a pesar del limitado tamaño muestral, se realizó un análisis de los resultados proporcionados por la bioplataforma electroquímica mediante curvas ROC para evaluar el potencial diagnóstico de estos biomarcadores en las enfermedades estudiadas. Los parámetros obtenidos, resumidos en la **tabla 3.21**, demostraron que la bioplataforma desarrollada permitía, a través de la determinación de $dsDNA_{hIgG}$-Abs, $dsDNA_{hIgA}$-Abs, $dsDNA_{hIgM}$-Abs y $dsDNA_{total}$-Abs la discriminación total entre individuos sanos y pacientes con SLE o AD, con valores del área bajo la curva (AUC), sensibilidad y especificidad del 100%. Además, es importante destacar que, aunque no era posible discriminar entre pacientes con SLE y AD por un solapamiento parcial en las concentraciones obtenidas, se lograron sensibilidades del 100%, especificidades superiores al 66,7% y AUC del 83,3% para $dsDNA_{hIgG}$-Abs, $dsDNA_{hIgM}$-Abs y $dsDNA_{total}$-Abs, con un valor más bajo para $dsDNA_{hIgA}$-Abs, que es la inmunoglobulina menos concentrada en sangre. Y lo que es más interesante, la combinación de los resultados de $dsDNA_{hIgG}$-Abs, $dsDNA_{hIgA}$-Abs, $dsDNA_{hIgM}$-Abs y $dsDNA_{total}$-Abs mostró plena capacidad para discriminar tanto individuos sanos frente a pacientes con SLE o AD, como pacientes SLE frente a pacientes con AD. Además, este análisis exhaustivo nos permitió establecer los valores de corte que se muestran en la última fila de la **tabla 3.21** para cada uno de los cuatro biomarcadores para cada una de las discriminaciones evaluadas.



e)

Parámetro analítico	*dsDNA$_{hIgG}$-Abs*	*dsDNA$_{hIgA}$-Abs*	*dsDNA$_{hIgM}$-Abs*	*dsDNA$_{total}$-Abs*
R^2	0.997	0.999	0.999	0.998
Pendiente	1.01 ± 0.02	1.01 ± 0.01	1.008 ± 0.008	1.01 ± 0.01
Ordenada en el origen, U mL^{-1}	20 ± 30	0 ± 12	4 ± 8	–44 ± 57

Figura 3.52. *Gráfica de correlación resultante de la comparación de los niveles séricos de* ***a)*** *dsDNA$_{hIgG}$-Abs,* ***b)*** *dsDNA$_{hIgA}$-Abs,* ***c)*** *dsDNA$_{hIgM}$-Abs* ***d)*** *dsDNA$_{total}$-Abs proporcionados por la bioplataforma electroquímica cuádruple y por la metodología ELISA convencional, empleando los mismos inmunorreactivos, en todas las muestras analizadas.* ***e)*** *Resumen de los parámetros de todos los ajustes por mínimos cuadrados.*

Tabla 3.21. Potencial de los biomarcadores analizados con la bioplataforma cuádruple (1: $dsDNA_{hIgG}$-Abs; 2: $dsDNA_{hIgA}$-Abs; 3: $dsDNA_{hIgM}$-Abs; y 4: $dsDNA_{total}$-Abs), considerados de forma individual o combinada, para detectar y discriminar enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas y los valores de corte séricos establecidos.

Parámetros	***Sanos vs. Pacientes SLE***					***Sanos vs. Pacientes AD***					***Pacientes SLE vs. Pacientes AD***				
	1	*2*	*3*	*4*	*1+2+3+4*	*1*	*2*	*3*	*4*	*1+2+3+4*	*1*	*2*	*3*	*4*	*1+2+3+4*
AUC	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83.3	66.7	83.3	83.3	100
Sensibilidad	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Especificidad	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	66.7	66.7	66.7	66.7	100
Valor de corte, U mL^{-1}	907	302	157	1426	--	1115	721	354	2191	--	2073	1151	546	3715	--

Bioplataforma electroquímica cuádruple para la determinación de autoanticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles (ENAs-Abs)

En esta sección se presentan los resultados más relevantes obtenidos en el desarrollo, caracterización y aplicación de una bioplataforma electroquímica cuádruple para la determinación de autoanticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles (ENAs-Abs), en particular, frente a La/SSB, Ro/SSA, U1RNP70 y smRNP, publicados en [Arévalo et al., 2023c], trabajo anexado al final de la Memoria.

El fundamento de esta bioplataforma, representado en la ***figura 3.53***, implica la implementación de formatos de inmunoensayo de tipo indirecto, inmovilizando cada proteína antígeno sobre el soporte micromagnético para la captura selectiva de cada biomarcador específico, marcados enzimáticamente con un anticuerpo secundario conjugado con enzima HRP. Como se especifica en la sección 2.2.1, las proteínas La/SSB, Ro/SSA y U1RNP70, se adquirieron comercialmente con un tag de His, para inmovilizarlas explotando la química His-tag sobre las His-tag *isolation*-MBs. En cambio, la proteína smRNP, no disponible comercialmente con ese marcaje, se inmovilizó covalentemente empleando la química de la EDC/NHSS sobre HOOC-MBs.

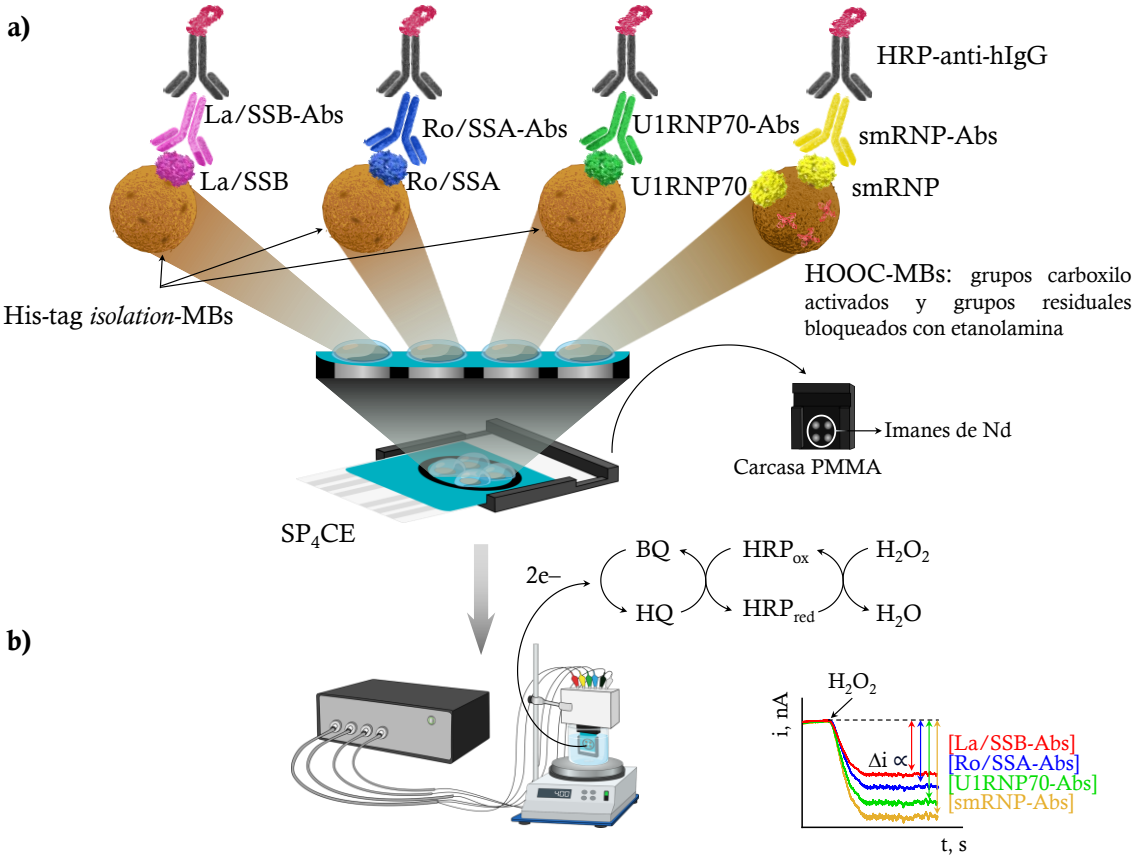


Figura 3.53. a) *Esquema de la bioplataforma electroquímica cuádruple asistida por MBs desarrollada para la determinación de La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs y smRNP-Abs (ENAs-Abs).* ***b)*** *Transducción amperométrica cuádruple en disolución bajo agitación constante.*

Optimización de las variables experimentales

Una vez comprobado que el esquema del bioensayo establecido era viable para la determinación cuádruple de los ENAs-Abs, y puesto que la bioplataforma requiere la preparación de lotes independientes de bioconjugados magnéticos para cada una de las dianas, con el fin de conseguir el mejor rendimiento analítico se optimizaron individualmente las variables experimentales involucradas en su preparación. Para ello, y siguiendo el criterio S/B, se compararon las respuestas amperométricas que proporcionaban bioplataformas para la determinación individual de cada biomarcador para disoluciones de 0 (blanco, B) y 12.5, 10, 5 o 10 U mL^{-1} (señal, S) de estándares de La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs o smRNP-Abs, respectivamente. Las condiciones evaluadas, rango y valores óptimos seleccionados se resumen en la **tabla 3.22** y los resultados se representan en las ***figuras 3.54–3.57***.

El volumen de His-tag *isolation*-MBs se optimizó por primera vez en el Grupo de Investigación en este trabajo para la formación de los bioconjugados para la determinación individual de La/SSB-Abs. Los resultados obtenidos (***figura 3.54***) demostraron que la mayor discriminación entre la ausencia y presencia de biomarcador se producía cuando se empleaban 2.0 µL de suspensión comercial de las MBs. A volúmenes superiores a este óptimo, se obtenía una disminución significativa de la señal específica que se atribuyó a una menor eficiencia en el proceso de inmunorreconocimiento y/o al aumento de la barrera de difusión en la superficie del WE [Fernández et al., 2023]. Así, se emplearon 2.0 µL de la suspensión comercial de His-tag *isolation*-MBs para la inmovilización de proteínas a través de la química His-tag y 3.0 µL de la suspensión de HOOC-MBs, volumen previamente optimizado en el Grupo de Investigación [Esteban-Fernández de Ávila et al., 2013], cuando se empleaba la química de la EDC/NHSS.

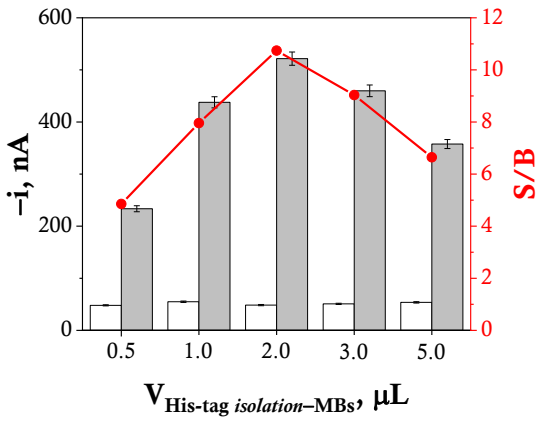


Figura 3.54. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma asistida por MBs para la determinación individual de La/SSB-Abs, en ausencia (B, barras blancas) y presencia (S, barras grises) de 12.5 U mL^{-1} de estándar de La/SSB-Abs, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con el volumen de His-tag isolation-MBs.*

A pesar de que la concentración de antígeno óptima a inmovilizar era diferente para cada biomarcador (***figura 3.55.i***), se observó la misma tendencia en todos los casos: las respuestas específicas (S) aumentaban con la concentración de la proteína inmovilizada hasta alcanzar el valor óptimo, a partir del cual se producía un descenso debido al peor reconocimiento del autoanticuerpo diana por impedimento estérico y las respuestas inespecíficas apenas variaban hasta el valor óptimo, a excepción de la U1RNP70, a partir del cual aumentaban.

Es importante destacar también que en ausencia de proteína antígeno no era posible detectar ninguno de los biomarcadores diana (relación S/B ~ 1 para las barras "0" de todos los paneles de la ***figura 3.55***), confirmando, por un lado, la ausencia de adsorciones inespecíficas tanto de los ENAs-Abs como del HRP-anti-hIgG, y por otro, que la captura de los anticuerpos se producía selectivamente a través del antígeno inmovilizado sobre las MBs.

El resto de variables estudiadas y optimizadas: tiempos de incubación para la inmovilización de la proteína antígeno (***figura 3.55.ii***) y para la captura selectiva de los ENAs-Abs (***figura 3.56.ii***) de 15 minutos, volumen (***figura 3.57.i***) y tiempo de incubación (***figura 3.57.ii***) de la disolución comercial de HRP-anti-hIgG para el marcaje enzimático de los ENAs-Abs capturados sobre las MBs de 25 µL y 30 minutos, resultaron coincidentes para la determinación de los cuatro biomarcadores, lo que representa un ventaja práctica importante para la preparación simultánea de los cuatro bioconjugados. Los resultados de estas optimizaciones mostraron, en general, un incremento de las respuestas obtenidas en ausencia de biomarcador (B) y una disminución drástica en las medidas obtenidas en su presencia (S) para concentraciones o tiempos de incubación de anticuerpos secundarios superiores a los valores óptimos, atribuidos a un aumento de las adsorciones inespecíficas, a fenómenos de agregación y a eficiencias menos favorables de las reacciones de inmunorreconocimiento.

Además, y como se ha observado en otras investigaciones de esta Tesis Doctoral [Arévalo et al., 2021], resultaba una mayor relación S/B cuando la captura selectiva de los autoanticuerpos diana y su marcaje enzimático se realizaba en dos etapas independientes (***figura 3.56.i***), debido a la peor eficiencia en la captura de los autoanticuerpos marcados con el anticuerpo secundario.

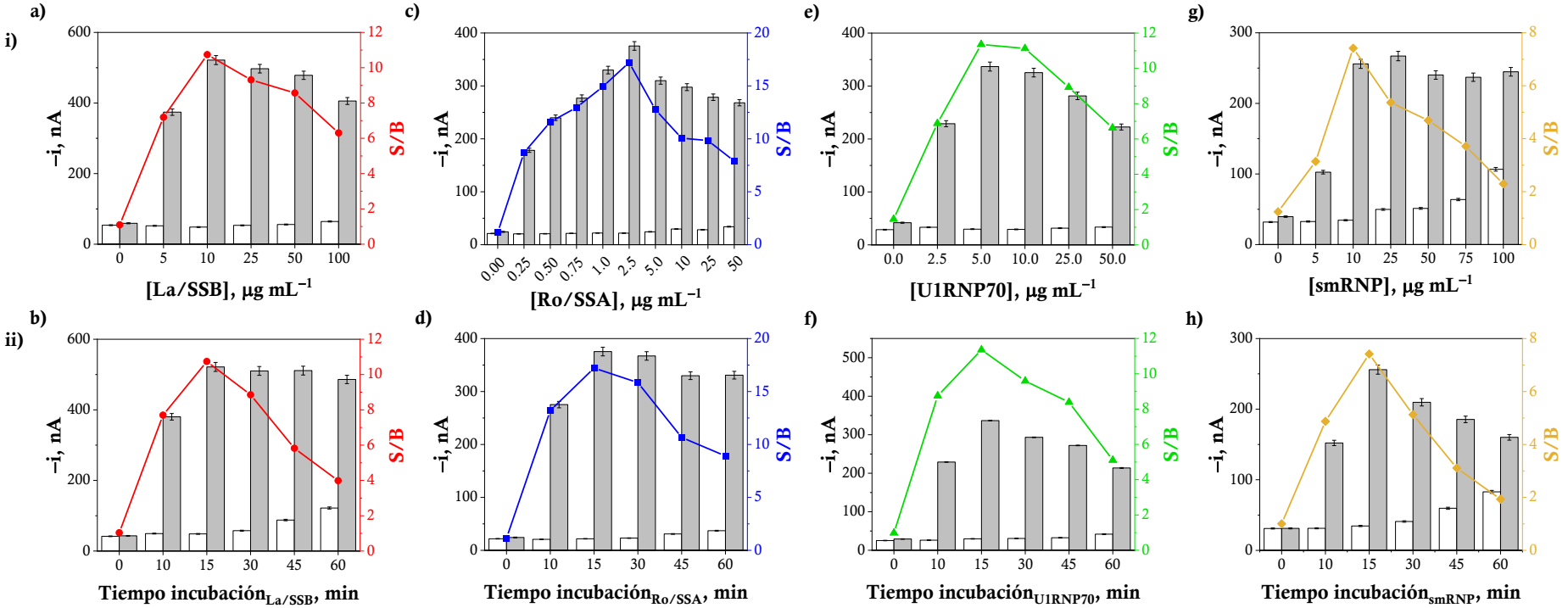


Figura 3.55. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con las bioplataformas asistidas por MBs para la determinación individual de* ***a, b)*** *La/SSB-Abs,* ***c, d)*** *Ro/SSA-Abs,* ***e, f)*** *U1RNP70-Abs y* ***g, h)*** *smRNP-Abs en ausencia (B, barras blancas) y presencia (S, barras grises) de 12.5, 10, 5 y 10 U mL^{-1} de estándar de La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs y smRNP-Abs, respectivamente y las correspondientes relaciones S/B con* ***i)*** *la concentración y* ***ii)*** *tiempo de incubación de las proteínas antígeno.*

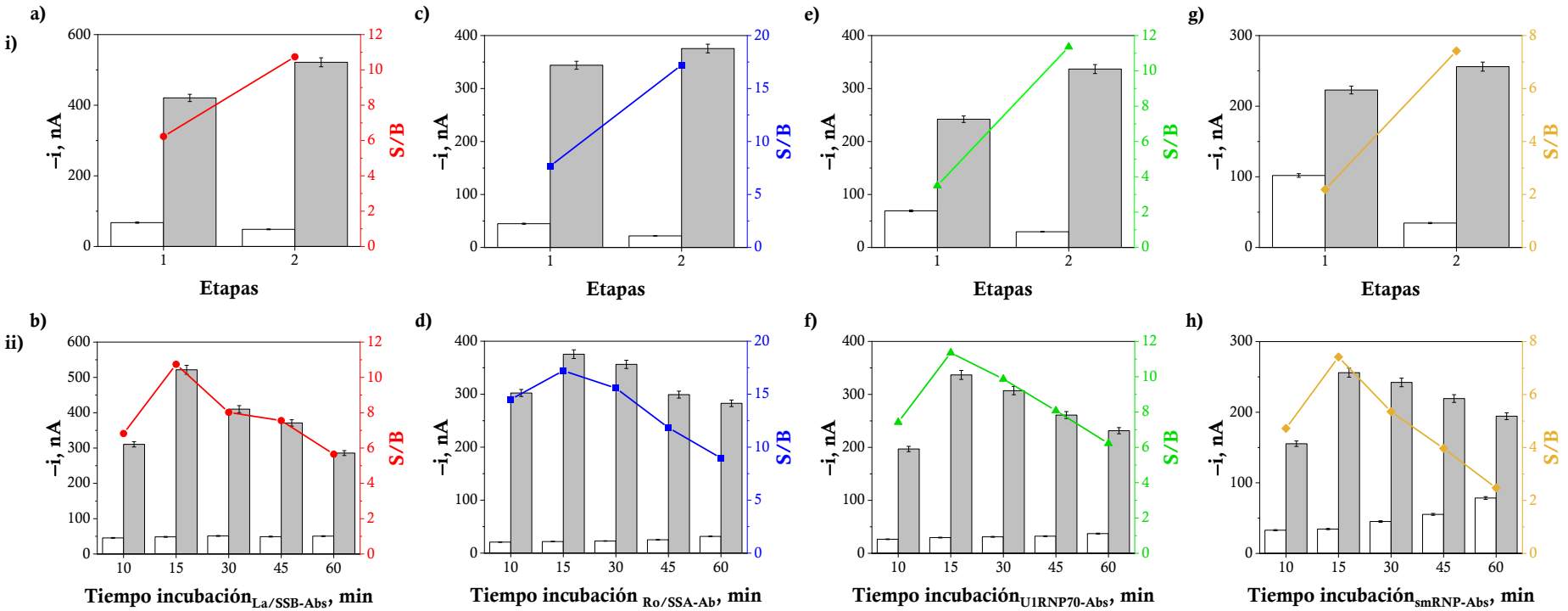


Figura 3.56. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando las bioplataformas asistidas por MBs para la determinación individual de* ***a, b)*** *La/SSB-Abs,* ***c, d)*** *Ro/SSA-Abs,* ***e, f)*** *U1RNP70-Abs y* ***g, h)*** *smRNP-Abs en ausencia (B, barras blancas) y presencia (S, barras grises) de 12.5, 10, 5 y 10 U mL*$^{-1}$ *de estándar de La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs y smRNP-Abs, respectivamente y las correspondientes relaciones S/B con* ***i)*** *el número de etapas de incubación y* ***ii)*** *el tiempo de incubación de los estándares de ENAs-Abs.*

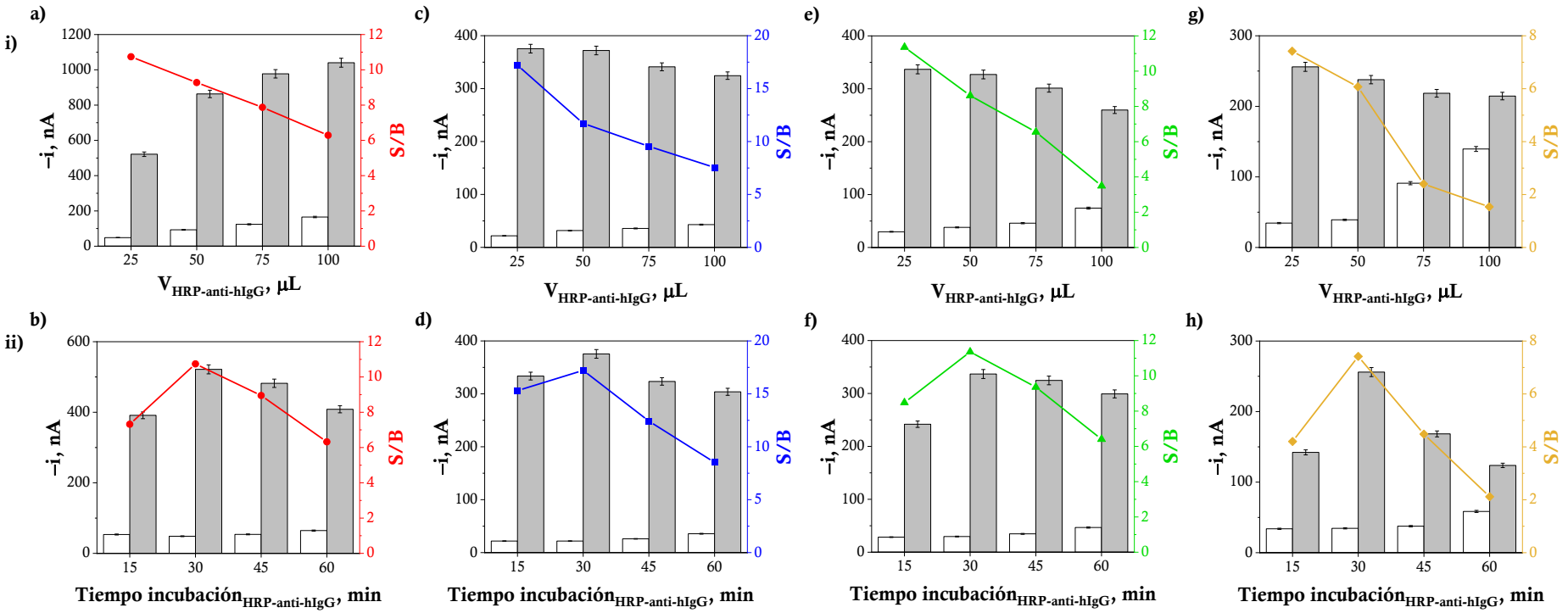


Figura 3.57. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataformas asistidas por MBs para la determinación individual de* ***a, b)*** *La/SSB-Abs,* ***c, d)*** *Ro/SSA-Abs,* ***e, f)*** *U1RNP70-Abs y* ***g, h)*** *smRNP-Abs en ausencia (B, barras blancas) y presencia (S, barras grises) de 12.5, 10, 5 y 10 U mL^{-1} de estándar de La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs y smRNP-Abs, respectivamente y las correspondientes relaciones S/B con el* ***i)*** *volumen y* ***ii)*** *tiempo de incubación de la disolución de HRP-anti-hIgG.*

Tabla 3.22. Variables experimentales evaluadas, rango estudiado y valor seleccionado para la determinación de ENAs-Abs empleando las bioplataformas electroquímicas asistidas por MBs para su determinación individual.

Variable experimental		***ENAs-Abs***	***Rango estudiado***	***Valor seleccionado***
Volumen MBs, µL	His-tag *isolation*-MBs	La/SSB	0.5–5.0	2.0
		Ro/SSA	-	
		U1RNP70	-	
	HOOC-MBs	smRNP	-	3.0
[Proteína antígeno], µg mL^{-1}		La/SSB	0.0–100.0	10.0
		Ro/SSA	0.0–50.0	2.5
		U1RNP70	0.0–50.0	5.0
		smRNP	0.0–100.0	10.0
Tiempo incubación proteína antígeno, min		La/SSB Ro/SSA U1RNP70 smRNP	0–60	15
Nº etapas realización ensayo		La/SSB Ro/SSA U1RNP70 smRNP	1, 2	2
Tiempo incubación autoanticuerpo, min		La/SSB Ro/SSA U1RNP70 smRNP	10–60	15
Volumen HRP-anti-hIgG, µL		La/SSB Ro/SSA U1RNP70 smRNP	25–100	25
Tiempo incubación HRP-anti-hIgG, min		La/SSB Ro/SSA U1RNP70 smRNP	15–60	30

Evaluación de la viabilidad de multiplexado

Se compararon las respuestas amperométricas obtenidas para bioconjugados preparados de la misma manera sobre SPCEs y SP_4CEs, en ausencia (blanco, B) y presencia (señal, S) de 25 U mL^{-1} de estándar de cada biomarcador diana.

Los resultados, mostrados en la ***figura 3.58***, confirmaron la viabilidad del multiplexado, demostrando que, pese a la disminución de las respuestas amperométricas por la menor área de los WEs de los SP_4CEs o el hecho de capturar la misma cantidad de MB en una superficie más pequeña, lo que puede dificultar la transferencia de electrones y/o implicar una mayor barrera para la difusión en la superficie WE [Fernández et al., 2023], no existían diferencias significativas en los valores de la relación S/B, descartándose también la ausencia de reactividad cruzada entre los WEs adyacentes.

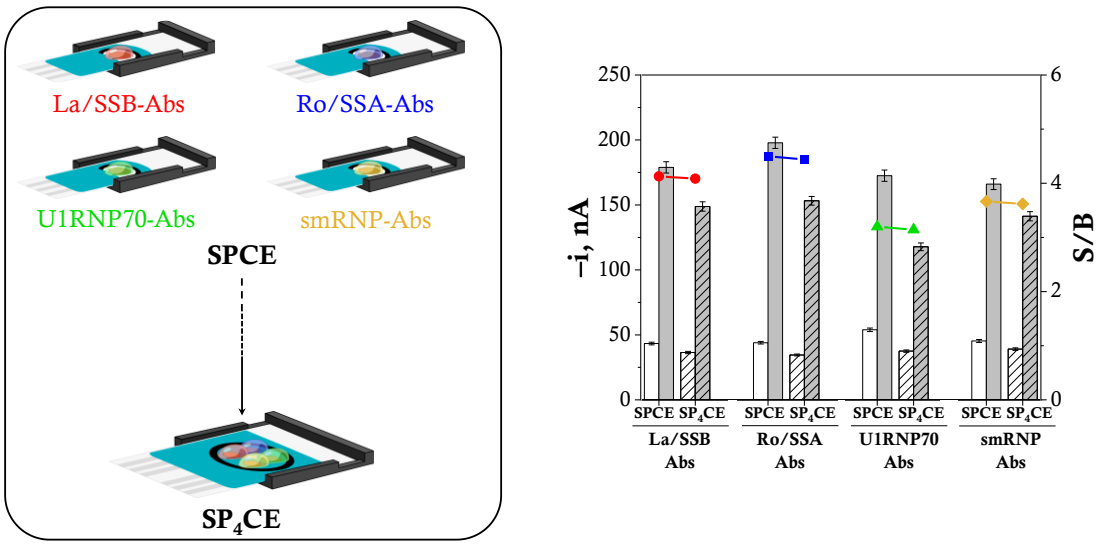


Figura 3.58. *Comparación de las respuestas amperométricas que proporcionan las bioplataformas para los bioconjugados preparados en ausencia (barras blancas) y presencia (barras grises) de 25 U mL^{-1} de estándar de La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs y smRNP-Abs medidas sobre SPCEs (barras lisas) y SP_4CEs (barras rayadas) y de las relaciones S/B (símbolos y líneas en color).*

Calibrados y características analíticas

Se evaluó el rendimiento analítico de la bioplataforma cuádruple para cada biomarcador en las condiciones optimizadas, obteniéndose los calibrados lineales semilogarítmicos que se muestran en la ***figura 3.59*** y cuyos parámetros analíticos se resumen en la **tabla 3.23** junto con el resto de las características analíticas y operacionales.

Tabla 3.23. Características analíticas ofrecidas por la bioplataforma electroquímica cuádruple desarrollada para la determinación amperométrica de ENAs-Abs.

Parámetro analítico	***ENAs-Abs***			
	La/SSB-Abs	*Ro/SSA-Abs*	*U1RNP70-Abs*	*smRNP-Abs*
Intervalo lineal	0.05–50	0.1–100	0.1–100	0.2–100
R^2	0.995	0.999	0.993	0.999
Pendiente, nA por década de concentración (U mL^{-1})	192 ± 3	90 ± 2	108 ± 2	66.5 ± 0.4
Ordenada en el origen, nA	–1 ± 4	45 ± 2	–23 ± 3	42.0 ± 0.6
LOD (n = 10), U mL^{-1}	0.01	0.04	0.03	0.05
LOQ (n = 10), U mL^{-1}	0.05	0.1	0.09	0.2
RSD (n = 5), %*	2.4	2.1	2.5	2.4

**RSD calculada para 5 medidas amperométricas obtenidas con diferentes bioplataformas cuádruples para bioconjugados preparados el mismo día con disoluciones estándar que contenían 10 U mL^{-1} de La/SSB-Abs y 25 U mL^{-1} de Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs y smRNP-Abs.*

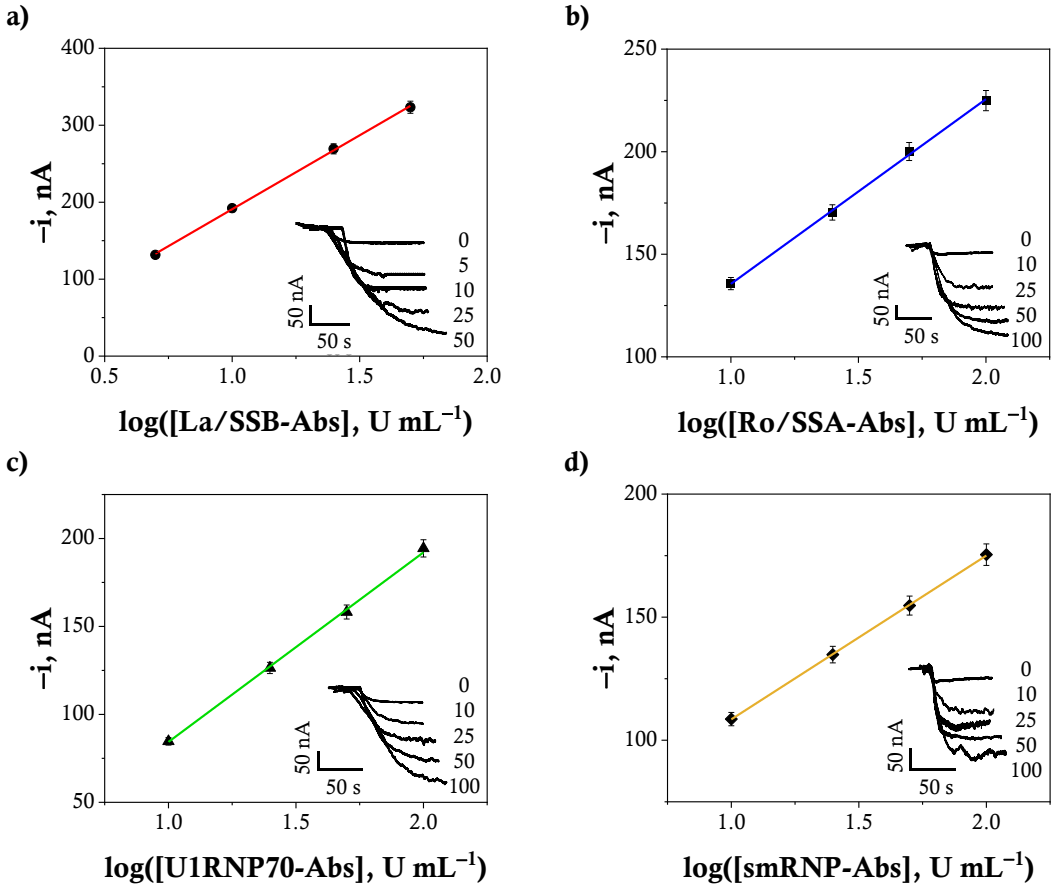


Figura 3.59. *Curvas de calibrado ajustadas y registros amperométricos reales obtenidos con la bioplataforma electroquímica cuádruple asistida por MBs para la determinación de* ***a)*** *La/SSB-Abs,* ***b)*** *Ro/SSA-Abs,* ***c)*** *U1RNP70-Abs y* ***d)*** *smRNP-Abs.*

Debido a la ausencia de otras bioplataformas descritas para la determinación de estos biomarcadores, las características analíticas de esta bioplataforma solo pueden compararse con el de los kits ELISA comerciales para la detección individual de cada biomarcador: *Alpha Diagnostic International* para La/SSB-Abs (Cat. No.: 3220-SSB), Ro/SSA-Abs (Cat. No.: 3210-SSA), U1RNP70-Abs (Cat. No.: 3300-120-RNG) y smRNP-Abs (Cat. No.: 3300-110-SRG), así como las ofrecidas por los kits comerciales de Creative Diagnostics que emplean los mismos inmunorreactivos que en la bioplataforma para La/SSB-Abs (Cat. No.: DEIA1688), Ro/SSA-Abs (Cat. No.: DEIA1685), U1RNP70 (Cat. No.: DEIA4147) y smRNP-Abs (Cat. No.: DEIA1690).

Todos estos kits ofrecen LODs de 1 U mL^{-1}, valores entre 20 y 100 veces superiores a los obtenidos con la bioplataforma cuádruple, que además proporciona rangos lineales que comprenden hasta tres órdenes de magnitud para los biomarcadores diana. Es importante destacar también que los valores de los LODs que ofrece esta bioplataforma electroquímica son muy inferiores a los niveles de corte séricos establecidos por estos kits comerciales, de 25 U mL^{-1} para los cuatro biomarcadores diana, para identificar pacientes con enfermedades autoinmunes, demostrando la compatibilidad de la bioplataforma para este propósito.

Por otro lado, los valores obtenidos para la RSD, por debajo del 3% para los cuatro biomarcadores, confirma la buena reproducibilidad de los protocolos empleados tanto en la fabricación de los bioconjugados como en su detección amperométrica sobre los SP_4CEs, y es destacable teniendo en cuenta que los kits ELISA comerciales presentan valores de hasta el 11 % y no ofrece la posibilidad de determinación multiplexada.

Aunque frente a estas metodologías convencionales, la bioplataforma no es significativamente ventajosa en tiempos de determinación (solo 15 minutos inferior) sí resulta muy atractivo su carácter multiplexado y el hecho de emplear sustratos e instrumentación asequible en el punto de atención.

Estabilidad de almacenamiento

Los bioconjugados magnéticos preparados hasta la inmovilización de la proteína antígeno, en el caso de los que se basan en la química His-tag, y tras el bloqueo de los grupos residuales activados en la determinación de smRNP-Abs, se almacenaron en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado a 4 ºC. Las medidas amperométricas con las bioplataformas preparadas a partir de ellos cada día control en ausencia y presencia de 12.5 U mL^{-1} de estándar de La/SSB-Abs o 25 U mL^{-1} de estándares de Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs o smRNP-Abs (***figura 3.60***) demostraron que los bioconjugados se podían almacenar durante aproximadamente 35 días sin pérdida significativa de señal.

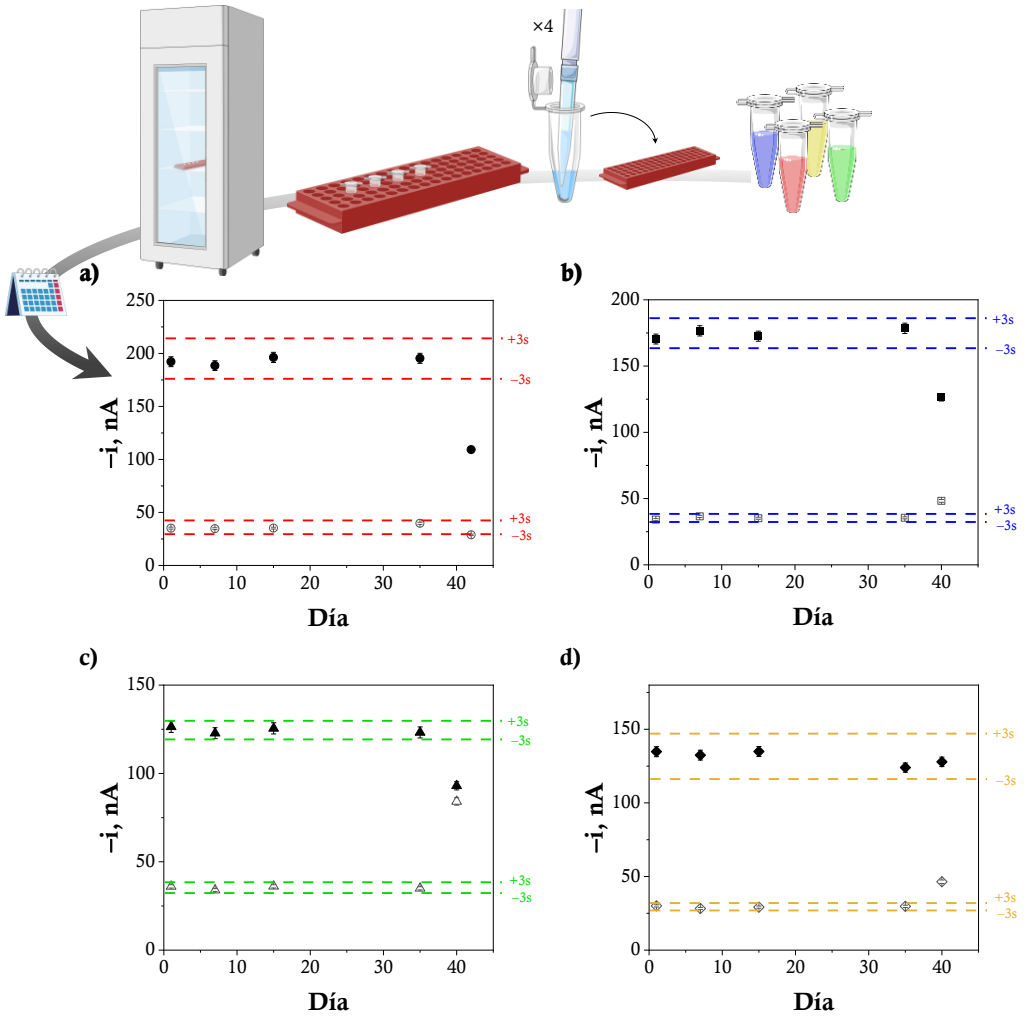


Figura 3.60. *Gráficos de control obtenidos en el estudio de estabilidad de almacenamiento de las La/SSB-, Ro/SSA-, U1RNP70- y smRNP-His-tag isolation-MBs en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado a 4 ºC. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas con las bioplataformas preparadas a partir de ellas en ausencia (símbolos blancos) y presencia (símbolos negros) de 12.5 o 25 U mL^{-1} de estándar de* ***a)*** *La/SSB-Abs,* ***b)*** *Ro/SSA-Abs,* ***c)*** *U1RNP70-Abs y* ***d)*** *smRNP-Abs, respectivamente. Los límites de control (líneas discontinuas rojas, azules, verdes o amarillas) se establecieron como ± 3s del valor promedio obtenido de tres medidas realizadas en día de preparación de las La/SSB-, Ro/SSA-, U1RNP70- y smRNP-His-tag isolation-MBs.*

Estudio de selectividad

Para evaluar el comportamiento de la bioplataforma cuádruple en presencia de otras proteínas y anticuerpos que coexisten en las muestras de suero con los biomarcadores diana, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas para 0 (blanco, B) y 12.5, 10, 50 o 25 U mL^{-1} de estándar de La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs o smRNP-Abs preparados en ausencia (control) o en presencia de estos posibles interferentes a las concentraciones descritas en muestras de suero de individuos sanos.

Los resultados presentados en la ***figura 3.61*** revelaron que la presencia de hIgG afectaba a la determinación de los cuatro autoanticuerpos, y que la determinación de smRNP-Abs también se veía afectada por la presencia de HSA. Estas interferencias, ya descritas en otros trabajos de investigación [Arévalo et al., 2020; Muñoz-San Martín et al., 2022] y relacionadas con las adsorciones inespecíficas de las hIgGs sobre la superficie de las MBs, desaparecían cuando la presencia de estas proteínas séricas se evaluaba a concentraciones 10 o 100 veces inferiores.

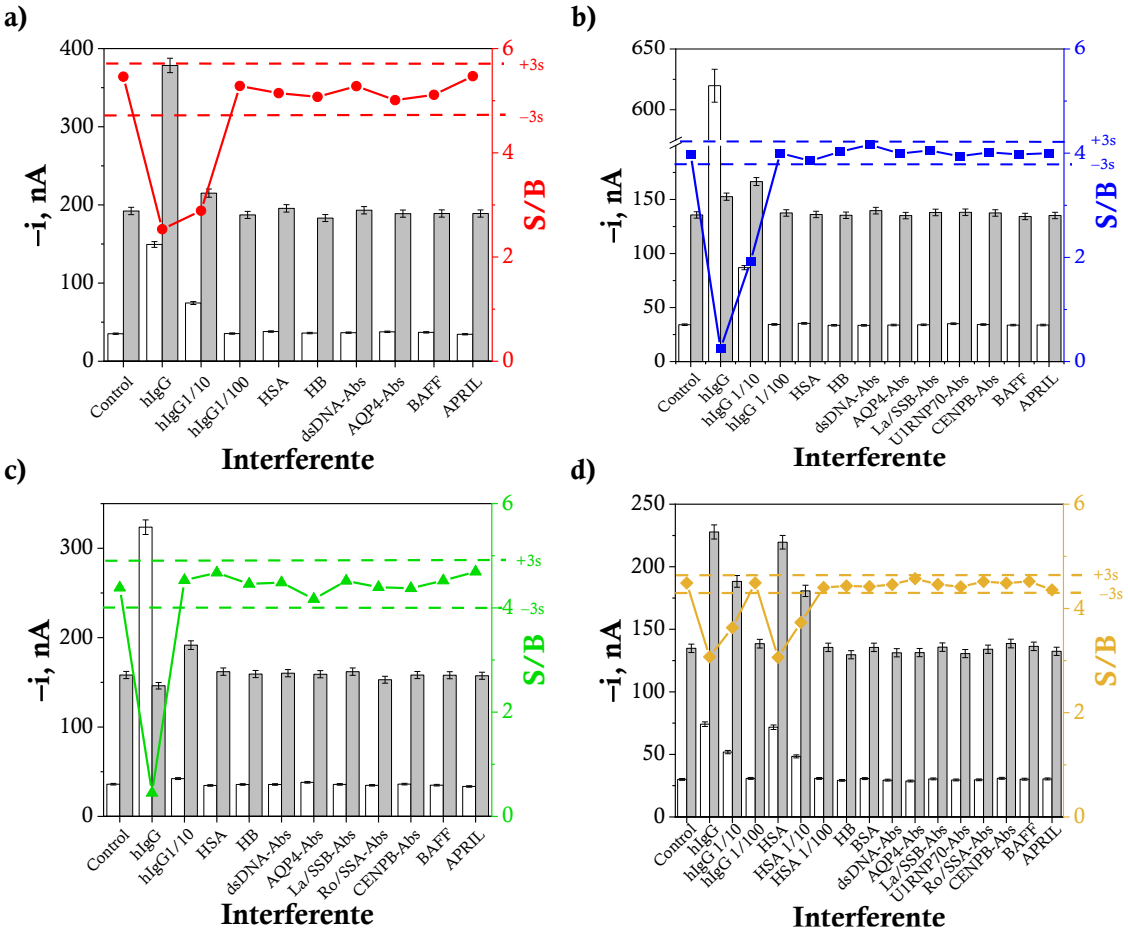


Figura 3.61. *Respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma cuádruple asistida por MBs para 0 (B, barras blancas) y* ***a)*** *12.5 U mL^{-1} de estándares de La/SSB-Abs,* ***b)*** *10 U mL^{-1} de estándares de Ro/SSA-Abs,* ***c)*** *50 U mL^{-1} de estándares de U1RNP70-Abs o* ***d)*** *25 U mL^{-1} de estándares de smRNP-Abs (S, barras grises), preparados en ausencia (control) y presencia de 1 mg mL^{-1} hIgG; 0.1 mg mL^{-1} hIgG (1/10); 0.01 mg mL^{-1} hIgG (1/100); 50 mg mL^{-1} HSA; 5 mg mL^{-1} HSA (1/10); 0.5 mg mL^{-1} HSA (1/100) ; 5 mg mL^{-1} HB; 5 mg mL^{-1} BSA; 25 U mL^{-1} dsDNA-Abs; 1 ng mL^{-1} AQP4-Abs; 12.5 U mL^{-1} La/SSB-Abs; 10 U mL^{-1} Ro/SSA-Abs; 10 U mL^{-1} U1RNP70-Abs; 10 U mL^{-1} CENPB-Abs; 1 ng mL^{-1} BAFF y 1 ng mL^{-1} APRIL, y sus correspondientes relaciones S/B (símbolos y líneas rojos/azules/verdes/amarillos, respectivamente).*

Aplicación al análisis de muestras de suero

La aplicabilidad de la bioplataforma cuádruple se evaluó analizando muestras de suero de individuos sanos y pacientes con SLE y SS.

Previamente se estudió la exactitud de la bioplataforma analizando los controles negativo y positivo proporcionados en cada kit comercial cuyos inmunorreactivos han sido empleados en el desarrollo del método. En la **tabla 3.24** se comparan los resultados que proporciona la bioplataforma con los indicados en las especificaciones de los kits comerciales, confirmándose la exactitud y precisión de las determinaciones realizadas en este tipo de muestras.

Tabla 3.24. Comparación de los resultados que proporciona la bioplataforma cuádruple en el análisis de los controles suministrados por los kits ELISA comerciales en la determinación de cada biomarcador diana y los indicados en las especificaciones.

ENAs-Abs	***Control suministrado por cada kit ELISA comercial***			
	Negativo, U mL^{-1}		***Positivo, U mL^{-1}***	
	Bioplataforma	*Especificaciones*	*Bioplataforma*	*Especificaciones*
La/SSB-Abs	0.49 ± 0.05	0.5	14.8 ± 0.8	15
Ro/SSA-Abs	2.2 ± 0.1	2	76 ± 6	75
U1RNP70-Abs	2.0 ± 0.2	2	53 ± 5	55
smRNP-Abs	4.0 ± 0.3	4	75 ± 10	75

Tras confirmar la ausencia de efecto matriz por comparación estadística de las pendientes de los calibrados obtenidos para estándares preparados en disolución BB o en una muestra de suero representativa de un individuo sano diluida 1000 veces (**tabla 3.25**), la determinación del contenido endógeno en sueros reales se realizó interpolando las repuestas amperométricas obtenidas para las muestras diluidas en los calibrados preparados para estándares de cada biomarcador (***figura 3.59***).

Tabla 3.25. Comparación de las pendientes (en nA por década de concentración (U mL^{-1})) de los calibrados obtenidos con la bioplataforma cuádruple para estándares preparados en disolución BB o en muestras de suero diluidas 1000 veces.

ENAs-Abs	***Calibrado***		t_{exp}***
	*Externo**	*Adiciones***	
La/SSB-Abs	192 ± 3	186 ± 2	1.717
Ro/SSA-Abs	90 ± 2	88 ± 1	0.818
U1RNP70-Abs	108 ± 2	109 ± 2	0.362
smRNP-Abs	66.5 ± 0.4	59 ± 3	2.102

**Disoluciones estándar preparadas en BB.*

*** Disoluciones estándar preparadas en una muestra de suero representativa de un individuo sano diluida 1000 veces.*

**** Comparación estadística con $t_{tab,4,0.05} = 2.776$.*

Los niveles resultantes obtenidos en la determinación de ENAs-Abs de todas las muestras analizadas con la bioplataforma cuádruple se representan en la ***figura 3.62***, y se resumen en la **tabla 3.26**.

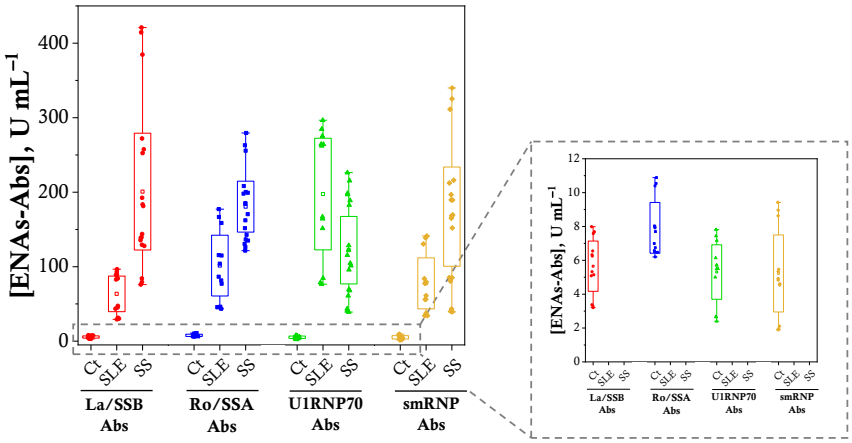


Figura 3.62. *Niveles séricos de La/SSB-Abs (rojos), Ro/SSA-Abs (azules), U1RNP70-Abs (verdes) y smRNP-Abs (amarillos) proporcionados por la bioplataforma cuádruple asistida por MBs en muestras de individuos sanos (Ct) y pacientes diagnosticados con SLE y SS.*

Los resultados demostraron que con la bioplataforma desarrollada era posible discriminar claramente entre individuos sanos y pacientes diagnosticados con SLE y SS para los cuatro biomarcadores ENAs-Abs, determinándose para todos los pacientes niveles superiores a los valores de corte establecidos por la tecnología ELISA para estos biomarcadores en muestras de suero de pacientes con enfermedades autoinmunes (< 25 U mL^{-1}).

Los valores determinados con la bioplataforma desarrollada también se compararon con los que se obtenían empleando los kits ELISA comerciales para la determinación individual de cada biomarcador diana basándose en el uso de los mismos inmunorreactivos. La comparación estadística, incluida también en la **tabla 3.26**, y las correlaciones que se muestran en la ***figura 3.63***, confirman la fiabilidad de los resultados que proporciona la bioplataforma electroquímica multiplexada.

Tabla 3.26. Niveles séricos de los cuatro ENAs-Abs determinados con la bioplataforma electroquímica cuádruple asistida por MBs y las metodologías ELISA en muestras de individuos sanos y pacientes diagnosticados con SLE y SS.

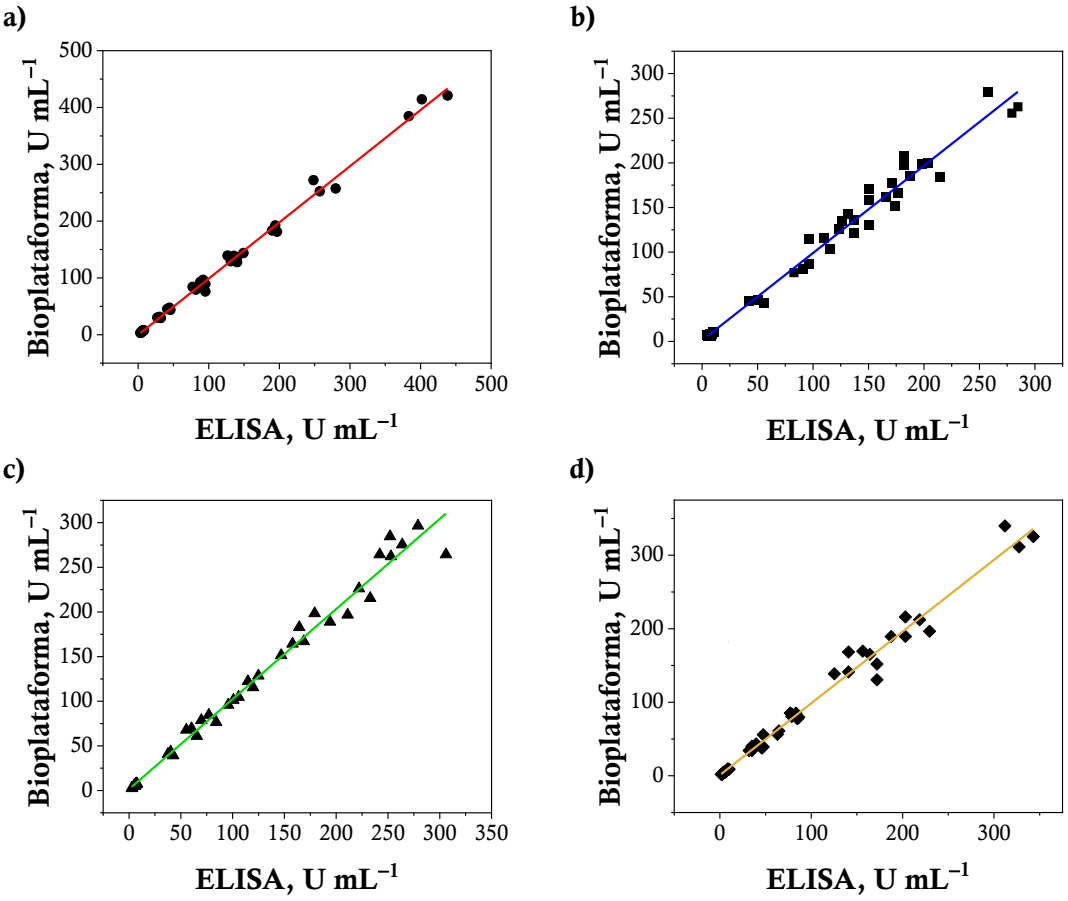
Sujeto	***Muestra***	***[La/SSB-Abs], U mL^{-1}***		***[Ro/SSA-Abs], U mL^{-1}***		***[U1RNP70-Abs], U mL^{-1}***		***[smRNP-Abs], U mL^{-1}***	
		Bioplataforma	*ELISA*	*Bioplataforma*	*ELISA*	*Bioplataforma*	*ELISA*	*Bioplataforma*	*ELISA*
Sanos	1	6.4 ± 0.4 (0.033)	6 ± 2	10.6 ± 0.6 (1.846)	10 ± 1	5.8 ± 0.6 (0.646)	5.7 ± 0.8	4.7 ± 0.4 (1.107)	4.4 ± 0.9
	2	7.8 ± 0.5 (0.385)	8 ± 2	6.8 ± 0.5 (0.714)	6.6 ± 0.9	7.5 ± 0.8 (0.760)	7 ± 2	9 ± 1 (0.837)	9 ± 1
	3	3.3 ± 0.2 (1.242)	3.5 ± 0.7	7.9 ± 0.4 (1.143)	8.1 ± 0.7	2.6 ± 0.7 (2.251)	2.8 ± 0.4	2.0 ± 0.3 (0.277)	2.0 ± 0.5
	4	5.2 ± 0.3 (0.022)	5 ± 1	6.4 ± 0.4 (1.426)	6.1 ± 0.9	5.3 ± 0.7 (0.423)	5 ± 1	5.2 ± 0.7 (1.928)	6 ± 1
Pacientes SLE	5	45 ± 5 (0.971)	44 ± 6	45 ± 4 (1.841)	49 ± 9	80 ± 10 (0.619)	77 ± 18	58 ± 7 (0.226)	58 ± 8
	6	93 ± 9 (0.400)	92 ± 9	82 ± 12 (1.712)	90 ± 17	267 ± 18 (1.928)	253 ± 27	137 ± 14 (1.025)	146 ± 36
	7	85 ± 8 (0.910)	88 ± 10	168 ± 12 (0.138)	166 ± 35	282 ± 40 (0.155)	279 ± 67	35 ± 5 (0.884)	38 ± 9
	8	30 ± 2 (0.225)	30 ± 6	111 ± 16 (0.841)	107 ± 17	161 ± 21 (0.394)	158 ± 27	80 ± 8 (0.937)	83 ± 40

**Los valores de t_{exp} se indican entre paréntesis y en todos los caos fueron inferiores al de $t_{tab,4,0.05} = 2.776$.*

Sujeto	*Muestra*	*[La/SSB-Abs], U mL⁻¹*		*[Ro/SSA-Abs], U mL⁻¹*		*[U1RNP70-Abs], U mL⁻¹*		*[smRNP-Abs], U mL⁻¹*	
		Bioplataforma	*ELISA*	*Bioplataforma*	*ELISA*	*Bioplataforma*	*ELISA*	*Bioplataforma*	*ELISA*
Pacientes SS	9**	80 ± 10	85 ± 23	266 ± 30	274 ± 35	41 ± 5	40 ± 6	41 ± 5	41 ± 8
		(0.821)		(0.724)		(0.508)		(0.111)	
	10	132 ± 16	133 ± 17	128 ± 17	128 ± 18	122 ± 16	120 ± 2	84 ± 7	80 ± 8
		(0.110)		(0.153)		(0.493)		(1.692)	
	11	261 ± 25	262 ± 40	161 ± 23	163 ± 31	213 ± 37	222 ± 27	162 ± 22	159 ± 28
		(0.106)		(0.226)		(0.860)		(0.352)	
	12	139 ± 10	142 ± 17	137 ± 15	139 ± 24	66 ± 11	60 ± 12	183 ± 29	182 ± 27
		(0.509)		(0.399)		(1.471)		(0.062)	
	13	407 ± 48	409 ± 57	197 ± 30	198 ± 40	190 ± 19	179 ± 37	326 ± 35	327 ± 39
		(0.126)		(0.109)		(1.119)		(0.160)	
	14	186 ± 14	200 ± 36	194 ± 20	191 ± 28	101 ± 11	101 ± 12	208 ± 26	217 ± 33
		(1.609)		(0.406)		(0.039)		(0.898)	

**Los valores de t_{exp} se indican entre paréntesis y en todos los caos fueron inferiores al de $t_{tab,4,0.05} = 2.776$.*

***Las especificaciones de Central BioHub® GmbH para los niveles de La/SSB-Abs y Ro/SSA-Abs en esta muestra son 76.0 y > 200 U mL⁻¹, respectivamente.*



e)

Parámetro analítico	*La/SSB-Abs*	*Ro/SSA-Abs*	*U1RNP70-Abs*	*smRNP-Abs*
R^2	0.997	0.990	0.993	0.991
Pendiente	0.99 ± 0.01	0.98 ± 0.02	1.01 ± 0.02	0.98 ± 0.02
Ordenada en el origen, U mL^{-1}	–0 ± 2	1 ± 3	1 ± 3	1 ± 3

Figura 3.63. *Gráficas de correlación resultantes de la comparación de los niveles séricos de* ***a)*** *La/SSB-Abs,* ***b)*** *Ro/SSA-Abs,* ***c)*** *U1RNP70-Abs y* ***d)*** *smRNP-Abs proporcionados por la bioplataforma electroquímica cuádruple y por la metodología ELISA convencional empleando los mismos inmunorreactivos.* ***e)*** *Parámetros analíticos del ajuste lineal.*

El potencial de la bioplataforma electroquímica desarrollada y de la firma de los cuatro autoanticuerpos ENAs-Abs seleccionados para el diagnóstico diferencial de diversas enfermedades autoinmunes se evaluó construyendo, a partir de los resultados de la **tabla 3.26**, las correspondientes curvas ROC (***figura 3.64***).

Los parámetros resultantes de estas curvas, recogidos en la **tabla 3.27**, permitieron concluir que la bioplataforma desarrollada ofrecía la completa discriminación entre individuos sanos y pacientes con SLE o SS, alcanzando valores de especificidad y sensibilidad del 100% y áreas bajo la curva (AUC) de 1.000 para cada autoanticuerpo. Por otro lado, y aunque individualmente los

ENAs-Abs estudiados no eran capaces de discriminar entre los dos tipos de pacientes evaluados a pesar de presentar especificidades por encima del 66.7% y AUC mayores de 0.750, la combinación de los resultados de los cuatro biomarcadores diana sí permitía discriminar entre pacientes con SLE y SS, avance pionero no descrito hasta la fecha con ninguna tecnología. Es importante resaltar además que los parámetros obtenidos demuestran que los La/SSB-Abs y Ro/SSA-Abs son los que ofrecen mejores valores de sensibilidad, especificidad y AUC para discriminar entre pacientes con SLE y SS, de acuerdo con las observaciones descritas por Agmon-Levin y cols. [Agmon-Levin et al., 2017] de utilizar ambos biomarcadores como marca distintiva de estas dos enfermedades.

El análisis por curvas ROC permitió además establecer los valores de corte, que se recogen en la última fila de la **tabla 3.27**, para distinguir entre individuos sanos y pacientes con SS y SLE, lo que es todavía más complejo y clínicamente relevante.

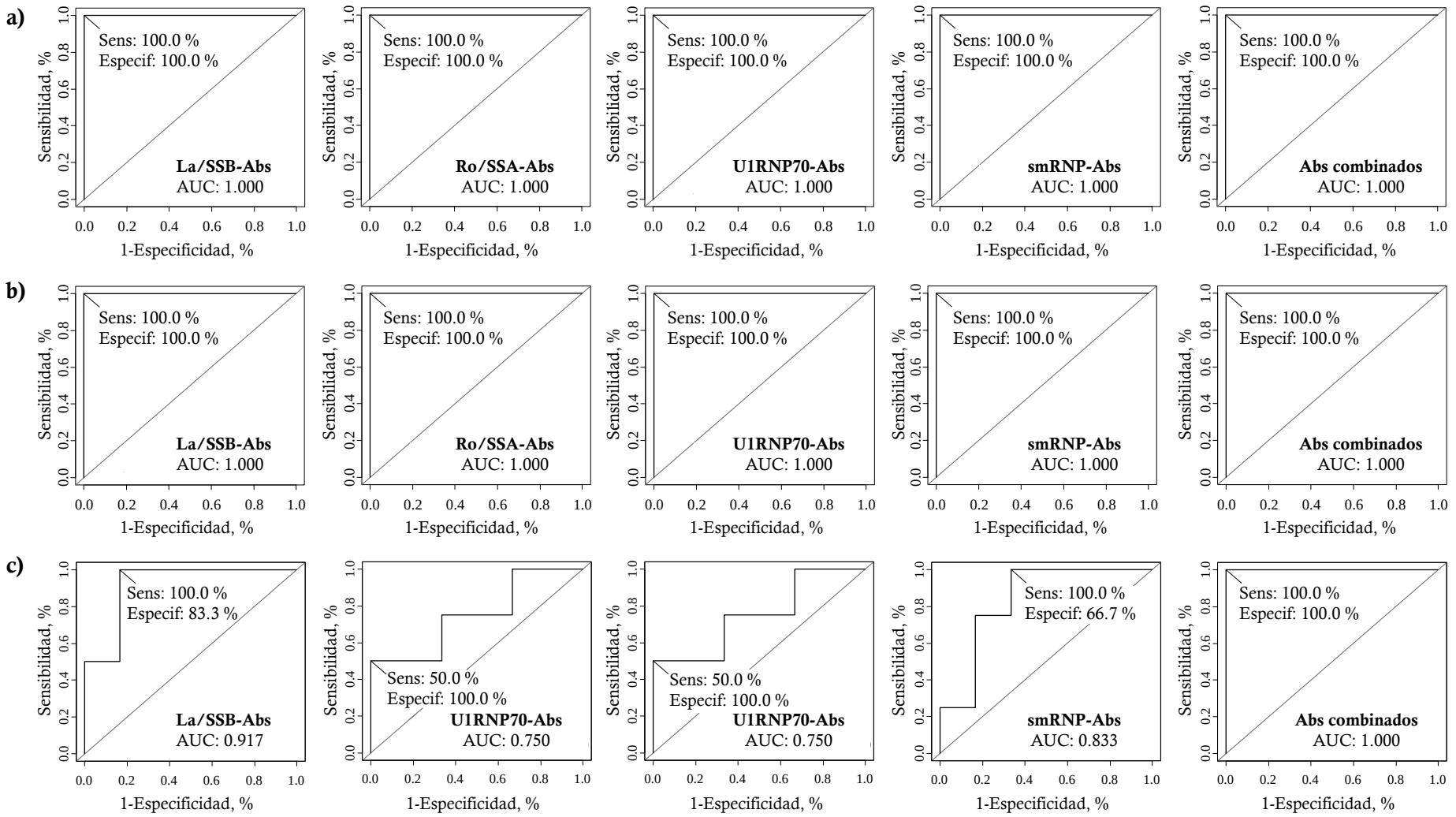


Figura 3.64. *Curvas ROC construidas para evaluar la capacidad de diagnóstico de los valores séricos de los cuatro biomarcadores ENAs-Abs determinados con la bioplataforma electroquímica cuádruple asistida por MBs para discriminar entre individuos sanos y pacientes diagnosticados con* ***a)*** *SS o* ***b)*** *SLE y* ***c)*** *entre pacientes SS y SLE.*

Tabla 3.27. Potencial de los resultados que proporciona la bioplataforma electroquímica para los cuatro biomarcadores ENAs-Abs (1: La/SSB-Abs; 2: Ro/SSA-Abs; 3: U1RNP70-Abs; 4: smRNP-Abs) considerados de forma individual o combinada para discriminar entre enfermedades autoinmunes y valores de corte establecidos en suero.

Parámetros	***Sanos vs. Pacientes SS***					***Sanos vs. Pacientes SLE***					***Pacientes SS vs. Pacientes SLE***				
	1	*2*	*3*	*4*	*1+2+3+4*	*1*	*2*	*3*	*4*	*1+2+3+4*	*1*	*2*	*3*	*4*	*1+2+3+4*
AUC	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	91.7	87.5	75	83.3	100
Sensibilidad	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	50	100	100
Especificidad	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83.3	100	100	66.7	100
Valor de corte, U mL^{-1}	43.9	69.3	24.3	25.0	--	18.9	27.8	43.8	22.0	--	112.5	119.5	240.0	149.5	--

Como prueba de concepto, y apoyándose en el trabajo descrito previamente para la determinación individual y total de los tres isotipos más comunes de inmunoglobulina humanas frente a dsDNA [Arévalo et al., 2023b], se demostró la versatilidad de la bioplataforma electroquímica desarrollada para la detección y cuantificación del contenido total de inmunoglobulinas humanas y sus isotipos más comunes (hIgG, hIgA y hIgM) frente al antígeno La/SSB en la muestra de suero de un paciente con SS (muestra de paciente 13 en la **tabla 3.26**), según se esquematiza en la ***figura 3.65***. Para ello se prepararon lotes de La/SSB-His-tag *isolation*-MBs que se incubaron con esta muestra de suero diluida 1000 veces durante 15 minutos y para la detección de isotipos individuales o totales de los La/SSB-Abs capturados se marcaron enzimáticamente de forma diferenciada con los anticuerpos secundarios selectivos a cada isotipo (HRP-anti-h(IgG/IgA/IgM)) o con la mezcla de ellos (mezcla comercial proporcionada por el kit ELISA Creative Diagnostics, Cat. No.: DEIA1688).

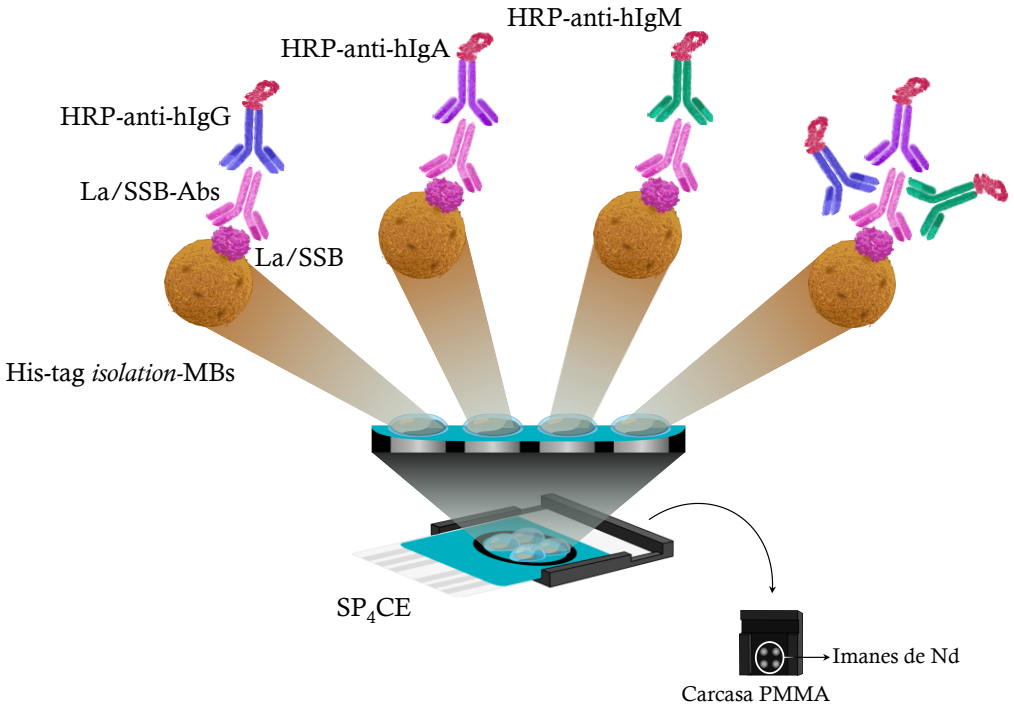


Figura 3.65. *Esquema de la prueba de concepto realizada para la determinación individual y total de los tres isotipos de hIgs más comunes frente a La/SSB (La/SSB$_{hIgG}$-Abs, La/SSB$_{hIgA}$-Abs, La/SSB$_{hIgM}$-Abs y La/SSB$_{total}$-Abs) con una bioplataforma cuádruple.*

Los resultados mostrados en la ***figura 3.66*** y resumidos en la **tabla 3.28** demostraron la presencia de los isotipos de inmunoglobulinas en este tipo de pacientes, de acuerdo con lo descrito previamente en la literatura [Pourmand et al., 1999].

Tabla 3.28. Niveles séricos individuales y total de los tres isotipos más comunes de hIgs frente a La/SSB determinados empleando la bioplataforma electroquímica cuádruple asistida por MBs en una muestra de un paciente diagnosticado con SS.

Biomarcador	***Nivel sérico, U mL^{-1}***
La/SSB$_{hIgG}$-Abs	398 ± 10
La/SSB$_{hIgA}$-Abs	94 ± 2
La/SSB$_{hIgM}$-Abs	16.6 ± 0.4
La/SSB$_{total}$-Abs	519 ± 13

El contenido mayoritario, como era de esperar, correspondía con el isotipo de hIgG, el más comúnmente aceptado a la hora de diagnosticar las enfermedades autoinmunes. Además, el contenido total se correspondía con la suma del contenido de los tres isotipos indivuales.

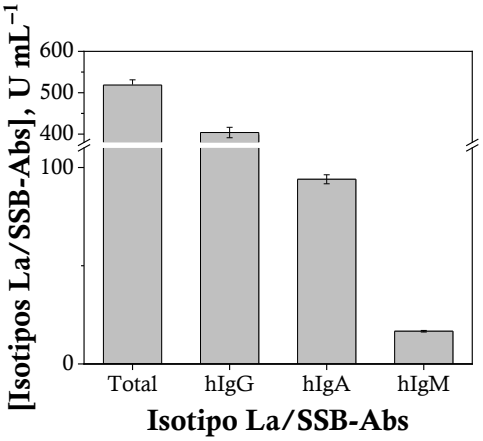


Figura 3.66. *Concentraciones séricas individuales y totales de los tres isotipos más comunes de hIgs frente a La/SSB determinados con la bioplataforma electroquímica cuádruple asistida por MBs en la muestra de un paciente con SS.*

Aplicación de las bioplataformas desarrolladas para la determinación óctuple de autoanticuerpos frente a dsDNA (dsDNA-Abs) y frente a ENAs (ENAs-Abs)

El desarrollo y aplicación de dos bioplataformas electroquímicas cuádruples asistidas por el empleo de MBs para la determinación de dsDNA-Abs y ENAs-Abs nos ha permitido demostrar su potencial pionero en el diagnóstico diferencial entre enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, estableciendo además valores de corte séricos para ellos.

Con el fin de retar aún más las capacidades y oportunidades que ofrecen estas bioherramientas, y como demostración conceptual, en esta Tesis Doctoral se han transferido las dos bioplataformas cuádruples desarrolladas a una óctuple. Para ello, se siguieron los protocolos descritos en la sección 2.5.2 para la formación de los diferentes bioconjugados y detectar los ocho biomarcadores en una muestra de suero de un individuo sano y otra de un paciente con SLE (***figura 3.67***) sobre SP_8CEs y medida amperométrica en gota.

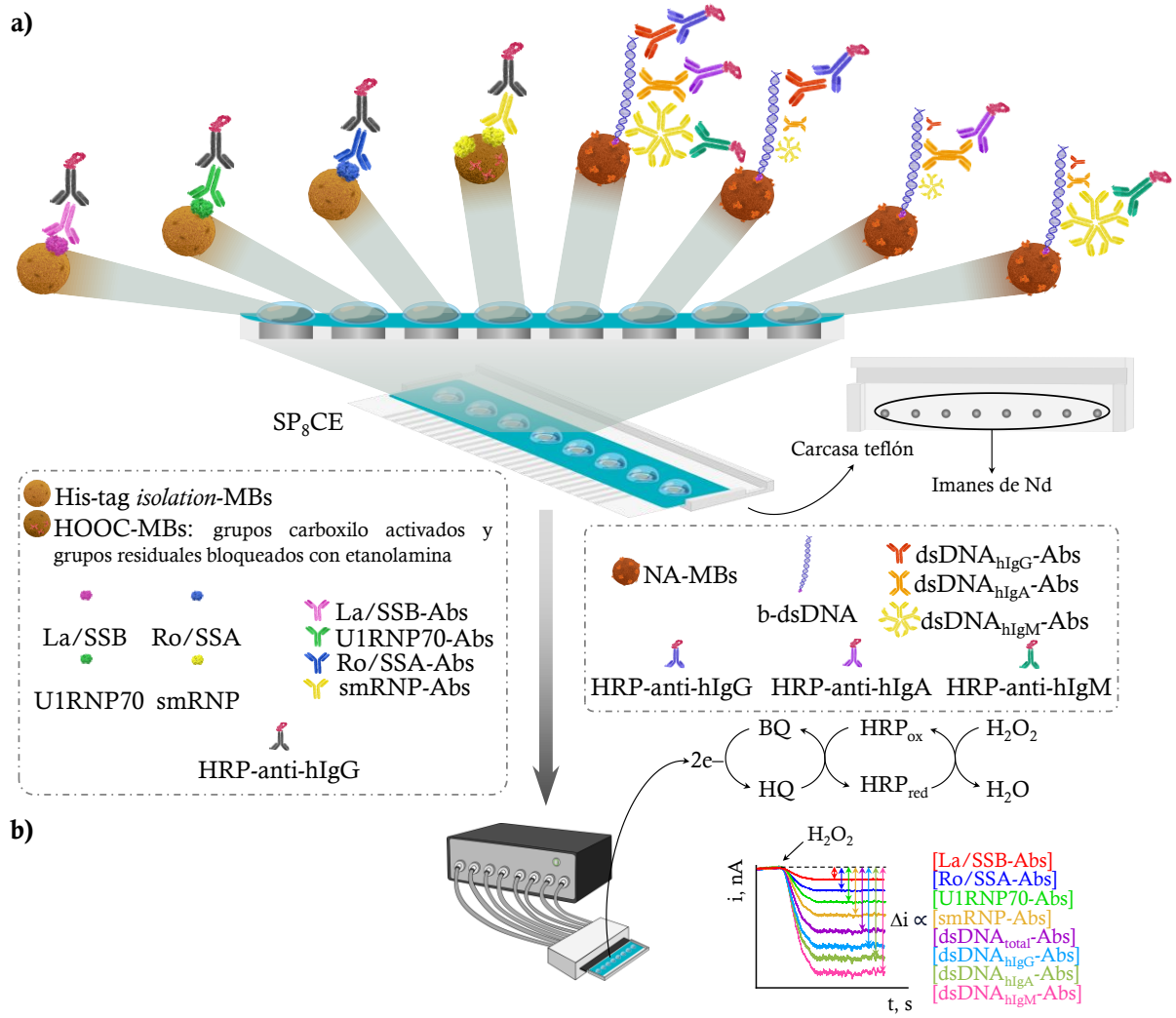


Figura 3.67. a) *Esquema de la prueba de concepto de la bioplataforma electroquímica óctuple asistida por MBs desarrollada para la determinación de ENAs-Abs y dsDNA-Abs.* ***b)*** *Transducción amperométrica óctuple en gota.*

La comparación entre las respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma electroquímica óctuple (***figura 3.68***) para la muestra del individuo sano (sujeto 1, **tabla 3.26**) y del paciente con SLE (paciente 5, **tabla 3.26**) confirma, como era de esperar, un contenido sérico significativamente superior en los ocho autoanticuerpos en la muestra del paciente con SLE.

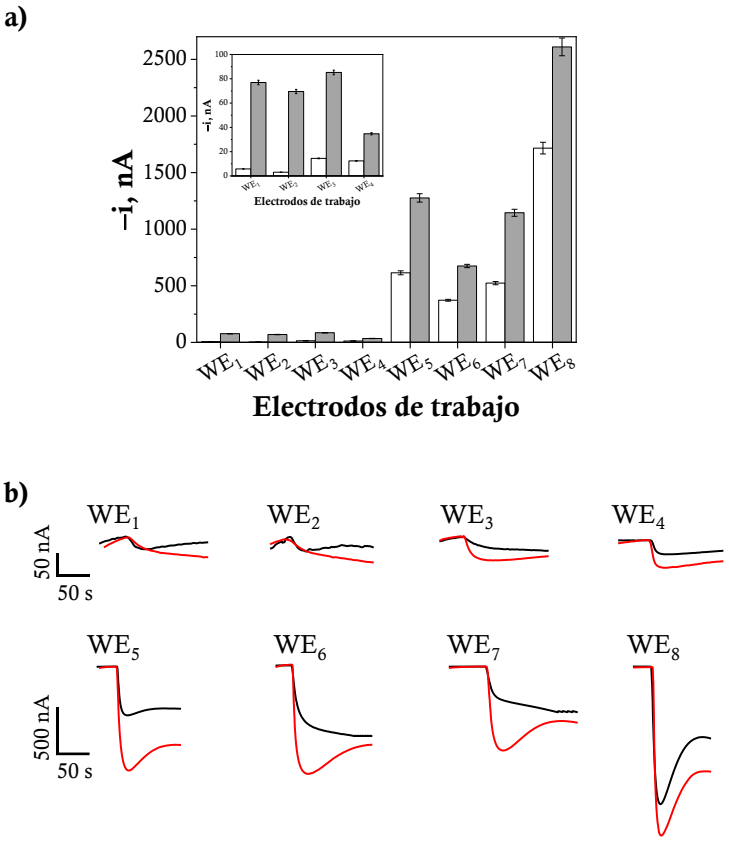


Figura 3.68. a) *Respuestas amperométricas obtenidas para la determinación de La/SSB-Abs (WE_1), U1RNP70-Abs (WE_2), Ro/SSA-Abs (WE_3), smRNP-Abs (WE_4), $dsDNA_{total}$-Abs (WE_5), $dsDNA_{hIgG}$-Abs (WE_6), $dsDNA_{hIgA}$-Abs (WE_7) y $dsDNA_{hIgM}$-Abs (WE_8) con la bioplataforma electroquímica óctuple y* ***b)*** *amperogramas reales obtenidos en muestras de suero de un individuo sano (barras blancas, amperogramas negros) y de un paciente con SLE (barras grises, amperogramas rojos).*

PARTE II. PLATAFORMAS BIOSENSORAS ELECTROQUÍMICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES PROTEÍNICOS

Investigaciones previas han evidenciado que, a pesar de que el sistema inmune genera respuestas frente al cáncer, en algunos casos también lo promueven, existiendo una asociación bidireccional entre estas dos patologías. Algunos mediadores inmunológicos causan daños en los tejidos que derivan en inflamaciones crónicas y, por tanto, aumentan el riesgo de carcinogénesis. Asimismo, se ha descrito que algunos tumores malignos favorecen el desarrollo de enfermedades autoinmunes [Franks & Slansky, 2012; Giat et al., 2017].

Considerando todos estos antecedentes y como uno de los propósitos de esta Tesis Doctoral, se ha buscado establecer una relación entre las enfermedades autoinmunes y el cáncer mediante la evaluación de diferentes biomarcadores proteínicos presentes en esta última enfermedad y, en algunos casos, en los trastornos autoinmunes.

Para ello, en esta segunda parte se analizarán los resultados más relevantes obtenidos en el diseño, optimización, caracterización y aplicación de las plataformas biosensoras electroquímicas en formato integrado o asistidas por el empleo de micropartículas magnéticas (MBs) desarrolladas a lo largo de esta Tesis Doctoral para la determinación individual o dual de biomarcadores proteínicos utilizando para su transducción amperométrica SPCEs o SP_2CEs, respectivamente.

De este modo, se van a discutir los resultados conseguidos en la determinación individual de MMP-9, un biomarcador relevante en cáncer de mama, y dual de BAFF y APRIL, biomarcadores clínicamente relevantes en cáncer colorrectal y enfermedades autoinmunes, permitiendo establecer una relación entre ellas. Estos resultados han sido publicados en los artículos descritos a continuación y cuyos PDFs se incluyen en el apartado Publicaciones-*published papers* del Anexo de esta Memoria:

- [Arévalo et al., 2021]: *Electrochemical immunoplatform to assist in the diagnosis and classification of breast cancer through the determination of matrix-metalloproteinse-9*, Talanta 225 (2021) 122054. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.122054.
- [Arévalo et al., 2022a]: *Binary MoS_2 nanostructures as nanocarriers for amplification in multiplexed electrochemical immunosensing: simultaneous determination of B cell activation factor and proliferation-induced signal immunity-related cytokines*, Microchimica Acta 189 (2022) 143. DOI: 0.1007/s00604-022-05250-4.
- [Arévalo et al., 2022c]: *Simultaneous electrochemical immunosensing of relevant cytokines to diagnose and track cancer and autoimmune diseases*, Bioelectrochemistry 146 (2022) 108157. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108157.

3.3. DESARROLLO DE BIOPLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS INDIVIDUALES

3.3.1. BIOPLATAFORMA ELECTROQUÍMICA ASISTIDA POR MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

En esta sección se presentan los resultados más relevantes derivados del desarrollo de la bioplataforma electroquímica para la determinación individual del biomarcador proteínico MMP-9, asistido por el empleo de MBs funcionalizadas con grupos carboxilo (HOOC-MBs) y SPCE como transductor electroquímico, para la evaluación de su potencial clínico en el cáncer, publicados en [Arévalo et al., 2021].

Bioplataforma electroquímica para la determinación de metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9)

Investigaciones previas acerca de este biomarcador han revelado que esta proteína, involucrada en la remodelación de la matriz extracelular durante procesos fisiológicamente necesarios, contribuye a la progresión de enfermedades autoinmunes y cáncer cuando se desregula [Roy et al., 2009; Cathcart et al., 2015]. De hecho, el perfil sérico de la MMP-9 se ha empleado para el diagnóstico de cáncer [Wilson et al., 2006] y también se encuentra alterado en la neuroinflamación asociada a la esclerosis múltiple y en pacientes con ictus isquémico [Castellanos et al., 2003; Biela et al., 2015]. Es por ello por lo que en esta Tesis Doctoral se ha considerado como un potencial biomarcador de gran importancia clínica cuya determinación a través de biosensores electroquímicos servirá como base para el diagnóstico y pronóstico de un abanico de enfermedades.

La preparación y transducción de la bioplataforma electroquímica desarrollada se fundamenta en un inmunoensayo tipo sándwich (***figura 3.69***) donde el anticuerpo de captura ($cAb_{MMP\text{-}9}$) es inmovilizado covalentemente sobre las HOOC-MBs, con sus grupos carboxilo previamente activados y bloqueados posteriormente con etanolamina. La captura selectiva, detección y marcaje enzimático de la proteína diana se realizó en una única etapa, incubando el anticuerpo de detección biotinilado ($b\text{-}dAb_{MMP\text{-}9}$) y el conjugado Estrep-HRP junto con la proteína diana. Finalmente, las MBs modificadas se capturaron magnéticamente sobre la superficie del WE del SPCE previamente colocado en una carcasa casera de PMMA con un imán de Nd embebido en ella, para sumergir al conjunto MBs modificadas/SPCE-carcasa en la célula que contenía la disolución de medida suplementada con HQ, monitorizando bajo agitación continua la variación de la corriente catódica aplicando un potencial de –0.2 V frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag tras adicionar H_2O_2.

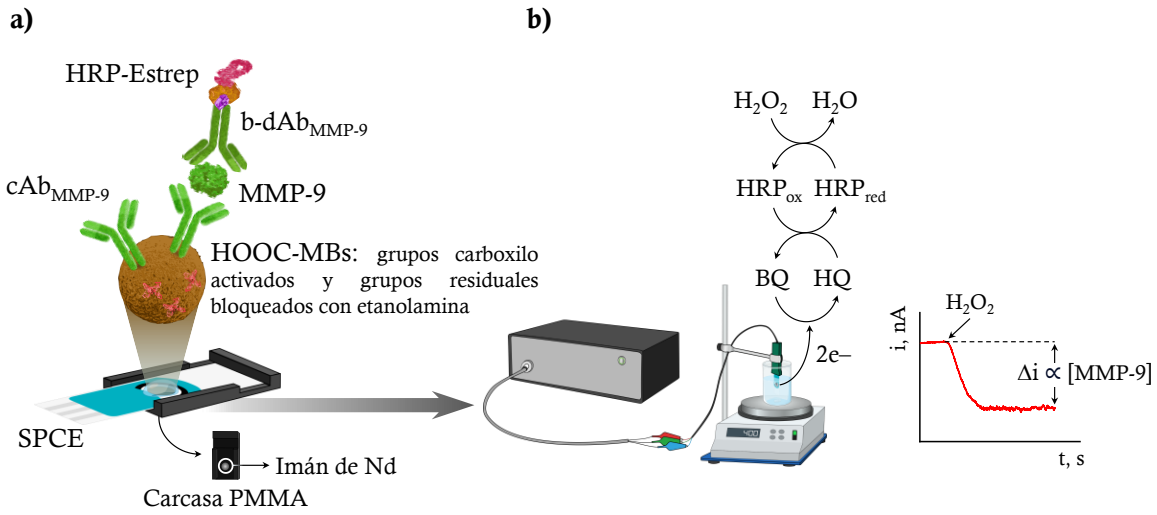


Figura 3.69. a) *Esquema del inmunoensayo tipo sándwich de la bioplataforma electroquímica desarrollada para la determinación de MMP-9.* ***b)*** *Transducción amperométrica en disolución bajo agitación constante.*

Optimización de las variables experimentales.

El protocolo descrito anteriormente se optimizó con el fin de obtener el mejor comportamiento analítico y funcionamiento, comparando los registros amperométricos resultantes de las medidas inespecíficas en ausencia (blanco, B) y específicas en presencia de 2500 pg mL^{-1} de estándar de MMP-9 (señal, S), y seleccionando el valor óptimo siguiendo el criterio de mayor relación S/B. Las variables experimentales evaluadas, su rango estudiado y el valor seleccionado se representan en las ***figuras 3.70–3.72*** y se resumen en la **tabla 3.29.**

La optimización de las condiciones relativas al anticuerpo de captura, mostradas en la ***figura 3.70***, permitieron concluir que la relación S/B aumentaba con la carga del anticuerpo al incrementar las respuestas específicas hasta alcanzar el valor de 25 µg mL^{-1} de cAb$_{MMP-9}$, a partir del cual se producía un peor reconocimiento del antígeno diana por impedimento estérico [Eletxigerra et al., 2014], disminuyendo la relación S/B, comportamiento que se confirmó también en el estudio del tiempo de incubación.

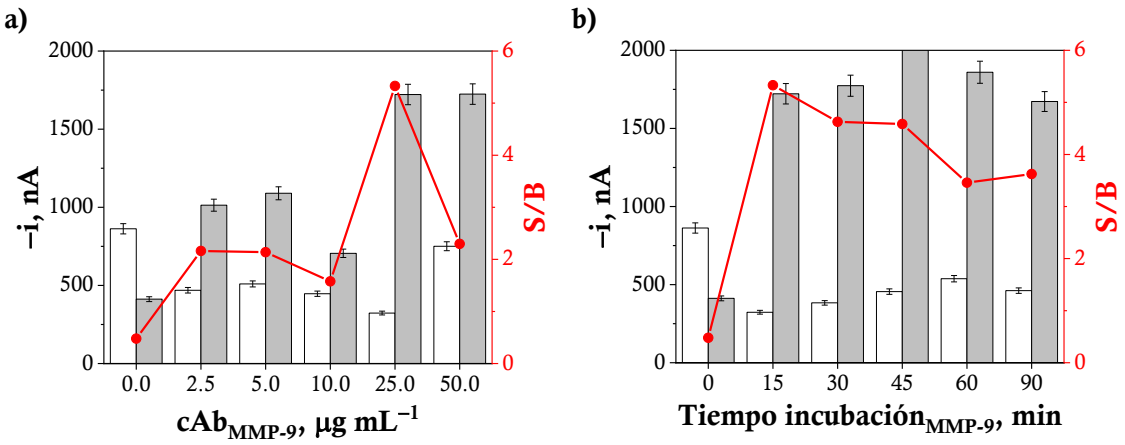


Figura 3.70. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de MMP-9 en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 2500 pg mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de MMP-9, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con* ***a)*** *la concentración y* ***b)*** *el tiempo de incubación de cAb$_{MMP-9}$.*

Las siguientes etapas involucradas en la preparación de los inmunocomplejos tipo sándwich sobre las cAb$_{MMP-9}$-HOOC-MBs se evaluaron comparando diferentes protocolos: incubación en una única etapa (1) una disolución mezcla que contenía la proteína diana, junto con el anticuerpo de detección (b-dA$_{MMP-9}$) y el marcaje enzimático (Estrep-HRP); dos incubaciones sucesivas, (2A) en primer lugar la proteína diana y después una disolución mezcla de b-dAb$_{MMP-9}$ con Estrep-HRP o (2B) incubación de la disolución mezcla de la proteína diana junto con b-dAb$_{MMP-9}$ y posteriormente Estrep-HRP; o finalmente tres etapas (3) de incubación diferentes para cada biorreactivo. Los resultados del estudio (***figura 3.71.a***) demostraron que la mayor relación S/B se obtenía al incubar en una única etapa todos los biorreactivos, probablemente debido a una mejora en la eficiencia del inmunorreconocimiento y marcaje enzimático al estar presentes todos los reactivos en una disolución homogénea. Este hecho supuso una gran ventaja en el desarrollo de la bioplataforma al reducir y simplificar el ensayo, con un tiempo de incubación de la mezcla optimizado de 30 minutos.

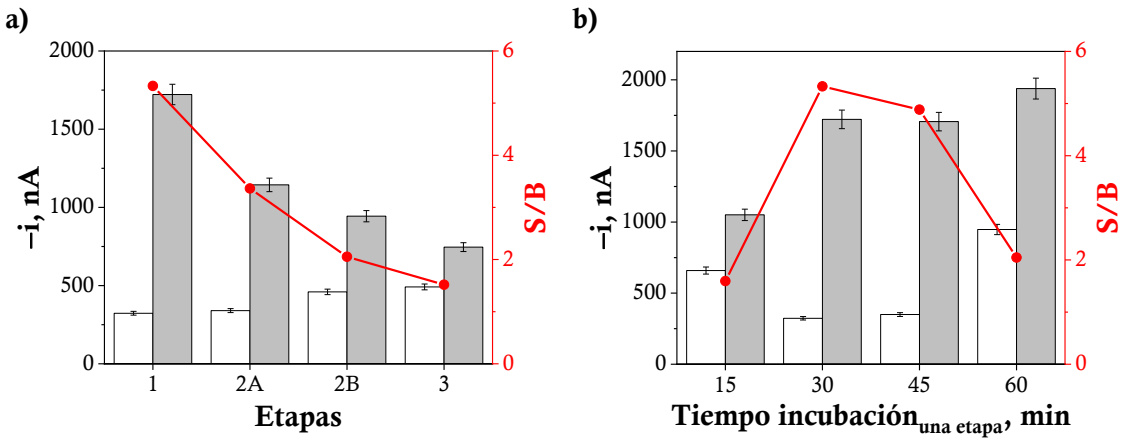


Figura 3.71. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de MMP-9 en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 2500 pg mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de MMP-9, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con* ***a)*** *etapas de incubación y* ***b)*** *tiempo de incubación de la disolución mezcla que contenía MMP-9, b-dAb$_{MMP\text{-}9}$ y Estrep-HRP (una etapa).*

Finalmente, la optimización de la concentración y dilución de b-dAb$_{MMP\text{-}9}$ y Estrep-HRP, respectivamente (***figura 3.72***), demostró que a concentraciones superiores a 1.0 µg mL^{-1} de b-dAb$_{MMP\text{-}9}$ se producía un aumento en las señales inespecíficas y una disminución en las específicas debido a adsorciones sobre la superficie de las MBs y al impedimento estérico en el marcaje enzimático. Del mismo modo, cuanto mayor era el factor de dilución de Estrep-HRP las señales registradas eran menores por falta de una buena discriminación al haber insuficiencia de trazador enzimático, mientras que a diluciones bajas se producían adsorciones inespecíficas del mismo.

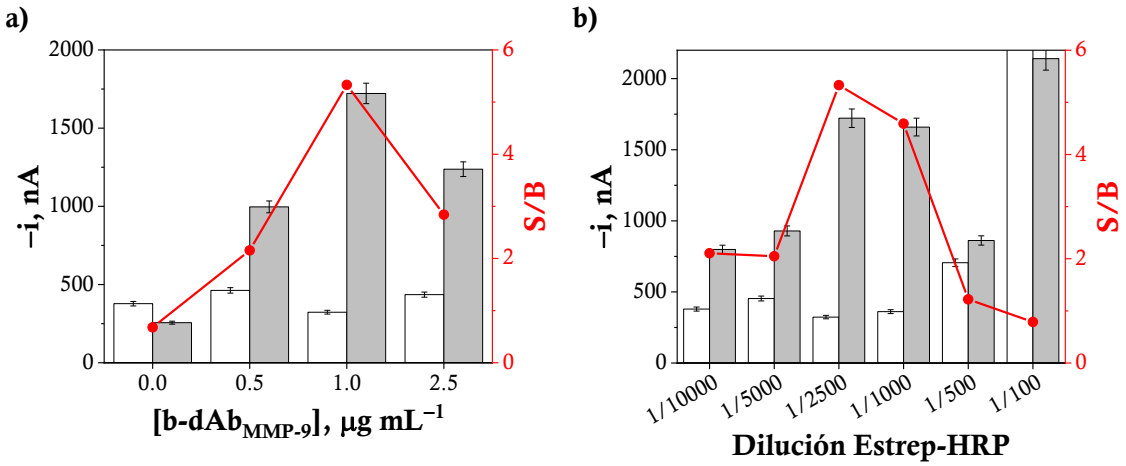


Figura 3.72. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma asistida por MBs para la determinación de MMP-9 en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 2500 pg mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de MMP-9, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con la* ***a)*** *concentración de b-dAb$_{MMP\text{-}9}$ y* ***b)*** *dilución de Estrep-HRP.*

Tabla 3.29. Variables experimentales evaluadas, rango estudiado y valor seleccionado, para la optimización de la bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación de MMP-9.

Variable experimental	*Rango estudiado*	*Valor seleccionado*
Concentración $cAb_{MMP\text{-}9}$, µg mL^{-1}	0.0–50.0	25.0
Tiempo de incubación $cAb_{MMP\text{-}9}$, min	15–90	15
Nº etapas realización de inmunoensayo	1–3	1
Tiempo de incubación una etapa, min	15–60	30
Concentración b-$dAb_{MMP\text{-}9}$, µg mL^{-1}	0.0–2.5	1.0
Dilución Estrep-HRP	1/10000–1/100	1/2500

Características analíticas y operacionales

El fin del estudio de optimización de las variables experimentales involucradas en el desarrollo de la bioplataforma electroquímica Estrep-HRP-b-$dAb_{MMP\text{-}9}$-MMP-9-$cAb_{MMP\text{-}9}$-HOOC-MBs permitió construir el calibrado para la determinación de MMP-9. La representación gráfica de dicho calibrado (***figura 3.73***) mostró la existencia aparente de dos intervalos lineales con diferentes pendientes, el primero comprendido entre 8.0 y 75 pg mL^{-1} y el segundo entre 75 y 10000 pg mL^{-1}; cuyas características analíticas se resumen en la **tabla 3.30**.

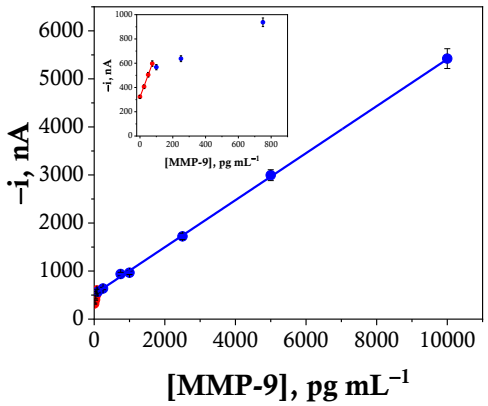


Figura 3.73. *Calibrados obtenidos con la bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación de MMP-9.*

Tabla 3.30. Características analíticas ofrecidas por la bioplataforma electroquímica asistida por MBs para la determinación amperométrica de MMP-9.

Parámetro	*Primer intervalo*	*Segundo intervalo*
Intervalo lineal, pg mL^{-1}	8.0–75	75–10000
R^2	0.9995	0.9999
Pendiente, mL nA pg^{-1}	3.68 ± 0.08	0.491 ± 0.004
Ordenada en el origen, nA	320 ± 4	518 ± 17

La aparición de dos intervalos lineales en el mismo calibrado también ha sido descrita en otros estudios [Afsharan et al., 2016; Guerrero et al., 2020], y se relaciona con una pérdida de la sensibilidad cuando se determinan concentraciones elevadas de biomarcador debido a la cantidad limitada de anticuerpo de captura ($cAb_{MMP\text{-}9}$) inmovilizada sobre las MBs. Por tanto, durante esta investigación se seleccionó el rango lineal resultante para concentraciones bajas de proteína diana, el cual presentaba mayor sensibilidad.

Los límites de detección y de cuantificación se calcularon a partir de diez medidas en ausencia de biomarcador diana, atendiendo a los cálculos descritos en la sección 2.9, obteniéndose valores de 2.4 y 8.0 pg mL^{-1}, respectivamente. Con el fin de comparar estos resultados con otros biosensores, cabe señalar el biosensor desarrollado por Ruiz Vega y cols. [Ruiz-Vega et al., 2018] que, aunque ofrecía un límite de detección similar al obtenido con esta bioplataforma (11–30 pg mL^{-1}), requería un protocolo más complejo basado en la preparación del inmunoconjugado modificado con Poly-HRP y una activación del soporte magnético durante 2 horas. Por otro lado, al comparar la bioplataforma electroquímica evaluada en esta Tesis Doctoral con el inmunosensor impedimétrico desarrollado por Shabani y cols. [Shabani et al., 2020] cabe destacar las 12 h necesarias para su preparación, un tiempo mucho más largo que las 2 h que se requieren para modificar las HOOC-MBs y que el LOD que proporciona esta nueva bioplataforma era más de 60 veces menor. Estos resultados mejorados frente a los publicados para otros biosensores supusieron una ventaja a la hora de una posible implementación de la inmunoplataforma desarrollada, con protocolos cortos y simples, en dispositivos en el punto de atención.

La reproducibilidad de diez bioplataformas preparadas de la misma manera se analizó comparando estadísticamente, mediante el cálculo de la RSD, las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de 750 pg mL^{-1} de estándar de MMP-9. El valor de 3.8% confirmó la buena replicación que presentaban los protocolos empleados para la preparación de los inmunocomplejos tipo sándwich y la detección electroquímica.

Estabilidad de almacenamiento

Con el fin de examinar la posibilidad de reducir los tiempos de ensayo utilizando los inmunoconjugados preparados previamente, se evaluó la estabilidad de almacenamiento mediante la preparación de un lote de MBs modificadas y bloqueadas (cAb$_{MMP-9}$-HOOC-MBs) resuspendidas en PBS 10 mM de pH 7.4 y conservadas a 4 ºC hasta su empleo. Cada día control se midieron las respuestas amperométricas de los bioconjugados resultantes preparados en ausencia y presencia de 5000 pg mL^{-1} de estándar de MMP-9, comprobando que era posible usar las cAb$_{MMP-9}$-HOOC-MBs durante aproximadamente 15 días. De esta manera se permite acortar los tiempos de ensayo sin pérdida de señal, como se muestra en la ***figura 3.74***.

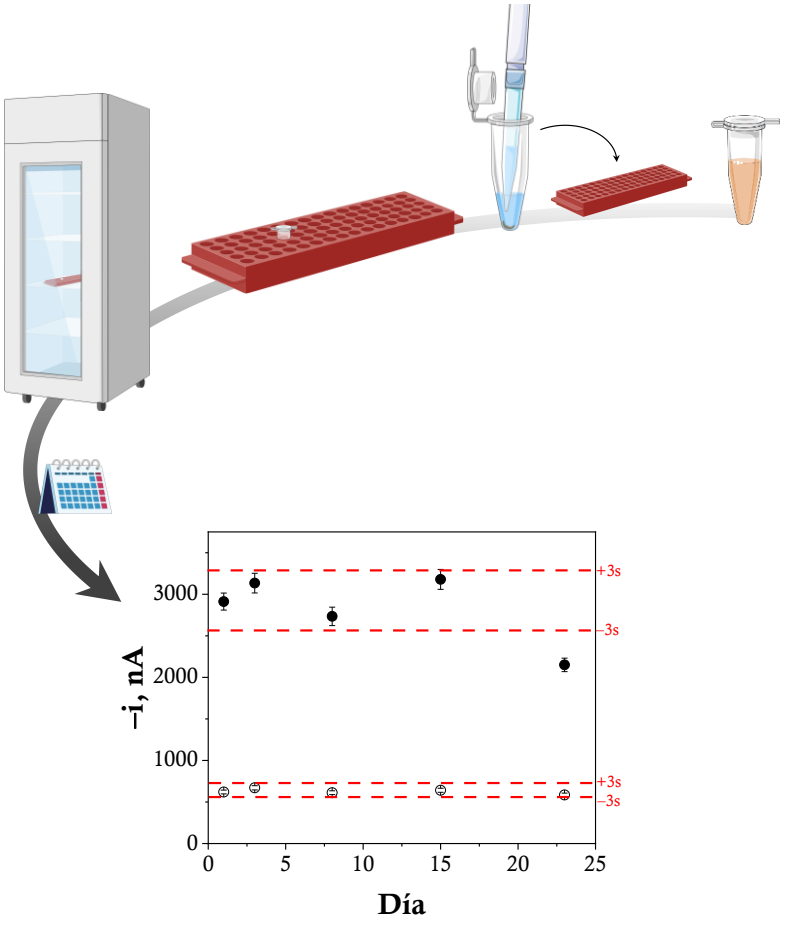


Figura 3.74. *Gráfica de control obtenida en el estudio de estabilidad de almacenamiento del soporte magnético cAb$_{MMP-9}$-HOOC-MBs en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado a 4 ºC. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (puntos blancos) y presencia (puntos negros) de 5000 pg mL^{-1} de estándar de MMP-9. Los límites de control (líneas discontinuas rojas) se establecieron como ± 3s del valor promedio obtenido de tres medidas resultantes del día de preparación de los bioconjugados magnéticos.*

Estudio de selectividad

Finalmente, la selectividad de los inmunorreactivos empleados se evaluó comparando las respuestas amperométricas medidas para 0 (blanco, B) y 4000 pg mL^{-1} de estándar de MMP-9 (señal, S) en ausencia (control) y presencia de biomoléculas potencialmente interferentes, todas ellas de gran relevancia clínica en cáncer y enfermedades neurodegenerativas, a la concentración esperable para muestras de suero y plasma de individuos sanos.

Los resultados del estudio, representados en la ***figura 3.75***, revelaron que en presencia de algunas especies: TAU, TDP-43, HSA y HB, se obtenían respuestas específicas significativamente altas. La interferencia provocada por la presencia de HB se atribuyó a su actividad peroxidasa, como han informado otros estudios previos [Grigorieva et al., 2013; Arévalo et al., 2020]. Por otro lado, como se ha descrito en otras investigaciones, la HSA también supone una interferencia [Zhao, R. N. et al., 2019]. Este hecho puede estar relacionado con adsorciones inespecíficas de la proteína sobre la superficie de las MBs debido a su afinidad a los polímeros que recubren el núcleo metálico [Oleschuk et al., 2000; Gifford et al., 2006; Modh et al., 2018] y/o a la impurificación de la HSA comercial por IgGs con una amplia gama de especificidades [Jansen van Vuuren et al., 2010; Nilsen et al., 2020]. Sin embargo, no se ha descrito justificación para el aumento de señal específica observado en presencia de TAU y TDP-43.

Hay que resaltar que, a pesar de ello, las relaciones S/B se mantenían dentro del intervalo establecido por los límites calculados como ±3s, permitiendo concluir que la presencia de estos potenciales interferentes no suponía un problema en la determinación de MMP-9 en muestras clínicas al establecerse una buena discriminación en ausencia y presencia del biomarcador diana.

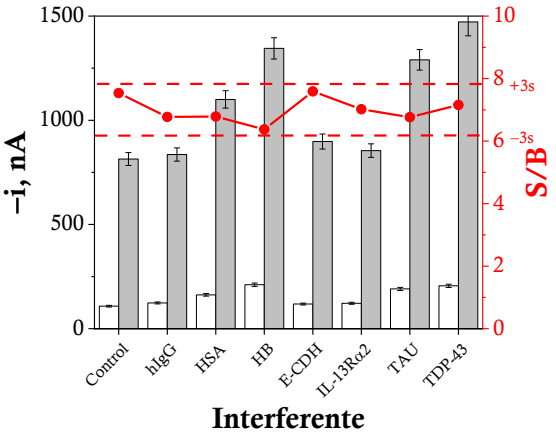


Figura 3.75. *Respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma asistida por MBs desarrollada para disoluciones estándar de 0 (B, barras blancas) y 4000 pg mL^{-1} de MMP-9 (S, barras grises), preparadas en ausencia (control) y presencia de 1 mg mL^{-1} hIgG; 5 mg mL^{-1} HSA; 5 mg mL^{-1} HB; 60 ng mL^{-1} E-CDH; 10 ng mL^{-1} IL-13Rα2; 5 pg mL^{-1} TAU; 1 ng mL^{-1} TDP-43, y sus correspondientes relaciones S/B (puntos y líneas rojos).*

Aplicación al análisis de muestras de suero y lisados celulares

La bioplataforma electroquímica desarrollada se destinó, primeramente, al estudio de la expresión de MMP-9 en lisados de células MDA-MB-436 crecidas en DMSO, PMA y PMA con BFA, tal y como se ha detallado en la sección 2.4.

Se compararon estadísticamente las pendientes resultantes de los calibrados obtenidos para disoluciones estándar de MMP-9 preparadas en medio regulador o en 0.5 µg de lisado celular tratado con cada uno de los componentes utilizados en el crecimiento celular, con el fin de evaluar la posible existencia de efecto matriz. Los valores de t_{exp} inferiores a $t_{tab,\ 2,\ 0.05} = 4.303$ confirmaron su ausencia. Sin embargo, considerando los bajos niveles de MMP-9 en la pequeña cantidad de lisado empleada, se propuso para la determinación del contenido endógeno de proteína diana el método de adiciones estándar, añadiendo sobre 0.5 µg de lisado concentraciones crecientes de estándar de MMP-9 y sustrayendo la señal obtenida en ausencia del biomarcador, para finalmente obtener de esta forma los niveles resumidos en la **tabla 3.31** para el análisis de tres réplicas de cada lisado celular.

Debe señalarse que se seleccionó una cantidad de lisado celular de 0.5 µg porque para mayores cantidades se producía un aumento en las respuestas amperométricas menor que el esperado, lo que se asoció al efecto Hook producido cuando la cantidad de proteína diana endógena supera en gran medida a la carga de $cAb_{MMP\text{-}9}$ inmovilizada sobre el soporte magnético [Vashist & Luong, 2018].

Tabla 3.31. Niveles de concentración de MMP-9 determinados con la bioplataforma electroquímica asistida por MBs en muestras de lisados celulares crecidas con DMSO, PMA y PMA con BFA.

Lisados de células MDA-MB-436 crecidas con	***[MMP-9], pg µg^{-1}***
DMSO	3 ± 2
PMA	62 ± 4
PMA + BFA	55 ± 6

Los resultados revelaron que el tratamiento celular con PMA estimulaba considerablemente la expresión de MMP-9 en esta línea celular. Este hecho ya fue analizado por Roomi y cols. en su investigación sobre las metaloproteinasas de matriz [Roomi et al., 2009] donde establecieron una clasificación de las líneas celulares en función de la susceptibilidad de expresión de la MMP-9; y ha sido apoyado también por los resultados proporcionados por el análisis con *Western Blot* (WB, ***figura 3.76.a***) realizado en el Grupo de Investigación ProteoFun de UFIEC-ISCIII según el protocolo descrito en la sección 2.8.2. Además, los niveles proporcionados por la bioplataforma electroquímica mostraron que, probablemente debido a que la proteína diana no se secretaba lo

suficiente y por tanto se mantenía en el entorno intracelular, la presencia de BFA no ocasionaba apenas efecto en estas células.

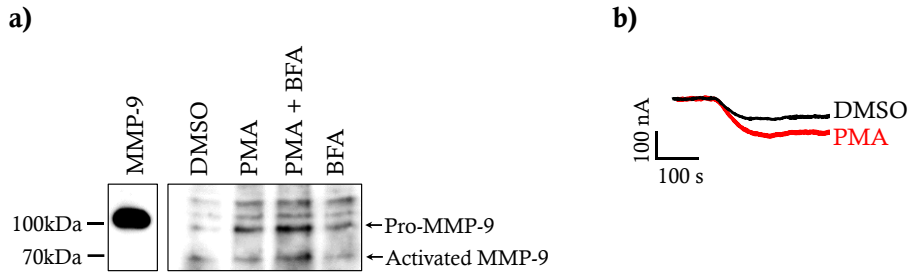
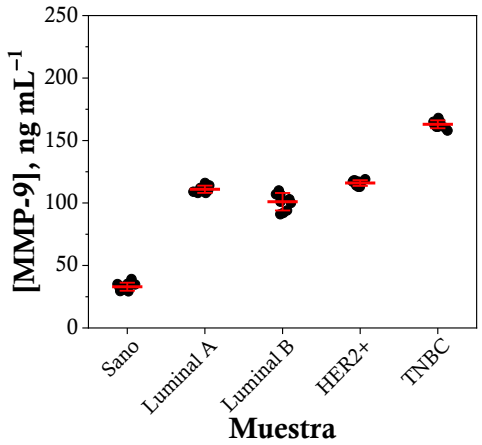


Figura 3.76. a) *Evaluación de la expresión de MMP-9 en lisados de la línea celular MDA-MB-436 mediante WB.* ***b)*** *Amperogramas reales registrados con la bioplataforma electroquímica asistida por MBs desarrollada para 0.5 µg de lisados de células MDA-MB-436 crecidas en presencia de DMSO y PMA.*

En segundo lugar, la bioplataforma desarrollada se enfrentó al análisis de la proteína diana MMP-9 en muestras de suero de individuos sanos y pacientes diagnosticados con diferentes subtipos de cáncer de mama. Teniendo en cuenta la complejidad y variabilidad individual observada en algunas muestras, se decidió emplear también el método de adiciones estándar para cuantificar el contenido endógeno en las mismas.

Las muestras se diluyeron 50 veces en disolución comercial PFBB y se adicionaron concentraciones crecientes de estándar de MMP-9 comprendidas entre 0 y 5000 pg mL^{-1}. Como ejemplo de una muestra de suero de un individuo sano, el cálculo del ajuste lineal (R^2 = 0.9998) de la recta de calibrado derivó en la ecuación: –i (nA) = (396 ± 23, nA) + (0.59 ± 0.05, nA mL pg^{-1}) × [MMP-9, pg mL^{-1}], tras eliminar la señal registrada para el blanco en ausencia de biomarcador.

Los niveles resultantes, representados en la ***figura 3.77*** y resumidos en la **tabla 3.32** se compararon con los obtenidos al emplear la metodología ELISA, utilizando los mismos inmunorreactivos.



Individuo	*MMP-9, ng mL^{-1}*
Sano	33 ± 3
Luminal A	111 ± 3
Luminal B	101 ± 7
HER2+	116 ± 2
TNBC	163 ± 3

Figura 3.77. *Niveles séricos de MMP-9 proporcionados por la bioplataforma electroquímica en muestras de suero de individuos sanos y pacientes con diferentes subtipos de cáncer de mama.*

Como se puede observar en la gráfica, la variabilidad entre los contenidos analizados para cada subgrupo de muestra con la bioplataforma electroquímica era muy baja, pudiendo discriminar claramente entre individuos sanos y pacientes con cáncer de mama. Es importante resaltar además que la significativa sobreexpresión de MMP-9 encontrada en los pacientes diagnosticados con el subtipo TNBC (considerado como el más invasivo, con mayor probabilidad de reincidencia y peor pronóstico), que estaba de acuerdo con lo descrito por Wang y cols. [Wang R. X. et al., 2018], abría la vía a contribuir al diagnóstico diferencial de este subtipo.

Tabla 3.32. Niveles séricos de MMP-9 determinados empleando la bioplataforma electroquímica y la metodología ELISA en muestras de suero de individuos sanos y pacientes con diferentes subtipos de BC.

Sujetos		***Muestra***	***[MMP-9], ng mL^{-1}***		t_{exp}*
			Bioplataforma	*ELISA*	
Sanos		1	36 ± 9	36 ± 3	0.172
		2	31 ± 4	31 ± 8	0.002
		3	33 ± 8	35 ± 2	1.178
Pacientes BC	Luminal A	4	109 ± 3	99 ± 15	2.733
		5	113 ± 3	108 ± 6	2.629
		6	110 ± 6	118 ± 11	2.719
	Luminal B	7	92 ± 5	89 ± 7	1.818
		8	104 ± 9	107 ± 15	0.973
	HER2+	9	107 ± 8	105 ± 8	0.777
		10	116 ± 8	120 ± 6	1.678
		11	117 ± 1	115 ± 5	2.074
		12	115 ± 6	115 ± 14	0.046
	TNBC	13	163 ± 7	161 ± 15	0.688
		14	161 ± 6	165 ± 12	1.266
		15	164 ± 10	161 ± 12	0.176

*$t_{exp} < t_{tab\ 4,\ 0.05} = 2.776$

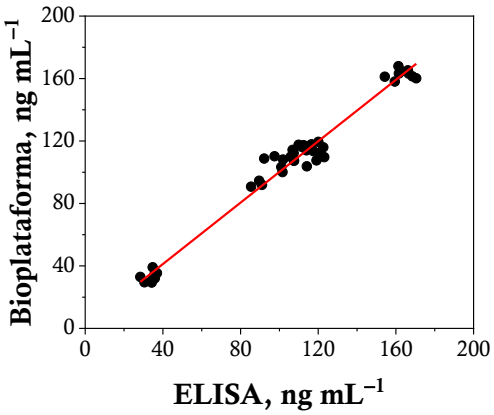


Figura 3.78. *Gráfica de correlación resultante de la comparación de los niveles séricos de MMP-9 proporcionados por la bioplataforma electroquímica y por la metodología ELISA convencional, empleando los mismos inmunorreactivos.*

La comparación estadística entre los valores medidos con la bioplataforma electroquímica desarrollada y con la tecnología ELISA confirmó que no existían diferencias significativas entre ambas metodologías, cumpliéndose en todos los casos el criterio de $t_{exp} < t_{tab,4,0.05} = 2.776$, a diferencia de la comparación estimada por Ruiz Vega y cols. [Ruiz-Vega et al., 2018], cuyo biosensor mostraba una sobreestimación de la concentración de MMP-9 del 20% frente al método ELISA empleado para muestras de plasma de pacientes que sufrieron ictus isquémico. La excelente exactitud en los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación se ratificó con el estudio de correlación, donde los parámetros resultantes por el ajuste lineal (***figura 3.78***) de ordenada en el origen ((1.9 ± 2.5) ng mL^{-1}) y pendiente (0.98 ± 0.02) incluían al cero y a la unidad, respectivamente.

Por último, a los tratamientos estadísticos utilizados para evaluar la veracidad de los valores derivados del análisis por biosensado se les unió la concordancia de las resultados obtenidos por aplicación de la bioplataforma electroquímica con los niveles de concentración de MMP-9 proporcionados en la literatura por otros autores, de 19.5 ± 8.5 ng mL^{-1} y 69.4 ± 44.8 ng mL^{-1} para individuos sanos y pacientes con BC, respectivamente, así como con los límites de corte establecidos para este biomarcador diana en muestras de suero de 50 ng mL^{-1} [Wu, Z. et al., 2008].

3.4. DESARROLLO DE BIOPLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS MULTIPLEXADAS

En este Apartado se discuten los resultados más relevantes derivados de la investigación en dos citoquinas de gran relevancia inmunológica y cancerígena, estableciendo una relación entre las enfermedades autoinmunes y el cáncer gracias al desarrollo de dos bioplataformas electroquímicas, una en formato integrado y otra asistida por MBs, basadas en ensayos tipo sándwich para la detección simultánea de los dos biomarcadores diana empleando electrodos serigrafiados de carbono duales (SP_2CEs).

3.4.1. BIOPLATAFORMA ELECTROQUÍMICA EN FORMATO INTEGRADO

En esta sección se presentan los resultados obtenidos, y publicados en [Arévalo et al., 2022b], del desarrollo de una bioplataforma electroquímica dual para la determinación de las citoquinas factor de activación de células B (BAFF) y ligando inductor de la proliferación (APRIL) mediante un diseño integrado, con el fin de evaluar su potencial como biomarcadores de enfermedades autoinmunes y cáncer.

Bioplataforma electroquímica dual para la determinación de BAFF y APRIL

A lo largo de las investigaciones llevadas a cabo en el marco de esta Tesis Doctoral se ha buscado progresar en las metodologías existentes empleadas para análisis rutinarios con el diseño de protocolos más sencillos, cortos tiempos de ensayo y mejora de las características analíticas. Teniendo en cuenta la modernización que los biosensores electroquímicos nos ofrecen en la actualidad y su posibilidad de acoplamiento con nanomateriales para mejorar todavía más sus capacidades, en este trabajo se han sintetizado y explotado nanomateriales híbridos derivados de MoS_2 como nanotransportadores de biomoléculas capaces de amplificar la señal electroquímica.

La bioplataforma dual desarrollada en formato integrado y descrita en esta Memoria (***figura 3.79***) se fundamenta en un inmunoensayo tipo sándwich, en el que los anticuerpos de captura biotinilados (b-cAb_{BAFF} y b-cAb_{APRIL}) son inmovilizados sobre la superficie electródica, previamente modificada por *electrografting* y activada con una disolución de EDC/NHSS, a través de su afinidad por la neutravidina fijada en los grupos activados, para la posterior captura selectiva y eficiente de BAFF y ARPIL, respectivamente. Finalmente, cada citoquina diana es detectada mediante el empleo de un nanotransportador a modo de marcaje enzimático, formado por una nanoestructura binaria de MoS_2/MWCNTs decorada con múltiples moléculas del anticuerpo de detección correspondiente (dAb_{BAFF} o dAb_{APRIL}) y de la enzima HRP, para amplificar la respuesta electroquímica. La detección electroquímica se lleva a cabo por amperometría sumergiendo el SP_2CE modificado en la célula de medida que contiene la HQ, se aplica un potencial constante de –0.2 V *vs.* electrodo de pseudoreferencia de Ag, y se adiciona H_2O_2 como sustrato enzimático para registrar la variación de corriente catódica, proporcional, debido al formato de ensayo, a la concentración de BAFF o APRIL.

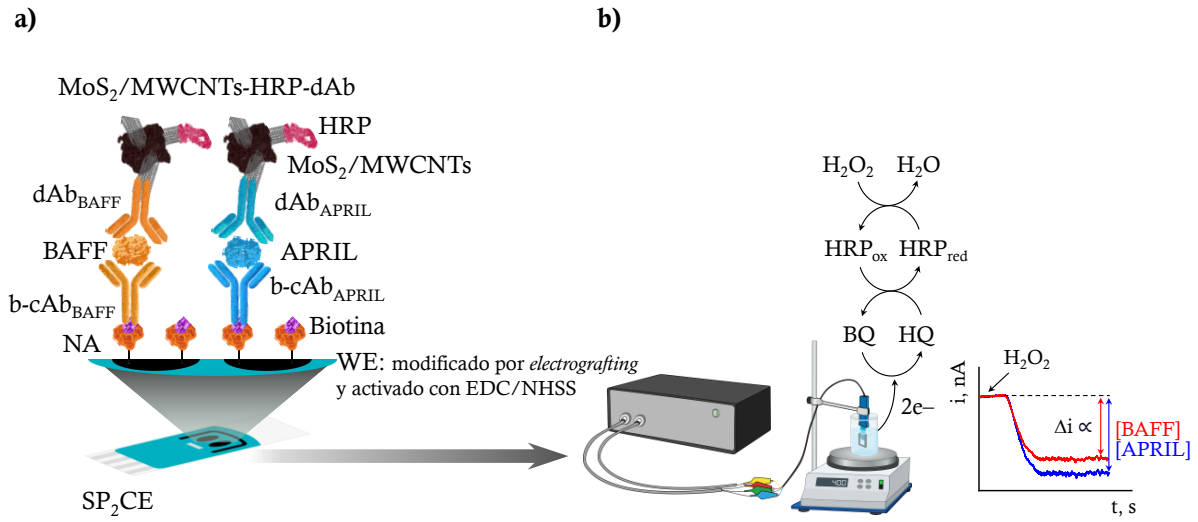


Figura 3.79. ***a)*** *Esquema de la inmunoplataforma electroquímica dual desarrollada para la determinación de BAFF y APRIL.* ***b)*** *Transducción amperométrica en disolución bajo agitación constante.*

Nanoestructuras binarias de MoS_2 y nanotubos de carbono

En los últimos años se ha investigado en la aplicación de nanomateriales de dos dimensiones (2D) en el ámbito tecnológico. A lo largo de estos estudios se han descubierto propiedades fisicoquímicas únicas proporcionadas por algunos materiales y nanoestructuras, como es el caso de las monocapas de dicalcogenuros de metales de transición (TMDs), que han sustituido al grafeno en algunas aplicaciones [Kalantar-zadeh & Ou, 2016]. Entre estos TMDs, las nanoestructuras de MoS_2 han comenzado a ser utilizadas para el desarrollo de biosensores, aprovechando su biocompatibilidad y su actividad catalítica intrínseca similar a la peroxidasa. Algunos ejemplos son los descritos por Ganatra & Zhang o Dalila y cols. que emplean nanoláminas [Ganatra & Zhang, 2014; Dalila et al., 2019], por Wang y cols. con nanopartículas [Wang, T. et al., 2013] y Lin y cols. usando puntos cuánticos o *quantum dots* [Lin, D. et al., 2018] de MoS_2. Sin embargo, la baja conductividad eléctrica de estas nanoestructuras requiere su combinación con otros nanomateriales, por ejemplo, de carbono, capaces de mejorar las reacciones de transferencia electrónica [Kudr et al., 2019]. Cabe mencionar, como ejemplos en este campo, los nanomateriales híbridos derivados de MoS_2 y óxido de grafeno (GO) empleados para la preparación de los biosensores descritos por Venkatesan y cols. y Yoon y cols. [Venkatesan et al., 2017; Yoon et al., 2017] o las combinaciones con nanotubos de carbono (CNTs) propuestas por Lin y cols. [Lin, Y. et al., 2015].

Con el fin de seleccionar el nanomaterial que proporcione el mejor comportamiento analítico para su uso como etiqueta transportadora capaz de amplificar la respuesta electroquímica, se evaluó la morfología y las propiedades ópticas y electroquímicas de nanoestructuras híbridas de

MoS_2 con nanotubos de carbono de pared múltiple (MoS_2/MWCNTs), oxido de grafeno reducido (MoS_2/rGO) o ambos (MoS_2/rGO/MWCNTs), llevando a cabo estudios de caracterización empleando las diversas técnicas descritas en las secciones 2.6 y 2.7.

En primer lugar, se investigó la estructura y morfología de los diferentes nanomateriales mediante SEM (***figura 3.80***) y TEM (***figura 3.81***).

Respecto al barrido por SEM, los paneles a–c de la ***figura 3.80*** muestra las imágenes representativas generadas para los nanomateriales en bruto. La estructura de MoS_2 sintetizada por el método hidrotermal descrito en la sección 2.5.1, escaneada a diferentes niveles de aumento (***figura 3.80.a***), permite apreciar la formación de numerosas láminas estrechamente apiladas [Xing & Ma, 2016]. Este material se une a los MWCNTs, como una estructura bidimensional (***figura 3.80.b***), presentándose (***figura 3.80.d***) a modo de nanopartículas decoradas e interconectadas con los nanotubos. El nanocompuesto resultante exhibe una elevada porosidad y, como se verá, un buen comportamiento electroquímico. En cambio, la combinación de MoS_2 con el grafeno, de aspecto laminar (***figura 3.80.c***), da lugar a una estructura binaria ligeramente diferente a la observada con MWCNTs, no apreciándose estructuras globulares sobre el rGO (***figura 3.80.e***), lo que dificulta la distinción de ambos materiales. Todo ello concluyó en la representación gráfica del último compuesto combinado estudiado (MoS_2/rGO/MWCNTs), pudiendo observar que los nanoagregados de MoS_2 junto con las láminas de rGO se depositaban sobre una red tridimensional de MWCNTs [Govindasamy et al., 2016].

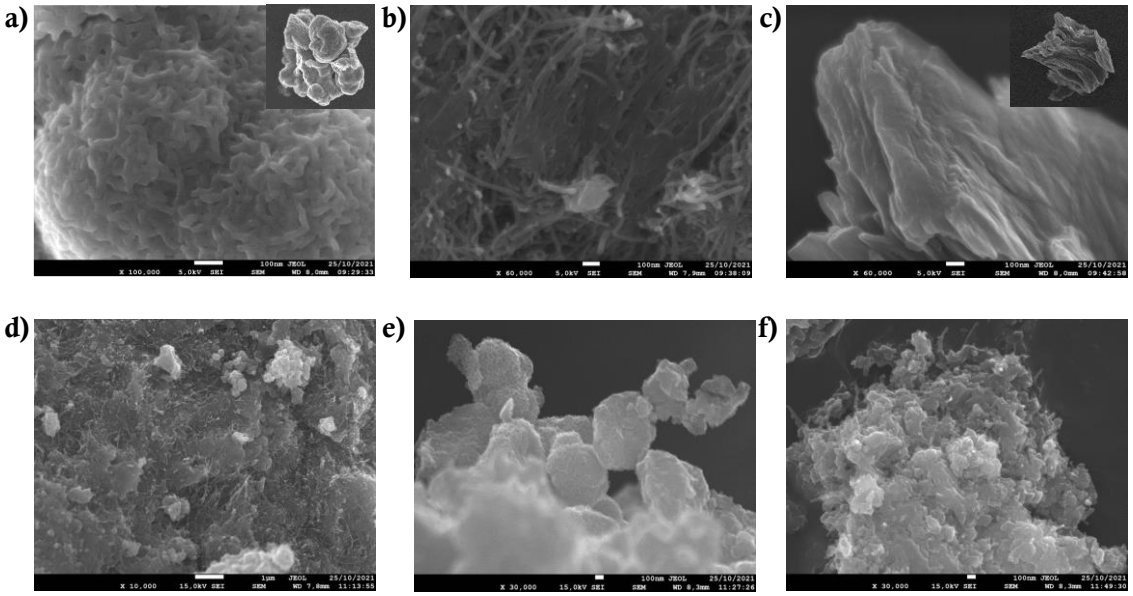


Figura 3.80. *Imágenes obtenidas por SEM de* ***a)*** *MoS_2 junto con su ampliación,* ***b)*** *o-MWCNTs,* ***c)*** *GO junto con su ampliación,* ***d)*** *MoS_2/MWCNTs,* ***e)*** *MoS_2/rGO y* ***f)*** *MoS_2/rGO/MWCNTs.*

La morfología de los nanocompuestos, caracterizada por TEM, confirmó que las láminas agregadas del MoS_2 (***figura 3.81.a***) se mantenían inalteradas al formar el híbrido con MWCNTs (***figura 3.81.b***), apareciendo también en la imagen los nanotubos. Sin embargo, como se muestra

en la ***figura 3.81.c***, se observó que el MoS_2 se dispersa sobre las láminas de rGO. No obstante, se ha descrito en la bibliografía [Song, H. et al., 2018] que esta estructura laminar podría adquirir un formato tridimensional basado en el autoensamblaje si durante la síntesis hidrotermal se produjera una superposición parcial o coalescencia conducida por la reducción del GO. Por último, la nanoestructura MoS_2/rGO/MWCNTs (***figura 3.81.d***) presentaba una morfología más compleja apareciendo agregados de MoS_2 y algunos nanotubos sobre las láminas de rGO.

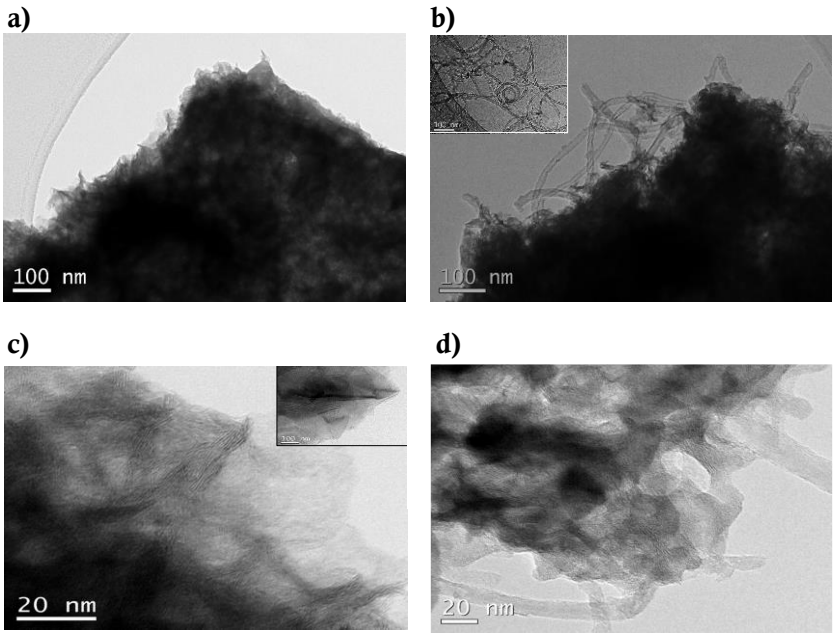


Figura 3.81. *Imágenes producidas por TEM de* ***a)*** *MoS_2,* ***b)*** *MoS_2/MWCNTs, junco con los o-MWCNTs,* ***c)*** *MoS_2/rGO, junto con GO y* ***d)*** *MoS_2/rGO/MWCNTs.*

Los resultados del análisis estructural por SEM y TEM demostraron que los nanocompuestos sintetizados con MWCNTs (MoS_2/MWCNTs) mantenían sin alteración la estructura superficial e interna de los materiales, proporcionando una cara exterior rugosa con nanoagregados, mientras que la presencia de GO daba lugar a la formación de láminas dispersas sobre este sustrato.

Las propiedades ópticas de los nanocompuestos se estudiaron mediante espectroscopia Raman (***figura 3.82***) y UV-visible (***figura 3.83***).

Por un lado, se compararon los espectros vibracionales Raman de los materiales preparados con MWCNTs: MWCNTs, MoS_2/MWCNTs y MoS_2/rGO/MWCNTs, medidos a λ_{exc} de 532 nm. Como se observa en la ***figura 3.82***, los picos vibracionales característicos del MoS_2 (E^1_{2g} y A_{1g}) aparecen en los dos nanocompuestos que lo contienen. El primero de estos picos, E^1_{2g}, es producido por los movimientos opuestos en el plano de los átomos de S y Mo, mientras que el segundo, A_{1g}, representa el movimiento relativo fuera del plano de los átomos de S [Shen et al., 2021]. Además, la banda observada a 359 cm^{-1} en los dos nanocompuestos de MoS_2 se asoció a los modos de flexión O–Mo–O del oxígeno puente del MoO_3 [Singh, S. & Sharma, 2021]. La comparación entre las

bandas D y G, atribuidas junto con la banda D' a defectos en los MWCNTs procesados [Koroteev et al., 2011], manifestadas a mayores frecuencias de desplazamiento Raman para el espectro de MoS_2/rGO/MWCNTs frente al MoS_2/MWCNTs, confirmaban una interacción sustancial entre los tres componentes [Basu et al., 2019]. Finalmente, los picos relacionados con los modos vibracionales de MoS_2: LA(M), E_{1g}, E^1_{2g} y A_{1g} resultantes para MoS_2/MWCNTs, sufrieron un desplazamiento a menores frecuencias que los derivados de la síntesis con rGO (MoS_2/rGO/MWCNTs), según muestran los valores de la **tabla 3.33**.

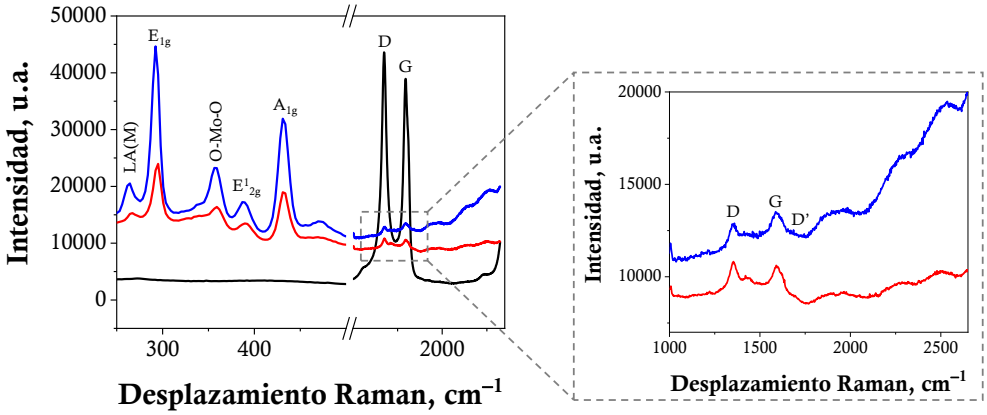


Figura 3.82. *Espectro Raman obtenido para MWCNTs (línea negra), MoS_2/MWCNTs (línea roja) y MoS_2/rGO/MWCNTs (línea azul).*

Tabla 3.33. Valores de frecuencia Raman (cm^{-1}) para los modos vibracionales asociados al MoS_2.

Pico vibracional	***Nanocompuesto***	
	MoS_2/MWCNTs	*MoS_2/rGO/MWCNTs*
LA(M)	267	264
E_{1g}	295	292
E^1_{2g}	392	387
A_{1g}	431	430

Por otro lado, se verificó la formación de las nanoestructuras híbridas de MoS_2 registrando los espectros de absorbancia para 30 µg mL^{-1} de los nanomateriales en bruto y de cada nanocompuesto preparados en dispersiones acuosas mediante espectroscopia UV-visible (***figura 3.83***). Los resultados obtenidos permitieron observar que no se producía absorción a la longitud de onda escaneada para el rGO ni para el MWCNTs, mientras que el espectro de MoS_2 mostraba dos bandas de absorción a 210 y 230 nm, que también aparecían, como era de esperar, en los espectros de los nanocompuestos de MoS_2/MWCNTs y MoS_2/rGO/MWCNTs. En cambio, el posible encapsulamiento de las estructuras de MoS_2 originado en la combinación MoS_2/rGO se puso de manifiesto en forma de banda de absorción de menor intensidad [Yoon et al., 2017].

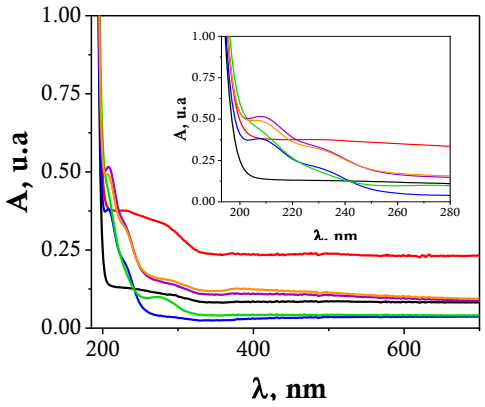


Figura 3.83. *Espectro UV-visible registrado para GO (línea negra), MWCNTs (línea roja), MoS_2 (línea azul), MoS_2/rGO (línea verde), MoS_2/MWCNTs (línea morada) y MoS_2/rGO/MWCNTs (línea naranja.*

La actividad catalítica intrínseca del MoS_2 y de los nanomateriales derivados se evaluó empleando el sistema TMB/H_2O_2 como sustrato enzimático. Las dispersiones de MoS_2 (***figura 3.84.d***) y MoS_2/MWCNTs (***figura 3.84.f***) se colorearon casi inmediatamente con un tono azul debido a la oxidación del TMB en presencia de MoS_2. Este proceso comienza con la descomposición del enlace O–O entre el H_2O_2 y un radical ·OH que oxida al TMB, dando lugar a la coloración típica [Zheng et al., 2020]. De igual manera, este mismo comportamiento se observó cuando se emplearon otros compuestos que también actúan como sustratos de la peroxidasa: OPD (*o*-fenilendiamina) y ABTS (sal de diamonio 2,2'-azino-bis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]). En cambio, en presencia de rGO, el MoS_2 perdía su habilidad para exhibir sus propiedades intrínsecas como nanozima, debido probablemente al encapsulamiento de este material por las láminas de grafeno.

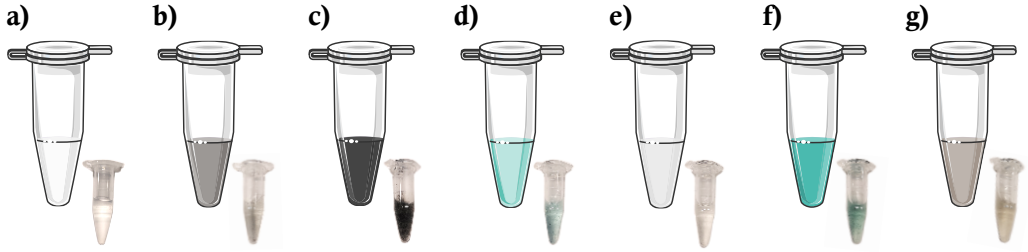


Figura 3.84. *Representación gráfica de las imágenes fotografiadas mostrando la actividad peroxidasa intrínseca de* ***a)*** *250 µL de la disolución comercial de TMB/H_2O_2, en presencia de* ***b)*** *GO,* ***c)*** *MWCNTs,* ***d)*** *MoS_2,* ***e)*** *MoS_2/rGO,* ***f)*** *MoS_2/MWCNTs y* ***g)*** *MoS_2/rGO/MWCNTs.*

Por último, se caracterizaron electroquímicamente los nanocompuestos derivados de MoS_2 mediante la modificación de la superficie electródica de SPCEs, depositando una gota de 5 µL de cada dispersión de nanomaterial basado en MoS_2 y dejándola secar para, a continuación, medir

por voltamperometría cíclica (CV) y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) cada SPCE preparado (***figura 3.85***), según los protocolos descritos en las secciones 2.6.2 y 2.6.3.

Los voltamperogramas registrados para todos los electrodos modificados y sin modificar (***figura 3.85.a***) no mostraron diferencias significativas aparentes, presentando intensidades (i_p) y potenciales (E_p) anódicos y catódicos similares, así como valores de ΔE en el rango de electroactividad del par redox. Sin embargo, por EIS sí se obtuvieron diferencias en los valores de la resistencia a la transferencia electródica (R_{CT}) sobre los SPCEs modificados con los diferentes nanomateriales (***figura 3.85.b***). Este diferente comportamiento entre las dos técnicas se relacionó con su fundamento y condiciones de aplicación. Así, las perturbaciones respecto al estado estacionario son mayores en CV frente a la EIS, cuyo sistema solo está infinitesimalmente perturbado.

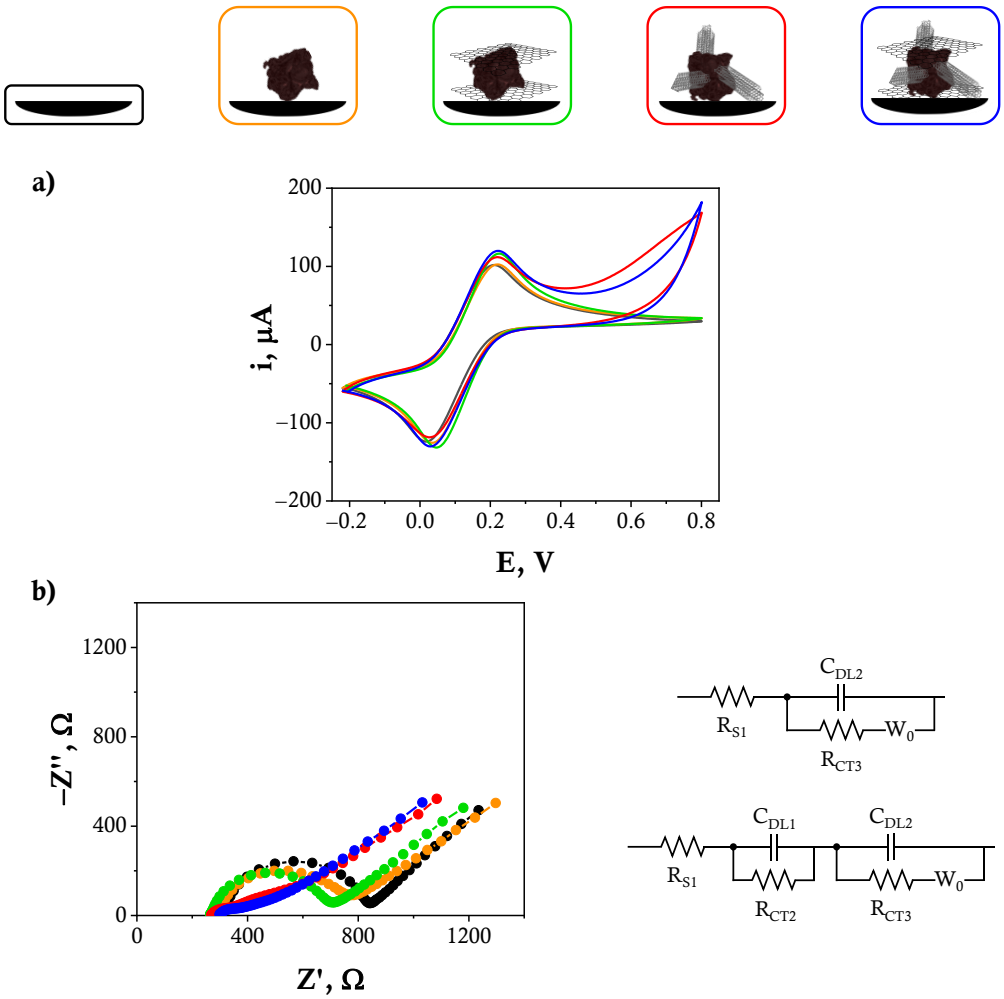


Figura 3.85. a) *Voltamperogramas cíclicos registrados por CV y* ***b)*** *Gráficos de Nyquist registrados por EIS y circuito equivalente de Randles-Ershler asociado a los resultados experimentales, medidos en disolución que contenía 5 mM de* $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ *y 0.1 M de KCl para SPCEs sin modificar (línea negra) y modificados con* MoS_2 *(línea naranja),* MoS_2*/rGO (línea verde),* MoS_2*/MWCNTs (línea roja) o* MoS_2*/rGO/MWCNTs (línea azul).*

Como se puede observar en el gráfico de Nyquist, los electrodos modificados con nanomateriales compuestos por MWCNTs presentaban menor resistencia a la transferencia de carga (**tabla 3.34**). Este hecho se debe probablemente al mejor comportamiento conductor originado por la presencia de los nanotubos, ya que no ocurre cuando los WE se modifican solo con MoS_2 o rGO. Así, este comportamiento concuerda con la existencia de nanoestructuras porosas observadas por SEM y TEM. Además, estas nanoestructuras incrementan la superficie específica del WE, proporcionando más sitios activos para conjugar biomoléculas.

Tabla 3.34. Valores de resistencia a la transferencia electródica (R_{CT}) registrados para cada SPCE evaluado.

Electrodo modificado	***R_{CT}, Ω***
SPCE sin modificar	544
MoS_2-SPCE	508
MoS_2/rGO-SPCE	451
MoS_2/MWCNTs-SPCE	145
MoS_2/rGO/MWCNTs-SPCE	129

Todos estos estudios de caracterización permitieron seleccionar al nanomaterial sintetizado MoS_2/MWCNTs como el más adecuado para su empleo como nanotransportador de las etiquetas para el marcaje enzimático capaz, además, de amplificar la respuesta electroquímica.

Optimización de las variables experimentales

Una vez estudiado el comportamiento de los nanomateriales sintetizados y habiendo elegido el más adecuado para su aplicación en la bioplataforma, se optimizaron tanto las variables experimentales involucradas en el funcionamiento como nanotransportador de biomoléculas del nanohíbrido MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb, como las variables relacionadas con la modificación de la superficie electródica, en este caso basada en el *electrografting* con *p*-ABA y activación con EDC/NHSS, seguido de la incorporación de neutravidina (NA) y la inmovilización del anticuerpo de captura biotinilado, dando lugar a la superficie b-cAb-NA-*p*-ABA-SP_2CE. Con el objetivo de lograr el mejor funcionamiento y rendimiento analítico de la bioplataforma dual MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb_{BAFF}-BAFF-b-cAb_{BAFF}- y MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb_{APRIL}-APRIL-b-cAb_{APRIL}-NA-*p*-ABA-SP_2CE, se siguió el criterio de la mayor relación S/B establecido a lo largo de la Memoria para la selección de los valores óptimos de cada variable dentro del rango estudiado, comparando las respuestas amperométricas (Δi); calculadas según la ***ecuación 3.1*** para los registros medidos con inmunoplataformas individuales en ausencia (blanco, B) y en presencia de 5 o 4 ng mL^{-1} (señal, S) de estándar de BAFF o APRIL, respectivamente.

Respecto al efecto de la composición y la concentración del nanotransportador (MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb), las variables estudiadas, el rango comprendido y el valor seleccionado se resumen en la **tabla 3.35** y representan en la ***figura 3.86***.

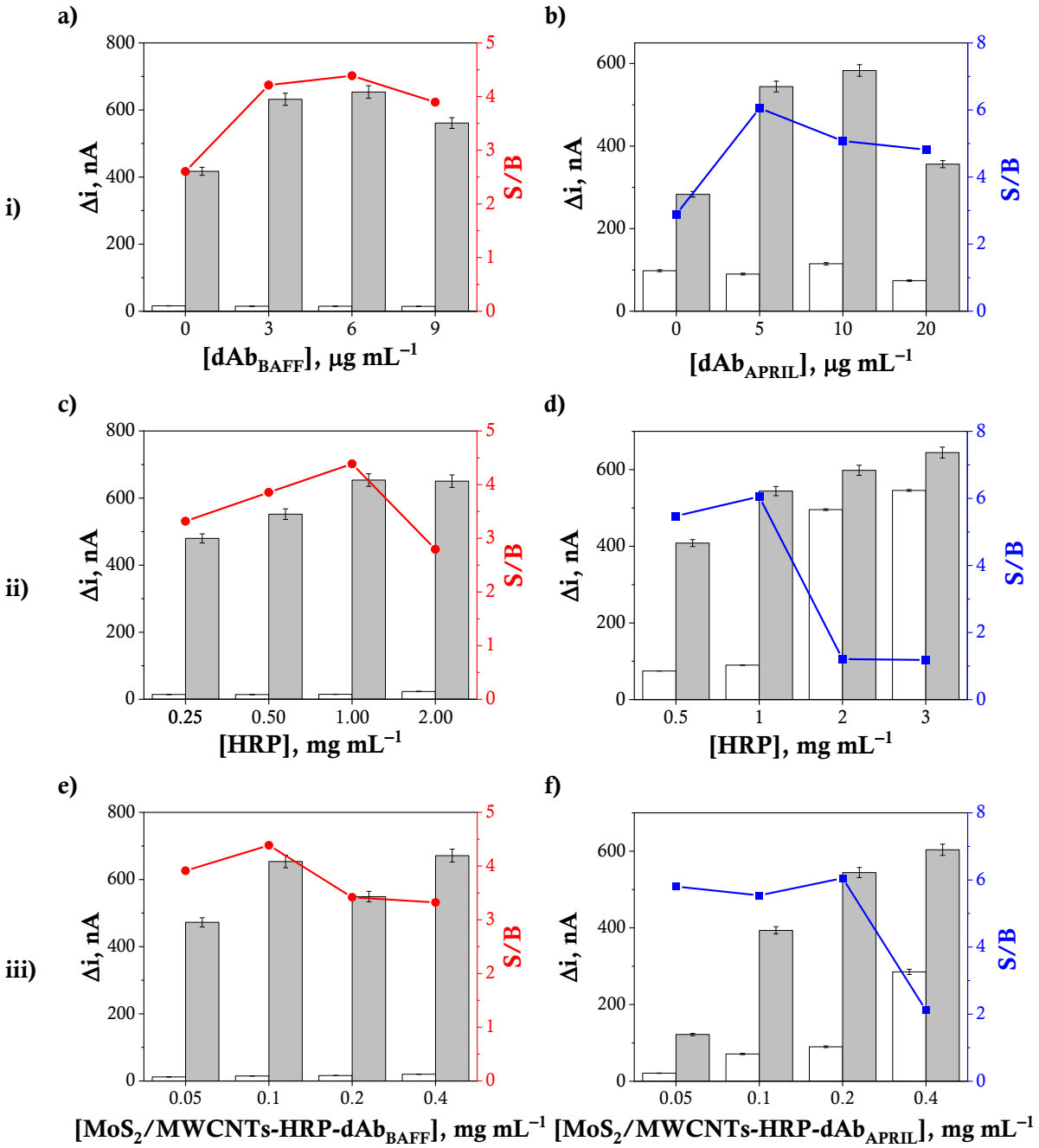


Figura 3.86. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando bioplataformas individuales en formato integrado para la determinación de* ***a, c, e)*** *BAFF o* ***b, d, f)*** *APRIL, en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 5 o 4 ng mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de cada citoquina respectivamente, y las relaciones S/B obtenidas (puntos/cuadrados y líneas rojos/azules) con la concentración de* ***i)*** *dAb,* ***ii)*** *HRP y* ***iii)*** *MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb.*

En relación con la composición de MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb, el efecto que la carga de dAb ejercía en el nanotransportador preparado para cada biomarcador diana (***figura 3.86.i***) sobre la respuesta del inmunosensor se traducía en un aumento de la relación S/B por incremento de la señal en presencia de estándar en función de la cantidad de dAb hasta alcanzar los valores óptimos de 6 y 5 µg mL^{-1} para BAFF y APRIL respectivamente, a partir de los cuales disminuía la relación por posible saturación de la etiqueta y/o reconocimiento menos favorable de la diana por impedimento estérico. En cuanto a la concentración de HRP (***figura 3.86.ii***), en el caso de BAFF se producía un aumento progresivo de las señales hasta alcanzar 1 mg mL^{-1}. En cambio, para APRIL se observaba un comportamiento anormal en el que concentraciones superiores a 1 mg mL^{-1} proporcionaban un incremento inesperado en las señales inespecíficas. Por último, la carga de nanotransportador sobre la bioplataforma de BAFF (***figura 3.86.e***) implicaba un ligero aumento de la señal inespecífica, obteniéndose la mayor relación S/B con 0.1 mg mL^{-1}, mientras que en la determinación de APRIL (***figura 3.86.f***) se observó un aumento progresivo de las señales específicas e inespecíficas con la carga de nanotransportador hasta alcanzar la relación óptima en 0.2 mg mL^{-1}.

Tabla 3.35. Variables experimentales evaluadas, rango estudiado y valor seleccionado, para la optimización de la preparación y funcionamiento del nanomaterial.

Variable experimental	*Citoquina*	*Rango estudiado*	*Valor seleccionado*
Concentración dAb, µg mL^{-1}	BAFF	0.0–9.0	6.0
	APRIL	0.0–20.0	5.0
Concentración HRP, mg mL^{-1}	BAFF	0.25–2.0	1.0
	APRIL	0.5–3.0	
Concentración MoS_2/MWCNTs, mg mL^{-1}	BAFF	0.05–0.4	0.1
	APRIL		0.2

Las variables estudiadas, el rango evaluado y el valor seleccionado para lograr el mejor comportamiento de la bioplataforma dual se muestran en las ***figuras 3.87–3.90*** y se indican en la **tabla 3.36**.

La comparación de la inmovilización de los b-cAb sobre estreptavidina (Estrep) y neutravidina (NA) (***figura 3.87.i***), demostró que se obtenía una mayor relación S/B sobre la NA, lo que se atribuyó a las menores interacciones inespecíficas obtenidas en ausencia de citoquina diana debido a la carga prácticamente neutra de la NA [Jain et al., 2017; Arévalo et al., 2020]. A partir de este estudio se optimizó la concentración y el tiempo de incubación de la NA para inmovilizar la mayor cantidad de b-cAb en cada biosensor (***figura 3.87.ii-iii***), que llevaron a

seleccionar concentraciones y tiempos de incubación de NA de 600 µg mL^{-1} y 15 minutos para BAFF y 400 µg mL^{-1} y 30 minutos para APRIL.

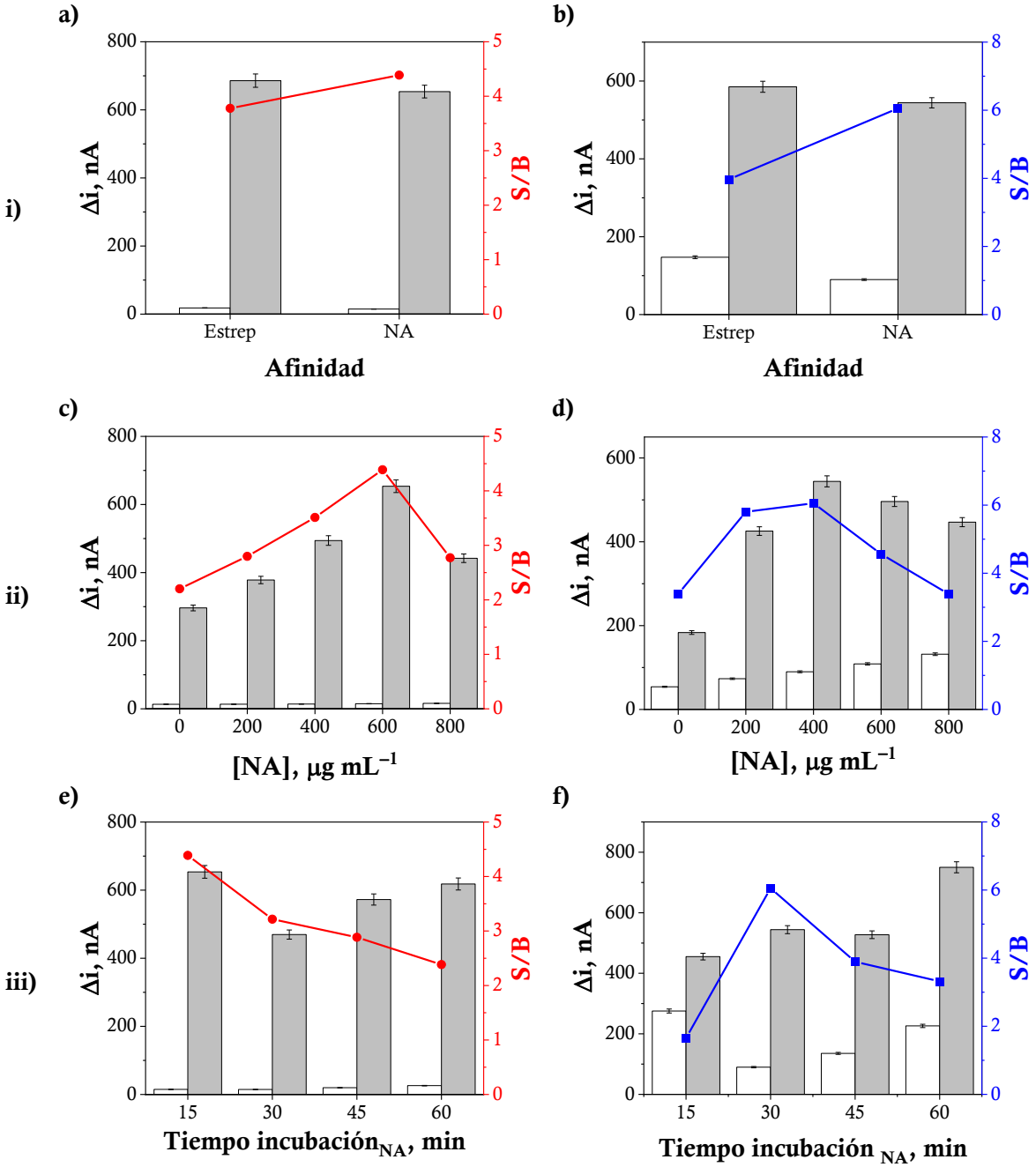


Figura 3.87. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma individual en formato integrado para la determinación de* ***a, c, e)*** *BAFF o* ***b, d, f)*** *APRIL, en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 5 o 4 ng* mL^{-1} *(S, barras grises) de estándar de cada citoquina respectivamente, y las relaciones S/B obtenidas (puntos/cuadrados y líneas rojas/azules) con* ***i)*** *el tipo de proteína de afinidad,* ***ii)*** *concentración y* ***iii)*** *tiempo de incubación de NA.*

Seguidamente, se optimizó la concentración de b-cAb inmovilizado y su tiempo de incubación (***figura 3.88***). Se observó que en presencia de b-cAb las corrientes específicas se mantenían prácticamente constantes, seleccionándose las concentraciones óptimas que proporcionaban menores respuestas inespecíficas. Asimismo, se estudió el efecto del tiempo de incubación observándose un incremento de las respuestas específicas empleando tiempos de 30 y 15 minutos, respectivamente, a partir de los cuales disminuían probablemente por el impedimento estérico provocado en la captura del biomarcador diana cuando se inmovilizan sobre las NA-*p*-ABA-SPCE demasiadas moléculas de b-cAb.

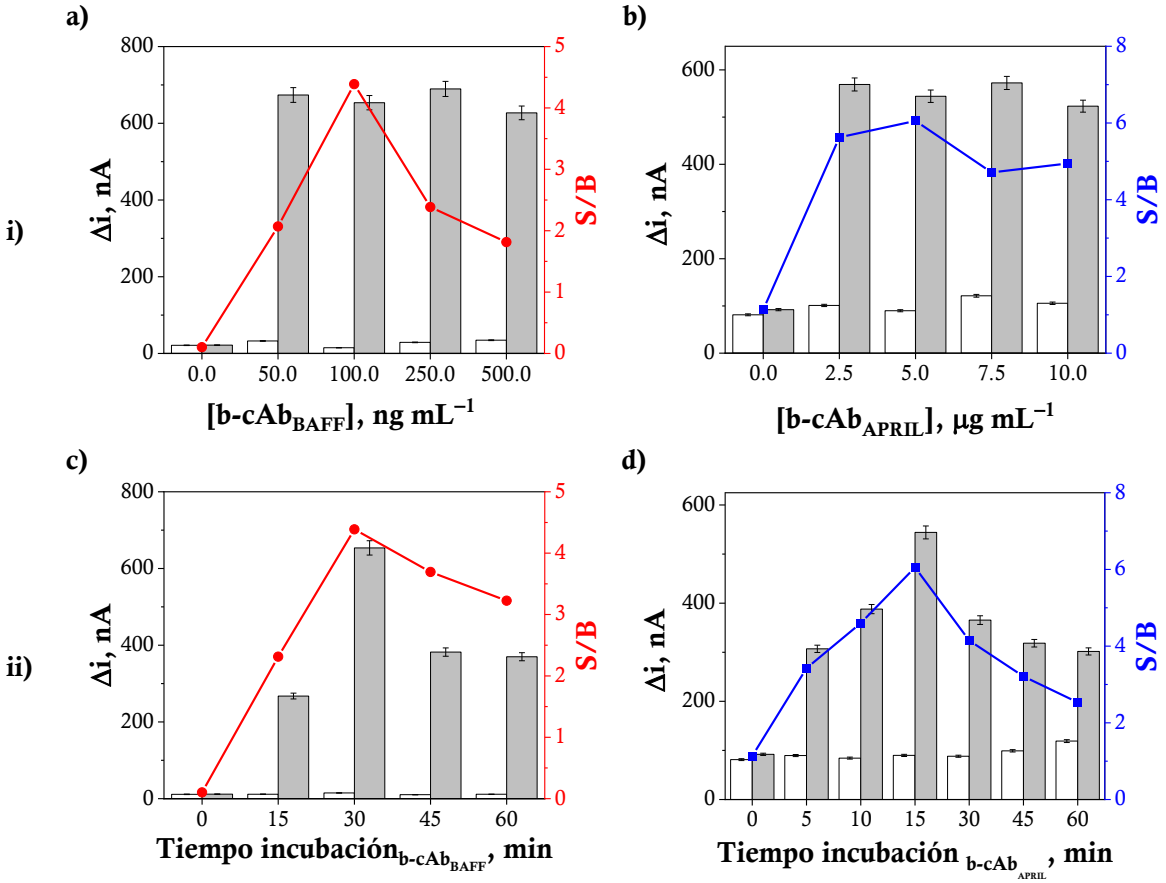


Figura 3.88. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma individual en formato integrado para la determinación de* ***a, c)*** *BAFF o* ***b, d)*** *APRIL, en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 5 o 4 ng mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de cada citoquina respectivamente, y las relaciones S/B obtenidas (puntos/cuadrados y líneas rojas/azules) con* ***i)*** *concentración y* ***ii)*** *tiempo de incubación de b-cAb.*

Con el fin de bloquear los posibles grupos activados residuales y moléculas de NA libres sobre la superficie electródica, se estudiaron diferentes disoluciones que contenían biotina, caseína y BSA, considerados comúnmente agentes bloqueantes, con distintas combinaciones ((A) biotina 2 mg mL^{-1}, (B) caseína 2% + biotina 2 mg mL^{-1}, (C) BSA 2%, (D) caseína 2% + BSA 1% + biotina 3 mg mL^{-1}). Los resultados (***figura 3.89***) confirmaron que para los biosensores desarrollados la

mejor disolución bloqueante era la que contenía únicamente biotina. Por ello, se optimizó su concentración y el tiempo de incubación, resultando como valores óptimos 2 mg mL^{-1} y 15 minutos. Como muestran las ***figuras 3.89.i–3.89.ii)***, el empleo de concentraciones superiores a la óptima provocaba una disminución de las corrientes por una peor conductividad del electrodo.

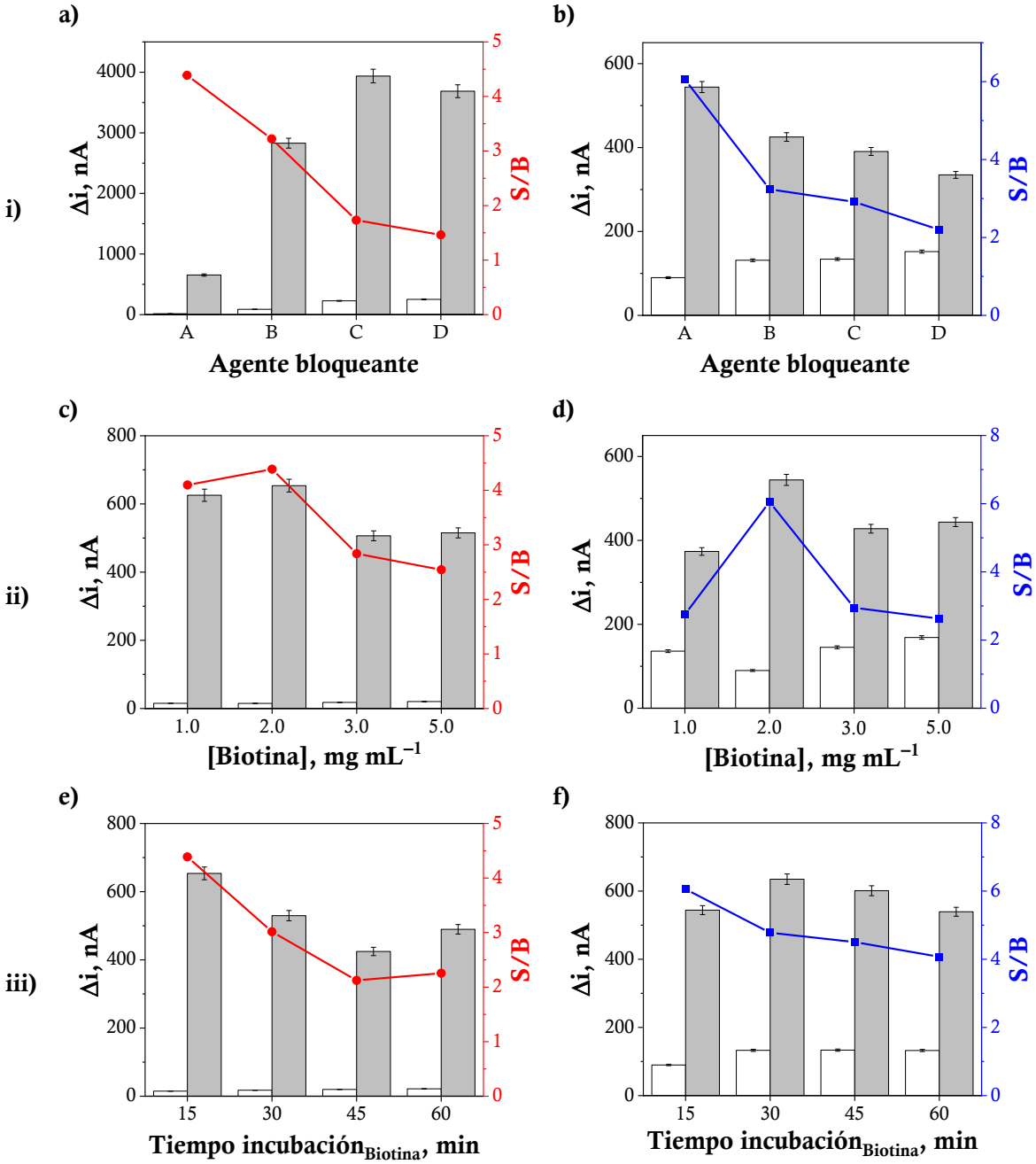


Figura 3.89. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma individual en formato integrado para la determinación de* ***a, c, e)*** *BAFF o* ***b, d, f)*** *APRIL, en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 5 o 4 ng* mL^{-1} *(S, barras grises) de estándar de cada citoquina respectivamente, y las relaciones S/B obtenidas (puntos/cuadrados y líneas rojos/azules) con* ***i)*** *composición del agente bloqueante,* ***ii)*** *concentración y* ***iii)*** *tiempo de incubación de biotina.*

Finalmente se optimizaron los tiempos de incubación de cada biomarcador diana y del nanotransportador de elementos de señalización. Los resultados obtenidos (***figura 3.90***) demostraban tendencias similares para ambas citoquinas y llevaron a seleccionar 30 minutos para la incubación de los dos biomarcadores y para el marcaje enzimático de BAFF con el nanotransportador y 15 minutos para determinar APRIL.

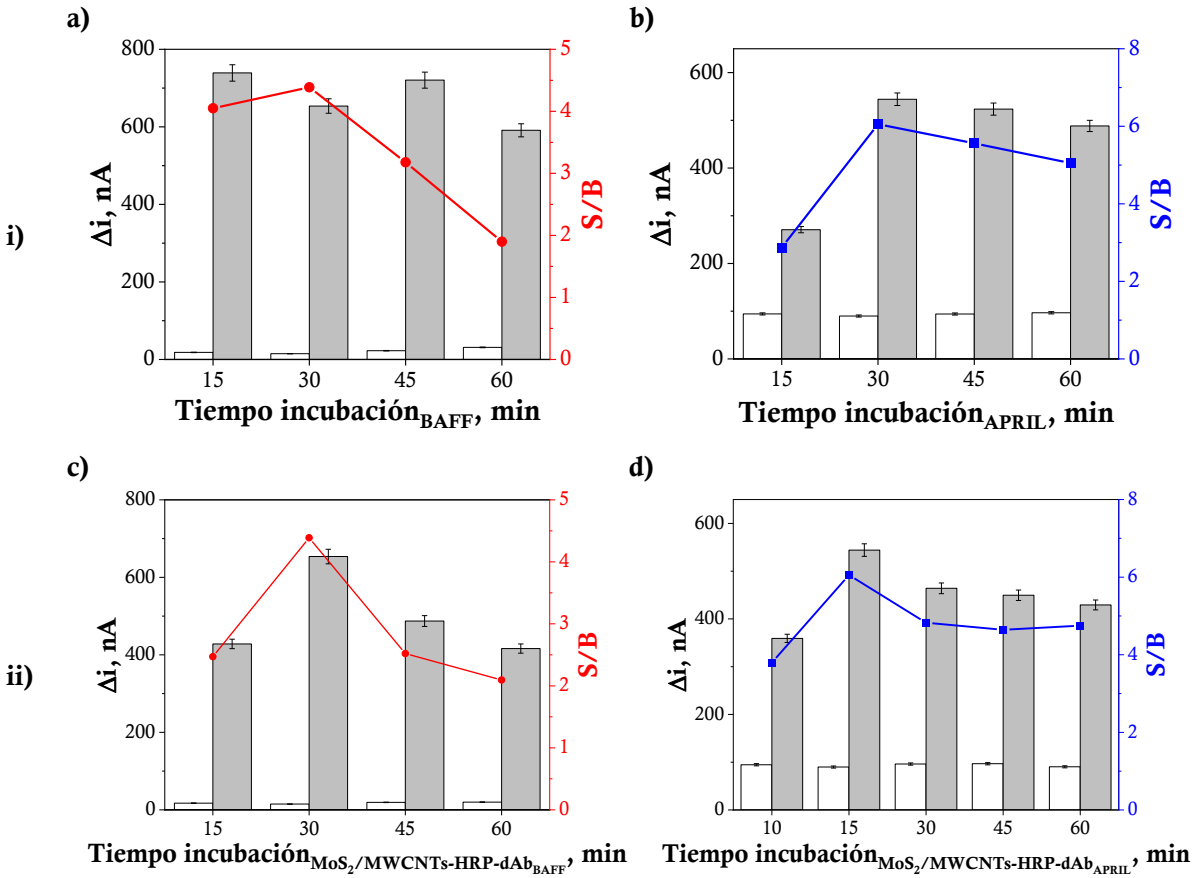


Figura 3.90. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma individual en formato integrado para la determinación de* ***a)*** *BAFF o* ***b)*** *APRIL, en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 5 o 4 ng mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de cada citoquina respectivamente, y las relaciones S/B obtenidas (puntos/cuadrados y líneas rojos/azules) con el tiempo de incubación de i) citoquina diana y ii) MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb.*

Tabla 3.36. Variables experimentales evaluadas, rango estudiado y valor seleccionado para la preparación de las bioplataformas individuales.

Variable experimental	*Citoquina*	*Rango estudiado*	*Valor seleccionado*
Tipo de afinidad	BAFF	Estrep/ NA	NA
	APRIL		
Concentración NA, µg mL^{-1}	BAFF	0.0–800.0	600.0
	APRIL		400.0
Tiempo incubación NA, min	BAFF	15–60	15
	APRIL		30
Concentración cAb, ng mL^{-1}	BAFF	0.0–500.0	100.0
Concentración cAb, µg mL^{-1}	APRIL	0.0–10.0	5.0
Tiempo incubación cAb, min	BAFF	15–60	30
	APRIL	5–60	15
Agente bloqueante*	BAFF	A–D	D
	APRIL		
Concentración biotina, mg mL^{-1}	BAFF	1.0–5.0	2.0
	APRIL		
Tiempo incubación biotina, min	BAFF	15–60	15
	APRIL		
Tiempo incubación diana, min	BAFF	15–60	30
	APRIL		
Tiempo incubación marcaje con nanotransportador, min	BAFF	15–60	30
	APRIL	10–60	15

**(A) biotina 2 mg mL^{-1}, (B) caseína 2% + biotina 2 mg mL^{-1}, (C) BSA 2%, (D) caseína 2% + BSA 1% + biotina 3 mg mL^{-1}.*

Estudio de caracterización electroquímica

Cada etapa involucrada en la preparación de las inmunoplataformas individuales en formato integrado MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb_{BAFF}-BAFF-biotina-b-cAb_{BAFF}-NA-*p*-ABA-SPCE (***figura 3.91.a***) y MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb_{APRIL}-APRIL-biotina-b-cAb_{APRIL}-NA-*p*-ABA-SPCE (***figura 3.91.b***) para la posterior transferencia a formato dual sobre SP_2CEs, se caracterizó mediante EIS empleando el par redox $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ según el protocolo descrito en la sección 2.6.3, registrando los valores de R_{CT} resumidos en la **tabla 3.37** y mostrados en la ***figura 3.91***, permitiendo describir también los circuitos equivalentes de los SPCEs modificados.

Tabla 3.37. Valores de R_{CT} (Ω) para cada etapa de preparación de las bioplataformas electroquímicas en formato integrado para la determinación individual de BAFF y APRIL.

Etapa	***R_{CT}, Ω***	
	BAFF	*APRIL*
SPCE	972	1293
p-ABA-SPCE	3862	3724
EDC/NHSS-*p*-ABA-SPCE	1950	1970
NA-EDC/NHSS-*p*-ABA-SPCE	2015	1809
b-cAb-NA-EDC/NHSS-*p*-ABA-SPCE	2196	2076
Biotina-b-cAb-NA-EDC/NHSS-*p*-ABA-SPCE	2287	2264
Citoquina-biotina-b-cAb-NA-EDC/NHSS-*p*-ABA-SPCE	2326	2368
Marcaje-citoquina-biotina-b-cAb-NA-EDC/NHSS-*p*-ABA-SPCE	2225	2187

Como se puede observar en el gráfico de Nyquist de la ***figura 3.91.i***, la modificación del electrodo de trabajo con *p*-ABA mediante *electrografting* (línea y puntos morados) supuso un aumento en la resistencia a la transferencia electrónica (R_{CT}) frente al SPCE sin modificar (línea y puntos negros) atribuido a la repulsión electrostática entre el par redox aniónico y los grupos carboxilo confinados en la superficie del electrodo modificado, cargados negativamente al pH de trabajo. En cambio, al activar estos grupos con EDC/NHSS se produjo un descenso drástico en la R_{CT} (línea y puntos turquesa) debido a la neutralización de las cargas de los grupos carboxilo. Tras la inmovilización de los b-cAbs, como era de esperar, la R_{CT} aumentaba debido a la formación de una capa parcialmente aislante creada por los anticuerpos sobre la superficie electródica (línea y puntos verdes). Además, como puede apreciarse, el espectro de impedancia aparece distorsionado en el caso de la bioplataforma para determinar BAFF (***figura 3.91.a***), observándose claramente dos semicírculos en el caso de APRIL (***figura 3.91.b***). Estos fenómenos se atribuyen a la formación de dos capas sobre la superficie del electrodo, hecho más notable con el segundo biomarcador diana al inmovilizarse mayor carga de b-cAb_{APRIL} (5 µg mL^{-1} *vs.* 100 ng mL^{-1}). La incubación con la biotina (línea y puntos rojos), como bloqueante, y con las citoquinas antígeno (línea y puntos azules) dieron lugar a un aumento de la resistencia a la transferencia de carga debido a que las proteínas obstaculizan la transferencia interfacial de los electrones. Finalmente, esta R_{CT} se vio drásticamente disminuida tras la incubación con los nanotransportadores de elementos de señalización (línea y puntos grises) gracias a su mayor conductividad.

Por otro lado, estos gráficos de Nyquist se ajustan a dos circuitos equivalentes (***figura 3.91.c***), un primer circuito más sencillo, con el esquema $R_1(C_2[R_3W_0])$, y un segundo más complejo con al menos dos semicircuitos de RC, donde el R_{CT2} corresponde a la formación del segundo semicírculo del gráfico por la transferencia electrónica a través de las moléculas inmovilizadas.

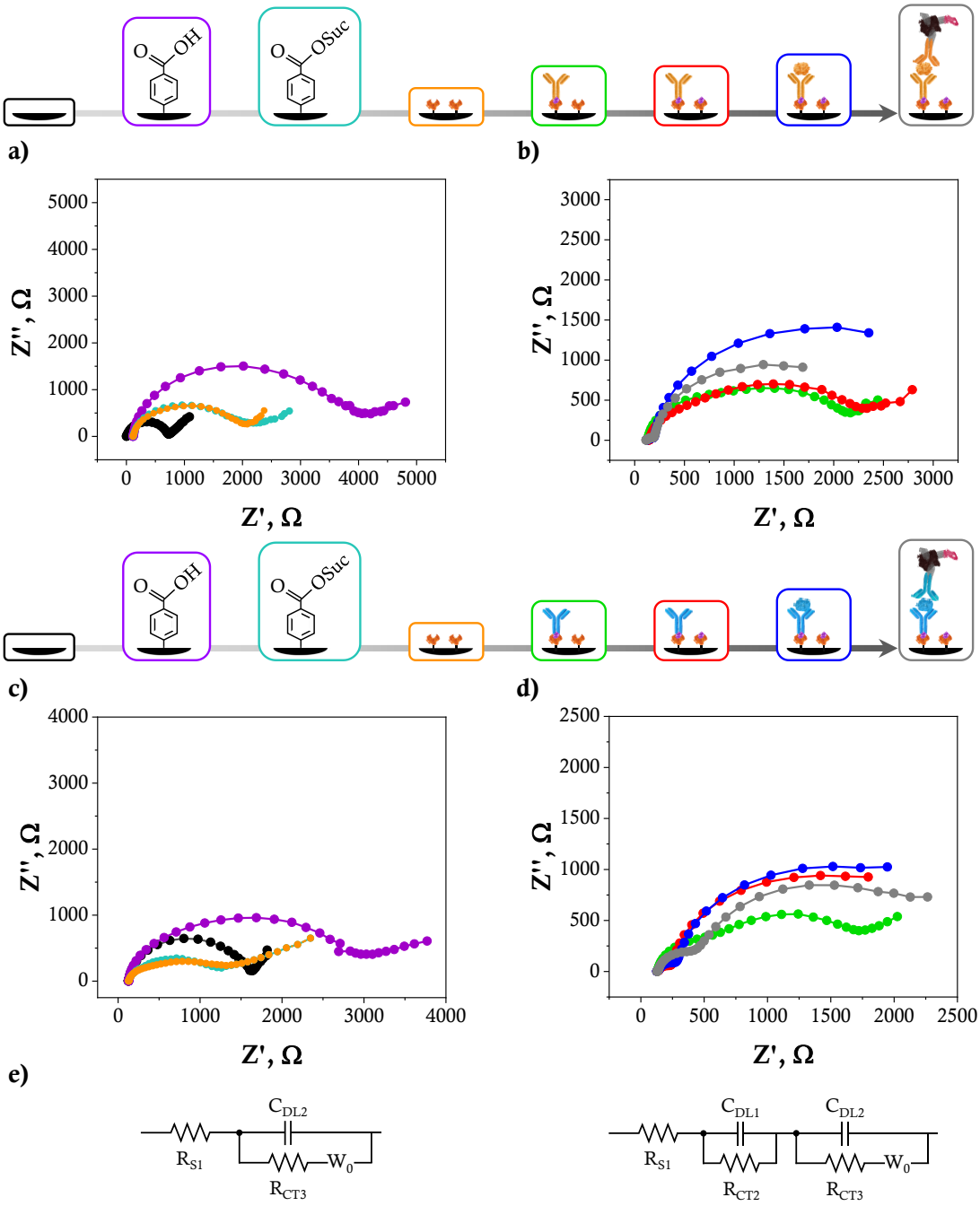


Figura 3.91. *Gráficos de Nyquist obtenidos en las diferentes etapas de preparación de la bioplataforma integrada para la determinación de* ***a, b)*** *BAFF o* ***c, d)*** *APRIL registrados por EIS y* ***e)*** *circuitos equivalentes de Randles-Ershler asociado a los resultados experimentales. Espectros obtenidos en disoluciones de* $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ *sobre* ***a, c)*** *SPCE sin modificar (línea negra), p-ABA-SPCE (línea morada), EDC/NHSS-p-ABA-SPCE (línea turquesa), NA-EDC/NHSS-p-ABA-SPCE (línea y puntos naranjas),* ***b, d)*** *b-cAb-NA-EDC/NHSS-p-ABA-SPCE (línea y puntos verdes), biotina-b-cAb-NA-EDC/NHSS-p-ABA-SPCE (línea y puntos rojos), citoquina-biotina-b-cAb-NA-EDC/NHSS-p-ABA-SPCE (línea y puntos azules) y* MoS_2*/MWCNTs-HRP-dAb-citoquina-biotina-b-cAb-NA-EDC/NHSS-p-ABA-SPCE (línea y puntos grises).*

Estudio de selectividad

La selectividad de los reactivos empleados para la formación de los bioconjugados se examinó comparando las señales medidas para 0 y 10 o 4 ng mL^{-1} de estándar de BAFF o APRIL en ausencia (control) y presencia de distintas proteínas no diana y biomarcadores de enfermedades autoinmunes y cáncer a las concentraciones séricas esperables en individuos sanos.

En la ***figura 3.92*** se comparan las señales según el criterio S/B para cada biomarcador analizado con su inmunoplataforma individual en formato integrado. Los resultados confirmaron que ninguna de las biomoléculas no diana estudiadas supuso una interferencia significativa en la medida amperométrica, encontrándose en todos los casos valores de S/B dentro del intervalo comprendido entre ± 3s.

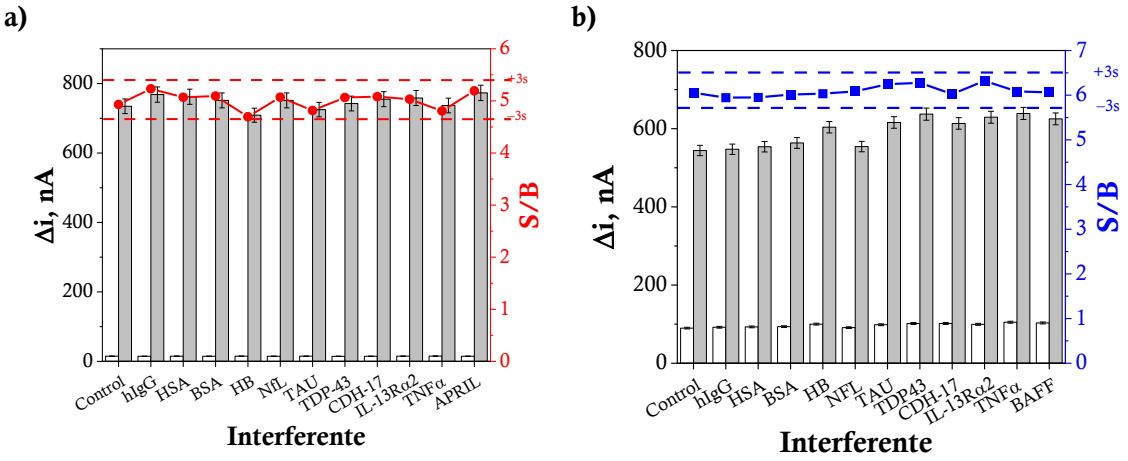


Figura 3.92. *Respuestas amperométricas obtenidas con las inmunoplataformas individuales en formato integrado para disoluciones estándar de* ***a)*** *0 (B, barras blancas) y 10 ng mL^{-1} de estándar de BAFF (S, barras grises) o* ***b)*** *0 (B, barras blancas) y 4 ng mL^{-1} de estándar de APRIL, preparadas en ausencia (control) y presencia de 1 mg mL^{-1} hIgG; 50 mg mL^{-1} HSA; 5 mg mL^{-1} BSA; 5 mg mL^{-1} HB; 30 pg mL^{-1} NfL; 5 pg mL^{-1} TAU; 1 ng mL^{-1} TDP-43; 500 ng mL^{-1} CDH-17; 10 ng mL^{-1} IL-13Rα2; 100 pg mL^{-1} TNFα; 4 ng mL^{-1} APRIL o 1 ng mL^{-1} BAFF y sus correspondientes relaciones S/B (puntos/cuadrados y líneas rojos/azules).*

Evaluación de la reactividad cruzada en la detección

La viabilidad de multiplexado y las posibles interferencias en la medida causadas por la modificación de las superficies electródicas adyacentes se estudió comparando las respuestas amperométricas (Δi) proporcionadas por la bioplataforma electroquímica dual desarrollada para la determinación de disoluciones preparadas en ausencia y presencia de 100 o 25 ng mL^{-1} de estándar de BAFF y APRIL.

Como se muestra en la ***figura 3.93***, las señales registradas para las disoluciones que contenían la misma concentración de biomarcador diana se mantenían prácticamente invariables en presencia del biomarcador no diana, lo que permitió asegurar la ausencia de reactividad cruzada entre las superficies electródicas de SP_2CEs y confirmó la viabilidad de multiplexado.

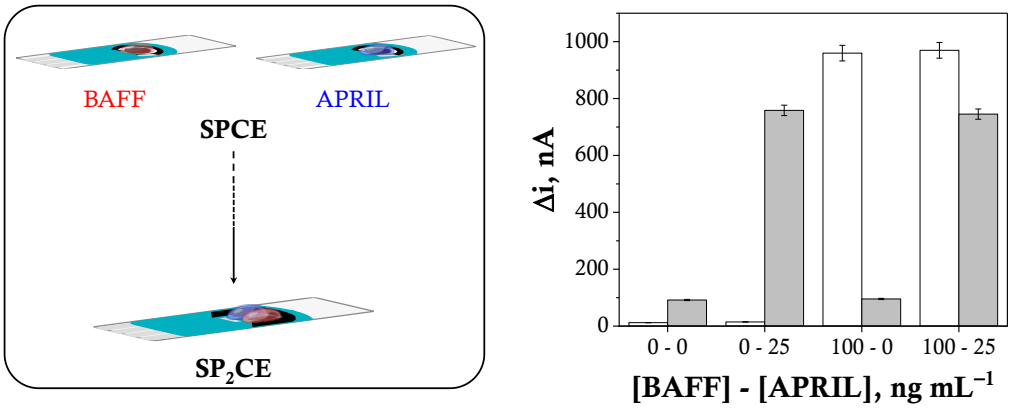


Figura 3.93. *Evaluación de la reactividad cruzada y de la viabilidad para la implementación en una bioplataforma dual comparando las medidas amperométricas obtenidas para disoluciones mezcla conteniendo las concentraciones indicadas de estándares de BAFF (barras blancas) y APRIL (barras grises).*

Calibrados y características analíticas

Una vez examinado el comportamiento individual de las plataformas en formato integrado y comprobada la viabilidad de su transferencia a una bioplataforma para la determinación dual, se obtuvieron los calibrados mostrados en la ***figura 3.94*** para disoluciones estándar de BAFF y APRIL en las condiciones optimizadas.

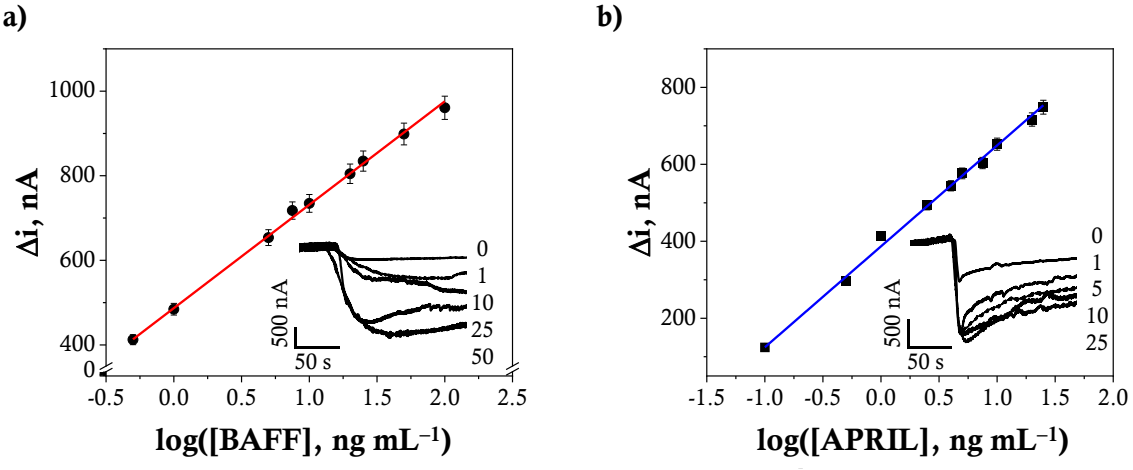


Figura 3.94. *Curvas de calibrado ajustadas y registros amperométricos reales obtenidos con la bioplataforma electroquímica dual en formato integrado usando MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb para la determinación de* ***a)*** *BAFF y* ***b)*** *APRIL.*

El ajuste por el método de mínimos cuadrados entre la corriente (Δi) y el logaritmo de la concentración del biomarcador diana proporcionó los valores de los parámetros analíticos resumidos en la **tabla 3.38**.

La sensibilidad proporcionada por la bioplataforma dual se evaluó estadísticamente comparando las respuestas amperométricas de diez bioplataformas medidas en ausencia de biomarcador diana. Los valores de los límites de detección (LOD) de 0.08 y 0.06 ng mL^{-1} y cuantificación (LOQ) de 0.24 y 0.19 ng mL^{-1} para BAFF y APRIL respectivamente, no pudieron compararse con los de la metodología ELISA que empleaba los mismos inmunorreactivos al no indicarse en las especificaciones comerciales. No obstante, otros kits comerciales de la misma marca incorporan en sus especificaciones los datos de la dosis mínima detectable (MDD), calculada según la ***ecuación 3.2***, que a diferencia del LOD (concentración de analito a partir de la cual se establece si puede ser detectado por el método analítico determinado), es la concentración mínima de analito que debe estar presente en la muestra para generar una señal específica [Carbaugh, 2003].

$$MDD = \bar{x} \pm 2s \qquad \textit{Ecuación 3.2}$$

Aunque otros kits ELISA comerciales ofrecen valores de sensibilidad (**tabla 3.39**) mejores a los proporcionados con la bioplataforma electroquímica desarrollada, sus rangos lineales son inferiores. Además, la posibilidad de determinar ambas citoquinas simultáneamente en un reducido tiempo de ensayo (1.5 horas desde la inmovilización del b-cAb) es un factor de gran relevancia ofrecido de forma pionera en esta investigación y no por los kits comerciales.

En relación con la reproducibilidad valorada como la RSD de las respuestas amperométricas proporcionadas por cinco inmunoplataformas duales preparadas el mismo día o distintos días para 10 o 2.5 ng mL^{-1} de estándar de BAFF y APRIL, respectivamente, los resultados demostraron que tanto los protocolos empleados para la modificación y formación de los inmunoconjugados como para registrar la medida amperométrica eran precisos.

Todas estas características analíticas demuestran la compatibilidad de la bioplataforma electroquímica dual en formato integrado para determinar el contenido endógeno de BAFF y APRIL en muestras clínicas, cuyos niveles esperados en individuos sanos fueran inferiores a 0.8 y 4 ng mL^{-1}, respectivamente [Treamtrakanpon et al., 2012; Kryštůfková et al., 2018].

Tabla 3.38. Características analíticas ofrecidas por la bioplataforma electroquímica dual desarrollada en formato integrado para la determinación amperométrica de BAFF y APRIL.

Parámetro analítico	***BAFF***	***APRIL***
Intervalo lineal, ng mL^{-1}	0.24–120	0.19–25
R^2	0.999	0.997
Pendiente, nA por década de concentración	244 ± 3	258 ± 5
Ordenada en el origen, nA	487 ± 3	389 ± 4
LOD (n = 10), ng mL^{-1}	0.08	0.06
LOQ (n = 10), ng mL^{-1}	0.24	0.19
RSD* (n = 5), %	2.9[a]; 3.6[b]	2.4[a]; 3.5[b]

**Medida para 10 y 2.5 ng mL^{-1} de estándar de BAFF y APRIL, respectivamente.*

[a]Para bioplataformas duales preparadas en el mismo día.

[b]Para bioplataformas duales preparadas en distintos días.

Tabla 3.39. Características analíticas ofrecidas por diversos kits ELISA comerciales para la determinación individual de BAFF o APRIL.

Citoquina	*Kit ELISA*	*Intervalo lineal*	*Sensibilidad*	*Tiempo de ensayo**	*Aplicabilidad clínica*
BAFF	BAFF Human Instant ELISA™ Kit (Invitrogen, Cat. No.: BMS2007INST)	0.31–20.0 ng mL^{-1}	0.13 ng mL^{-1}	3 horas 10 minutos	Plasma, suero y cultivo celular (sobrenadante)
	Human BAFF/CD257 (B-Cell Activating Factor) ELISA Kit (Elabscience®, Cat. No.: E-EL-H0009	62.50–4000 pg mL^{-1}	37.50 pg mL^{-1}	3 horas 30 minutos	Plasma, suero y fluidos biológicos
	BAFF, soluble (human) Matched Pair Detection Set (AdipoGen™, Cat. No.: AG-46B-0001-KI01	16–1000 pg mL^{-1}	16 pg mL^{-1}	6 horas 30 minutos	Plasma, suero y cultivo celular (sobrenadante)
APRIL	APRIL Human ELISA Kit (Invitrogen, Cat. No.: BMS2008)	0.78–50.0 ng mL^{-1}	0.4 ng mL^{-1}	3 horas 10 minutos	Plasma, suero y cultivo celular (sobrenadante)
	Human APRIL ELISA (BioVendor Group®, Cat. No.: RAG023R)	7.781–500 pg mL^{-1}	3 pg mL^{-1}	3 horas 40 minutos	Plasma, suero y cultivo celular (sobrenadante)
	APRIL (human) ELISA Kit (AdipoGen®, Cat. No.: AG-45B-0012-KI01)	3.9–250 pg mL^{-1}	1 pg mL^{-1}	3 horas 40 minutos	Plasma, suero y cultivo celular (sobrenadante)

**Desde la inmovilización del anticuerpo de captura.*

Con el fin de demostrar las ventajas, en términos de sensibilidad, alcanzadas al emplear el nanotransportador sintetizado MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb, se compararon las pendientes resultantes para los calibrados obtenidos con disoluciones estándar dentro del mismo intervalo lineal con bioplataformas electroquímicas basadas en el empleo de MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb y de MWCNTs-HRP-dAb (sin la presencia de MoS_2) como nanotransportadores y de aquellas que emplean un marcaje enzimático convencional (HRP-anti-IgG-dAb_{BAFF}/Estrep-HRP-b-dAb_{APRIL}) en lugar del nanotransportador formado por el nanomaterial binario.

Las pendientes resultantes del ajuste lineal, resumidas en la **tabla 3.40**, mostraron que los valores eran considerablemente inferiores cuando se empleaba el nanotransportador en ausencia de MoS_2. Esto demuestra que las nanopartículas de MoS_2 contribuyen a mejorar la conductividad de los MWCNTs y confirman su actividad pseudoperoxidasa intrínseca. Los resultados también muestran que la bioplataforma que empleaba el marcaje convencional (HRP-anti-IgG-dAb_{BAFF}/Estrep-HRP-b-dAb_{APRIL}) ofrecía la menor pendiente, lo que se atribuyó a una transferencia electrónica más desfavorable, lenta y menos eficaz por la pérdida de superficie específica proporcionada por los MWCNTs para inmovilizar grandes cantidades de biomoléculas y nanopartículas de MoS_2.

Tabla 3.40. Comparación de las pendientes resultantes del ajuste lineal de los calibrados obtenidos con las bioplataformas electroquímicas en formato integrado empleando como marcaje enzimático MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb, MWCNTs-HRP-dAb o convencional (HRP-anti-IgG-dAb_{BAFF}/Estrep-HRP-b-dAb_{APRIL}).

Marcaje enzimático	***Pendiente, nA por década de concentración (R^2)***	
	BAFF	*APRIL*
MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb	244 ± 3 (0.999)	258 ± 5 (0.997)
MWCNTs-HRP-dAb	86 ± 7 (0.991)	179 ± 8 (0.993)
Convencional	39 ± 3 (0.990)	104 ± 6 (0.994)

**Valores de R^2 indicados entre paréntesis.*

Estudio de estabilidad de almacenamiento

Las estabilidades de almacenamiento tanto de los bionanoconjugados preparados (MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb) (***figura 3.95.a–3.95b***) como de las inmunoplataformas duales modificadas con b-cAb y bloqueadas (***figura 3.95.c–3.95.d***) se evaluaron conservando los primeros a 4 ºC resuspendidos en PBST 100 mM de pH 7.4 y las segundas con 25 µL de PBS 10 mM de pH 7.4 depositados sobre su superficie y en condiciones húmedas.

Cada día de control se midieron las respuestas amperométricas proporcionadas en ausencia y presencia de 10 ng mL^{-1} de estándar de BAFF (***figura 3.95.a–3.95.c***) o 4 ng mL^{-1} de estándar de APRIL (***figura 3.95.b–3.95.d***) por bioplataformas preparadas a partir de los bionanoconjugados y las bioplataformas almacenadas. Los resultados obtenidos demostraron que los bionanoconjugados eran estables durante al menos 3 meses, mientras que las inmunoplataformas se podían modificar y almacenar sin pérdida de señal durante aproximadamente un mes.

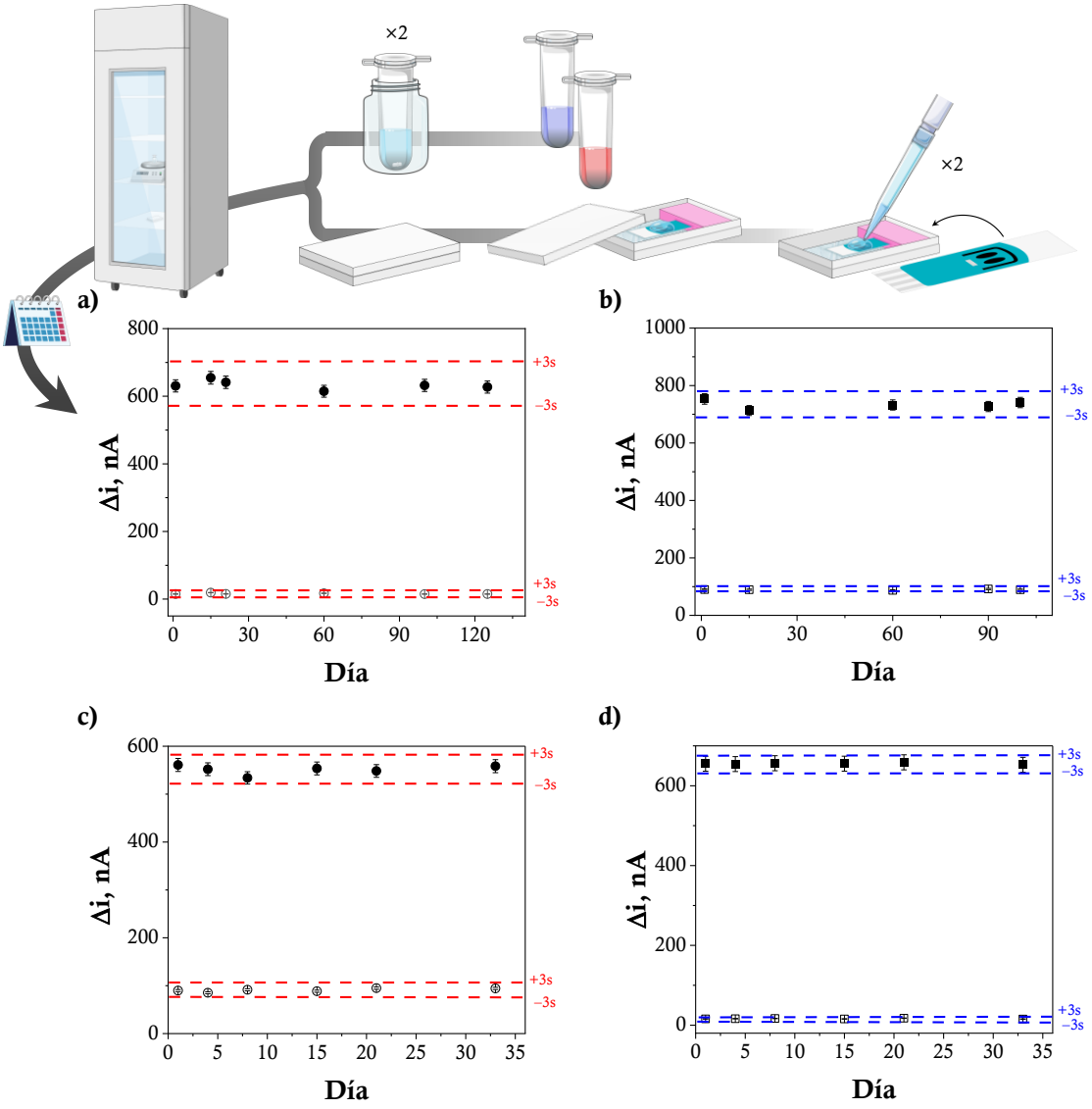


Figura 3.95. *Gráficas de control obtenidas en el estudio de estabilidad de almacenamiento a 4 ºC de* ***a, b)*** *MoS_2/MWCNTs-HRP-dAb resuspendidos en PBST 100 mM de pH 7.4 y* ***c, d)*** *biotina-b-cAb-NA-p-ABA-SPCEs con 25 µL de PBS 10 mM pH 7.4 depositados sobre su superficie y en condiciones húmedas. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en* ***a, c)*** *ausencia (puntos blancos) y presencia (puntos negros) de 10 ng mL^{-1} de estándar de BAFF y* ***b, d)*** *ausencia (cuadrados blancos) y presencia (cuadrados negros) de 4 ng mL^{-1} de estándar de APRIL. Los límites de control (líneas discontinuas rojas o azules, respectivamente) se establecieron como ± 3s del valor promedio obtenido de tres medidas realizadas el día de preparación de cada bioconjugado.*

Aplicación al análisis de muestras de suero y extractos celulares

Siendo uno de los objetivos principales de la investigación enmarcada en esta Tesis Doctoral el estudio de la relación entre las enfermedades autoinmunes y el cáncer, la bioplataforma dual desarrollada en formato integrado se ha aplicado al análisis simultáneo de BAFF y APRIL tanto en extractos de células de cáncer colorrectal con diferentes capacidades metastásicas como en muestras de suero de individuos sanos y pacientes diagnosticados con SLE y CRC.

Para ello, en primer lugar, fue necesario comparar estadísticamente las pendientes proporcionadas por la bioplataforma al determinar estándares de ambas citoquinas preparados en las diferentes matrices con las obtenidas para calibrados de estándares preparados en disolución reguladora. Los resultados obtenidos (valores de $t_{exp} < t_{tab,0.05,4} = 2.776$, **tabla 3.41**) confirmaron que no existía efecto matriz si se empleaban 0.5 µg de extracto celular y las muestras séricas se diluían 10 veces. A la vista de estos resultados, la determinación del contenido endógeno de cada biomarcador diana se llevó a cabo interpolando las respuestas amperométricas proporcionadas por la bioplataforma electroquímica dual en formato integrado para cada muestra analizada en el calibrado de estándares preparado en disolución BB.

Tabla 3.41. Estudio estadístico del análisis de las pendientes (nA por década de concentración) obtenidas con la bioplataforma electroquímica dual en formato integrado para la determinación de estándares de BAFF y APRIL preparados en BB, en 0.5 µg de una muestra representativa de extracto celular o en una muestra representativa de suero de un individuo sano diluida 10 veces.

Calibrado	***BAFF***		***APRIL***	
	Pendiente	t_{exp}	*Pendiente*	t_{exp}
Disolución reguladora	244 ± 3	-	258 ± 5	-
Muestra de suero diluida 10 veces	230 ± 8	1.638	248 ± 3	1.715
0.5 µg de extracto celular	233 ± 6	1.639	261 ± 17	0.169

Los niveles endógenos obtenidos en el análisis de 16 muestras séricas se representan gráficamente en la ***figura 3.96*** y los obtenidos en los 5 extractos celulares se comparan con los que proporciona la metodología ELISA utilizando los mismos inmunorreactivos en las **tablas 3.42** y **3.43**.

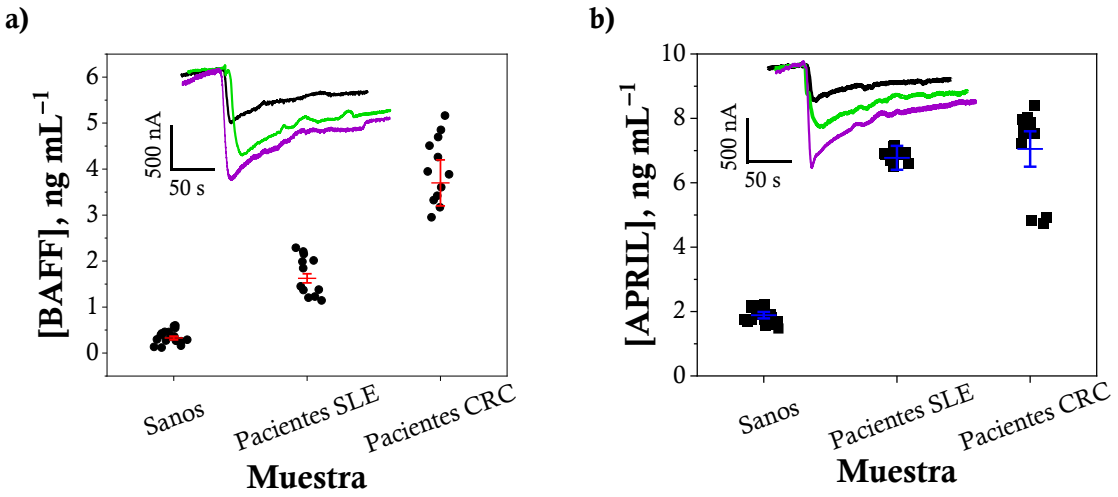


Figura 3.96. *Niveles séricos y registros amperométricos reales representativos de* ***a)*** *BAFF (puntos negros) y* ***b)*** *APRIL (cuadrados negros) proporcionados por la bioplataforma electroquímica dual en formato integrado desarrollada en muestras de suero de individuos sanos (línea negra) y pacientes diagnosticados con SLE (línea verde) y CRC (línea morada).*

Tabla 3.42. Niveles de BAFF y APRIL determinados en muestras de extractos celulares empleando la bioplataforma electroquímica dual en formato integrado y la metodología ELISA.

Muestra	***[BAFF], ng mL^{-1}***		t_{exp}	***[APRIL], ng mL^{-1}***		t_{exp}
	Bioplataforma	*ELISA*		*Bioplataforma*	*ELISA*	
KM12C	1.7 ± 0.1 (2.5)	1.9 ± 0.3 (5.4)	0.314	1.7 ± 0.1 (3.0)	1.7 ± 0.3 (6.1)	0.001
KM12SM	5.00 ± 0.03 (2.4)	5.3 ± 0.6 (4.8)	0.348	7.0 ± 0.6 (3.4)	8 ± 1 (7.5)	0.828
KM12L4a	3.2 ± 0.2 (2.0)	3.1 ± 0.3 (4.5)	0.070	4.5 ± 0.4 (3.5)	4.2 ± 0.5 (4.6)	0.324
SW480	0.90 ± 0.07 (3.2)	1.1 ± 0.2 (8.0)	0.275	0.81 ± 0.05 (2.4)	0.8 ± 0.1 (5.1)	0.043
SW620	2.6 ± 0.2 (2.5)	2.8 ± 0.4 (6.1)	0.309	3.1 ± 0.2 (2.9)	3.4 ± 0.5 (6.2)	0.385

**Los valores de RSD (%) se indican entre paréntesis.*

Tabla 3.43. Niveles séricos de BAFF y APRIL obtenidos en muestras de individuos sanos y pacientes diagnosticados con SLE y CRC empleando la bioplataforma electroquímica dual en formato integrado y la metodología ELISA.

Sujeto	***Muestra***	***[BAFF], ng mL^{-1}***		t_{exp}	***[APRIL], ng mL^{-1}***		t_{exp}
		Bioplataforma	*ELISA*		*Bioplataforma*	*ELISA*	
Sanos	1	0.45 ± 0.05 (3.6)	0.49 ± 0.09 (7.1)	0.057	2.2 ± 0.1 (2.1)	2.2 ± 0.2 (3.5)	0.026
	2	0.29 ± 0.03 (3.8)	0.29 ± 0.05 (6.9)	0.011	1.70 ± 0.08 (1.9)	1.7 ± 0.2 (4.5)	0.051
	3	0.32 ± 0.03 (3.5)	0.34 ± 0.04 (5.2)	0.004	2.2 ± 0.2 (1.5)	2.2 ± 0.3 (5.3)	0.050
	4	0.22 ± 0.02 (3.8)	0.23 ± 0.04 (7.7)	0.005	1.70 ± 0.06 (1.4)	1.6 ± 0.3 (7.3)	0.149
	5	0.37 ± 0.04 (4.8)	0.39 ± 0.05 (5.0)	0.027	1.9 ± 0.2 (3.6)	2.2 ± 0.3 (5.3)	0.395
	6	0.14 ± 0.05 (2.8)	0.12 ± 0.02 (7.0)	0.015	1.8 ± 0.1 (3.3)	1.8 ±0.3 (6.4)	0.007
	7	0.26 ± 0.02 (3.6)	0.30 ± 0.06 (7.9)	0.043	2.0 ± 0.2 (3.6)	1.9 ± 0.3 (6.1)	0.052
	8	0.57 ± 0.07 (4.8)	0.7 ± 0.1 (6.2)	0.110	1.6 ± 0.2 (4.5)	1.6 ± 0.3 (7.4)	0.162
Paciente SLE	9	1.9 ± 0.2 (4.4)	1.9 ± 0.3 (5.6)	0.027	6.7 ± 0.4 (2.3)	7.2 ± 0.8 (4.4)	0.573
	10	1.20 ± 0.09 (3.1)	1.2 ± 0.2 (5.9)	0.065	6.4 ± 0.5 (3.2)	6 ± 1 (6.6)	1.021
	11	2.0 ± 0.1 (2.8)	2.1 ± 0.3 (6.0)	0.125	7.0 ± 0.3 (1.8)	6 ± 1 (6.8)	0.703
	12	1.4 ± 0.1 (3.5)	1.4 ± 0.2 (6.6)	0.012	7.0 ± 0.3 (2.0)	6.3 ± 0.6 (3.9)	0.893
Paciente CRC	13	3.1 ± 0.2 (5.0)	3.6 ± 0.6 (6.4)	0.652	7.5 ± 0.6 (3.2)	7.3 ± 0.7 (3.7)	0.233
	14	4.3 ± 0.8 (3.1)	4.2 ± 0.7 (6.6)	0.044	7.8 ± 0.6 (3.2)	8.2 ± 0.6 (3.0)	0.449
	15	2.9 ± 0.2 (3.3)	3.1 ± 0.5 (6.0)	0.321	4.8 ± 0.3 (2.2)	4.8 ± 0.5 (4.0)	0.002
	16	4.5 ± 0.4 (3.3)	4.9 ± 0.6 (4.8)	0.518	8.1 ± 0.7 (3.6)	7.9 ± 0.7 (3.4)	0.148

**Los valores de RSD (%) se indican entre paréntesis.*

De acuerdo con los resultados descritos en la literatura [Lascano et al., 2012; Wang, T. et al., 2013; Warakomska et al., 2021], los niveles obtenidos por el análisis de extractos celulares demostraron la expresión superior de BAFF y APRIL en células con mayor potencial metastásico (KM12SM, KM12L4a y SW620), confirmando el papel tan importante que tienen estas citoquinas en la producción y desarrollo de tumores, y particularmente su agresividad en CRC.

A lo largo de los últimos años, las investigaciones en este campo han confirmado que, por un lado, la sobreexpresión de ambas citoquinas es una de las características de enfermedades sistémicas como SLE al relacionar sus niveles circulantes con los de las inmunoglobulinas totales (Igs) y con diferentes autoanticuerpos frente a antígenos nucleares, principalmente dsDNA-Abs. De esta manera, se ha establecido una relación entre estos biomarcadores y el papel patogénico que presentan en las enfermedades autoinmunes por su capacidad para estimular la producción de células T [Stohl et al., 2003; Fawzy et al., 2011; Salazar-Camarena et al., 2016]. Por otro lado, se ha visto que estas citoquinas también contribuyen a los procesos cancerígenos liberándose e involucrándose en la regulación del crecimiento, diferenciación y supervivencia de los tumores. De esta manera los estudios han revelado que BAFF es partícipe de la conservación tanto de las células normales como malignas, en primer lugar, a través de la promoción de la diferenciación y supervivencia de las células plasmáticas y de la inhibición de apoptosis. Y, en segundo lugar, por la estimulación del crecimiento tumoral al producirse la sobreexpresión de APRIL [Moreaux et al., 2009; Kampa et al., 2020; Calu et al., 2021].

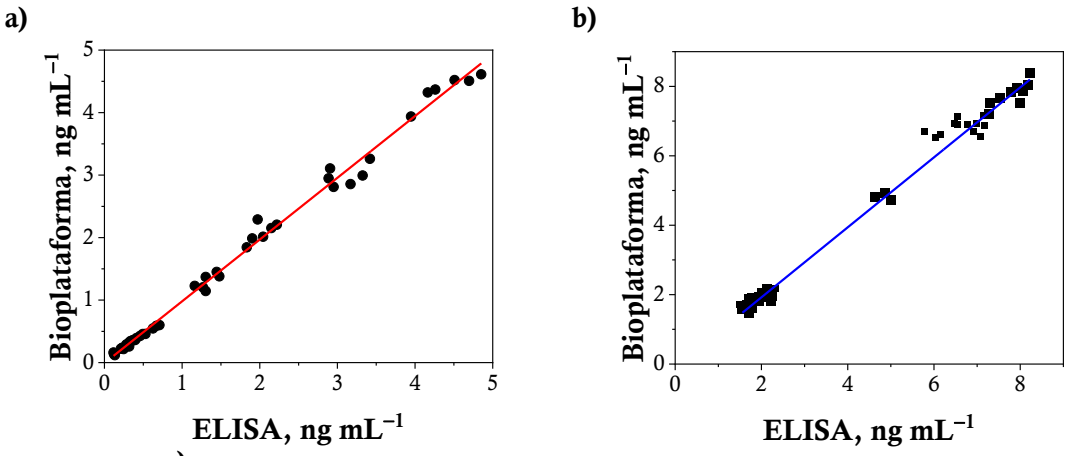
Esta fuerte implicación de BAFF y APRIL en la regulación de las infecciones, inflamaciones, trastornos autoinmunes y homeostasis tisular [Hahne et al., 1998] se comprobó también con los resultados obtenidos al determinar sus contenidos endógenos en muestras de suero. De esta manera, y como se muestra en la ***figura 3.96***, los niveles séricos obtenidos en los pacientes diagnosticados con SLE y CRC eran superiores a los de los individuos sanos, demostrando la posibilidad de discriminar claramente entre sujetos sanos y este tipo de pacientes a partir de estas determinaciones con la bioplataforma electroquímica desarrollada.

Es importante puntualizar también que los niveles séricos de BAFF y APRIL determinados con la bioplataforma para individuos sanos y pacientes con SLE concordaban con los descritos por Salazar-Camarena y cols. y Fawzy y cols., de (0.97 ± 0.21) *vs.* (3.19 ± 4.26) ng mL^{-1} y (0.52 ± 0.18) *vs.* (1.47 ± 1.54) ng mL^{-1} para BAFF y (13.41 ± 19.84) *vs.* (31.42 ± 27.42) ng mL^{-1} para APRIL [Fawzy et al., 2011; Salazar-Camarena et al., 2016]. Además, las concentraciones obtenidas para BAFF también estaban de acuerdo con los valores de corte establecidos por Vasconcellos y cols., de 1.43 ng mL^{-1} [Vasconcellos et al., 2017].

Para valorar la precisión de los resultados proporcionados por la bioplataforma electroquímica dual desarrollada en formato integrado para la determinación de las dos citoquinas diana tanto en los extractos celulares como en las muestras de suero, se concluyó por comparación estadística con los resultados que proporcionaban las metodologías ELISA que empleaban los

mismos inmunorreactivos que la bioplataforma descrita. En todos los casos se obtuvieron valores de t_{exp} inferiores a $t_{tab,4,0.05} = 2.776$.

Además, el estudio de correlación (***figura 3.97***) entre los resultados que proporcionaban ambas metodologías proporcionó valores de la ordenada que contenían el 0 y de pendiente próximos a la unidad.



c)

Parámetro analítico	*BAFF*	*APRIL*
R^2	0.994	0.995
Pendiente	0.99 ± 0.01	1.01 ± 0.01
Ordenada en el origen, ng mL^{-1}	–0.01 ± 0.02	–0.09 ± 0.07

Figura 3.97. *Gráfica de correlación resultante de la comparación de los niveles séricos de* ***a)*** *BAFF y* ***b)*** *APRIL, proporcionados por la bioplataforma electroquímica dual en formato integrado y por las metodologías individuales ELISA convencionales.* ***c)*** *Parámetros analíticos del ajuste lineal.*

Con el objetivo de profundizar en la capacidad de discriminación entre individuos sanos y pacientes con SLE o CRC, así como entre ambos tipos de pacientes, mediante la determinación amperométrica de BAFF y APRIL con la inmunoplataforma electroquímica dual desarrollada, se han analizado los resultados obtenidos mediante curvas ROC (***figura 3.98***) y establecido, además, los valores de corte para diferenciar de manera fiable los tres grupos de sujetos estudiados.

La comparación entre individuos sanos y pacientes proporcionó valores de área bajo la curva (AUC) del 100%. Al comparar los individuos sanos con pacientes diagnosticados con SLE se obtuvieron valores de especificidad y sensibilidad del 100%, estableciendo valores de corte séricos de 0.885 ng mL^{-1} para BAFF y 4.3 ng mL^{-1} para APRIL. Por otro lado, los valores de corte que permitían discriminar entre individuos sanos y pacientes diagnosticados con CRC a una sensibilidad y especificidad del 100% fueron de 1.735 y 3.5 ng mL^{-1}, respectivamente.

En cambio, la comparación entre los resultados para pacientes diagnosticados con SLE y CRC mostró una sensibilidad y especificidad del 100% para BAFF, estableciéndose un valor de corte de 2.45 ng mL^{-1}, pero no para APRIL.

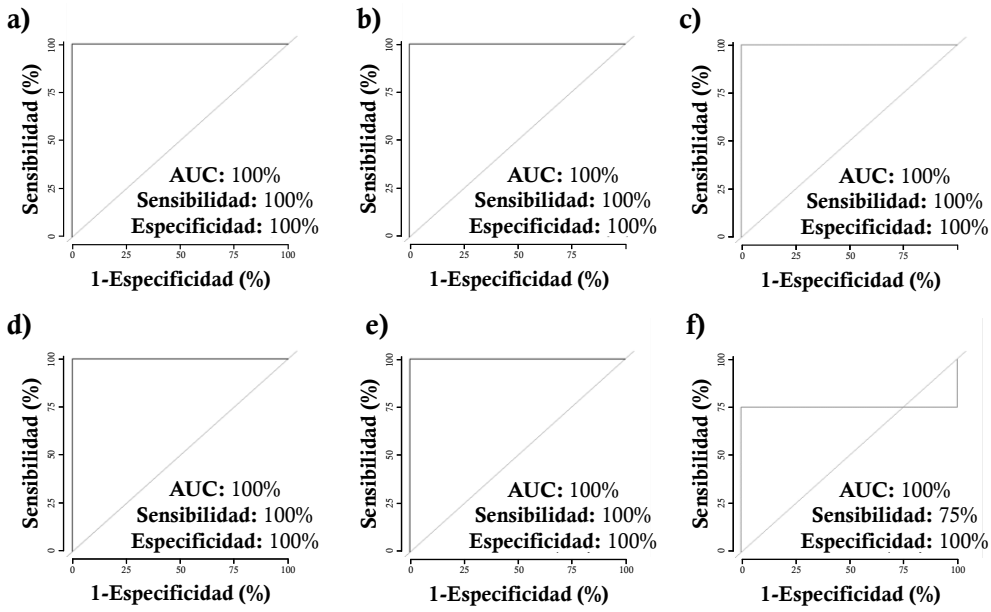


Figura 3.98. *Curvas ROC construidas para evaluar la capacidad de diagnóstico de los valores séricos de* ***a, b, c)*** *BAFF y* ***d, e, f)*** *APRIL proporcionados por la bioplataforma electroquímica dual en formato integrado para discriminar entre individuos sanos y pacientes diagnosticados con* ***a, d)*** *SLE o* ***b, e)*** *CRC o* ***c, f)*** *entre los pacientes SLE y CRC.*

3.4.2. BIOPLATAFORMA ELECTROQUÍMICA ASISTIDA POR MBS

En esta sección se describe y compara una bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs para la determinación simultánea de BAFF y APRIL con la descrita en formato integrado también desarrollada en el marco de esta Tesis Doctoral. Los resultados de esta investigación se publicaron en el trabajo [Arévalo et al., 2022c]: *Simultaneous electrochemical immunosensing of relevant cytokines to diagnose and track cancer and autoimmune diseases*, Bioelectrochemistry 146 (2022) 108157, anexado en el apartado de Publicaciones – *Published papers*.

Bioplataforma electroquímica dual para la determinación de BAFF y APRIL

A pesar de las buenas características analíticas proporcionadas por la inmunoplataforma dual en formato integrado descrita en la sección 3.4.1, con el fin de desarrollar una configuración que implique un protocolo más sencillo, que requiera menor tiempo de ensayo y sea compatible con la práctica clínica para análisis de rutina llevados a cabo por cualquier personal no especializado, en esta investigación, y aprovechando las ventajas proporcionadas por el uso de microsoportes magnéticos, también se desarrolló una bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs y empleando SP_2CEs.

El protocolo esquematizado para la formación de los bioconjugados magnéticos y la posterior transducción amperométrica sobre SP_2CEs se muestra en la ***figura 3.99***. Como se observa, el formato de ensayo empleado en su preparación era de tipo sándwich donde los anticuerpos de captura, biotinilado para BAFF ($b\text{-}cAb_{BAFF}$) y no biotinilado para APRIL (cAb_{APRIL}) se inmovilizaban sobre NA-MBs o HOOC-MBs previa activación con EDC/NHSS, respectivamente. Fue la disponibilidad comercial de los anticuerpos la que condicionó el empleo de diferentes soportes magnéticos y de distintas estrategias para el ensamblaje y marcaje enzimático de los inmunocomplejos tipo sándwich. Así, el diferente origen animal de los anticuerpos empleados para la determinación de BAFF: $b\text{-}cAb_{BAFF}$ de cabra y dAb_{BAFF} de ratón, permitió emplear un anticuerpo secundario anti-rIgG conjugado con HRP (HRP-anti-rIgG) para marcar enzimáticamente el anticuerpo de detección, mientras que el mismo origen animal de los empleados para APRIL nos condicionó al empleo del biotinilado como elemento detector y de Estrep-HRP para su marcaje enzimático.

Así, tras la preparación de las $b\text{-}cAb_{BAFF}$-NA-MBs y cAb_{APRIL}-HOOC-MBs, y el bloqueo de los grupos activos residuales de las segundas, se capturan selectivamente las citoquinas diana y se marcan enzimáticamente como se ha indicado.

Los bioconjugados resultantes se atraparon magnéticamente sobre su correspondiente WE del SP_2CE una vez colocado sobre una carcasa de PMMA de fabricación casera con dos imanes de Nd embebidos. El conjunto MBs modificadas/SP_2CE/carcasa se conectó al potenciostato, se sumergió en la célula de medida y se aplicó un potencial constante de –0.2 V *vs.* electrodo de

pseudoreferencia de Ag para medir las variaciones de corriente catódicas que resultaban para cada diana empleando el sistema HRP/H_2O_2/HQ.

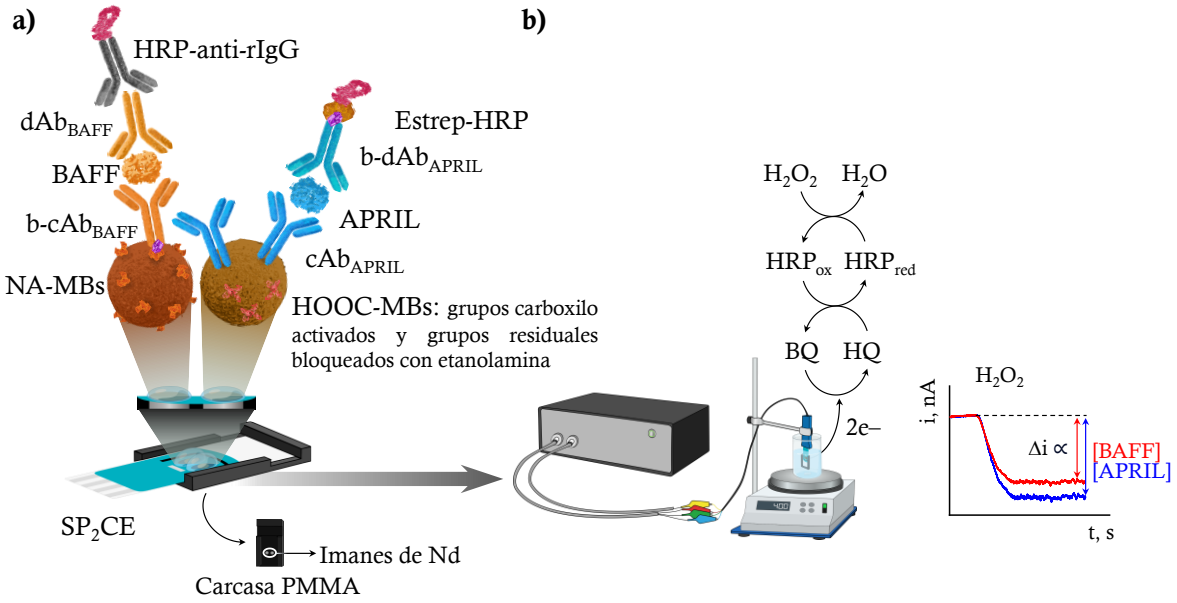


Figura 3.99. a) *Esquema de los inmunoensayos tipos sándwich que implica la bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs desarrollada para la determinación simultánea de BAFF y APRIL.* ***b)*** *Transducción amperométrica en disolución bajo agitación constante.*

Optimización de las variables experimentales

Una vez establecidos los formatos de inmunoensayo, se optimizaron las variables experimentales más determinantes implicadas en la preparación de HRP-anti-rIgG-dAb$_{BAFF}$-BAFF-b-cAb$_{BAFF}$-NA-MBs y Estrep-HRP-b-dAb$_{APRIL}$-APRIL-cAb$_{APRIL}$-HOOC-MBs para conseguir el mejor rendimiento analítico. Teniendo en cuenta el formato tipo sándwich empleado, el criterio seguido para seleccionar los valores óptimos de cada variable estudiada dentro del rango evaluado fue el mismo utilizado a lo largo de la Tesis Doctoral, es decir, la mayor relación S/B.

Para ello, se midieron y compararon las respuestas amperométricas ofrecidas por las bioplataformas individuales asistidas por MBs (SPCEs) para la determinación de 0 (blanco, B) y 250 pg mL^{-1} o 5 ng mL^{-1} (señal, S) de estándar de BAFF o APRIL, respectivamente. En las ***figuras 3.100–3.102*** se muestran las gráficas de los resultados obtenidos para cada variable experimental estudiada, que se resumen en la **tabla 3.44** junto con el rango evaluado y el valor seleccionado.

En primer lugar, se evaluó el tipo de soporte micromagnético para la formación de los inmunocomplejos tipo sándwich para la determinación de BAFF: NA-MBs empleando b-cAb$_{BAFF}$ como anticuerpo de captura y dAb$_{BAFF}$ como anticuerpo de detección, según el esquema de la ***figura 3.99***, o HOOC-MBs usando dAb$_{BAFF}$ y b-cAb$_{BAFF}$ como anticuerpos de captura y detección, respectivamente. Como se muestra en la ***figura 3.100***, la mayor relación S/B se obtuvo al utilizar las NA-MBs por atribución de que la inmovilización covalente del dAb$_{BAFF}$ sobre las HOOC-MBs

activadas afecta al reconocimiento de la diana. Además, es importante resaltar que el protocolo para la formación de los inmunoconjugados b-cAb$_{BAFF}$-NA-MBs es más corto (45 *vs.* 90 minutos) y sencillo (1 *vs.* 2 etapas) que el de los dAb$_{BAFF}$-HOOC-MBs. Por todo ello, se decidió continuar trabajando con las b-cAb$_{BAFF}$-NA-MBs.

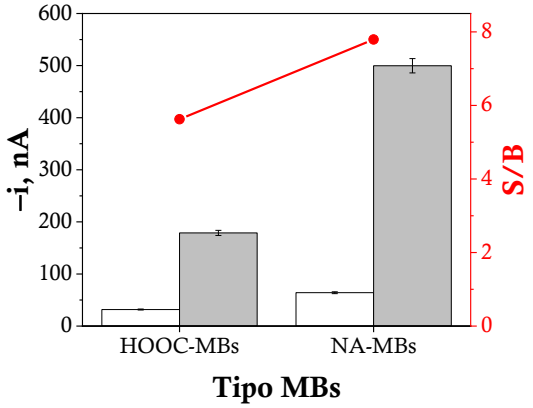


Figura 3.100. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma individual asistida para la determinación de BAFF en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 250 pg mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de dicha citoquina, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con el tipo de MBs empleado.*

A continuación, se optimizaron las concentraciones (***figuras 3.101.a*** y ***3.102.a***) y tiempos de incubación (***figuras 3.101.b*** y ***3.102.b***) de los anticuerpos de captura b-cAb$_{BAFF}$ y cAb$_{APRIL}$. Una carga limitante de anticuerpo de captura resultaba en respuestas amperométricas bajas, las mejores relaciones S/B se obtenían para determinados valores de concentración y tiempo de incubación y para valores superiores a estos, la excesiva carga de anticuerpo inmovilizada se traducía en un peor reconocimiento por impedimento estérico y en valores inferiores de la relación S/B. Las relaciones S/B prácticamente iguales a la unidad, obtenidas en ausencia de b-cAb$_{BAFF}$ y cAb$_{APRIL}$ confirmaron que la determinación de ambas citoquinas se realizaba a través de la formación de inmunocomplejos tipo sándwich y que no se producían adsorciones inespecíficas ni de las citoquinas dianas ni de los trazadores enzimáticos.

Respecto al número de etapas de incubación, se compararon los resultados obtenidos incubando las b-cAb$_{BAFF}$-NA-MBs o cAb$_{APRIL}$-HOOC-MBs con disoluciones independientes de citoquina diana, anticuerpo de detección y trazador enzimático en tres etapas separadas (3); en dos etapas sucesivas incubando primero con una disolución de la citoquina y el anticuerpo de detección y después con la disolución del trazador enzimático (2A) o primero con la disolución de estándar de citoquina y después con una disolución mezcla del anticuerpo de detección y el trazador enzimático (2B); una única etapa de incubación con una disolución mezcla de la diana, anticuerpo de detección y trazador enzimático (1). Los resultados (***figura 3.101.c*** y ***3.102.c***) demostraron que, en el caso de la determinación de BAFF, la mayor discriminación entre las

señales específicas e inespecíficas ocurría cuando se empleaban tres disoluciones independientes, lo cual está relacionado seguramente con el aglutinamiento de los inmunorreactivos al encontrarse juntos en una misma disolución, impidiendo el reconocimiento de la citoquina por dAb_{BAFF} una vez marcado con HRP-anti-rIgG. En cambio, para APRIL, el protocolo que resultó óptimo fue el que implicaba una única etapa de incubación en una disolución mezcla de la diana, anticuerpo de detección y trazador enzimático, debido a la mejora de la eficiencia del reconocimiento y marcaje enzimático en disolución homogénea. Esto suponía la simplificación y la reducción del tiempo del inmunoensayo.

En relación con la determinación de BAFF (***figura 3.101***), se optimizó el tiempo de incubación de la disolución que contenía la citoquina diana, resultando la mejor relación S/B en 45 minutos (***figura 3.101.d***). Seguidamente, se optimizó la concentración (***figura 3.101.e***) y tiempo de incubación (***figura 3.101.f***) de dAb_{BAFF}. Las relaciones S/B resultantes demostraron que a medida que aumentaba la carga de dAb_{BAFF} se producía un incremento en las respuestas específicas hasta alcanzar los valores óptimos de 1 μg mL^{-1} y 30 minutos, a partir de los cuales las señales inespecíficas se veían afectadas por mayores adsorciones no específicas. Finalmente, se optimizó la concentración (***figura 3.101.g***) y tiempo de incubación (***figura 3.101.h***) de HRP-anti-rIgG. Los resultados obtenidos mostraron que, una vez alcanzado los valores óptimos, continuaban aumentando tanto las señales específicas como las inespecíficas, resultando en una disminución de la relación S/B.

Para la determinación de APRIL, que de acuerdo con nuestros resultados debía realizarse en una única etapa, se optimizó la concentración de b-dAb_{APRIL} (***figura 3.102.d***) y dilución de Estrep-HRP (***figura 3.102.e***). Respecto a la concentración de b-dAb_{APRIL}, los resultados mostraron que a concentraciones mayores de 0.5 μg mL^{-1} se producía una disminución de las señales específicas debido, probablemente, al impedimento estérico. De acuerdo con los resultados de la optimización del marcaje enzimático lo más adecuado era trabajar con diluciones intermedias porque a mayores diluciones el trazador resultaba limitante, mientras que a menores diluciones cobraban importancia las adsorciones inespecíficas. Por último, se optimizó el tiempo de incubación de la etapa (***figura 3.102.f***), seleccionándose 30 minutos.

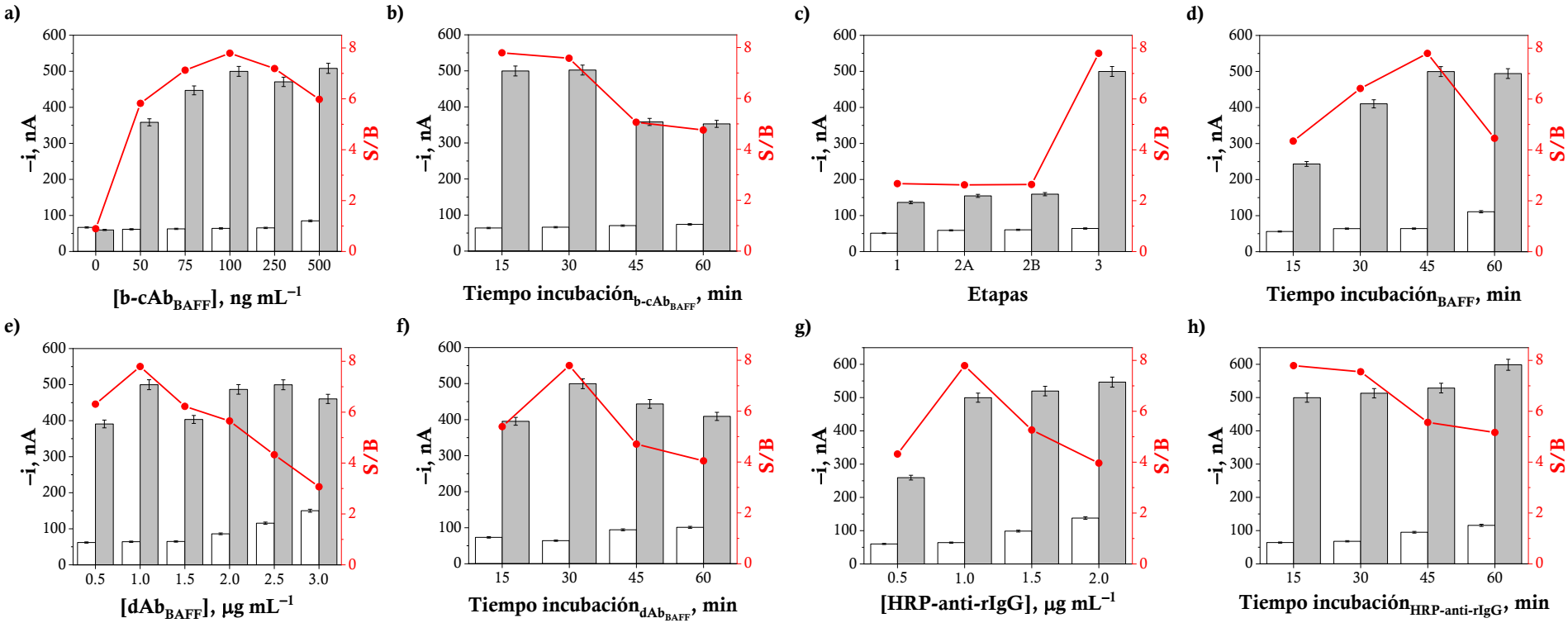


Figura 3.101. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma individual asistida por MBs para la determinación de BAFF, en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 250 pg mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de la citoquina, y las relaciones S/B obtenidas (puntos y líneas rojos) con* ***a)*** *concentración y* ***b)*** *tiempo de incubación de b-cAb$_{BAFF}$,* ***c)*** *etapas empleadas,* ***d)*** *tiempo de incubación de BAFF,* ***e)*** *concentración y* ***f)*** *tiempo de incubación de dAb$_{BAFF}$ y* ***g)*** *concentración y* ***h)*** *tiempo de incubación de HRP-anti-rIgG.*

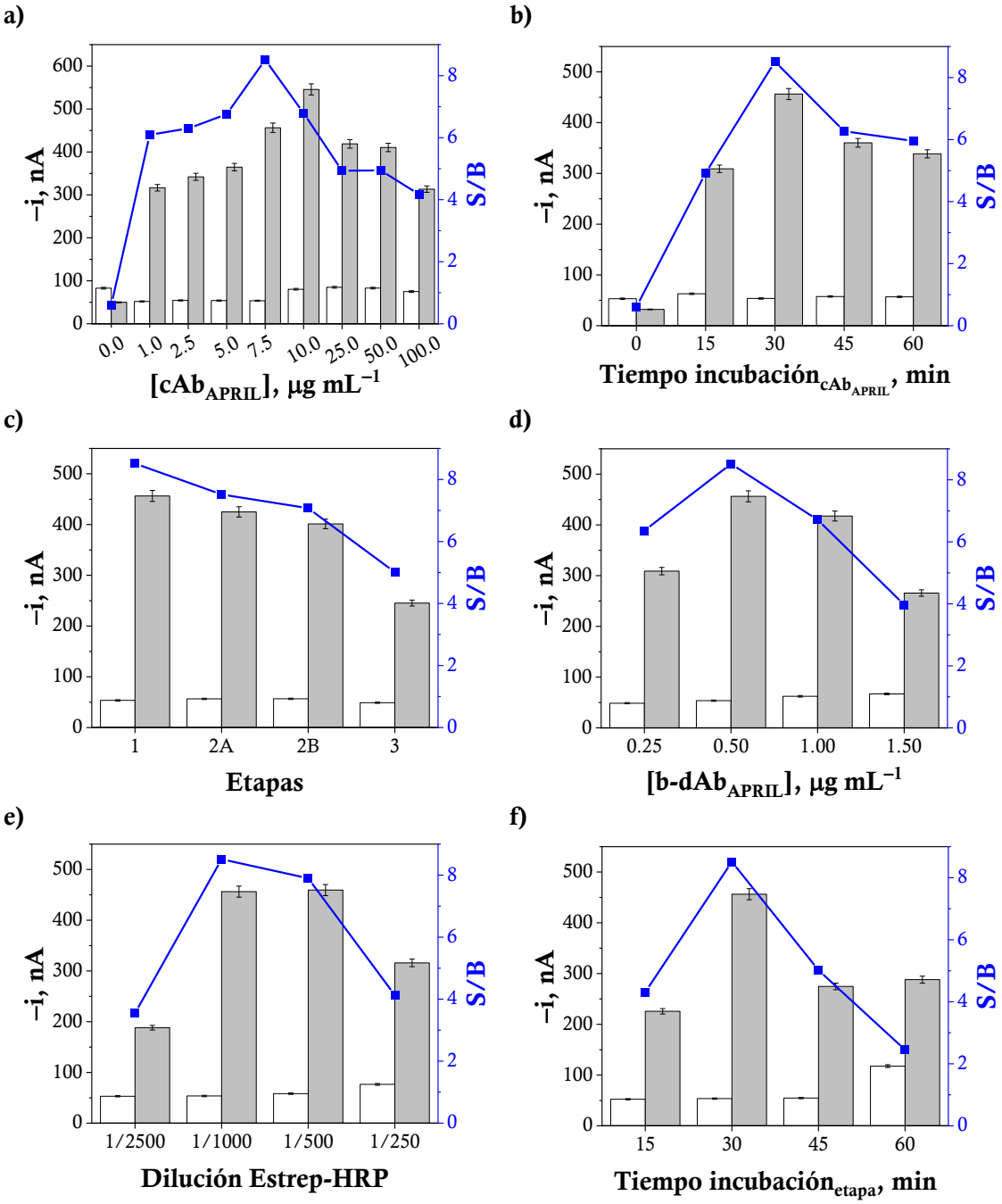


Figura 3.102. *Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma individual asistida por MBs para la determinación de APRIL, en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 5 ng mL^{-1} (S, barras grises) de estándar de la citoquina, y las relaciones S/B obtenidas (cuadrados y líneas azules) con* ***a)*** *concentración y* ***b)*** *tiempo de incubación de cAb$_{APRIL}$,* ***c)*** *etapas empleadas,* ***d)*** *concentración de b-dAb$_{APRIL}$,* ***e)*** *dilución de Estrep-HRP y* ***f)*** *tiempo de incubación de una etapa.*

Tabla 3.44. Variables experimentales evaluadas, rango estudiado y valor seleccionado, para la optimización de la preparación y funcionamiento de las bioplataformas asistidas por el empleo de MBs para la determinación individual de BAFF y APRIL.

Citoquina	*Variable experimental*	*Rango evaluado*	*Valor seleccionado*
BAFF	Tipo de MBs	HOOC; NA	NA
	Concentración b-cAb$_{BAFF}$, ng mL^{-1}	0.0–500.0	100.0
	Tiempo incubación b-cAb$_{BAFF}$, min	0–60	15
	Nº etapas realización inmunoensayo	1–3	3
	Tiempo incubación BAFF, min	15–60	45
	Concentración dAb$_{BAFF}$, µg mL^{-1}	0.0–3.0	1.0
	Tiempo incubación dAb$_{BAFF}$, min	15–60	15
	Concentración HRP-anti-rIgG, µg mL^{-1}	0.5–2.0	1.0
	Tiempo incubación HRP-anti-rIgG, min	15–60	15
APRIL	Concentración cAb$_{APRIL}$, µg mL^{-1}	0.0–100.0	7.5
	Tiempo incubación cAb$_{APRIL}$, min	0–60	30
	Nº etapas realización inmunoensayo	1–3	1
	Concentración b-dAb$_{APRIL}$, µg mL^{-1}	0.25–1.50	0.50
	Dilución Estrep-HRP	1/2500–1/250	1/1000
	Tiempo incubación etapa, min	15–60	30

Es importante puntualizar aquí que los distintos protocolos optimizados para la determinación de BAFF y APRIL no supusieron un inconveniente para su determinación simultánea puesto que cada inmunoconjugado se preparaba de manera independiente.

Evaluación de la reactividad cruzada en la detección

Una vez optimizadas las condiciones experimentales para la determinación amperométrica de ambas citoquinas y con el fin de evaluar la posibilidad de transferir las metodologías individuales a una dual, se compararon las respuestas amperométricas registradas en ausencia y presencia de 25 pg mL^{-1} y 1 ng mL^{-1} de estándares de BAFF y APRIL, respectivamente, empleando SPCEs o SP$_2$CEs.

Como se muestra en la ***figura 3.103.a***, las respuestas proporcionadas por los bioconjugados medidos en los SP$_2$CEs fueron un 55–70% menores que las obtenidas sobre SPCEs. De igual manera que en otros formatos multiplexados, este hecho se atribuye a la menor área superficial de los WEs del SP$_2$CE frente al WE del SPCE (6.3 *vs.* 12.6 mm^2) y/o a una menor difusión cuando se deposita la misma cantidad de bioconjugados magnéticos sobre una superficie más pequeña. Sin

embargo, no se observaron diferencias significativas entre las relaciones S/B resultantes sobre ambos sustratos electródicos.

Por otro lado, la viabilidad de la metodología dual se estudió comparando las respuestas amperométricas medidas en cada superficie electródica del SP_2CE para los bioconjugados magnéticos de cada citoquina preparados con disoluciones mezcla que contenían diferentes concentraciones de cada estándar (***figura 3.103.b***).

Los resultados demostraron que no existía reactividad cruzada significativa entre los electrodos de trabajo WE_1 y WE_2 al medir las señales ofrecidas por los bioconjugados en presencia de la citoquina no diana.

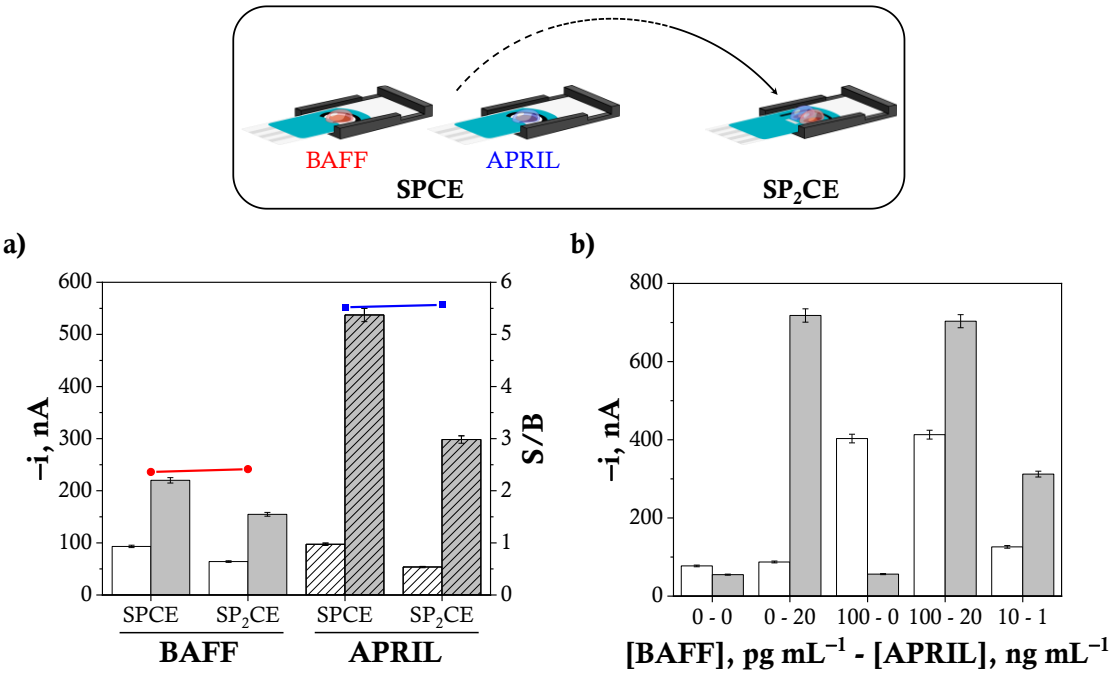


Figura 3.103. a) *Evaluación de la posibilidad de transferencia de la metodología individual a la determinación simultánea dual comparando las respuestas amperométricas medidas en ausencia (barras blancas) y presencia (barras grises) de 25 pg mL^{-1} o 1 ng mL^{-1} de estándares de BAFF (barras lisas) o APRIL (barras rayadas), respectivamente, y las relaciones S/B (puntos y línea rojos, BAFF; cuadrados y línea azules, APRIL).* ***b)*** *Medidas amperométricas obtenidas con la bioplataforma dual para combinaciones de disoluciones estándar conteniendo las concentraciones indicadas de BAFF (barras blancas) y APRIL (barras grises).*

Los resultados obtenidos en ambos estudios confirmaron tanto la viabilidad de multiplexado como la elevada selectividad de los inmunorreactivos involucrados en la formación de los bioconjugados, permitiendo la determinación simultánea de BAFF y APRIL empleando la bioplataforma electroquímica dual desarrollada.

Calibrados y características analíticas

Confirmada la viabilidad de la determinación dual, y en las condiciones previamente optimizadas, se construyeron los calibrados para disoluciones de concentraciones crecientes de estándares de BAFF y APRIL (***figura 3.104***).

En el caso de la determinación de BAFF, se obtuvo una dependencia lineal entre la concentración y la corriente catódica hasta los 100 pg mL^{-1}. Las respuestas amperométricas inferiores a las esperadas registradas para concentraciones mayores se atribuyeron al efecto Hook. En cambio, la dependencia lineal observada en la determinación de APRIL seguía un ajuste semilogarítmico. Esta diferencia en los tipos de dependencia (lineal y semilogarítmica) se atribuyó al empleo de diferentes inmunorreactivos y estrategias de marcaje enzimático para la determinación de cada biomarcador diana. De esta manera, mientras que en la detección de BAFF múltiples anticuerpos secundarios (HRP-anti-rIgG) pueden unirse a un único anticuerpo de detección (dAb_{BAFF}) [MacPhee, 2010; Owen et al., 2010], la multivalencia cuádruple de la estreptavidina puede provocar que múltiples anticuerpos de detección biotinilados (b-dAb_{APRIL}) estén unidos a una única molécula de Estrep-HRP [González-Álvarez et al., 2013; Miranda-Castro et al., 2018].

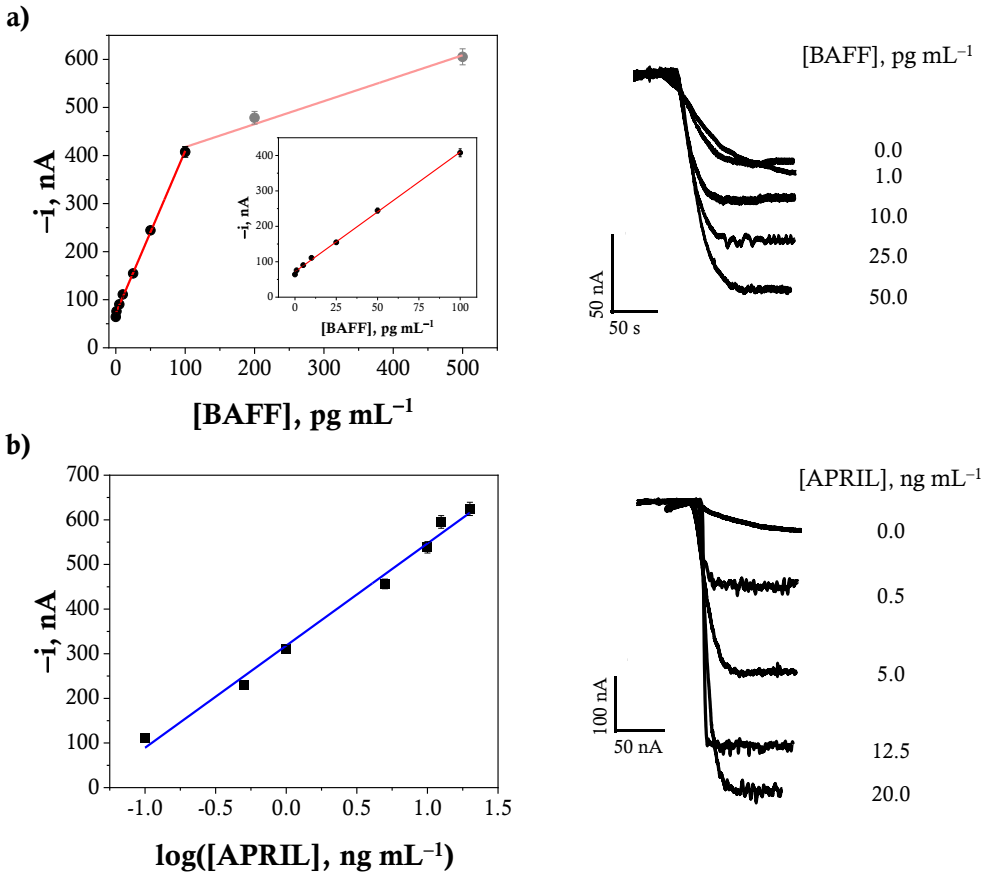


Figura 3.104. *Curva de calibrado ajustada y registros amperométricos reales obtenidos con la bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs para la determinación de* ***a)*** *BAFF y* ***b)*** *APRIL.*

El estudio estadístico para el cálculo de los parámetros analíticos siguiendo el ajuste por mínimos cuadrados proporcionó los valores resumidos en la **tabla 3.45**.

Seguidamente, se evaluó la sensibilidad y reproducibilidad de la bioplataforma desarrollada a través de la determinación estadística de los límites de detección y cuantificación y los valores de RSD.

Para ello, en primer lugar, se midieron las respuestas amperométricas proporcionadas por 5 bioplataformas electroquímicas preparadas en ausencia de estándar. La reproducibilidad se estimó comparando las respuestas amperométricas obtenidas por 5 bioplataformas preparadas en presencia de 50 pg mL^{-1} o 1 ng mL^{-1} de estándar de BAFF y APRIL, respectivamente, el mismo día (intra-) o distintos días (interensayo).

Tabla 3.45. Características analíticas ofrecidas por la bioplataforma electroquímica dual desarrollada asistida por MBs para la determinación amperométrica de BAFF y APRIL.

Parámetro analítico	***BAFF***	***APRIL***
Intervalo lineal	1.1–100 pg mL^{-1}	0.05–20 ng mL^{-1}
R^2	0.999	0.995
Pendiente	3.38 ± 0.05 mL nA pg^{-1}	229 ± 10 nA por década de concentración
Ordenada en el origen, nA	72 ± 2	318 ± 9
LOD (n = 5)	0.33	0.016
LOQ (n = 5)	1.1	0.05
RSD* (n = 5), %	2.75[a]; 2.96[b]	2.38[a]; 2.60[b]

**50 pg mL^{-1} y 5 ng mL^{-1} de estándar de BAFF y APRIL, respectivamente.*

[a]*Bioplataformas duales preparadas el mismo día.*

[b]*Bioplataformas duales preparadas distintos días.*

Los valores de LOD obtenidos con esta bioplataforma asistida por MBs eran inferiores a los de la desarrollada anteriormente en formato integrado: 0.33 *vs.* 80 y 16 *vs.* 60 pg mL^{-1} para BAFF y APRIL, respectivamente. A pesar de que las dos bioplataformas puestas a punto en esta Tesis Doctoral para la determinación de las dos citoquinas diana requieren los mismos tiempos de ensayo, una de las ventajas que presenta la asistida por MBs es que, para alcanzar una sensibilidad mayor, no requiere de la modificación ni preparación de nanomateriales, lo que facilita su implementación y empleo para determinaciones rutinarias.

Por otro lado, la bioplataforma para la determinación de BAFF mejora los límites de detección proporcionados por los kits ELISA comerciales (**tabla 3.39**), hecho que no ocurre para APRIL. Sin embargo, con esta inmunoplataforma es posible la determinación simultánea de ambas

citoquinas en una única determinación y en tiempos de ensayo más de dos veces inferiores al que requieren los kits comerciales.

Los valores de RSD de la bioplataforma dual inferiores al 3.0% confirmaron la buena reproducibilidad tanto de los protocolos para la preparación de los bioconjugados como para la transducción amperométrica. Es importante destacar en este punto que los kits comerciales que emplean los mismos inmunorreactivos ofrecen valores de RSD de 3.4 y 3.8% para el mismo día y 11.6 y 8.5% en distintos días para BAFF y APRIL, respectivamente, lo que demuestra la mejor reproducibilidad ofrecida por esta bioplataforma desarrollada, particularmente para determinaciones realizadas en días distintos.

Todas estas ventajas pusieron de manifiesto el atractivo de la bioplataforma electroquímica dual desarrollada para su aplicación en el ámbito clínico, con sensibilidad suficiente para determinar BAFF y APRIL en muestras de elevada complejidad, teniendo en cuenta que los límites de corte establecidos para ambos biomarcadores en muestras de suero de individuos sanos son de 0.8 y 4 ng mL^{-1} para BAFF y APRIL, respectivamente, y en cortos tiempos de ensayo [Treamtrakanpon et al., 2012; Kryštůfková et al., 2018].

Estabilidad de almacenamiento

La posibilidad de emplear MBs modificadas y almacenadas para la posterior captura de la citoquina diana se estudió conservando b-cAb_{BAFF}-NA-MBs y cAb_{APRIL}-HOOC-MBs, tras la etapa de bloqueo con etanolamina, resuspendidas en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado y a 4 ºC.

Cada día control se midieron las respuestas amperométricas proporcionadas por cada inmunoplataforma, empleando los bioconjugados almacenados, en ausencia y presencia de 250 pg mL^{-1} o 1 ng mL^{-1} de estándar de BAFF y APRIL, respectivamente.

Como se observa en la ***figura 3.105***, las MBs modificadas resultaron ser estables aproximadamente 30 días. Por lo tanto, durante un mes era posible utilizar los inmunoconjugados almacenados sin pérdida de sensibilidad de la bioplataforma.

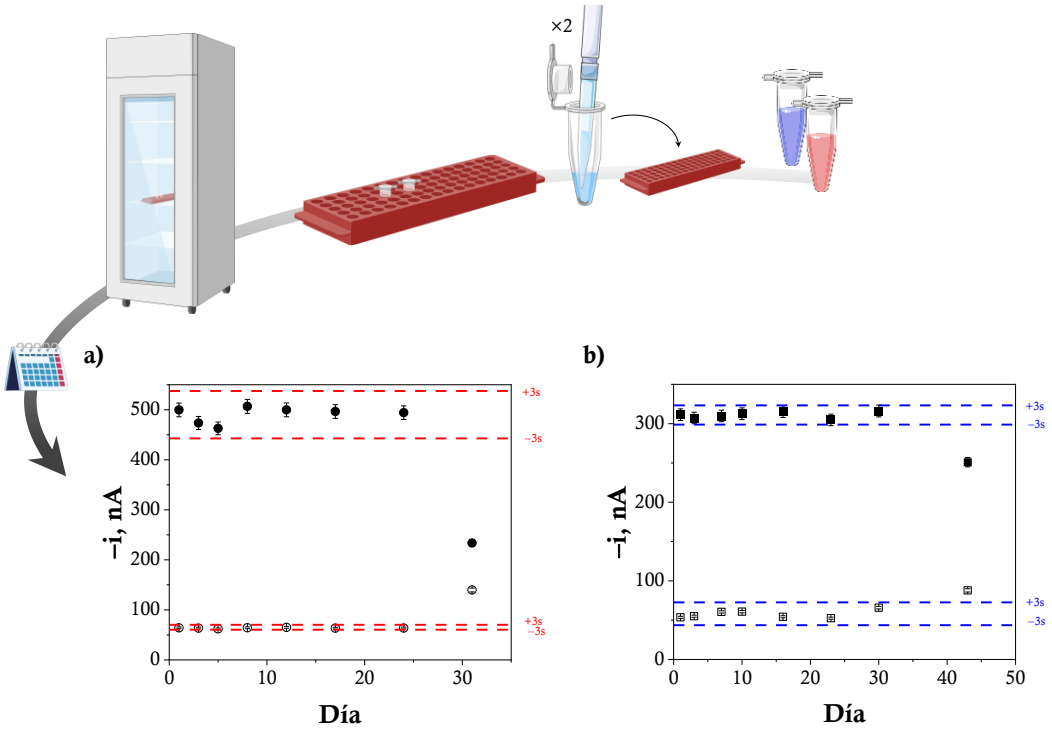


Figura 3.105. *Gráfica de control obtenida en el estudio de estabilidad de almacenamiento de b-cAb$_{BAFF}$-NA-MBs y cAb$_{APRIL}$-HOOC-MBs almacenadas en PBS 10 mM de pH 7.4 filtrado a 4 ºC. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en* ***a)*** *ausencia (puntos blancos) y presencia (puntos negros) de 250 pg mL^{-1} de estándar de BAFF o* ***b)*** *ausencia (cuadrados blancos) y presencia (cuadrados negros) de 1 ng mL^{-1} de estándar de APRIL. Los límites de control (líneas discontinuas rojas o azules, respectivamente) se establecieron como ± 3s del valor promedio obtenido de tres medidas resultantes del día de preparación de las b-cAb$_{BAFF}$-NA-MBs y cAb$_{APRIL}$-HOOC-MBs.*

Estudio de selectividad

La selectividad de los inmunorreactivos empleados para la formación de los bioconjugados descritos se evaluó estudiando el efecto de la presencia de potenciales interferentes presentes en muestras clínicas.

Para ello, se compararon las respuestas amperométricas proporcionadas por la inmunoplataforma dual para 0 y 250 pg mL^{-1} de estándar de BAFF y 0 y 1 ng mL^{-1} de estándar de APRIL en ausencia (control) y presencia de diferentes proteínas no diana consideradas como interferentes, a las concentraciones esperables en muestras de suero de individuos sanos.

De acuerdo con los resultados obtenidos (***figura 3.106***) solo hIgG y HSA supusieron una interferencia significativa en la determinación de BAFF. Como se ha visto anteriormente en otros trabajos [Arévalo et al., 2020; Muñoz-San Martín et al., 2022], estas interferencias pueden atribuirse, por un lado, a adsorciones inespecíficas de las moléculas de hIgG sobre la superficie del sustrato magnético y a las impurezas de anticuerpos anti-animales circulantes reactivos presentes en la hIgG y, por otro lado, a la presencia de hIgG en HSA no purificada completamente. Esta

última hipótesis está de acuerdo con la ausencia de interferencia en presencia de BSA. No obstante, cuando las muestras se diluían al menos 10 veces, las interferencias producidas por ambas proteínas se minimizaban y no representaban un problema en la determinación de BAFF.

Los resultados del análisis del efecto producido por los demás posibles interferentes confirmaron la buena selectividad de los anticuerpos empleados.

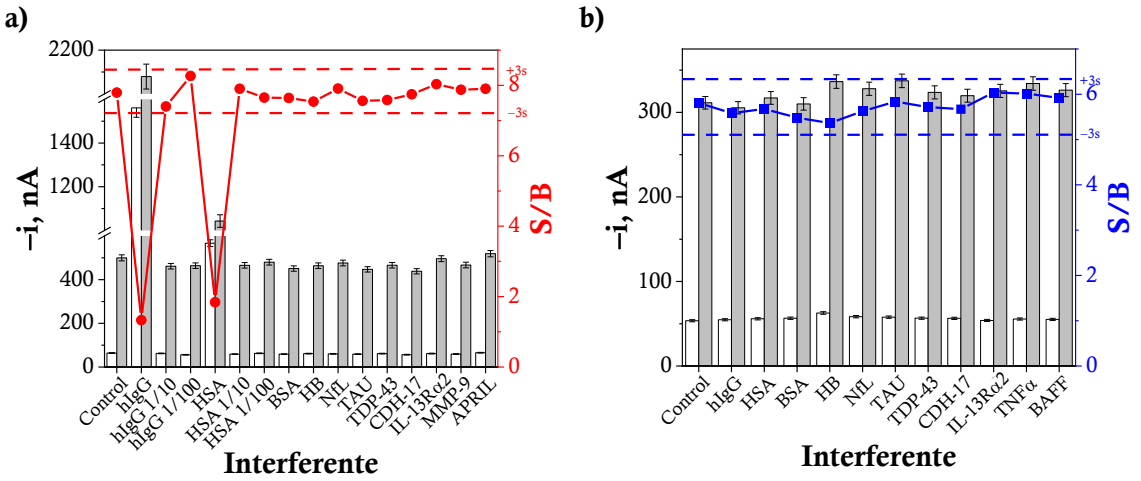


Figura 3.106. *Respuestas amperométricas obtenidas con la bioplataforma dual asistida por MBs desarrollada para disoluciones estándar de* ***a)*** *0 (B, barras blancas) y 250 (S, barras grises) pg mL^{-1} de BAFF o* ***b)*** *0 (B, barras blancas) y 1 ng mL^{-1} (S, barras grises) de APRIL, preparadas en ausencia (control) y presencia de 1 mg mL^{-1} hIgG; 0.1 mg mL^{-1} hIgG (1/10); 0.01 mg mL^{-1} hIgG (1/100); 50 mg mL^{-1} HSA; 5 mg mL^{-1} HSA (1/10); 0.5 mg mL^{-1} HSA (1/100); 5 mg mL^{-1} BSA; 5 mg mL^{-1} HB; 30 pg mL^{-1} NfL; 5 pg mL^{-1} TAU; 1 ng mL^{-1} TDP-43; 500 ng mL^{-1} CDH-17; 10 ng mL^{-1} IL-13Rα2; 30 ng mL^{-1} MMP-9; 100 pg mL^{-1} TNFα; 4 ng mL^{-1} APRIL; 1 ng mL^{-1} BAFF, y sus correspondientes relaciones S/B (puntos/cuadrados y líneas rojos o azules, respectivamente).*

Aplicación al análisis de muestras de suero y extractos celulares

La inmunoplataforma dual desarrollada se destinó a la determinación del contenido endógeno de BAFF y APRIL en muestras de suero de individuos sanos y pacientes con SLE y CRC, así como en extractos de células de CRC con diferente agresividad.

En primer lugar, se evaluó la posible existencia de efecto matriz para comprobar si se podía determinar el contenido endógeno por simple interpolación de las medidas registradas para cada muestra diluida (analizada por triplicado) en los calibrados preparados con disoluciones estándar de cada citoquina diana (***figura 3.104***). La comparación estadística de las pendientes obtenidas para estos calibrados y los preparados con concentraciones crecientes de estándar sobre la muestra de suero de un individuo sano diluida 100 veces o sobre 0.5 µg de extracto celular, resumida en la **tabla 3.46**, confirmaron que en estas condiciones no existía efecto matriz, obteniéndose en todos los casos valores de t_{exp} resultantes inferiores al $t_{tab,\,4,\,0.05} = 2.776$.

Tabla 3.46. Análisis estadístico de las pendientes obtenidas con la bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs para la determinación de estándares de BAFF y APRIL preparados en BB, en una muestra de suero de un individuo sano diluida 100 veces o en 0.5 µg de extracto celular.

Calibrado	***BAFF***		***APRIL***	
	Pendiente [a]	t_{exp}	***Pendiente*** [b]	t_{exp}
Disolución reguladora	3.38 ± 0.05	-	229 ± 10	-
Suero de individuo sano diluido 100 veces	3.1 ± 0.2	2.312	226 ± 11	0.178
0.5 µg de extracto celular	3.2 ± 0.2	1.107	242 ± 38	0.587

[a] *mL nA pg*$^{-1}$

[b] *nA por década de concentración (ng mL*$^{-1}$*)*

Trabajos previos han investigado el papel que estas citoquinas diana ejercen sobre enfermedades prevalentes como el cáncer. Estos estudios han revelado que el sistema BAFF-APRIL forma una cascada de señales capaz de regular la diferenciación, supervivencia, proliferación y migración celular, siendo un sistema crítico que puede favorecer el crecimiento de células cancerígenas [Ullah & Mackay, 2023]. Las investigaciones relativas a la sobreexpresión de estas dos citoquinas pertenecientes a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) han confirmado que la manifestación excesiva de BAFF y APRIL se asocia con la progresión tumoral, considerándolas potenciales biomarcadores de la metástasis y tumorigénesis del CRC [Lascano et al., 2012; Yaacoub et al., 2016; Warakomska et al., 2021].

De este modo y conforme con las investigaciones previas, los resultados del análisis de los distintos extractos celulares con la inmunoplataforma dual desarrollada resumidos en la **tabla 3.47**, manifestaron que tanto BAFF como APRIL estaban sobreexpresadas en muestras que presentaban más potencial metastásico: KM12SM, KM12L4a y SW620.

Los niveles derivados de la determinación del contenido endógeno de BAFF y APRIL con la inmunoplataforma electroquímica dual se validaron con tecnologías ELISA para la determinación individual de cada citoquina que empleaban los mismos inmunorreactivos. El resultado de la comparación estadística a través del estudio *t-Student* confirmó la precisión de la metodología desarrollada para la determinación de ambas citoquinas diana, siendo todos los niveles estadísticamente comparables con valores de t_{exp} inferiores a la $t_{tab,4,0.05}$ = 2.776.

Tabla 3.47. Niveles de BAFF y APRIL determinados con la bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs y las tecnologías ELISA para su determinación individual en muestras de extractos celulares.

Muestra	***[BAFF], ng mL^{-1}***		**t_{exp}**	***[APRIL], ng mL^{-1}***		**t_{exp}**
	Bioplataforma	*ELISA*		*Bioplataforma*	*ELISA*	
KM12C	1.8 ± 0.1 (2.6)	1.9 ± 0.3 (5.4)	0.214	1.8 ± 0.1 (2.5)	1.7 ± 0.3 (6.1)	0.930
KM12SM	5.0 ± 0.3 (2.1)	5.3 ± 0.6 (4.8)	0.397	7.0 ± 0.6 (3.2)	8 ± 1 (7.5)	0.794
KM12L4a	3.4 ± 0.3 (3.1)	3.1 ± 0.3 (4.5)	0.328	4.3 ± 0.3 (2.6)	4.2 ± 0.5 (4.6)	0.130
SW480	0.88 ± 0.07 (3.2)	1.1 ± 0.2 (8.0)	0.250	0.86 ± 0.05 (2.4)	0.8 ± 0.1 (5.1)	0.107
SW620	2.8 ± 0.2 (2.4)	2.8 ± 0.4 (6.1)	0.056	3.0 ± 0.3 (3.6)	3.4 ± 0.5 (6.2)	0.378

**Los valores de RSD (%) se indican entre paréntesis.*

Teniendo en cuenta que en investigaciones previas llevadas a cabo en la última década se ha observado que ambas citoquinas, y en especial BAFF, presentan una función crucial en la autoinmunidad [Vincent et al., 2012], y que sus niveles séricos aumentan en pacientes que sufren algún trastorno autoinmune [Vincent et al., 2013], se ha considerado interesante evaluar en esta Tesis Doctoral el potencial de BAFF y APRIL en SLE como modelo de enfermedad autoinmune, tratando también de establecer una relación con el CRC.

Para ello la inmunoplataforma electroquímica desarrollada se enfrentó al análisis por triplicado de muestras de suero de 8 individuos sanos, 4 pacientes con SLE y 4 con CRC obteniéndose los niveles resumidos en la **tabla 3.48** y representados en la ***figura 3.107***.

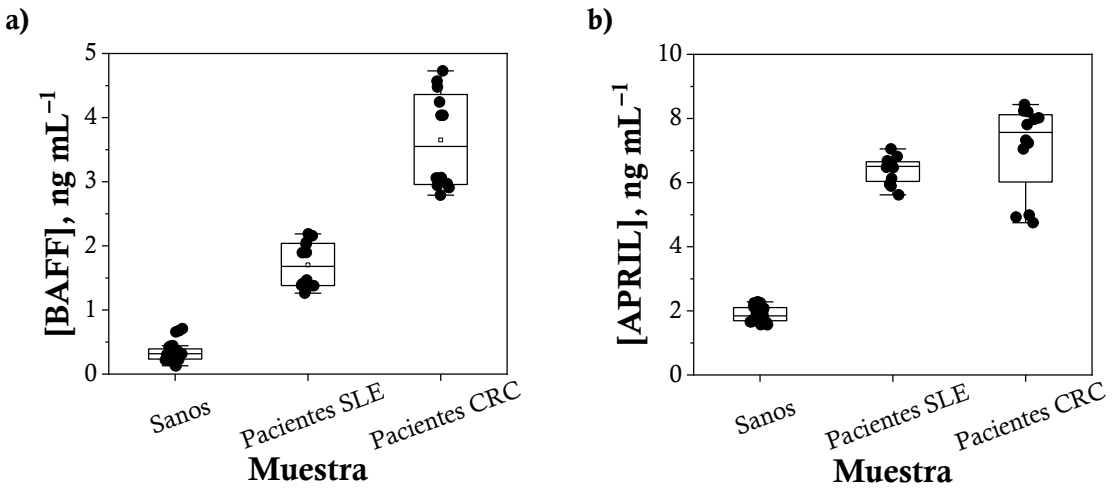
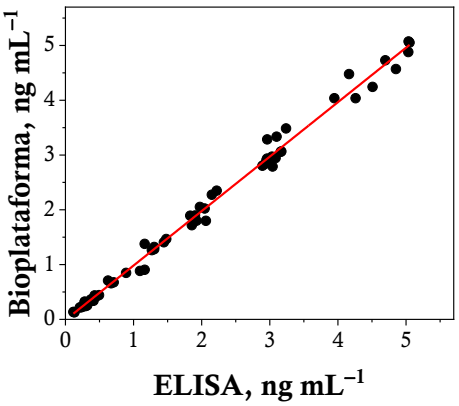


Figura 3.107. a) *Niveles séricos de BAFF y* ***b)*** *APRIL proporcionados por la bioplataforma dual asistida por MBs en muestras de suero de individuos sanos y pacientes diagnosticados con SLE y CRC.*

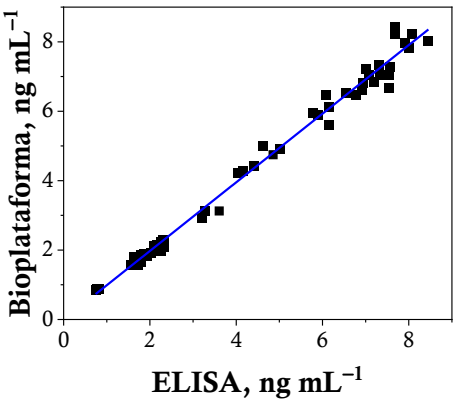
Los resultados confirmaron que los niveles séricos obtenidos para los dos tipos de pacientes estudiados eran notablemente superiores a los de los individuos sanos, estando de acuerdo los niveles de BAFF con los valores de corte séricos establecidos en pacientes con SLE [Fawzy et al., 2011; Salazar-Camarena et al., 2016]. Además, tal y como se muestra en la ***figura 3.107.a***, es posible discriminar claramente entre pacientes con SLE y con CRC al ser significativamente mayores los niveles de BAFF en estos últimos.

Con el fin de confirmar la exactitud de los resultados obtenidos con la bioplataforma electroquímica dual, los niveles séricos se compararon en la **tabla 3.48** con los resultantes para estas muestras utilizando las metodologías ELISA para la determinación individual de cada citoquina que emplean los mismos inmunorreactivos que la bioplataforma dual. Por un lado, los valores de t_{exp} calculados para la comparación estadística de los niveles proporcionados por las dos técnicas fueron todos inferiores al valor de $t_{tab,4,0.05} = 2.776$. Por otro lado, el ajuste lineal de las rectas de correlación obtenidas enfrentado los resultados de ambas metodologías (***figura 3.108***) proporcionó valores de pendiente y de ordenada en el origen que incluían el 1 y el 0, respectivamente.

a)



b)



c)

Parámetro analítico	***BAFF***	***APRIL***
R^2	0.993	0.990
Pendiente	0.99 ± 0.01	0.99 ± 0.01
Ordenada en el origen, ng mL^{-1}	–0.01 ± 0.02	–0.00 ± 0.06

Figura 3.108. *Gráfica de correlación resultante de la comparación de los niveles séricos de* ***a)*** *BAFF y* ***b)*** *APRIL proporcionados por la bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs y por las metodologías ELISA para su determinación individual.* ***c)*** *Parámetros analíticos del ajuste lineal.*

Tabla 3.48. Niveles séricos de BAFF y APRIL determinados con la bioplataforma electroquímica dual y la metodología ELISA en muestras de individuos sanos y pacientes diagnosticados con SLE y CRC.

Sujeto	*Muestra*	*[BAFF], ng mL^{-1}*		t_{exp}	*[APRIL], ng mL^{-1}*		t_{exp}
		Bioplataforma	*ELISA*		*Bioplataforma*	*ELISA*	
Sanos	1	0.43 ± 0.03 (2.5)	0.49 ± 0.09 (7.1)	0.074	2.2 ± 0.2 (3.1)	2.2 ± 0.2 (3.5)	0.063
	2	0.31 ± 0.02 (3.3)	0.29 ± 0.05 (6.9)	0.025	1.7 ± 0.1 (2.8)	1.7 ± 0.2 (4.5)	0.052
	3	0.31 ± 0.03 (3.9)	0.34 ± 0.04 (5.2)	0.026	2.2 ± 0.2 (2.9)	2.2 ± 0.3 (5.3)	0.052
	4	0.22 ± 0.01 (2.0)	0.23 ± 0.04 (7.7)	0.010	1.7 ± 0.1 (2.8)	1.6 ± 0.3 (7.3)	0.123
	5	0.36 ± 0.05 (3.1)	0.39 ± 0.05 (5.0)	0.050	2.0 ± 0.2 (3.1)	2.2 ± 0.3 (5.3)	0.267
	6	0.13 ± 0.01 (2.9)	0.12 ± 0.02 (7.0)	0.008	1.8 ± 0.1 (2.9)	1.8 ±0.3 (6.4)	0.006
	7	0.25 ± 0.02 (3.0)	0.30 ± 0.06 (7.9)	0.056	1.9 ± 0.1 (3.0)	1.9 ± 0.3 (6.1)	0.054
	8	0.68 ± 0.06 (3.7)	0.7 ± 0.1 (6.2)	0.016	1.6 ± 0.1 (3.1)	1.6 ± 0.3 (7.4)	0.112
Pacientes SLE	9	1.9 ± 0.2 (3.8)	1.9 ± 0.3 (5.6)	0.013	6.8 ± 0.6 (3.4)	7.2 ± 0.8 (4.4)	0.482
	10	1.3 ± 0.1 (4.4)	1.2 ± 0.2 (5.9)	0.092	5.8 ± 0.4 (3.0)	6 ± 1 (6.6)	0.056
	11	2.1 ± 0.2 (3.3)	2.1 ± 0.3 (6.0)	0.136	6.6 ± 0.4 (2.8)	6 ± 1 (6.8)	0.236
	12	1.4 ± 0.1 (3.0)	1.4 ± 0.2 (6.6)	0.031	6.4 ± 0.5 (3.5)	6.3 ± 0.6 (3.9)	0.148
Pacientes CRC	13	2.9 ± 0.3 (4.6)	3.6 ± 0.6 (6.4)	0.865	7.2 ± 0.3 (1.9)	7.3 ± 0.7 (3.7)	0.095
	14	4.1 ± 0.3 (2.9)	4.2 ± 0.7 (6.6)	0.165	8.0 ± 0.5 (2.6)	8.2 ± 0.6 (3.0)	0.186
	15	3.0 ± 0.2 (2.6)	3.1 ± 0.5 (6.0)	0.205	4.9 ± 0.3 (2.5)	4.8 ± 0.5 (4.0)	0.072
	16	4.6 ± 0.3 (2.8)	4.9 ± 0.6 (4.8)	0.383	8.2 ± 0.6 (2.8)	7.9 ± 0.7 (3.4)	0.322

**Los valores de RSD (%) se indican entre paréntesis.*

Una vez realizado un escrutinio preliminar en base a los resultados gráficos, la verdadera capacidad de la inmunoplataforma desarrollada en este trabajo para discriminar entre los tres diferentes grupos de sujetos estudiados, así como entre la agresividad de las células CRC analizadas se demostró a través de las curvas ROC, cuya representación gráfica se muestra en la ***figura 3.109*** y los parámetros derivados del ajuste se resumen en la **tabla 3.49**.

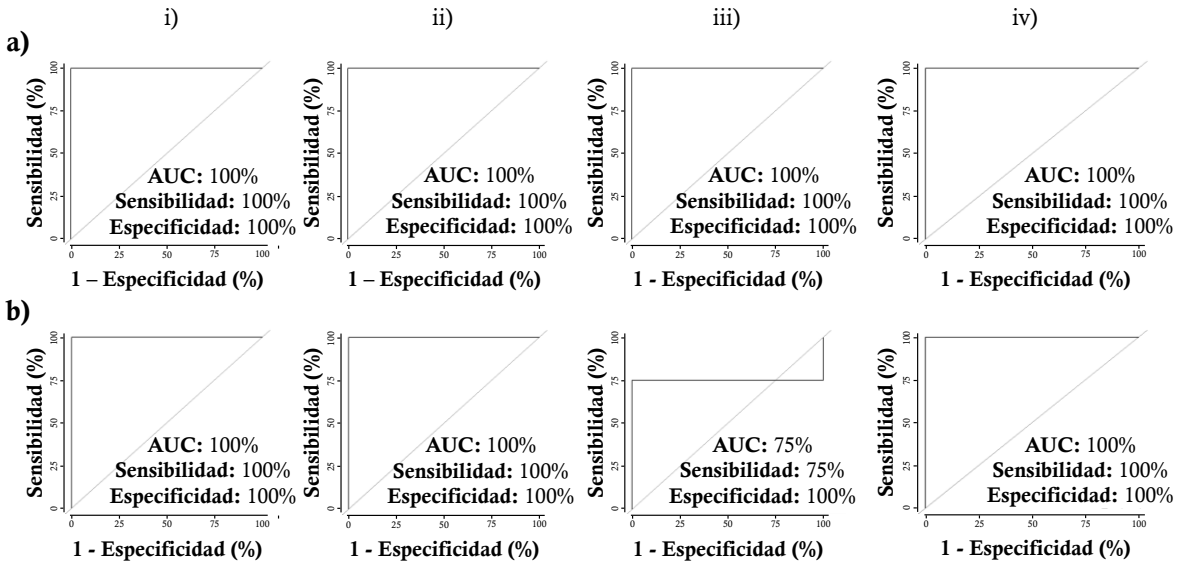


Figura 3.109. *Curvas ROC construidas para evaluar la capacidad de diagnóstico de los valores séricos de* ***a)*** *BAFF y* ***b)*** *APRIL proporcionados por la bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs para discriminar entre individuos sanos y pacientes diagnosticados con i) SLE, ii) CRC; iii) entre pacientes con SLE y CRC; y iv) entre células de CRC metastásicas y no metastásicas.*

Las curvas ROC demostraron que la inmunoplataforma electroquímica desarrollada asistida por MBs era capaz de discriminar, con sensibilidades y especificidades máximas, entre individuos sanos y pacientes con SLE o CRC y entre las células de CRC metastásicas y no metastásicas estudiadas para ambas citoquinas. Además, la discriminación entre pacientes diagnosticados con SLE y CRC era posible empleando la inmunoplataforma asistida por MBs tanto a través de la determinación de BAFF como de APRIL. Es importante recordar en este punto que la discriminación entre estos dos grupos de pacientes con la bioplataforma dual desarrollada en formato integrado [Arévalo et al., 2022b] solo era posible a través de la determinación de BAFF pero no de APRIL y que había concordancia entre los valores de corte establecidos para las discriminaciones posibles con ambas bioplataformas [Arévalo et al., 2022b].

Tabla 3.49. Potencial de los niveles de BAFF (1) y APRIL (2) determinados con la bioplataforma dual asistida por el empleo de MBs para discriminar entre individuos sanos y pacientes diagnosticados con SLE y CRC, y células no metastásicas y metastásicas y valores de corte establecidos.

Parámetros	***Suero***									***Lisados celulares***	
	Sanos vs. Pacientes SLE			***Sano vs. Pacientes CRC***			***Pacientes SLE vs. Pacientes CRC***			***Células no metastásicas vs. metastásicas***	
	1	*2*	*Total**	*1*	*2*	*Total**	*1*	*2*	*Total**	*1*	*2*
AUC	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sensibilidad	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Especificidad	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Valor de corte, ng mL^{-1}	0.99	4.00	--	1.79	3.55	--	2.50	7.00	--	2.30	2.40

**Combinación de los dos biomarcadores.*

Para constatar estos resultados, se compararon los niveles resultantes de la determinación de BAFF y APRIL con la inmunoplataforma asistida por MBs desarrollada en este trabajo y con la desarrollada en formato integrado descrita previamente [Arévalo et al., 2022b]. Esta comparación esquematizada en la ***figura 3.110*** demostró, por un lado, que no había diferencias significativas entre los niveles proporcionados por cada bioplataforma, y, por otro lado, que la peor correlación (R^2 = 0.95) se producía cuando se comparaban los dos grupos de pacientes.

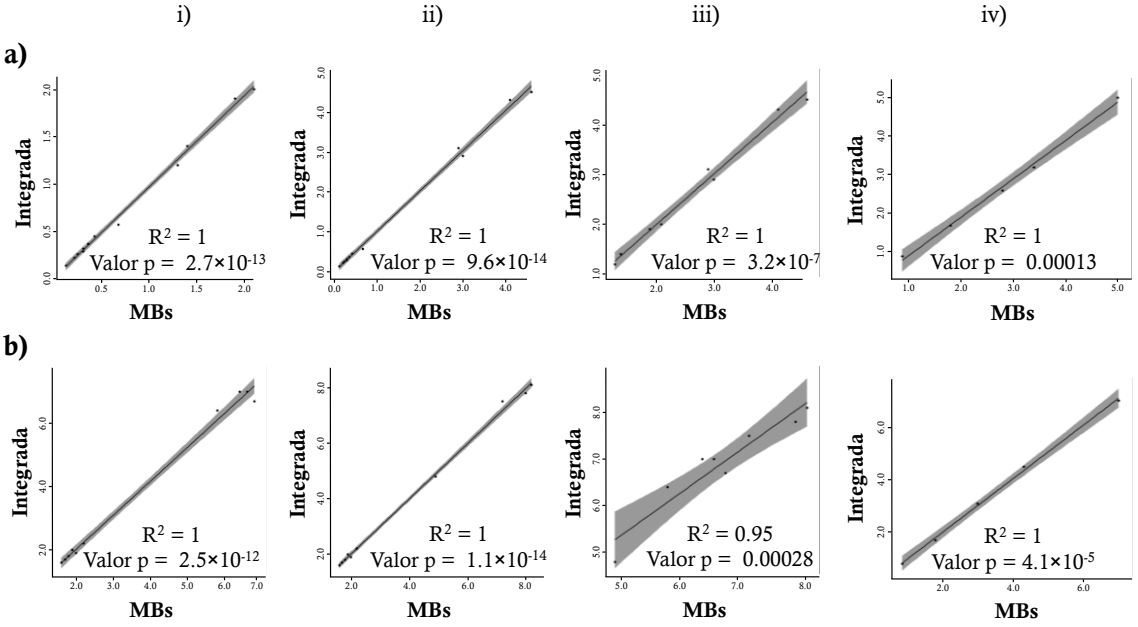


Figura 3.110. *Correlación entre los resultados cuantitativos empleando la correlación de Pearson (R) proporcionados por la inmunoplataforma electroquímica dual asistida por MBs y en formato integrado para la discriminación de BAFF y APRIL entre individuos sanos y pacientes diagnosticados con i) SLE, ii) CRC; iii) entre pacientes con SLE y CRC; y iv) entre células de CRC metastásicas y no metastásicas.*

Para concluir es importante enfatizar que gracias la bioplataforma electroquímica dual asistida por MBs desarrollada en esta Tesis Doctoral para la determinación simultánea de BAFF y APRIL, se han propuesto valores de corte en suero y en extractos celulares para ambas citoquinas, siendo posible la discriminación entre células de CRC metastásicas y no metastásicas, entre individuos sanos y pacientes con SLE o CRC y, lo que todavía es más desafiante, entre pacientes con SLE y con CRC.

CAPÍTULO 4.

CONCLUSIONES – CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

Los resultados derivados de las investigaciones realizadas en esta Tesis Doctoral, previamente descritos y discutidos, permiten concluir que las bioplataformas electroquímicas constituyen magníficas herramientas analíticas capaces de determinar, de forma simple y en tiempos cortos de ensayo, múltiples biomarcadores clínicamente relevantes en enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer. Además, gracias a su viabilidad de multiplexado, fácil miniaturización y portabilidad, coste reducido y pequeñas cantidades de muestra requeridas, se ofrecen compatibles para su implementación en dispositivos en el punto de atención apoyando a las tecnologías convencionales y/o de última generación en el diagnóstico temprano, pronóstico y seguimiento de enfermedades prevalentes.

Si bien el potencial de los biosensores, y en particular, de los biosensores electroquímicos, está ampliamente reconocido, la clave para acercarse y ser partícipe del hito que persigue mejorar la calidad de vida de la sociedad a través de bioherramientas rápidas, sencillas, de bajo coste y disponibles globalmente, se fundamenta en varios pilares:

En primer lugar, una minuciosa selección de los biomarcadores a determinar que estén decisivamente implicados tanto en la aparición como en la progresión de la enfermedad de estudio y que preferiblemente se encuentren presentes en muestras mínimamente invasivas.

En segundo lugar, la elección adecuada de los elementos de biorreconocimiento y sus estrategias de inmovilización de forma directa o indirecta, así como del formato de bioensayo que asegure la captura eficiente del biomarcador diana y su determinación sensible y selectiva sobre sustratos adecuados y empleando una técnica de transducción electroquímica fácilmente implementable en dispositivos en el punto de atención.

Por último, la decisión de trabajar con nanomateriales para mejorar las características analíticas y operacionales de las bioplataformas.

De acuerdo con esta hoja de ruta, en esta Tesis Doctoral se han desarrollado bioplataformas electroquímicas cuyas aportaciones científicas más destacables son, en primera instancia, su exclusividad, por tratarse de las primeras configuraciones descritas hasta la fecha para la determinación individual de CENPB-Abs y AQP4-Abs, dual de CENPB-Abs y CENPA-Abs, de las citoquinas BAFF y APRIL, cuádruple de los tres isotipos más comunes de inmunoglobulinas y de su contenido total frente a dsDNA (dsDNA-Abs) y de los cuatro ENAs-Abs específicos La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs y smRNP-Abs, además de la primera prueba de concepto para la determinación óctuple de estos cuatro y de los isotipos (contenidos individuales y total) de dsDNA-Abs. Asimismo, la aplicación real de estas nuevas bioherramientas al análisis de cohortes de pacientes seleccionadas ha confirmado la relevancia clínica de los biomarcadores evaluados y su implicación en distintas enfermedades prevalentes.

En segunda instancia, para el desarrollo de estas bioherramientas se han probado y comparado diferentes estrategias de inmovilización de los biorreceptores, destacando la aplicación de la química His-tag, aprovechando y demostrando las ventajas que ofrece en términos de sensibilidad, regeneración y simplicidad.

Además, se ha estudiado el comportamiento ofrecido por diferentes nanomateriales basados en MoS_2, sintetizados y modificados para transporte de biomoléculas de reconocimiento y señalización con fines de amplificación de señal.

Por otro lado, se ha puesto de manifiesto el potencial diagnóstico y discriminatorio tanto de biomarcadores individuales como de firmas específicas de biomarcadores determinados con las bioplataformas desarrolladas para el diagnóstico diferencial de enfermedades: 1) cuádruple de ENAs-Abs para discriminar entre SLE y SS o entre enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas; 2) cuádruple de los contenidos individuales y total de los tres isotipos más comunes de dsDNA-Abs para diferenciar SLE de AD; 3) dual de las citoquinas BAFF y APRIL para discriminar enfermedad autoinmune SLE y cáncer CRC o entre células atendiendo a sus capacidades metastásicas. Además, la bioplataforma electroquímica descrita para la determinación de MMP-9 demostró su potencial para diagnosticar cáncer de mama y, lo que es todavía más relevante y desafiante, asistir en la identificación del subtipo triple negativo, el de peor pronóstico.

De esta manera, se considera que los avances demostrados en esta Tesis Doctoral han resaltado la versatilidad, oportunidades y potencial de las bioplataformas electroquímicas desarrolladas, para asistir en los desafiantes retos que impone tanto la investigación como la implementación de la medicina de precisión en las enfermedades prevalentes de nuestros días. Su contribución a la discriminación de enfermedades de sintomatologías similares podría abrir un nuevo camino hacia su diagnóstico, pronóstico y seguimiento de precisión.

Concluida esta etapa nos atrevemos a decir que afortunadamente nuestra misión no acaba aquí, y que debemos seguir esforzándonos para que la biodetección electroquímica siga demostrando sus oportunidades únicas y capacidades inimaginables para poner en valor y aprovechar toda la información que es capaz de proporcionar a nivel molecular de forma simple, versátil, personalizada, sostenible y asequible.

CONCLUSIONS

The results derived from the research carried out in this PhD Thesis, previously described and discussed, allow us to conclude that electrochemical bioplatforms constitute a magnificent analytical tool capable of determining multiple clinically relevant biomarkers in autoimmune, neurodegenerative and cancer diseases in a simple way and in shorter analysis times. Furthermore, thanks to their multiplexing feasibility, easy miniaturization and portability, low-cost and few sample amounts required, they offer compatibility for implementation in point-of-care devices to support conventional and/or next-generation technologies in early diagnosis, prognosis and monitoring of prevalent diseases.

Although the potential of biosensors, and in particular electrochemical biosensors, is widely recognized, the key to approaching and participating in the milestone of improving society's quality of life through fast, simple, low-cost and globally available biotools rests on several pillars:

Firstly, a careful selection of the biomarkers that are decisively involved in both the appearance and progression of the disease under study and that ideally are present in minimally invasive samples, will be determined.

Secondly, the appropriate choice of biorecognition elements and their direct or indirect immobilization strategies, as well as the bioassay format that ensures efficient capture of the target biomarker and its sensitive and selective determination on suitable substrates and using an electrochemical transduction technique that can be easily implemented in point-of-care devices.

Finally, the decision to work with nanomaterials to improve the analytical and operational characteristics of bioplatforms.

Following this roadmap, in this Doctoral Thesis, electrochemical bioplatforms have been developed whose most outstanding scientific contributions are, in the first instance, their exclusivity, as they are the first configurations described to date for the individual determination of CENPB-Abs and AQP4-Abs; dual determination of CENPB-Abs and CENPA-Abs, the cytokines BAFF and APRIL; quadruple determination of the three most common immunoglobulin isotypes and their total content against dsDNA and the four specific ENAs-Abs La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1RNP70-Abs, smRNP-Abs; as well as the first proof of concept for the octuple determination of these four and of the isotypes (individual and total content) of dsDNA-Abs. Furthermore, the current application of these new biotools to the analysis of selected patient cohorts has confirmed the clinical relevance of the biomarkers evaluated and their implication in different prevalent diseases.

In the development of these biotools, different strategies for the immobilization of bioreceptors have been tested and compared, highlighting the application of His-tag chemistry, exploiting and demonstrating the advantages it offers in terms of sensitivity, regeneration and simplicity.

Furthermore, the behaviour offered by different MoS_2-based nanomaterials, synthesized and modified for the transport of recognition and signaling biomolecules for signal amplification purpose, has been studied.

The diagnostic and discriminatory potential of both individual biomarkers and specific signatures of biomarkers determined with the bioplatforms developed for the differential diagnosis of diseases has been revealed: 1) quadruple of ENAs-Abs to discriminate between SLE and SS or between autoimmune and neurodegenerative diseases; 2) quadruple of individual and total contents of the three most common isotypes of dsDNA-Abs to differentiate SLE from AD; 3) dual cytokines BAFF and APRIL to discriminate autoimmune disease SLE and CRC cancer or between cells based on their metastatic capacities. Moreover, the electrochemical bioplatform described for the determination of MMP-9 showed its potential to diagnose BC and, what is even more relevant and challenging, to assist in the identification of the TPBC subtype, the one with worst prognosis.

In this way, it is considered that the advances demonstrated in this Doctoral Thesis have highlighted the versatility, opportunities and potential of the electrochemical bioplatforms developed, to assist in the challenging challenges imposed by both the research and implementation of precision medicine prevalent diseases of our days. Its contribution to the discrimination of diseases with similar symptoms could open a new path towards their precise diagnosis, prognosis and monitoring.

Once this stage is over, we dare to say that fortunately our mission does not end here and that we must continue to strive so that electrochemical biodetection continues to demonstrate its unique opportunities and unimaginable capabilities to value and take advantage of all the information it is capable of providing at the molecular level in a simple, versatile, personalized, sustainable and affordable way.

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

[Abbas et al., 2009] Abbas, A. K., & Lichtman, A. H. (2009). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system: Vol. Chapter 13* (3.ª ed.). Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.

[Afsharan et al., 2016] Afsharan, H., Khalilzadeh, B., Tajalli, H., Mollabashi, M., Navaeipour, F., & Rashidi, M.-R. (2016). A sandwich type immunosensor for ultrasensitive electrochemical quantification of p53 protein based on gold nanoparticles/graphene oxide. *Electrochimica Acta*, *188*, 153-164. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.11.133

[Agmon-Levin et al., 2017] Agmon-Levin, N., Dagan, A., Peri, Y., Anaya, J.-M., Selmi, C., Tincani, A., Bizzaro, N., Stojanovich, L., Damoiseaux, J., Cohen Tervaert, J. W., Mosca, M., Cervera, R., & Shoenfeld, Y. (2017). The interaction between anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies and anti-infectious antibodies in a wide spectrum of auto-immune diseases: another angle of the autoimmune mosaic. *Clin Exp Rheumatol*, *35*(6), 929-935

[Akhtar et al., 2018] Akhtar, K., Khan, S. A., Khan, S. B., & Asiri, A. M. (2018). Scanning electron microscopy: Principle and applications in nanomaterials characterization. En Handbook of Materials Characterization. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_4

[Altmann, 2018] Altmann, D.M. (2018). Neuroimmunology and neuroinflammation in autoimmune, neurodegenerative and psychiatric disease. Immunology, 154: 167-168. https://doi.org/10.1111/imm.12943

[Alvarado-Ramírez et al., 2021] Alvarado-Ramírez, L., Rostro-Alanis, M., Rodríguez-Rodríguez, J., Sosa-Hernández, J. E., Melchor-Martínez, E. M., Iqbal, H. M. N., & Parra-Saldívar, R. (2021). Enzyme (Single and Multiple) and Nanozyme Biosensors: Recent Developments and Their Novel Applications in the Water-Food-Health Nexus. Biosensors, 11(11), 410. https://doi.org/10.3390/bios11110410

[Amine & Mohammadi, 2018] Amine, A., & Mohammadi, H. (2018). Amperometry. In Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14204-0

[Amor et al., 2010] Amor, S., Puentes, F., Baker, D., & Van Der Valk, P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. Immunology, 129(2), 154-169. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x

[Anand et al., 2008] Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. Pharmaceutical Research, 25(9), 2097-2116. https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9

[Andreescu et al., 2006] Andreescu, S., Bucur, B., & Marty, J.-L. (2006). Affinity Immobilization of Tagged Enzymes (pp. 97-106). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-053-9_9

[Arévalo et al., 2020] Arévalo, B., Serafín, V., Sánchez-Paniagua, M., Montero-Calle, A., Barderas, R., López-Ruíz, B., Campuzano, S., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2020). Fast and sensitive diagnosis of autoimmune disorders through amperometric biosensing of serum anti-dsDNA autoantibodies. Biosensors and Bioelectronics, 160, 112233. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112233

[Arévalo et al., 2021] Arévalo, B., ben Hassine, A., Valverde, A., Serafín, V., Montero-Calle, A., Raouafi, N., Camps, J., Arenas, M., Barderas, R., Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S., & Pingarrón, J. M. (2021). Electrochemical immunoplatform to assist in the diagnosis and classification of breast cancer through the determination of matrix-metalloproteinase-9. Talanta, 225. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122054

[Arévalo et al., 2022a] Arévalo, B., Blázquez, M., Serafín, V., Montero-Calle, A., Calero, M., Valverde, A., Barderas, R., Campuzano, S., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2022). Unraveling autoimmune and neurodegenerative diseases by amperometric serological detection of antibodies against aquaporin-4. Bioelectrochemistry, 144. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.108041

[Arévalo et al., 2022b] Arévalo, B., Blázquez-García, M., Valverde, A., Serafín, V., Montero-Calle, A., Solís-Fernández, G., Barderas, R., Campuzano, S., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2022). Binary MoS2 nanostructures as nanocarriers for amplification in multiplexed electrochemical immunosensing: simultaneous determination of B cell activation factor and proliferation-induced signal immunity-related cytokines. Microchimica Acta, 189(4). https://doi.org/10.1007/s00604-022-05250-4

[Arévalo et al., 2022c] Arévalo, B., Blázquez-García, M., Valverde, A., Serafín, V., Montero-Calle, A., Solís-Fernández, G., Barderas, R., Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S., & Pingarrón, J. M. (2022). Simultaneous electrochemical immunosensing of relevant cytokines to diagnose and track cancer and autoimmune diseases. Bioelectrochemistry, 146. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108157

[Arévalo et al., 2023a] Arévalo, B., Blázquez-García, M., Valverde, A., Serafín, V., Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S., & Pingarrón, J. M. (2023). First electrochemical bioplatforms to determine anti-centromere B antibodies: critical comparison between integrated and magnetic bead-assisted strategies using His-tag chemistry. Sensors & Diagnostics, 2(2), 256-261. https://doi.org/10.1039/d2sd00193d

[Arévalo et al., 2023b] Arévalo, B., Serafín, V., Garranzo-Asensio, M., Montero-Calle, A., Barderas, R., Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S., & Pingarrón, J. M. (2023). Anti-double stranded DNA antibodies: Electrochemical isotyping in autoimmune and neurological diseases. Analytica Chimica Acta, 1257, 341153. https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341153

[Arévalo et al., 2023c] Arévalo, B., Serafín, V., Garranzo-Asensio, M., Barderas, R., Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S., & Pingarrón, J. M. (2023). Early and differential autoimmune diseases diagnosis by interrogating specific autoantibody signatures with multiplexed electrochemical bioplatforms. Biosensors and Bioelectronics: X, 13. https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100325

[Aronson & Ferner, 2017] Aronson, J. K., & Ferner, R. E. (2017). Biomarkers—A General Review. Current Protocols in Pharmacology, 76(1). https://doi.org/10.1002/cpph.19

[Arshad et al., 2021] Arshad, F., Varghese, F., Paplikar, A., Gangadhar, Y., Ramakrishnan, S., Chaudhuri, J. R., Mahadevan, A., & Alladi, S. (2021). Role of Autoantibodies in Neurodegenerative Dementia: An Emerging Association. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders, 50(2), 153-160. https://doi.org/10.1159/000517238

[Arvanitakis et al., 2019] Arvanitakis, Z., Shah, R. C., & Bennett, D. A. (2019). Diagnosis and Management of Dementia: Review. JAMA, 322(16), 1589. https://doi.org/10.1001/jama.2019.4782

[Arvelo et al., 2015] Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2015). Biology of colorectal cancer. ecancermedicalscience, 9. https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.520

[Attar & Koshak, 2010] Attar, S. M., & Koshak, E. A. (2010). Medical conditions associated with a positive anti-double-stranded deoxyribonucleic acid. Saudi Med J (Vol. 31, Número 7) www.smj.org.sa.

[Aydin, M. et al., 2021] Aydin, M., Aydin, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2021). Advances in immunosensor technology (pp. 1-62). https://doi.org/10.1016/bs.acc.2020.08.001

[Aydin, S., 2015] Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides, 72. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012

B

[Bahadir & Sezgintürk, 2015] Bahadir, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2015). Electrochemical biosensors for hormone analyses. En Biosensors and Bioelectronics (Vol. 68). https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.054

[Bahadir & Sezgintürk, 2016] Bahadir, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2016). A review on impedimetric biosensors. En Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology (Vol. 44, Número 1). https://doi.org/10.3109/21691401.2014.942456

[Bai et al., 2017] Bai, Y., Liu, T., Ruan, W., & Chen, W. (2017). Mechanical behavior of metallic strip flexible pipe subjected to tension. Composite Structures, 170, 1-10. https://doi.org/10.1016/j.compstruct.2017.02.044

[Balkwill & Mantovani, 2001] Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? The Lancet, 357(9255), 539-545. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0

[Bard & Faulkner, 2001] Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). Electrochemical methods: fundamentals and applications/Allen J. Bard, Larry R. Faulkner — 2nd ed. En Nature Catalysis.

[Basu et al., 2019] Basu, A. K., Sah, A. N., Pradhan, A., & Bhattacharya, S. (2019). Poly-L-Lysine functionalised MWCNT-rGO nanosheets based 3-d hybrid structure for femtomolar level cholesterol detection using cantilever-based sensing platform. Scientific Reports, 9(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-40259-5

[Belluzo et al., 2008] Belluzo, M., Ribone, M., & Lagier, C. (2008). Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics. Sensors, 8(3), 1366–1399. https://doi.org/10.3390/s8031366

[Bergveld, 1970] Bergveld, P. (1970). Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, BME-17(1), 70-71. https://doi.org/10.1109/TBME.1970.4502688

[Bhalla et al., 2016] Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. Essays in Biochemistry, 60(1), 1-8. https://doi.org/10.1042/EBC20150001

[Bhardwaj, 2014] Bhardwaj, T. (2014). A Review on Immobilization Techniques of Biosensors. International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT), 3(5), 294-298.

[Bhardwaj, 2015] Bhardwaj, T. (2015). Review on biosensor technologies. International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology (IJARET), 6(2), 36-62.

[Bhatt et al., 2010] Bhatt, A. N., Mathur, R., Farooque, A., Verma, A., & Dwarakanath, B. S. (2010). Cancer biomarkers - current perspectives. The Indian journal of medical research, 132, 129-149.

[Biela et al., 2015] Biela, A., Watkinson, M., Meier, U. C., Baker, D., Giovannoni, G., Becer, C. R., & Krause, S. (2015). Disposable MMP-9 sensor based on the degradation of peptide cross-linked hydrogel films using electrochemical impedance spectroscopy. Biosensors and Bioelectronics, 68, 660-667. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.01.060

[Bilgi & Ayranci, 2016] Bilgi, M., & Ayranci, E. (2016). Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase. Sensors and Actuators B: Chemical, 237, 849-855. https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.06.164

[Bolon, 2010] Bolon, B. (2012). Cellular and Molecular Mechanisms of Autoimmune Disease. Toxicologic Pathology, 40(2), 216-229. https://doi.org/10.1177/0192623311428481

[Bonilla & Oettgen, 2010] Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125(2), S33-S40. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017

[Borisov & Wolfbeis, 2008] Borisov, S. M., & Wolfbeis, O. S. (2008). Optical Biosensors. Chemical Reviews, 108(2), 423-461. https://doi.org/10.1021/cr068105t

[Brena & Batista-Viera, 2006] Brena, B. M., & Batista-Viera, F. (2006). Immobilization of Enzymes (pp. 15-30). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-053-9_2

[Brodal, 2016] Brodal, P. (2016). The Central Nervous System (Oxford University Press, Ed.; 5.a ed.).

[Bumbrah & Sharma, 2016] Bumbrah, G. S., & Sharma, R. M. (2016). Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. En Egyptian Journal of Forensic Sciences (Vol. 6, Número 3). https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.001

[Bustamante Zuleta, 2007] Bustamante Zuleta, E. (2007). El sistema nervioso: Desde las neuronas hasta el cerebro humano (Universidad de Antioquia, Ed.; 1st ed.). Universidad de Antioquia

[Byakodi et al., 2022] Byakodi, M., Shrikrishna, N. S., Sharma, R., Bhansali, S., Mishra, Y., Kaushik, A., & Gandhi, S. (2022). Emerging 0D, 1D, 2D, and 3D nanostructures for efficient point-of-care biosensing. Biosensors and Bioelectronics: X, 12, 100284. https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100284

C

[Cabiedes & Núñez-Álvarez, 2010] Cabiedes, J., & Núñez-Álvarez, C. A. (2010). Antinuclear antibodies. Reumatología Clínica (English Edition), 6(4), 224-230. https://doi.org/10.1016/S2173-5743(10)70049-6

[Cagney et al., 2018] Cagney, D. N., Sul, J., Huang, R. Y., Ligon, K. L., Wen, P. Y., & Alexander, B. M. (2018). The FDA NIH Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST) resource in neuro-oncology. Neuro-Oncology, 20(9), 1162-1172. https://doi.org/10.1093/neuonc/nox242

[Califf, 2018] Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. Experimental Biology and Medicine, 243(3), 213-221. https://doi.org/10.1177/1535370217750088

[Calu et al., 2021] Calu, V., Ionescu, A., Stanca, L., Geicu, O. I., Iordache, F., Pisoschi, A. M., Serban, A. I., & Bilteanu, L. (2021). Key biomarkers within the colorectal cancer related inflammatory microenvironment. Scientific Reports, 11(1), 7940. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86941-5

[Camarero, 2008] Camarero, J. A. (2008). Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports. Peptide Science, 90(3), 450-458. https://doi.org/10.1002/bip.20803

[Carbaugh, 2003] Carbaugh, E. H. (2003) Minimum detectable dose as a measure of bioassay programme capability. Radiation Protection Dosimetry, 105(1-4), 391-394. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006266

[Cass et al., 1984] Cass, A. E. G., Davis, Graham., Francis, G. D., Hill, H. A. O., Aston, W. J., Higgins, I. John., Plotkin, E. V., Scott, L. D. L., & Turner, A. P. F. (1984). Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. Analytical Chemistry, 56(4), 667-671. https://doi.org/10.1021/ac00268a018

[Castellanos et al., 2003] Castellanos, M., Leira, R., Serena, J., Pumar, J. M., Lizasoain, I., Castillo, J., & Dávalos, A. (2003). Plasma Metalloproteinase-9 Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke. Stroke, 34(1), 40-46. https://doi.org/10.1161/01.STR.0000046764.57344.31

[Cathcart et al., 2015] Cathcart, J., Pulkoski-Gross, A., & Cao, J. (2015). Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. Genes & Diseases, 2(1), 26-34. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.12.002

[Central Biohub® GmbH] Ethical statement: https://centralbiohub.de/ethical-statement. Actualizado última vez a 19 de marzo de 2024.

[Cesewski & Johnson, 2020] Cesewski, E., & Johnson, B. N. (2020). Electrochemical biosensors for pathogen detection. Biosensors and Bioelectronics, 159, 112214. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112214

[Chaudhary et al., 2021] Chaudhary, V. S., Kumar, D., & Kumar, S. (2021). Gold-Immobilized Photonic Crystal Fiber-Based SPR Biosensor for Detection of Malaria Disease in Human Body. IEEE Sensors Journal, 21(16), 17800-17807. https://doi.org/10.1109/JSEN.2021.3085829

[Chen et al., 2014] Chen, Y., Li, R., Wu, A. M., Shu, Y. Q., Lu, Z. Q., & Hu, X. Q. (2014). The complement and immunoglobulin levels in NMO patients. Neurological Sciences, 35(2), 215-220. https://doi.org/10.1007/s10072-013-1481-y

[Chevion et al., 2000] Chevion, S., Roberts, M. A., & Chevion, M. (2000). The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. Free Radical Biology and Medicine, 28(6), 860–870. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00178-7

[Ciucci, 2019] Ciucci, F. (2019). Modeling electrochemical impedance spectroscopy. En Current Opinion in Electrochemistry (Vol. 13). https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.12.003

[Clark, 1956] Clark, L. C. (1956). Monitor and control of tissue oxygen tensions. Transactions of the American Society for Artificial Internal Organs, 2, 41-48.

[Clark & Lyons, 1962] Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Annals of the New York Academy of Sciences, 102(1), 29-45. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x

[Clemens et al., 1976] Clemens, A. H., Chang, P. H., & Myers, R. W. (1976). [Development of an automatic system of insulin infusion controlled by blood sugar, its system for the determination of glucose and control algorithms]. Journees annuelles de diabetologie de l'Hotel-Dieu, 269-278.

[Conzuelo et al., 2012] Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., G. Pinacho, D., Reviejo, A. J., Marco, M. P., & Pingarrón, J. M. (2012). Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk. Biosensors and Bioelectronics, 36(1). https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.03.044

[Conzuelo et al., 2013] Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Martínez-Ruiz, P., Esteban-Torres, M., De Las Rivas, B., Reviejo, A. J., Muñoz, R., & Pingarrón, J. M. (2013). Integrated amperometric affinity biosensors using Co2+- tetradentate nitrilotriacetic acid modified disposable carbon electrodes: Application to the determination of β-lactam antibiotics. Analytical Chemistry, 85(6), 3246-3254. https://doi.org/10.1021/ac303604b

[Cooper & Stroehla, 2003] Cooper, G. S., & Stroehla, B. C. (2003). The epidemiology of autoimmune diseases. Autoimmunity Reviews, 2(3), 119-125. https://doi.org/10.1016/S1568-9972(03)00006-5

[Cotter, 2009] Cotter, T. G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. Nature Reviews Cancer, 9(7), 501-507. https://doi.org/10.1038/nrc2663

[Coulet, 2019] Coulet, P. R. (2019). What is a Biosensor? En Biosensor Principles and Applications (pp. 1-6). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9780367810849-1

[Cristea et al., 2015] Cristea, C., Florea, A., Tertis, M., & Sandulescu, R. (2015). Immunosensors. En Biosensors - Micro and Nanoscale Applications. InTech. https://doi.org/10.5772/60524

D

[Dalila et al., 2019] Dalila R, N., Md Arshad, M. K., Gopinath, S. C. B., Norhaimi, W. M. W., & Fathil, M. F. M. (2019). Current and future envision on developing biosensors aided by 2D molybdenum disulfide (MoS_2) productions. Biosensors and Bioelectronics, 132, 248-264. https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.005

[Datta, P., 2019] Datta, P. (2019). Immunoassay design. En Accurate Results in the Clinical Laboratory (pp. 69-73). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813776-5.00006-6

[Datta, S. et al., 2013] Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 Biotech, 3(1), 1-9. https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7

[De Bock et al., 2010] De Bock, M., de Seny, D., Meuwis, M.-A., Chapelle, J.-P., Louis, E., Malaise, M., Merville, M.-P., & Fillet, M. (2010). Challenges for Biomarker Discovery in Body Fluids Using SELDI-TOF-MS. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, 1-15. https://doi.org/10.1155/2010/906082

[DeMarshall et al., 2015] DeMarshall, C., Sarkar, A., Nagele, E. P., Goldwaser, E., Godsey, G., Acharya, N. K., & Nagele, R. G. (2015). Utility of Autoantibodies as Biomarkers for Diagnosis and Staging of Neurodegenerative Diseases (pp. 1-51). https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.05.005

[Ding & Qin, 2020] Ding, J., & Qin, W. (2020). Recent advances in potentiometric biosensors. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 124, 115803. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115803

[Dörner & Furie, 2019] Dörner, T., & Furie, R. (2019). Novel paradigms in systemic lupus erythematosus. The Lancet, 393(10188), 2344-2358. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30546-X

[Dugger & Dickson, 2017] Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 9(7), a028035. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035

E

[Earnshaw, 2015] Earnshaw, W. C. (2015). Discovering centromere proteins: from cold white hands to the A, B, C of CENPs. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 16(7), 443-449. https://doi.org/10.1038/nrm4001

[Eda et al., 2011] Eda, G., Yamaguchi, H., Voiry, D., Fujita, T., Chen, M., & Chhowalla, M. (2011). Photoluminescence from Chemically Exfoliated MoS2. Nano Letters, 11(12), 5111-5116. https://doi.org/10.1021/nl201874w

[Eguílaz et al., 2010] Eguílaz, M., Moreno-Guzmán, M., Campuzano, S., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2010). An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes. Biosensors and Bioelectronics, 26(2). https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.060

[Eletxigerra et al., 2014] Eletxigerra, U., Martinez-Perdiguero, J., Merino, S., Villalonga, R., Pingarrón, J. M., & Campuzano, S. (2014). Amperometric magnetoimmunoassay for the direct detection of tumor necrosis factor alpha biomarker in human serum. Analytica Chimica Acta, 838, 37-44. https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.047

[Elsayed et al., 2022] Elsayed, S. A.-R., Kamaly, H. M., & Esmail, M. A. (2022). Co-positivity of anti-dsDNA, anti-nucleosome, and anti-smith autoantibodies as serological biomarkers for disease activity in systemic lupus erythematosus. Egyptian Rheumatology and Rehabilitation, 49(1). https://doi.org/10.1186/s43166-021-00110-0

[Erdem et al., 2005] Erdem, A., Ozkanariksoysal, D., Karadeniz, H., Kara, P., Sengonul, A., Sayiner, A., & Ozsoz, M. (2005). Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology. Electrochemistry Communications, 7(8), 815-820. https://doi.org/10.1016/j.elecom.2005.05.006

[Escobar & Pimienta, 2016] Escobar, M. I., & Pimienta, H. J. (2016). Sistema nervioso: Neuroanatomía funcional y clínica. Programa editorial Universidad del Valle. https://doi.org/10.25100/peu.7652352

[Esfandiari et al., 2022] Esfandiari, M., Havaei, G., Zahiri, S., & Mohammadnezhad, G. (2022). Pincer complex immobilization onto different supports: Strategies and applications. Coordination Chemistry Reviews, 472, 214778. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214778

[Esteban-Fernández de Ávila et al., 2013] Esteban-Fernández de Ávila, B., Escamilla-Gómez, V., Campuzano, S., Pedrero, M., Salvador, J.-P., Marco, M.-P., & Pingarrón, J. M. (2013). Ultrasensitive amperometric magnetoimmunosensor for human C-reactive protein quantification in serum. Sensors and Actuators B: Chemical, 188, 212-220. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.07.026

F

[Fairweather, 2007] Fairweather, D. (2007). Autoimmune Disease: Mechanisms. En Encyclopedia of Life Sciences. Wiley. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020193

[Fawzy et al., 2011] Fawzy, S. M., Gheita, T. A., El-Nabarawy, E., El-Demellawy, H. H., & Shaker, O. G. (2011). Serum BAFF level and its correlations with various disease parameters in patients with systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. The Egyptian Rheumatologist, 33(1), 45-51. https://doi.org/10.1016/j.ejr.2010.12.001

[Fenzl et al., 2016] Fenzl, C., Hirsch, T., & Baeumner, A. J. (2016). Nanomaterials as versatile tools for signal amplification in (bio)analytical applications. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 79, 306-316. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.018

[Fernández et al., 2023] Fernández, I., Carinelli, S., González-Mora, J. L., Villalonga, R., Lecuona, M., & Salazar-Carballo, P. A. (2023). Electrochemical bioassay based on l-lysine-modified magnetic nanoparticles for Escherichia coli detection: Descriptive results and comparison with other commercial magnetic beads. Food Control, 145, 109492. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109492

[Feyzizarnagh et al., 2016] Feyzizarnagh, H., Park, B. W., Sharma, L., Patania, M. M., Yoon, D. Y., & Kim, D. S. (2016). Amperometric mediatorless hydrogen peroxide sensor with horseradish peroxidase encapsulated in peptide nanotubes. Sensing and Bio-Sensing Research, 7. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2015.12.003

[FitzGerald, 2016] FitzGerald, G. A. (2016). Measure for Measure: Biomarker standards and transparency. Science Translational Medicine, 8(343). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8590

[Fletcher, 2015] Fletcher, S. (2015). Screen-Printed Carbon Electrodes (pp. 425-444). https://doi.org/10.1002/9783527697489.ch12

[Fortunati et al., 2023] Fortunati, S., Giannetto, M., Giliberti, C., Mattarozzi, M., Bertucci, A., & Careri, M. (2023). Magnetic Beads as Versatile Tools for Electrochemical Biosensing Platforms in Point-of-Care Testing. Analysis & Sensing. https://doi.org/10.1002/anse.202300062

[Franks & Slansky, 2012] Franks, A. L., & Slansky, J. E. (2012). Multiple associations between a broad spectrum of autoimmune diseases, chronic inflammatory diseases and cancer. Anticancer research, 32(4), 1119-1136.

[Friedman et al., 1985] Friedman, L., Furberg, C., & De Mets, D. (1985). Fundamental of clinical trials (2.a ed.) (2.a ed.). Littleton: PSG Publishing Company, Inc.

[Fritzler et al., 2011] Fritzler, M. J., Rattner, J. B., Luft, L. M., Edworthy, S. M., Casiano, C. A., Peebles, C., & Mahler, M. (2011). Historical perspectives on the discovery and elucidation of autoantibodies to centromere proteins (CENP) and the emerging importance of antibodies to CENP-F. Autoimmunity Reviews, 10(4), 194-200. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.09.025

G

[Gahlen et al., 2017] Gahlen, A., Trampe, A.-K., Haupeltshofer, S., Ringelstein, M., Aktas, O., Berthele, A., Wildemann, B., Gold, R., Jarius, S., & Kleiter, I. (2017). Aquaporin-4 antibodies in patients treated with natalizumab for suspected MS. Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation, 4(4), e363. https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000363

[Ganatra & Zhang, 2014] Ganatra, R., & Zhang, Q. (2014). Few-Layer MoS 2 : A Promising Layered Semiconductor. ACS Nano, 8(5), 4074-4099. https://doi.org/10.1021/nn405938z

[García-Miranda Ferrari et al., 2021] García-Miranda Ferrari, A., Rowley-Neale, S. J., & Banks, C. E. (2021). Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field. Talanta Open, 3, 100032. https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100032

[Gargiulo et al., 2018] Gargiulo, M. L. Á., Khoury, M., Gómez, G., Grimaudo, S., Suárez, L., Collado, M. V., & Sarano, J. (2018). Cut-off values of immunological tests to identify patients at high risk of severe lupus nephritis. Valores de corte de pruebas inmunológicas para identificar pacientes con mayor riesgo de nefritis lúpica grave. Medicina, 78(5), 329–335.

[Giat et al., 2017] Giat, E., Ehrenfeld, M., & Shoenfeld, Y. (2017). Cancer and autoimmune diseases. Autoimmunity Reviews, 16(10), 1049-1057. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.07.022

[Giess et al., 2004] Giess, F., Friedrich, M. G., Heberle, J., Naumann, R. L., & Knoll, W. (2004). The Protein-Tethered Lipid Bilayer: A Novel Mimic of the Biological Membrane. Biophysical Journal, 87(5), 3213-3220. https://doi.org/10.1529/biophysj.104.046169

[Gifford et al., 2006] Gifford, R., Kehoe, J., Barnes, S., Kornilayev, B., Alterman, M., & Wilson, G. (2006). Protein interactions with subcutaneously implanted biosensors. Biomaterials, 27(12), 2587-2598. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.033

[Goh et al., 2020] Goh, P. S., Wong, K. C., & Ismail, A. F. (2020). Nanocomposite Membranes for Liquid and Gas Separations from the Perspective of Nanostructure Dimensions. Membranes, 10(10), 297. https://doi.org/10.3390/membranes10100297

[González-Álvarez et al., 2013] González-Álvarez, M. J., Pérez-Ruiz, E., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A. J., & Lobo-Castañón, M. J. (2013). Effect of Tags and Labels on the Performance of Enzyme-Amplified Electrochemical Genomagnetic Assays. Electroanalysis, 25(1), 147-153. https://doi.org/10.1002/elan.201200381

[González-Buitrago et al., 2003] González-Buitrago, J. M., González, C., Hernando, M., Carrasco, R., Sánchez, A., Navajo, J. A., & Papisch, W. (2003). Antibodies to centromere antigens measured by an automated enzyme immunoassay. Clinica Chimica Acta, 328(1-2), 135-138. https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00419-9

[González Rodríguez et al., 2021] González Rodríguez, C., Aparicio Hernández, M. B., & Alarcón Torres, I. (2021). Actualización y manejo clínico de los anticuerpos anti-ácido desoxirribonucleico. Advances in Laboratory Medicine / Avances en Medicina de Laboratorio, 2(3), 322-331. https://doi.org/10.1515/almed-2020-0067

[Govindasamy et al., 2016] Govindasamy, M., Mani, V., Chen, S.-M., Karthik, R., Manibalan, K., & Umamaheswari, R. (2016). MoS 2 Flowers Grown on Graphene/Carbon Nanotubes: a Versatile Substrate for Electrochemical Determination of Hydrogen Peroxide. En Int. J. Electrochem. Sci (Vol. 11). www.electrochemsci.org

[Granados-Romero et al., 2017] Granados-Romero, J. J., Valderrama-Treviño, A. I., Contreras-Flores, E. H., Barrera-Mera, B., Herrera Enríquez, M., Uriarte-Ruíz, K., Ceballos-Villalba, J. C., Estrada-Mata, A. G., Alvarado Rodríguez, C., & Arauz-Peña, G. (2017). Colorectal cancer: a review. International Journal of Research in Medical Sciences, 5(11), 4667. https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20174914

[Gribi et al., 2018] Gribi, S., du Bois de Dunilac, S., Ghezzi, D., & Lacour, S. P. (2018). A microfabricated nerve-on-a-chip platform for rapid assessment of neural conduction in explanted peripheral nerve fibers. Nature Communications, 9(1), 4403. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06895-7

[Grieshaber et al., 2008] Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. En Sensors (Vol. 8, Número 3). https://doi.org/10.3390/s8031400

[Grigorieva et al., 2013] Grigorieva, D. V, Gorudko, I. V, Sokolov, A. V, Kosmachevskaya, O. V, Topunov, A. F., Buko, I. V, Konstantinova, E. E., Cherenkevich, S. N., & Panasenko, O. M. (2013). Methods Measurement of Plasma Hemoglobin Peroxidase Activity. En Translated from Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny (Vol. 155, Número 1).

[Grimes et al., 2002] Grimes, C., Mungle, C., Zeng, K., Jain, M., Dreschel, W., Paulose, M., & Ong, K. (2002). Wireless Magnetoelastic Resonance Sensors: A Critical Review. Sensors, 2(7), 294-313. https://doi.org/10.3390/s20700294

[Guerrero et al., 2020] Guerrero, S., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2020). Design of electrochemical immunosensors using electro-click chemistry. Application to the detection of IL-1β cytokine in saliva. Bioelectrochemistry, 133, 107484. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107484

[Guerrero et al., 2022] Guerrero, S., Sánchez-Tirado, E., Agüí, L., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2022). Monitoring autoimmune diseases by bioelectrochemical detection of autoantibodies. Application to the determination of anti-myelin basic protein autoantibodies in serum of multiple sclerosis patients. Talanta, 243, 123304. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123304

[Guilbault & Lubrano, 1973] Guilbault, G. G., & Lubrano, G. J. (1973). An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. Analytica Chimica Acta, 64(3), 439-455. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)82476-4

[Guilbault & Montalvo, 1969] Guilbault, G. G., & Montalvo, J. G. (1969). Urea-specific enzyme electrode. Journal of the American Chemical Society, 91(8), 2164-2165. https://doi.org/10.1021/ja01036a083

[Gupta, N. et al., 2019] Gupta, N., Renugopalakrishnan, V., Liepmann, D., Paulmurugan, R., & Malhotra, B. D. (2019). Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. Biosensors and Bioelectronics, 141, 111435. https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111435

[Gupta, U. et al., 2022] Gupta, U., Gupta, V., Arun, R. K., & Chanda, N. (2022). Recent advances in enzymatic biosensors for point-of-care detection of biomolecules. Biotechnology and Bioengineering, 119(12), 3393-3407. https://doi.org/10.1002/bit.28251

[Gupta, V. K. et al., 2011] Gupta, V. K., Jain, R., Radhapyari, K., Jadon, N., & Agarwal, S. (2011). Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—A review. Analytical Biochemistry, 408(2), 179-196. https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.09.027

H

[Hahne et al., 1998] Hahne, M., Kataoka, T., Schröter, M., Hofmann, K., Irmler, M., Bodmer, J.-L., Schneider, P., Bornand, T., Holler, N., French, L. E., Sordat, B., Rimoldi, D., & Tschopp, J. (1998). APRIL, a New Ligand of the Tumor Necrosis Factor Family, Stimulates Tumor Cell Growth. The Journal of Experimental Medicine, 188(6), 1185-1190. https://doi.org/10.1084/jem.188.6.1185

[Hammond et al., 2016] Hammond, J. L., Formisano, N., Estrela, P., Carrara, S., & Tkac, J. (2016). Electrochemical biosensors and nanobiosensors. Essays in Biochemistry, 60(1), 69–80. https://doi.org/10.1042/EBC20150008

[Haupt et al., 2020] Haupt, K., Medina Rangel, P. X., & Bui, B. T. S. (2020). Molecularly Imprinted Polymers: Antibody Mimics for Bioimaging and Therapy. Chemical Reviews, 120(17), 9554-9582. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00428

[Herz et al., 2010] Herz, J., Zipp, F., & Siffrin, V. (2010). Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. Experimental Neurology, 225(1), 9-17. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.11.019

[Hillebrand. et al., 2019] Hillebrand, S., Schanda, K., Nigritinou, M., Tsymala, I., Böhm, D., Peschl, P., Takai, Y., Fujihara, K., Nakashima, I., Misu, T., Reindl, M., Lassmann, H., & Bradl, M. (2019). Circulating AQP4-specific auto-antibodies alone can induce neuromyelitis optica spectrum disorder in the rat. Acta Neuropathologica, 137(3), 467-485. https://doi.org/10.1007/s00401-018-1950-8

[Hnasko, T. S. & Hnasko, R. M., 2015] Hnasko, T. S., & Hnasko, R. M. (2015). The western blot. Methods in Molecular Biology, 1318. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_9

[Hsieh & Rao, 2017] Hsieh, Y.-H. P., & Rao, Q. (2017). Immunoassays (pp. 487-502). https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_27

[Hughes, 1922] Hughes, W. S. (1922). The potential difference between glass and electrolytes in contact with the glass. Journal of the American Chemical Society, 44(12), 2860-2867. https://doi.org/10.1021/ja01433a021

[Hulka & Wilcosky, 1988] Hulka, B. S., & Wilcosky, T. (1988). Biological Markers in Epidemiologic Research. Archives of Environmental Health: An International Journal, 43(2), 83-89. https://doi.org/10.1080/00039896.1988.9935831

[Humphrey & Batty, 1974] Humphrey, J. H., & Batty, I. (1974). International reference preparation for human serum IgG, IgA, IgM. *Immunochemistry*, *11*(11), 759. https://doi.org/10.1016/0019-2791(74)90277-8

[Hurst et al., 2007] Hurst, N. G., Stocken, D. D., Wilson, S., Keh, C., Wakelam, M. J. O., & Ismail, T. (2007). Elevated serum matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) concentration predicts the presence of colorectal neoplasia in symptomatic patients. British Journal of Cancer, 97(7), 971-977. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603958

I

[Imam et al., 2021] Imam, H. T., Marr, P. C., & Marr, A. C. (2021). Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. Green Chemistry, 23(14), 4980-5005. https://doi.org/10.1039/D1GC01852C

[Infantino et al., 2018] Infantino, M., Manfredi, M., Merone, M., Grossi, V., Benucci, M., Li Gobbi, F., Bandinelli, F., Damiani, A., & Soda, P. (2018). Analytical variability in the determination of anti-double-stranded DNA antibodies: the strong need of a better definition of the old and new tests. Immunologic Research, 66(3), 340-347. https://doi.org/10.1007/s12026-018-8992-9

[Iqbal et al., 2012] Iqbal, M. A., Gupta, S. G., & Hussaini, S. S. (2012). A review on electrochemical biosensors: Principles and applications. Advances in Bioresearch, 3(4), 158-163.

J

[Jäger & Kuchroo, 2010] Jäger, A., & Kuchroo, V. K. (2010). Effector and Regulatory T-cell Subsets in Autoimmunity and Tissue Inflammation. Scandinavian Journal of Immunology, 72(3), 173-184. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02432.x

[Jain et al., 2017] Jain, A., Barve, A., Zhao, Z., Jin, W., & Cheng, K. (2017). Comparison of Avidin, Neutravidin, and Streptavidin as Nanocarriers for Efficient siRNA Delivery. Molecular Pharmaceutics, 14(5), 1517-1527. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00933

[Jansen van Vuuren et al., 2010] Jansen van Vuuren, B., Read, T., Olkhov, R. V., & Shaw, A. M. (2010). Human serum albumin interference on plasmon-based immunokinetic assay for antibody screening in model blood sera. Analytical Biochemistry, 405(1), 114-120. https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.05.015

[Jarius & Wildemann, 2010] Jarius, S., & Wildemann, B. (2010). AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. Nature Reviews Neurology, 6(7), 383-392. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.72

[Jarius & Wildemann, 2013] Jarius, S., & Wildemann, B. (2013). Aquaporin-4 Antibodies (NMO- IgG) as a Serological Marker of Neuromyelitis Optica: A Critical Review of the Literature. Brain Pathology, 23(6), 661-683. https://doi.org/10.1111/bpa.12084

[Jesionowski et al., 2014] Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: a review. Adsorption, 20(5-6), 801-821. https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y

[Jonsson & Brun, 2010] Jonsson, R., & Brun, J. G. (2010). Sjögren's Syndrome. En Encyclopedia of Life Sciences. Wiley. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002149.pub2

[Ju, 2018] Ju, H. (2018). Functional nanomaterials and nanoprobes for amplified biosensing. Applied Materials Today, 10, 51-71. https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.11.001

K

[Kalantar-zadeh & Ou, 2016] Kalantar-zadeh, K., & Ou, J. Z. (2016). Biosensors Based on Two-Dimensional MoS_2. ACS Sensors, 1(1), 5-16. https://doi.org/10.1021/acssensors.5b00142

[Kampa et al., 2020] Kampa, M., Notas, G., Stathopoulos, E. N., Tsapis, A., & Castanas, E. (2020). The TNFSF Members APRIL and BAFF and Their Receptors TACI, BCMA, and BAFFR in Oncology, With a Special Focus in Breast Cancer. Frontiers in Oncology, 10. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00827

[Kang et al., 2012] Kang, X. Bin, Pang, G. C., Liang, X. Y., Wang, M., Liu, J., & Zhu, W. M. (2012). Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase/GNPs-thionine/chitosan. Electrochimica Acta, 62. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.12.034

[Kannan, 2018] Kannan, M. (2018). Transmission Electron Microscope-Principle, Components and Applications. En A textbook on fundamentals and applications of nanotechnology.

[Karunakaran et al., 2015] Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. (2015). Introduction to Biosensors. En Biosensors and Bioelectronics (pp. 1-68). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3

[Kavanaugh & Solomon, 2002] Kavanaugh, A. F., & Solomon, D. H. (2002). Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: Anti-DNA antibody tests. Arthritis Care & Research, 47(5), 546-555. https://doi.org/10.1002/art.10558

[Kissinger & Heineman, 1983] Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. (1983). Cyclic voltammetry. En Journal of Chemical Education (Vol. 60, Número 9). https://doi.org/10.1021/ed060p702

[Kobeissy et al., 2014] Kobeissy, F. H., Gulbakan, B., Alawieh, A., Karam, P., Zhang, Z., Guingab-Cagmat, J. D., Mondello, S., Tan, W., Anagli, J., & Wang, K. (2014). Post-Genomics Nanotechnology Is Gaining Momentum: Nanoproteomics and Applications in Life Sciences. OMICS: A Journal of Integrative Biology, 18(2), 111-131. https://doi.org/10.1089/omi.2013.0074

[Kocurova et al., 2022] Kocurova, G., Ricny, J., & Ovsepian, S. V. (2022). Autoantibodies targeting neuronal proteins as biomarkers for neurodegenerative diseases. Theranostics, 12(7), 3045-3056. https://doi.org/10.7150/thno.72126

[Koksuz et al., 2012] Koksuz, T., Saracoglu, Z. N., Koku Aksu, A. E., Sabuncu, I., & Korkmaz, C. (2012). CREST Syndrome. Turkish Journal of Dermatology / Türk Dermatoloji Dergisi, 6(2), 48-50. https://doi.org/10.5152/tdd.2012.11

[Koroteev et al., 2011] Koroteev, V. O., Bulusheva, L. G., Asanov, I. P., Shlyakhova, E. V., Vyalikh, D. V., & Okotrub, A. V. (2011). Charge Transfer in the MoS 2 /Carbon Nanotube Composite. The Journal of Physical Chemistry C, 115(43), 21199-21204. https://doi.org/10.1021/jp205939e

[Krot & Rolls, 2021] Krot, M., & Rolls, A. (2021). Autoimmunity in neurodegeneration. Science, 374(6569), 823-824. https://doi.org/10.1126/science.abm4739

[Kryštůfková et al., 2018] Kryštůfková, O., Hulejová, H., Mann, H. F., Pecha, O., Půtová, I., Ekholm, L., Lundberg, I. E., & Vencovský, J. (2018). Serum levels of B-cell activating factor of the TNF family (BAFF) correlate with anti-Jo-1 autoantibodies levels and disease activity in patients with anti-Jo-1positive polymyositis and dermatomyositis. Arthritis Research & Therapy, 20(1), 158. https://doi.org/10.1186/s13075-018-1650-8

[Kudr et al., 2019] Kudr, J., Adam, V., & Zitka, O. (2019). Fabrication of Graphene/Molybdenum Disulfide Composites and Their Usage as Actuators for Electrochemical Sensors and Biosensors. Molecules, 24(18), 3374. https://doi.org/10.3390/molecules24183374

[Kuhn et al., 2015] Kuhn, A., Bonsmann, G., Anders, H.-J., Herzer, P., Tenbrock, K., & Schneider, M. (2015). The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. Deutsches Ärzteblatt international. https://doi.org/10.3238/arztebl.2015.0423

[Kurien & Scofield, 2006] Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. Methods, 38(4). https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007

L

[Lascano et al., 2012] Lascano, V., Zabalegui, L. F., Cameron, K., Guadagnoli, M., Jansen, M., Burggraaf, M., Versloot, M., Rodermond, H., van der Loos, C., Carvalho-Pinto, C. E., Kalthoff, H., Medema, J. P., & Hahne, M. (2012). The TNF family member APRIL promotes colorectal tumorigenesis. Cell Death & Differentiation, 19(11), 1826-1835. https://doi.org/10.1038/cdd.2012.68

[Laschuk et al., 2021] Laschuk, N. O., Easton, E. B., & Zenkina, O. V. (2021). Reducing the resistance for the use of electrochemical impedance spectroscopy analysis in materials chemistry. En RSC Advances (Vol. 11, Número 45). https://doi.org/10.1039/d1ra03785d

[Lechuga, 2005] Lechuga, L. M. (2005). Chapter 5 Optical biosensors (pp. 209-250). https://doi.org/10.1016/S0166-526X(05)44005-2

[Lei & Ju, 2012] Lei, J., & Ju, H. (2012). Signal amplification using functional nanomaterials for biosensing. Chemical Society Reviews, 41(6), 2122. https://doi.org/10.1039/c1cs15274b

[Lennon et al., 2004] Lennon, V. A., Wingerchuk, D. M., Kryzer, T. J., Pittock, S. J., Lucchinetti, C. F., Fujihara, K., Nakashima, I., & Weinshenker, B. G. (2004). A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. The Lancet, 364(9451), 2106-2112. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17551-X

[Ley et al., 2011] Ley, C., Holtmann, D., Mangold, K.-M., & Schrader, J. (2011). Immobilization of histidine-tagged proteins on electrodes. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 88(2), 539-551. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.07.044

[Li et al., 2016] Li, X., Song, S., Pei, Y., Dong, H., Aastrup, T., & Pei, Z. (2016). Oriented and reversible immobilization of His-tagged proteins on two- and three-dimensional surfaces for study of protein–protein interactions by a QCM biosensor. Sensors and Actuators B: Chemical, 224, 814-822. https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.096

[Liedberg et al., 1983] Liedberg, B., Nylander, C., & Lunström, I. (1983). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. Sensors and Actuators, 4, 299-304. https://doi.org/10.1016/0250-6874(83)85036-7

[Lim & Ahmed, 2016] Lim, S. A., & Ahmed, M. U. (2016). Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: a review. RSC Advances, 6(30), 24995-25014. https://doi.org/10.1039/C6RA00333H

[Lin, D. et al., 2018] Lin, D., Su, Z., & Wei, G. (2018). Three-dimensional porous reduced graphene oxide decorated with MoS2 quantum dots for electrochemical determination of hydrogen peroxide. Materials Today Chemistry, 7, 76-83. https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.02.001

[Lin, Y. et al., 2015] Lin, Y., Chen, X., Lin, Y., Zhou, Q., & Tang, D. (2015). Non-enzymatic sensing of hydrogen peroxide using a glassy carbon electrode modified with a nanocomposite made from carbon nanotubes and molybdenum disulfide. Microchimica Acta, 182(9-10), 1803-1809. https://doi.org/10.1007/s00604-015-1517-5

[Liu, A. et al., 2012] Liu, A., Wang, K., Weng, S., Lei, Y., Lin, L., Chen, W., Lin, X., & Chen, Y. (2012). Development of electrochemical DNA biosensors. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 37, 101-111. https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.008

[Liu, Q. et al., 2014] Liu, Q., Wu, C., Cai, H., Hu, N., Zhou, J., & Wang, P. (2014). Cell-Based Biosensors and Their Application in Biomedicine. Chemical Reviews, 114(12), 6423-6461. https://doi.org/10.1021/cr2003129

[Liu, Y. et al., 2015] Liu, Y., Liu, H., Luo, X., Deng, J., Pan, Y., & Liang, H. (2015). Overexpression of SMYD3 and matrix metalloproteinase-9 are associated with poor prognosis of patients with gastric cancer. Tumor Biology, 36(6), 4377-4386. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3077-z

[Liu, Y. et al., 2019] Liu, Y., Nan, X., Shi, W., Liu, X., He, Z., Sun, Y., & Ge, D. (2019). A glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase and Au nanocomposites with polynorepinephrine. RSC Advances, 9(29), 16439-16446. https://doi.org/10.1039/C9RA02054C

[Lübbers & Opitz, 1975] Lübbers, D. W., & Opitz, N. (1975). The pCO_2-/pO_2-Optode: A new probe for measurement of pCO_2 or pO in fluids and gases. Zeitschrift für Naturforschung C, 30(7-8), 532-533. https://doi.org/10.1515/znc-1975-7-819

[Lyon & Stevenson, 2006] Lyon, J. L., & Stevenson, K. J. (2006). Picomolar peroxide detection using a chemically activated redox mediator and square wave voltammetry. Analytical Chemistry, 78(24). https://doi.org/10.1021/ac061483d

M

[Macdonald et al., 2005] Macdonald, J. R., Johnson, W. B., Raistrick, I. D., Franceschetti, D. R., McKubre, M. C. H., Macdonald, D. D., Bonanos, N., Steele, B. C. H., & Butler, E. P. (2005). Impedance Spectroscopy (E. Barsoukov & J. R. Macdonald, Eds.). Wiley. https://doi.org/10.1002/0471716243

[Mackay et al., 2007] Mackay, F., Silveira, P., & Brink, R. (2007). B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. Current Opinion in Immunology, 19(3), 327-336. https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.04.008

[MacPhee, 2010] MacPhee, D. J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 61(2), 171-177. https://doi.org/10.1016/j.vascn.2009.12.001

[Maecker et al., 2012] Maecker, H. T., Lindstrom, T. M., Robinson, W. H., Utz, P. J., Hale, M., Boyd, S. D., Shen-Orr, S. S., & Fathman, C. G. (2012). New tools for classification and monitoring of autoimmune diseases. Nature Reviews Rheumatology, 8(6), 317-328. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.66

[Magadán-Mompó et al., 2011] Magadán-Mompó, S., Garet, E., Mantilla, L., & González-Fernández, Á. (2011). Desarrollo de herramientas para inmunodetección: generación de anticuerpos policlonales, monoclonales y bibliotecas de fagosDesarrollo de herramientas para inmunodetección: generación de anticuerpos policlonales, monoclonales y bibliotecas de fagos (J. M. García Estévez, C. Olabarria, S. Pérez, E. Rolán-Alvarez, & G. Rosón, Eds.; Capítulo XVII). Editorial Tecnos (grupo Anaya).

[Magliozzi et al., 2020] Magliozzi, R., Marastoni, D., & Calabrese, M. (2020). The BAFF / APRIL system as therapeutic target in multiple sclerosis. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 24(11), 1135-1145. https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1821647

[Mahler et al., 2010] Mahler, M., Maes, L., Blockmans, D., Westhovens, R., Bossuyt, X., Riemekasten, G., Schneider, S., Hiepe, F., Swart, A., Gürtler, I., Egerer, K., Fooke, M., & Fritzler, M. J. (2010). Clinical and serological evaluation of a novel CENP-A peptide-based ELISA. Arthritis Research & Therapy, 12(3), R99. https://doi.org/10.1186/ar3029

[Martin et al., 2010] Martin, K. J., Fournier, M. V., Reddy, G. P. V., & Pardee, A. B. (2010). A Need for Basic Research on Fluid-Based Early Detection Biomarkers. Cancer Research, 70(13), 5203-5206. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0987

[Martínez-García et al., 2016a] Martínez-García, G., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2016a). Multiplexed electrochemical immunosensing of obesity-related hormones at grafted graphene-modified electrodes. Electrochimica Acta, 202. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.03.140

[Martínez-García et al., 2016b] Martínez-García, G., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2016b). Multiplexed electrochemical immunosensing of obesity-related hormones at grafted graphene-modified electrodes. Electrochimica Acta, 202, 209-215. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.03.140

[Masetti et al., 2021] Masetti, R., Tiri, A., Tignanelli, A., Turrini, E., Argentiero, A., Pession, A., & Esposito, S. (2021). Autoimmunity and cancer. Autoimmunity Reviews, 20(9), 102882. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102882

[Masters et al., 2015] Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. Nature Reviews Disease Primers, 1(1), 15056. https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56

[Mayeux, 2004] Mayeux R. (2004). Biomarkers: potential uses and limitations. NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 1(2), 182–188. https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.182

[McComb et al., 2019] McComb, S., Thiriot, A., Akache, B., Krishnan, L., & Stark, F. (2019). Introduction to the Immune System (pp. 1-24). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9597-4_1

[McInnes & O'Dell, 2010] McInnes, I. B., & O'Dell, J. R. (2010). State-of-the-art: rheumatoid arthritis: Figure 1. Annals of the Rheumatic Diseases, 69(11), 1898-1906. https://doi.org/10.1136/ard.2010.134684

[McKinley & Cheeseman, 2016] McKinley, K. L., & Cheeseman, I. M. (2016). The molecular basis for centromere identity and function. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 17(1), 16-29. https://doi.org/10.1038/nrm.2015.5

[Mecocci et al., 1993] Mecocci, P., Ekman, R., Parnetti, L., & Senin, U. (1993). Antihistone and anti-dsDNA autoantibodies in Alzheimer's disease and vascular dementia. Biological Psychiatry, 34(6), 380-385. https://doi.org/10.1016/0006-3223(93)90182-D

[Mei et al., 2018] Mei, B. A., Munteshari, O., Lau, J., Dunn, B., & Pilon, L. (2018). Physical Interpretations of Nyquist Plots for EDLC Electrodes and Devices. Journal of Physical Chemistry C, 122(1), 194-206. https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b10582

[Menetski et al., 2019] Menetski, J. P., Hoffmann, S. C., Cush, S. S., Kamphaus, T. N., Austin, C. P., Herrling, P. L., & Wagner, J. A. (2019). The Foundation for the National Institutes of Health Biomarkers Consortium: Past Accomplishments and New Strategic Direction. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 105(4), 829-843. https://doi.org/10.1002/cpt.1362

[Migliorini et al., 2005] Migliorini, P., Baldini, C., Rocchi, V., & Bombardieri, S. (2005). Anti-Sm and anti-RNP antibodies. Autoimmunity, 38(1), 47-54. https://doi.org/10.1080/08916930400022715

[Miranda-Castro et al., 2018] Miranda-Castro, R., Santos-Álvarez, N. de-los-, & Lobo-Castañón, M. J. (2018). Understanding the Factors Affecting the Analytical Performance of Sandwich-hybridization Genosensors on Gold Electrodes. Electroanalysis, 30(7), 1229-1240. https://doi.org/10.1002/elan.201800049

[Miteva et al., 2023] Miteva, D., Vasilev, G. V., & Velikova, T. (2023). Role of Specific Autoantibodies in Neurodegenerative Diseases: Pathogenic Antibodies or Promising Biomarkers for Diagnosis. Antibodies, 12(4), 81. https://doi.org/10.3390/antib12040081

[Modh et al., 2018] Modh, H., Scheper, T., & Walter, J. G. (2018). Aptamer-modified magnetic beads in biosensing. En Sensors (Switzerland) (Vol. 18, Número 4). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/s18041041

[Mondal et al., 2020] Mondal, S., Adhikari, N., Banerjee, S., Amin, S. A., & Jha, T. (2020). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. European Journal of Medicinal Chemistry, 194, 112260. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112260

[Monošík et al., 2012] Monošík, R., Streďanský, M., & Šturdík, E. (2012). Biosensors - classification, characterization and new trends. Acta Chimica Slovaca, 5(1), 109-120. https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z

[Moraitis et al., 2019] Moraitis, E., Stathopoulos, Y., Hong, Y., Al-Obaidi, M., Mankad, K., Hacohen, Y., Sen, D., Hemingway, C., & Eleftheriou, D. (2019). Aquaporin-4 IgG antibody-related disorders in patients with juvenile systemic lupus erythematosus. Lupus, 28(10), 1243-1249. https://doi.org/10.1177/0961203319855125

[Moreaux et al., 2009] Moreaux, J., Veyrune, J.-L., De Vos, J., & Klein, B. (2009). APRIL is overexpressed in cancer: link with tumor progression. BMC Cancer, 9(1), 83. https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-83

[Moreno-Guzmán et al., 2012] Moreno-Guzmán, M., Ojeda, I., Villalonga, R., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2012). Ultrasensitive detection of adrenocorticotropin hormone (ACTH) using disposable phenylboronic-modified electrochemical immunosensors. Biosensors and Bioelectronics, 35(1). https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.015

[Morikawa et al., 1988] Morikawa, K., Walker, S. M., Nakajima, M., Pathak, S., Jessup, J. M., & Fidler, I. (1988). Influence of Organ Environment on the Growth, Selection, and Metastasis of Human Colon Carcinoma Cells in Nude Mice. Cancer Research, 48(23)

[Morrison et al., 2008] Morrison, D. W. G., Dokmeci, M. R., Demirci, U., & Khademhosseini, A. (2008). Clinical applications of micro- and nanoscale biosensors (K. Gonsalves, C. Halberstadt, C. T. Laurencin, & L. Nair, Eds.; Vol. 1). John Wiley & Sons

[Mundkur, 1949] Mundkur, B. D. (1949). Evidence Excluding Mutations, Polysomy, and Polyploidy as Possible Causes of Non-Mendelian Segregations in Saccharomyces. Annals of the Missouri Botanical Garden, 36(3), 259. https://doi.org/10.2307/2394394

[Muñoz-San Martín et al., 2022] Muñoz-San Martín, C., Gamella, M., Pedrero, M., Montero-Calle, A., Pérez-Ginés, V., Camps, J., Arenas, M., Barderas, R., Pingarrón, J. M., & Campuzano, S. (2022). Anticipating metastasis through electrochemical immunosensing of tumor hypoxia biomarkers. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 414(1), 399-412. https://doi.org/10.1007/s00216-021-03240-8

[Murugan et al., 2020] Murugan, D., Bhatia, H., Sai, V. V. R., & Satija, J. (2020). P-FAB: A Fiber-Optic Biosensor Device for Rapid Detection of COVID-19. Transactions of the Indian National Academy of Engineering, 5(2), 211-215. https://doi.org/10.1007/s41403-020-00122-w

N

[Nagase et al., 2006] Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovascular Research, 69(3), 562-573. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002

[Neiman et al., 2019] Neiman, M., Hellström, C., Just, D., Mattsson, C., Fagerberg, L., Schuppe-Koistinen, I., Gummesson, A., Bergström, G., Kallioniemi, O., Achour, A., Sallinen, R., Uhlén, M., & Nilsson, P. (2019). Individual and stable autoantibody repertoires in healthy individuals. Autoimmunity, 52(1), 1-11. https://doi.org/10.1080/08916934.2019.1581774

[Nelson & Griffin, 1916] Nelson, J. M., & Griffin, E. G. (1916). Adsorption of invertase. Journal of the American Chemical Society, 38(5), 1109-1115. https://doi.org/10.1021/ja02262a018

[Newman & Turner, 2007] Newman, J. D., & Turner, A. P. F. (2007). Historical Perspective of Biosensor and Biochip Development. En Handbook of Biosensors and Biochips. Wiley. https://doi.org/10.1002/9780470061565.hbb002

[Nguyen, H. & Kim, 2017] Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. Applied Science and Convergence Technology, 26(6), 157-163. https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157

[Nguyen, T. et al., 2012] Nguyen, T. T., Sly, K. L., & Conboy, J. C. (2012). Comparison of the Energetics of Avidin, Streptavidin, NeutrAvidin, and Anti-Biotin Antibody Binding to Biotinylated Lipid Bilayer Examined by Second-Harmonic Generation. Analytical Chemistry, 84(1), 201-208. https://doi.org/10.1021/ac202375n

[NIH, 2020] National Cancer Institute (NIH). (2020, septiembre 25). Cancer statistics. https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas.

[Nilsen et al., 2020] Nilsen, J., Trabjerg, E., Grevys, A., Azevedo, C., Brennan, S. O., Stensland, M., Wilson, J., Sand, K. M. K., Bern, M., Dalhus, B., Roopenian, D. C., Sandlie, I., Rand, K. D., & Andersen, J. T. (2020). An intact C-terminal end of albumin is required for its long half-life in humans. Communications Biology, 3(1), 181. https://doi.org/10.1038/s42003-020-0903-7

[Noel et al., 2008] Noel, A., Jost, M., & Maquoi, E. (2008). Matrix metalloproteinases at cancer tumor–host interface. Seminars in Cell & Developmental Biology, 19(1), 52-60. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.05.011

[Novaretti & Dinardo, 2011] Novaretti, M. C. Z., & Dinardo, C. L. (2011). Immunoglobulin. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 33(5), 377-382. https://doi.org/10.5581/1516-8484.20110102

[Novick & Rozzell, 2005] Novick, S. J., & Rozzell, J. D. (2005). Immobilization of Enzymes by Covalent Attachment. En Microbial Enzymes and Biotransformations (pp. 247-271). Humana Press. https://doi.org/10.1385/1-59259-846-3:247

O

[Oh et al., 2020] Oh, J., Park, Y., Lee, K.-A., & Kim, H.-S. (2020). Detection of Anti-Extractable Nuclear Antigens in Patients with Systemic Rheumatic Disease via Fluorescence Enzyme Immunoassay and Its Clinical Utility. Yonsei Medical Journal, 61(1), 73. https://doi.org/10.3349/ymj.2020.61.1.73

[Oleschuk et al., 2000] Oleschuk, R. D., McComb, M. E., Chow, A., Ens, W., Standing, K. G., Perreault, H., Marois, Y., & King, M. (2000). Characterization of plasma proteins adsorbed onto biomaterials by MALDI-TOFMS. Biomaterials, 21(16), 1701-1710. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00054-5

[Oliveira et al., 2022] Oliveira, O. N., Caseli, L., & Ariga, K. (2022). The Past and the Future of Langmuir and Langmuir–Blodgett Films. Chemical Reviews, 122(6), 6459-6513. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00754

[Oracki et al., 2010] Oracki, S. A., Walker, J. A., Hibbs, M. L., Corcoran, L. M., & Tarlinton, D. M. (2010). Plasma cell development and survival. Immunological Reviews, 237(1), 140-159. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00940.x

[Order, 1977] Order, S. E. (1977). Beneficial and detrimental effects of therapy on immunity in breast cancer. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics, 2(3-4), 377-380. https://doi.org/10.1016/0360-3016(77)90101-8

[Orgentec Diagnostika GmbH] Anti-Centromere B ORG 633 ELISA test. https://products.orgentec.com/pdfs/ifu/ORG%20633_IFU_EN_QM113209_2018-01-02_3.pdf

[O'Shea et al., 2019] O'Shea, J. J., Gadina, M., & Siegel, R. M. (2019). Cytokines and Cytokine Receptors. En Clinical Immunology (pp. 127-155.e1). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00009-0

[Owen et al., 2010] Owen, G. RH., Häkkinen, L., Wu, C., & Larjava, H. (2010). A reproducible technique for specific labeling of antigens using preformed fluorescent molecular IgG-F(ab′) 2 complexes from primary antibodies of the same species. Microscopy Research and Technique, 73(6), 623-630. https://doi.org/10.1002/jemt.20803

P

[Park & Kricka, 2013] Park, J. Y., & Kricka, L. J. (2013). Interferences in Immunoassay. En The Immunoassay Handbook (pp. 403-416). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00027-0

[Parkin & Cohen, 2001] Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. The Lancet, 357(9270), 1777-1789. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7

[Patel, 2020] Patel, A. (2020). Benign vs Malignant Tumors. JAMA Oncology, 6(9), 1488. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592

[Patrick, 2009] Patrick, L. (2009). Thyroid disruption: mechanism and clinical implications in human health. Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic, 14(4), 326-346.

[Paust & von Andrian, 2011] Paust, S., & von Andrian, U. H. (2011). Natural killer cell memory. Nature Immunology, 12(6), 500-508. https://doi.org/10.1038/ni.2032

[Pedrero et al., 2012] Pedrero, M., Campuzano, S., & Pingarrón, J. M. (2012). Magnetic Beads-Based Electrochemical Sensors Applied to the Detection and Quantification of Bioterrorism/Biohazard Agents. Electroanalysis, 24(3), 470-482. https://doi.org/10.1002/elan.201100528

[Penner, 2017] Penner, M. H. (2017). Basic Principles of Spectroscopy. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_6

[Pérez-Fernández et al., 2020] Pérez-Fernández, B., Costa-García, A., & Muñiz, A. de la E.-. (2020). Electrochemical (Bio)Sensors for Pesticides Detection Using Screen-Printed Electrodes. Biosensors, 10(4), 32. https://doi.org/10.3390/bios10040032

[Perkampus, 1992] Perkampus, H.-H. (1992). UV-VIS Spectroscopy and Its Applications. En UV-VIS Spectroscopy and Its Applications. https://doi.org/10.1007/978-3-642-77477-5

[Peterson & Vurek, 1984] Peterson, J. I., & Vurek, G. G. (1984). Fiber-optic sensors for biomedical applications. Science, 224(4645), 123-127.

[Pieper et al., 2013] Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 131(4), 959-971. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046

[Pohanka, 2017] Pohanka, M. (2017). The Piezoelectric Biosensors: Principles and Applications, a Review. International Journal of Electrochemical Science, 12(1), 496-506. https://doi.org/10.20964/2017.01.44

[Pohanka & Skládal, 2008] Pohanka, M., & Skládal, P. (2008). Electrochemical biosensors - principles and applications. Journal of Applied Biomedicine, 6(2), 57-64. https://doi.org/10.32725/jab.2008.008

[Poncharal et al., 1999] Poncharal, P., Wang, Z. L., Ugarte, D., & de Heer, W. A. (1999). Electrostatic Deflections and Electromechanical Resonances of Carbon Nanotubes. Science, 283(5407), 1513-1516. https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1513

[Porter, 1957] Porter K. A. (1957). Effect of homologous bone marrow injections in x-irradiated rabbits. British journal of experimental pathology, 38(4), 401–412

[Pourmand et al., 1999] Pourmand, N., Wahren-Herlenius, M., Gunnarsson, I., Svenungsson, E., Lofstrom, B., Ioannou, Y., Isenberg, D. A., & Magnusson, C. G. M. (1999). Ro/SSA and La/SSB specific IgA autoantibodies in serum of patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. Annals of the Rheumatic Diseases, 58(10), 623-629. https://doi.org/10.1136/ard.58.10.623

[Prattis et al., 2021] Prattis, I., Hui, E., Gubeljak, P., Kaminski Schierle, G. S., Lombardo, A., & Occhipinti, L. G. (2021). Graphene for Biosensing Applications in Point-of-Care Testing. Trends in Biotechnology, 39(10), 1065-1077. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.01.005

[Prieto-Simon et al., 2008] Prieto-Simon, B., Campas, M., & Marty, J.-L. (2008). Biomolecule Immobilization in Biosensor Development: Tailored Strategies Based on Affinity Interactions. Protein & Peptide Letters, 15(8), 757-763. https://doi.org/10.2174/092986608785203791

[Prüss, 2021] Prüss, H. (2021). Autoantibodies in neurological disease. Nature Reviews Immunology, 21(12), 798-813. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00543-w

[Pupim Ferreira et al., 2013] Pupim Ferreira, A. A., Venturini, C., Souza Castilho, M. de, Canaverolo, N., Vinicius, M., dos Santos, G. P., Sadao, C., Vicente, A., & Yamanak, H. (2013). Amperometric Biosensor for Diagnosis of Disease. En State of the Art in Biosensors - Environmental and Medical Applications. InTech. https://doi.org/10.5772/53656

Q

[Qu et al., 2021] Qu, J.-H., Leirs, K., Escudero, R., Strmšek, Ž., Jerala, R., Spasic, D., & Lammertyn, J. (2021). Novel Regeneration Approach for Creating Reusable FO-SPR Probes with NTA Surface Chemistry. Nanomaterials, 11(1), 186. https://doi.org/10.3390/nano11010186

[Quartuccio et al., 2015] Quartuccio, L., Baldini, C., Bartoloni, E., Priori, R., Carubbi, F., Corazza, L., Alunno, A., Colafrancesco, S., Luciano, N., Giacomelli, R., Gerli, R., Valesini, G., Bombardieri, S., & De Vita, S. (2015). Anti-SSA/SSB-negative Sjögren's syndrome shows a lower prevalence of lymphoproliferative manifestations, and a lower risk of lymphoma evolution. Autoimmunity Reviews, 14(11), 1019-1022. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.07.002

[Qureshi et al., 2023] Qureshi, R., Irfan, M., Ali, H., Khan, A., Nittala, A. S., Ali, S., Shah, A., Gondal, T. M., Sadak, F., Shah, Z., Hadi, M. U., Khan, S., Al-Tashi, Q., Wu, J., Bermak, A., & Alam, T. (2023). Artificial Intelligence and Biosensors in Healthcare and Its Clinical Relevance: A Review. IEEE Access, 11, 61600-61620. https://doi.org/10.1109/ACCESS.2023.3285596

R

[Radisky, E. S. & Radisky, D. C., 2010] Radisky, E. S., & Radisky, D. C. (2010). Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 15(2), 201-212. https://doi.org/10.1007/s10911-010-9177-x

[Reichel et al., 2007] Reichel, A., Schaible, D., Al Furoukh, N., Cohen, M., Schreiber, G., & Piehler, J. (2007). Noncovalent, Site-Specific Biotinylation of Histidine-Tagged Proteins. Analytical Chemistry, 79(22), 8590-8600. https://doi.org/10.1021/ac0714922

[Renedo et al., 2007] Renedo, O. D., Alonso-Lomillo, M. A., & Martínez, M. J. A. (2007). Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. Talanta, 73(2), 202-219. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.03.050

[Ridhorkar, 2023] Ridhorkar, D. M. (2023). Biosensing Technology: A Brief History. International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology, 11(1), 128-129. https://doi.org/10.22214/ijraset.2023.48492

[Rocchitta et al., 2016] Rocchitta, G., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., Nuvoli, S., Bagella, P., Demartis, M., Fiore, V., Manetti, R., & Serra, P. (2016). Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. Sensors, 16(6), 780. https://doi.org/10.3390/s16060780

[Roederer & Bastiaans, 1983] Roederer, J. E., & Bastiaans, G. J. (1983). Microgravimetric immunoassay with piezoelectric crystals. Analytical Chemistry, 55(14), 2333-2336. https://doi.org/10.1021/ac00264a030

[Rogers, 2000] Rogers, K. R. (2000). Principles of Affinity-Based Biosensors. Molecular Biotechnology, 14(2), 109-130. https://doi.org/10.1385/MB:14:2:109

[Ronkainen et al., 2010] Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. Chemical Society Reviews, 39(5), 1747. https://doi.org/10.1039/b714449k

[Roomi et al., 2009] Roomi, M. W., Monterrey, J. C., Kalinovsky, T., Rath, M., & Niedzwiecki, A. (2009). Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. Oncology Reports, 21(5). https://doi.org/10.3892/or_00000358

[Roy & Gupta, 2006] Roy, I., & Gupta, M. N. (2006). Bioaffinity Immobilization (pp. 107-116). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-053-9_10

[Roy et al., 2009] Roy, R., Yang, J., & Moses, M. A. (2009). Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 27(31), 5287-5297. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.5556

[Rubin et al., 2014] Rubin, R. L., Wall, D., & Konstantinov, K. N. (2014). Electrochemical biosensor for quantitation of anti-DNA autoantibodies in human serum. Biosensors and Bioelectronics, 51, 177-183. https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.041

[Ruiz-Vega et al., 2018] Ruiz-Vega, G., García-Robaina, A., Ben Ismail, M., Pasamar, H., García-Berrocoso, T., Montaner, J., Zourob, M., Othmane, A., del Campo, F. J., & Baldrich, E. (2018). Detection of plasma MMP-9 within minutes. Unveiling some of the clues to develop fast and simple electrochemical magneto-immunosensors. Biosensors and Bioelectronics, 115, 45-52. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.05.020

S

[Sabatino et al., 2019] Sabatino, J. J., Pröbstel, A.-K., & Zamvil, S. S. (2019). B cells in autoimmune and neurodegenerative central nervous system diseases. Nature Reviews Neuroscience, 20(12), 728-745. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0233-2

[Saif & Chu, 2010] Saif, M. W., & Chu, E. (2010). Biology of Colorectal Cancer. The Cancer Journal, 16(3), 196-201. https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3181e076af

[Salazar-Camarena et al., 2016] Salazar-Camarena, D. C., Ortiz-Lazareno, P. C., Cruz, A., Oregon-Romero, E., Machado-Contreras, J. R., Muñoz-Valle, J. F., Orozco-López, M., Marín-Rosales, M., & Palafox-Sánchez, C. A. (2016). Association of BAFF, APRIL serum levels, BAFF-R, TACI and BCMA expression on peripheral B-cell subsets with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. Lupus, 25(6), 582-592. https://doi.org/10.1177/0961203315608254

[Samanta & Sarkar, 2011] Samanta, D., & Sarkar, A. (2011). Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. Chemical Society Reviews, 40(5), 2567. https://doi.org/10.1039/c0cs00056f

[Sánchez-Tirado et al., 2018] Sánchez-Tirado, E., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2018). Magnetic multiwalled carbon nanotubes as nanocarrier tags for sensitive determination of fetuin in saliva. Biosensors and Bioelectronics, 113. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.056

[Scannevin et al., 2017] Scannevin, R. H., Alexander, R., Haarlander, T. M., Burke, S. L., Singer, M., Huo, C., Zhang, Y.-M., Maguire, D., Spurlino, J., Deckman, I., Carroll, K. I., Lewandowski, F., Devine, E., Dzordzorme, K., Tounge, B., Milligan, C., Bayoumy, S., Williams, R., Schalk-Hihi, C., … Rhodes, K. J. (2017). Discovery of a highly selective chemical inhibitor of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) that allosterically inhibits zymogen activation. Journal of Biological Chemistry, 292(43), 17963-17974. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.806075

[Schmetzer et al., 2021] Schmetzer, O., Lakin, E., Roediger, B., Duchow, A., Asseyer, S., Paul, F., & Siebert, N. (2021). Anti-aquaporin 4 IgG Is Not Associated with Any Clinical Disease Characteristics in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. Frontiers in Neurology, 12. https://doi.org/10.3389/fneur.2021.635419

[Schroeder & Cavacini, 2010] Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125(2), S41-S52. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046

[Schultz, 1982] Schultz, J. S. (1982). Optical sensor of plasma constituents (Patent US43444384).

[Serafín et al., 2019a] Serafín, V., Arévalo, B., Martínez-García, G., Aznar-Poveda, J., Lopez-Pastor, J. A., Beltrán-Sánchez, J. F., Garcia-Sanchez, A. J., Garcia-Haro, J., Campuzano, S., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2019). Enhanced determination of fertility hormones in saliva at disposable immunosensing platforms using a custom designed field-portable dual potentiostat. Sensors and Actuators B: Chemical, 299, 126934. https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126934

[Serafín et al., 2019b] Serafín, V., Valverde, A., Martínez-García, G., Martínez-Periñán, E., Comba, F., Garranzo-Asensio, M., Barderas, R., Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S., & Pingarrón, J. M. (2019). Graphene quantum dots-functionalized multi-walled carbon nanotubes as nanocarriers in electrochemical immunosensing. Determination of IL-13 receptor A2 in colorectal cells and tumor tissues with different metastatic potential. Sensors and Actuators, B: Chemical, 284. https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.012

[Shabani et al., 2020] Shabani, E., Abdekhodaie, M. J., Mousavi, S. A., & Taghipour, F. (2020). ZnO nanoparticle/nanorod-based label-free electrochemical immunoassay for rapid detection of MMP-9 biomarker. Biochemical Engineering Journal, 164, 107772. https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107772

[Sharma et al., 2010] Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., & Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. Journal of advanced pharmaceutical technology & research, 1(2), 109-126.

[Shen et al., 2021] Shen, P., Yang, X., Du, M., & Zhang, H. (2021). Temperature and laser-power dependent Raman spectra of MoS_2/RGO hybrid and few-layered MoS_2. Physica B: Condensed Matter, 604, 412693. https://doi.org/10.1016/j.physb.2020.412693

[Shubik, 1983] Shubik, M. (1983). The strategic audit: A game theoretic approach to corporate competitive strategy. Managerial and Decision Economics, 4(3), 160-171. https://doi.org/10.1002/mde.4090040306

[Sim et al., 2020] Sim, K.-Y., Im, K. C., & Park, S.-G. (2020). The Functional Roles and Applications of Immunoglobulins in Neurodegenerative Disease. International Journal of Molecular Sciences, 21(15), 5295. https://doi.org/10.3390/ijms21155295

[Singh, A. et al., 2021] Singh, A., Sharma, A., Ahmed, A., Sundramoorthy, A. K., Furukawa, H., Arya, S., & Khosla, A. (2021). Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. Biosensors, 11(9), 336. https://doi.org/10.3390/bios11090336

[Singh, S. & Sharma, 2021] Singh, S., & Sharma, S. (2021). MoS2/multiwalled carbon nanotubes-based composite for room-temperature ammonia sensing. Materials Today: Proceedings, 45, 4910-4913. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.364

[Skoog et al., 2005] Skoog, D. a., West, D. M., Holler, F. J., & Couch, S. R. (2005). Fundamentos de Química Analítica. Fundamentos de Química Analítica, 58.

[Song, H. et al., 2018] Song, H., Tang, A., Xu, G., Liu, L., Yin, M., & Pan, Y. (2018). One-step Convenient Hydrothermal Synthesis of MoS2/RGO as a High-performance Anode for Sodium-ion Batteries. International Journal of Electrochemical Science, 13(5), 4720-4730. https://doi.org/10.20964/2018.05.29

[Song, S. et al., 2008] Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C., & Zhao, J. (2008). Aptamer-based biosensors. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 27(2), 108-117. https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.004

[Spychalska et al., 2020] Spychalska, K., Zając, D., & Cabaj, J. (2020). Electrochemical biosensor for detection of 17β-estradiol using semi-conducting polymer and horseradish peroxidase. RSC Advances, 10(15), 9079-9087. https://doi.org/10.1039/C9RA09902F

[Stohl et al., 2003] Stohl, W., Metyas, S., Tan, S., Cheema, G. S., Oamar, B., Xu, D., Roschke, V., Wu, Y., Baker, K. P., & Hilbert, D. M. (2003). B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: Longitudinal observations. Arthritis & Rheumatism, 48(12), 3475-3486. https://doi.org/10.1002/art.11354

[Sun, B. L. et al., 2018] Sun, B.-L., Wang, L., Yang, T., Sun, J., Mao, L., Yang, M., Yuan, H., Colvin, R. A., & Yang, X. (2018). Lymphatic drainage system of the brain: A novel target for intervention of neurological diseases. Progress in Neurobiology, 163-164, 118-143. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.08.007

[Sun, Y. et al., 2018] Sun, Y., Wu, X., Zhang, K., Ren, Q., & Xie, R. (2018). Electrochemiluminescent quaternary Cu-Zn-In-S nanocrystals as a sensing platform: Enzyme-free and sensitive detection of the FLT3 gene based on triple signal amplification. Biosensors and Bioelectronics, 100. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.026

[Suzuki et al., 1975] Suzuki, S., Takahashi, F., Satoh, I., & Sonobe, N. (1975). Ethanol and Lactic Acid Sensors Using Electrodes Coated with Dehydrogenase—Collagen Membranes. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 48(11), 3246-3249. https://doi.org/10.1246/bcsj.48.3246

[Sweeney et al., 2019] Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. Physiological Reviews, 99(1), 21-78. https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017

T

[Taleat et al., 2014] Taleat, Z., Khoshroo, A., & Mazloum-Ardakani, M. (2014). Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). Microchimica Acta, 181(9-10), 865-891. https://doi.org/10.1007/s00604-014-1181-1

[Tampoia et al., 2019] Tampoia, M., Abbracciavento, L., Barberio, G., Fabris, M., & Bizzaro, N. (2019). A new M23-based ELISA assay for anti-aquaporin 4 autoantibodies: diagnostic accuracy and clinical correlation. Autoimmunity Highlights, 10(1), 5. https://doi.org/10.1186/s13317-019-0115-7

[Tan, 2012] Tan, E. M. (2012). Autoantibodies, autoimmune disease, and the birth of immune diagnostics. Journal of Clinical Investigation, 122(11), 3835-3836. https://doi.org/10.1172/JCI66510

[Tani et al., 2014] Tani, C., Carli, L., Vagnani, S., Talarico, R., Baldini, C., Mosca, M., & Bombardieri, S. (2014). The diagnosis and classification of mixed connective tissue disease. Journal of Autoimmunity, 48-49, 46-49. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.01.008

[Toche, 2012] Toche, P. P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. Revista Médica Clínica Las Condes, 23(4), 446-457. https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70335-8

[Torrente-Rodríguez et al., 2013] Torrente-Rodríguez, R. M., Campuzano, S., Gamella, M., Conzuelo, F., Reviejo, A. J., & Pingarrón, J. M. (2013). Label-Free Amperometric Magnetoimmunosensors for Direct Determination of Lactoperoxidase in Milk. Electroanalysis, 25(4), 967–974. https://doi.org/10.1002/elan.201300027

[Torrente-Rodríguez et al., 2017] Torrente-Rodríguez, R. M., Montiel, V. R. V., Campuzano, S., Pedrero, M., Farchado, M., Vargas, E., De Villena, F. J. M., Garranzo-Asensio, M., Barderas, R., & Pingarron, J. M. (2017). Electrochemical sensor for rapid determination of fibroblast growth factor receptor 4 in raw cancer cell lysates. PLoS ONE, 12(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175056

[Treamtrakanpon et al., 2012] Treamtrakanpon, W., Tantivitayakul, P., Benjachat, T., Somparn, P., Kittikowit, W., Eiam-ong, S., Leelahavanichkul, A., Hirankarn, N., & Avihingsanon, Y. (2012). APRIL, a proliferation-inducing ligand, as a potential marker of lupus nephritis. Arthritis Research & Therapy, 14(6), R252. https://doi.org/10.1186/ar4095

[Trindade Ximenes et al., 2021] Trindade Ximenes, I. A., de Oliveira, P. C. O., Wegermann, C. A., & de Moraes, M. C. (2021). Magnetic particles for enzyme immobilization: A versatile support for ligand screening. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 204, 114286. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114286

[Tsang & Tse, 2020] Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. Advances in Anatomic Pathology, 27(1), 27-35. https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232

[Tung et al., 2012] Tung, Y.-C., Huang, N.-T., Oh, B.-R., Patra, B., Pan, C.-C., Qiu, T., Chu, P. K., Zhang, W., & Kurabayashi, K. (2012). Optofluidic detection for cellular phenotyping. Lab on a Chip, 12(19), 3552. https://doi.org/10.1039/c2lc40509a

U

[Ullah et al., 2009] Ullah, M. F., & Aatif, M. (2009). The footprints of cancer development: Cancer biomarkers. Cancer Treatment Reviews, 35(3), 193-200. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.10.004

[Ullah & Mackay, 2023] Ullah, M. A., & Mackay, F. (2023). The BAFF-APRIL System in Cancer. Cancers, 15(6), 1791. https://doi.org/10.3390/cancers15061791

[Updike & Hicks, 1967] Updike, S. J., & Hicks, G. P. (1967). The Enzyme Electrode. Nature, 214(5092), 986-988. https://doi.org/10.1038/214986a0

[Uygun & Ertuğrul Uygun, 2014] Uygun, Z. O., & Ertuğrul Uygun, H. D. (2014). A short footnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors. Sensors and Actuators B: Chemical, 202, 448-453. https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.029

V

[Valenza et al., 2020] Valenza, M., Facchinetti, R., Steardo, L., & Scuderi, C. (2020). Altered Waste Disposal System in Aging and Alzheimer's Disease: Focus on Astrocytic Aquaporin-4. Frontiers in Pharmacology, 10. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01656

[Valverde et al., 2020] Valverde, A., Serafín, V., Montero-Calle, A., González-Cortés, A., Barderas, R., Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S., & Pingarrón, J. M. (2020). Carbon/Inorganic Hybrid Nanoarchitectures as Carriers for Signaling Elements in Electrochemical Immunosensors: First Biosensor for the Determination of the Inflammatory and Metastatic Processes Biomarker RANK-ligand. ChemElectroChem, 7(3), 810-820. https://doi.org/10.1002/celc.201902025

[Van Leeuwen et al., 2021] Van Leeuwen, N. M., Boonstra, M., Bakker, J. A., Grummels, A., Jordan, S., Liem, S., Distler, O., Hoffmann-Vold, A., Melsens, K., Smith, V., Truchetet, M., Scherer, H. U., Toes, R., Huizinga, T. W. J., & de Vries-Bouwstra, J. K. (2021). Anticentromere Antibody Levels and Isotypes and the Development of Systemic Sclerosis. Arthritis & Rheumatology, 73(12), 2338-2347. https://doi.org/10.1002/art.41814

[Vasconcellos et al., 2017] Vasconcellos A, Marken J, Wang T, Lood C, Giltiay NV. Increased Levels of BAFF in SLE Patients Correlates with Neutrophil Activation and Autoantibody Production [abstract]. Arthritis Rheumatol. 2017; 69 (suppl 10). https://acrabstracts.org/abstract/increased-levels-of-baff-in-sle-patients-correlates-with-neutrophil-activation-and-autoantibody-production/. Accessed March 18, 2024.

[Vashist & Luong, 2018] Vashist, S. K., & Luong, J. H. T. (2018). Bioanalytical Requirements and Regulatory Guidelines for Immunoassays. En Handbook of Immunoassay Technologies (pp. 81-95). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811762-0.00004-9

[Venkatesan et al., 2017] Venkatesan, A., Rathi, S., Lee, I., Park, J., Lim, D., Kang, M., Joh, H.-I., Kim, G.-H., & Kannan, E. S. (2017). Molybdenum disulfide nanoparticles decorated reduced graphene oxide: highly sensitive and selective hydrogen sensor. Nanotechnology, 28(36), 365501. https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa7d66

[Vericat et al., 2010] Vericat, C., Vela, M. E., Benitez, G., Carro, P., & Salvarezza, R. C. (2010). Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. Chemical Society Reviews, 39(5), 1805. https://doi.org/10.1039/b907301a

[Verkman et al., 2013] Verkman, A. S., Phuan, P., Asavapanumas, N., & Tradtrantip, L. (2013). Biology of AQP4 and Anti- AQP4 Antibody: Therapeutic Implications for NMO. Brain Pathology, 23(6), 684-695. https://doi.org/10.1111/bpa.12085

[Villalta et al., 2013] Villalta, D., Bizzaro, N., Bassi, N., Zen, M., Gatto, M., Ghirardello, A., Iaccarino, L., Punzi, L., & Doria, A. (2013). Anti-dsDNA Antibody Isotypes in Systemic Lupus Erythematosus: IgA in Addition to IgG Anti-dsDNA Help to Identify Glomerulonephritis and Active Disease. PLoS ONE, 8(8), e71458. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071458

[Vincent et al., 2012] Vincent, F. B., Morand, E. F., & Mackay, F. (2012). BAFF and innate immunity: new therapeutic targets for systemic lupus erythematosus. Immunology & Cell Biology, 90(3), 293-303. https://doi.org/10.1038/icb.2011.111

[Vincent et al., 2013] Vincent, F. B., Bourke, P., Morand, E. F., Mackay, F., & Bossingham, D. (2013). Focus on systemic lupus erythematosus in Indigenous Australians: towards a better understanding of autoimmune diseases. Internal Medicine Journal, 43(3), 227-234. https://doi.org/10.1111/imj.12039

[Vincent et al., 2014] Vincent, F. B., Morand, E. F., Schneider, P., & Mackay, F. (2014). The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. Nature Reviews Rheumatology, 10(6), 365-373. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.33

[Viswananthan & Govindasamy, 2019] Viswananthan, J., & Govindasamy, G. (2019). Biomedical Engineering and its Applications in Healthcare (S. Paul, Ed.). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3705-5

[Voet et al., 2019] Voet, S., Srinivasan, S., Lamkanfi, M., & van Loo, G. (2019). Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. EMBO Molecular Medicine, 11(6). https://doi.org/10.15252/emmm.201810248

[Vu et al., 2018] Vu, H. T., Hoang, T. X., & Kim, J. Y. (2018). All-Trans Retinoic Acid Enhances Matrix Metalloproteinase 2 Expression and Secretion in Human Myeloid Leukemia THP-1 Cells. BioMed Research International, 2018, 1-10. https://doi.org/10.1155/2018/5971080

W

[Wadhera et al., 2019] Wadhera, T., Kakkar, D., Wadhwa, G., & Raj, B. (2019). Recent Advances and Progress in Development of the Field Effect Transistor Biosensor: A Review. Journal of Electronic Materials, 48(12), 7635-7646. https://doi.org/10.1007/s11664-019-07705-6

[Walker et al., 2021] Walker, N. L., Roshkolaeva, A. B., Chapoval, A. I., & Dick, J. E. (2021). Recent advances in potentiometric biosensing. Current Opinion in Electrochemistry, 28, 100735. https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100735

[Wang, G. et al., 2013] Wang, G., Wang, F., Ding, W., Wang, J., Jing, R., Li, H., Wang, X., Wang, Y., Ju, S., & Wang, H. (2013). APRIL Induces Tumorigenesis and Metastasis of Colorectal Cancer Cells via Activation of the PI3K/Akt Pathway. PLoS ONE, 8(1), e55298. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055298

[Wang, J., 2005] Wang, J. (2005). Nanomaterial-Based Amplified Transduction of Biomolecular Interactions. Small, 1(11), 1036-1043. https://doi.org/10.1002/smll.200500214

[Wang, J. & Gu, 2015] Wang, J., & Gu, H. (2015). Novel Metal Nanomaterials and Their Catalytic Applications. Molecules, 20(9), 17070-17092. https://doi.org/10.3390/molecules200917070

[Wang, L. et al., 2015] Wang, L., Wang, F., & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. Journal of Internal Medicine, 278(4), 369-395. https://doi.org/10.1111/joim.12395

[Wang R. X. et al., 2018] Wang, R. X., Chen, S., Huang, L., & Shao, Z. M. (2018). Predictive and prognostic value of Matrix metalloproteinase (MMP) - 9 in neoadjuvant chemotherapy for triple-negative breast cancer patients. BMC Cancer, 18(1), 1-8. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4822-7

[Wang, T. et al., 2013] Wang, T., Zhu, H., Zhuo, J., Zhu, Z., Papakonstantinou, P., Lubarsky, G., Lin, J., & Li, M. (2013). Biosensor Based on Ultrasmall MoS 2 Nanoparticles for Electrochemical Detection of H_2O_2 Released by Cells at the Nanomolar Level. Analytical Chemistry, 85(21), 10289-10295. https://doi.org/10.1021/ac402114c

[Wang, X. & Xia, 2019] Wang, X., & Xia, Y. (2019). Anti-double Stranded DNA Antibodies: Origin, Pathogenicity, and Targeted Therapies. Frontiers in Immunology, 10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01667

[Warakomska et al., 2021] Warakomska, M., Tynecka, M., Lemancewicz, D., Grubczak, K., Dzieciol, J., Moniuszko, M., Eljaszewicz, A., & Bolkun, L. (2021). The effects of BAFF and APRIL signaling on non-small cell lung cancer cell proliferation and invasiveness. Oncology Letters, 22(4), 728. https://doi.org/10.3892/ol.2021.12989

[Wiederschain, 2009] Wiederschain, G. Ya. (2009). The ELISA guidebook. Biochemistry (Moscow), 74(9). https://doi.org/10.1134/s000629790909017x

[Wilson et al., 2006] Wilson, S., Wakelam, M. J., Hobbs, R. F., Ryan, A. V, Dunn, J. A., Redman, V. D., Patrick, F., Colbourne, L., Martin, A., & Ismail, T. (2006). Evaluation of the accuracy of serum MMP-9 as a test for colorectal cancer in a primary care population. BMC Cancer, 6(1), 258. https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-258

[Wong et al., 2009] Wong, L. S., Khan, F., & Micklefield, J. (2009). Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications. Chemical Reviews, 109(9), 4025-4053. https://doi.org/10.1021/cr8004668

[Wu, L. et al., 2022] Wu, L., Li, X., Miao, H., Xu, J., & Pan, G. (2022). State of the art in development of molecularly imprinted biosensors. VIEW, 3(3). https://doi.org/10.1002/VIW.20200170

[Wu, Z. et al., 2008] Wu, Z., Wu, Q., Yang, J., Wang, H., Ding, X., Yang, F., & Xu, X. (2008). Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. International Journal of Cancer, 122(9), 2050-2056. https://doi.org/10.1002/ijc.23337

X

[Xiao, D. et al., 2016] Xiao, D., Lu, T., Zeng, R., & Bi, Y. (2016). Preparation and highlighted applications of magnetic microparticles and nanoparticles: a review on recent advances. Microchimica Acta, 183(10), 2655-2675. https://doi.org/10.1007/s00604-016-1928-y

[Xiao, Z. X. et al., 2019] Xiao, Z. X., Olsen, N., & Zheng, S. G. (2019). The essential role of costimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. Lupus, 28(5), 575-582. https://doi.org/10.1177/0961203319829818

[Xiao, Z. X. et al., 2021] Xiao, Z. X., Miller, J. S., & Zheng, S. G. (2021). An updated advance of autoantibodies in autoimmune diseases. Autoimmunity Reviews, 20(2), 102743. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102743

[Xie et al., 1999] Xie, B., Ramanathan, K., & Danielsson, B. (1999). Principles of Enzyme Thermistor Systems: Applications to Biomedical and Other Measurements (pp. 1-33). https://doi.org/10.1007/3-540-49811-7_1

[Xing & Ma, 2016] Xing, L., & Ma, Z. (2016). A glassy carbon electrode modified with a nanocomposite consisting of MoS2 and reduced graphene oxide for electrochemical simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. Microchimica Acta, 183(1), 257-263. https://doi.org/10.1007/s00604-015-1648-8

[Xu et al., 2020] Xu, J., Miao, H., Wang, J., & Pan, G. (2020). Molecularly Imprinted Synthetic Antibodies: From Chemical Design to Biomedical Applications. Small, 16(27). https://doi.org/10.1002/smll.201906644

Y

[Yaacoub et al., 2016] Yaacoub, K., Pedeux, R., Tarte, K., & Guillaudeux, T. (2016). Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. Cancer Letters, 378(2), 150-159. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.05.012

[Yáñez-Sedeño et al., 2016] Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S., & Pingarrón, J. (2016). Magnetic Particles Coupled to Disposable Screen-Printed Transducers for Electrochemical Biosensing. Sensors, 16(10), 1585. https://doi.org/10.3390/s16101585

[Yokoyama et al., 2016] Yokoyama, J. S., Wang, Y., Schork, A. J., Thompson, W. K., Karch, C. M., Cruchaga, C., McEvoy, L. K., Witoelar, A., Chen, C.-H., Holland, D., Brewer, J. B., Franke, A., Dillon, W. P., Wilson, D. M., Mukherjee, P., Hess, C. P., Miller, Z., Bonham, L. W., Shen, J., … Desikan, R. S. (2016). Association Between Genetic Traits for Immune-Mediated Diseases and Alzheimer Disease. JAMA Neurology, 73(6), 691. https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.0150

[Yoo & Lee, 2010] Yoo, E.-H., & Lee, S.-Y. (2010). Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. Sensors, 10(5), 4558-4576. https://doi.org/10.3390/s100504558

[Yoon et al., 2017] Yoon, J., Lee, T., Bapurao G., B., Jo, J., Oh, B.-K., & Choi, J.-W. (2017). Electrochemical H_2O_2 biosensor composed of myoglobin on MoS_2 nanoparticle-graphene oxide hybrid structure. Biosensors and Bioelectronics, 93, 14-20. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.064

[Yousef et al., 2014] Yousef, E. M., Tahir, M. R., St-Pierre, Y., & Gaboury, L. A. (2014). MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. BMC Cancer, 14(1). https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-609

Z

[Zhang. H. & Miller, 2019] Zhang, H., & Miller, B. L. (2019). Immunosensor-based label-free and multiplex detection of influenza viruses: State of the art. Biosensors and Bioelectronics, 141, 111476. https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111476

[Zhang et al., 2020] Zhang, X., Yao, B., Hu, Q., Hong, Y., Wallace, A., Reynolds, K., Ramsey, C., Maeder, A., Reed, R., & Tang, Y. (2020). Detection of biomarkers in body fluids using bioprobes based on aggregation-induced emission fluorogens. Materials Chemistry Frontiers, 4(9), 2548-2570. https://doi.org/10.1039/D0QM00376J

[Zhao, R. N. et al., 2019] Zhao, R. N., Feng, Z., Zhao, Y.-N., Jia, L.-P., Ma, R.-N., Zhang, W., Shang, L., Xue, Q.-W., & Wang, H.-S. (2019). A sensitive electrochemical aptasensor for Mucin 1 detection based on catalytic hairpin assembly coupled with PtPdNPs peroxidase-like activity. Talanta, 200, 503-510. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.012

[Zhao, S. et al., 1993] Zhao, S., Walker, D. S., & Reichert, W. M. (1993). Cooperativity in the binding of avidin to biotin-lipid-doped Langmuir-Blodgett films. Langmuir, 9(11), 3166-3173. https://doi.org/10.1021/la00035a069

[Zheng et al., 2020] Zheng, J., Song, D., Chen, H., Xu, J., Alharbi, N. S., Hayat, T., & Zhang, M. (2020). Enhanced peroxidase-like activity of hierarchical MoS2-decorated N-doped carbon nanotubes with synergetic effect for colorimetric detection of H2O2 and ascorbic acid. Chinese Chemical Letters, 31(5), 1109-1113. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2019.09.037

[Zhou et al., 2021] Zhou, L., Li, R., Li, X., & Zhang, Y. (2021). One-step selective affinity purification and immobilization of His-tagged enzyme by recyclable magnetic nanoparticles. Engineering in Life Sciences, 21(6), 364-373. https://doi.org/10.1002/elsc.202000093

ANEXO

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A

A	Área *Area*
Ab	Anticuerpo *Antibody*
AbP	Anticuerpo policlonal *Polyclonal antibody*
AbM	Anticuerpo monoclonal *Monoclonal antibody*
ACAs	Anticuerpos frente al centrómero *Anti-centromere antibodies*
AcB	Disolución reguladora acetato *Acetate buffer*
AD	Enfermedad de Alzheimer *Alzheimer's Disease*
AE	Electrodo auxiliar *Auxiliary electrode*
AEDT	Ácido etilendianominotetraacético *Ethylendiaminetetraacetic acid*
AEGC	Grupo del Consenso Americano-Europeo *American-European Consensus Group*
ANAs	Anticuerpos frente a antígenos nucleares *Anti-nuclear antigens antibodies*
AP	Fosfatasa alcalina *Alkaline phosphatase*
APC	Células presentadoras de antígenos *Antigen presenting cells*
APRIL	Ligando inductor de la proliferación *A proliferation-inducing ligand*
AQP4	Acuaporina 4 *Aquaporin-4*
AQP4-Abs	Autoanticuerpos frente a la acuaporina 4 *Anti-aquaporin-4 autoantibodies*
ATCC	Colección americana de cultivos *American Type Culture Collection*

B

B	Señal blanco *Blank signal*
BAFF	Factor activador de células B *B-cell activating factor*
BAFF-R	Receptor de BAFF *BAFF receptor*
b-AQP4	Acuaporina 4 biotinilada *Biotynilated aquaporin-4*
BAW	Onda acústica aparente *Bulk acoustic wave*
BB	Disolución PBS suplementada con caseína 1% (p/v) *Blocking buffer*
BBB	Barrera hematoencefálica *Blood-brain barrier*
BC	Cáncer de mama *Breast cancer*
b-cAb	Anticuerpo de captura biotinilado *Biotinylated capture antibody*
BCMA	Receptor de antígenos de maduración de células B *B-cell maturation antigen receptor*
BCR	Receptor de linfocitos B *B cell receptor*
b-dAb	Anticuerpo de detección biotinilado *Biotinylated detector antibody*
b-dsDNA	DNA de cadena doble biotinilado *Biotinylated double strained DNA*
BFA	Brefeldina A *Brefeldin A*
BQ	*p*-Benzoquinona *p-Benzoquinone*
BSA	Albúmina de suero bovino *Bovine serum albumin*
B&W	Disolución *binding and washing* *Binding and washing buffer*

C

CA	Cronoamperometría *Chronoamperometry*
cAb	Anticuerpo de captura *Capture antibody*
CB	Disolución reguladora carbonato *Carbonate buffer*
CDH-17	Cadherina 17 *Cadherin 17*
C_{DL}	Capacitancia de doble capa *Double-layer capacitance*
CE	Contraelectrodo *Counter electrode*
CENPA	Proteína centromérica A *Centromeric A protein*
CENPA-Abs	Autoanticuerpos frente a la proteína centromérica A *Anti-centromeric A protein autoantibodies*
CENPB	Proteína centromérica B *Centromeric B protein*
CENPB-Abs	Autoanticuerpos frente a la proteína centromérica B *Anti-centromeric B protein autoantibodies*
cIgG/*rIgG*	Inmunoglobulina G de conejo *Rabbit immunoglobulin G*
c-MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados *Carboxylic multi-walled carbon nanotubes*
CNME	Centro Nacional de Microscopía Electrónica *Electron Microscopy National Center*
CNTs	Nanotubos de carbono *Carbon nanotubes*
CRC	Cáncer colorrectal *Colorectal cancer*
CREST	Calcinosis, Raynaud, Esófago, Esclerodactilia, Telangiectasia *Calcinosis, Raynaud, Esophagus, Sclerodactyly, Telangiectases*
CT	Individuo sano/control *Healthy/control individual*
CV	Voltamperometría cíclica *Cyclic voltammetry*

D

Ø	Diámetro *Diameter*
dAb	Anticuerpo de detección *Detector antibody*
DAMP	Patrones moleculares asociados a peligros *Danger-associated molecular patterns*
DMSO	Dimetilsulfóxido *Dimethylsulfoxide*
DNA	Ácido desoxirribonucleico *Deoxyribonucleic acid*
DPV	Voltamperometría diferencial de pulsos *Differential pulse voltammetry*
dsDNA	DNA de cadena doble *Double stranded DNA*
dsDNA-Abs	Autoanticuerpos frente a DNA de cadena doble *Anti-double stranded DNA autoantibodies*

E

E-CDH	E-cadherina *E-cadherin*
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide*
EIS	Espectroscopia de impedancia electroquímica *Electrochemical impedance spectroscopy*
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas *Enzyme-linked immunosorbent assay*
ENAs	Antígenos nucleares extraíbles *Extractable nuclear antigens*
ENAs-Abs	Autoanticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles *Anti-extractable nuclear antigens autoantibodies*
ER	Receptor de estrógenos *Estrogen receptor*
Estrep/ *Strep*	Estreptavidina *Streptavidin*
Estrep-HRP/ *Strep-HRP*	HRP conjugada con estreptavidina *Streptavidin conjugated HRP*
Estrep-MBs/ *Strep-MBs*	Micropartículas magnéticas de estreptavidina *Streptavidin coated magnetic beads*
EVR	Espacios de Virchow Robin *Virchow Robin spaces*

F

Fab	Fragmento de unión a antígeno *Fragment antigen-binding*
Fc	Fragmento cristalizable de los Abs *Fragment crystallizable*
FET	Transistor del efecto de campo *Field effect transistor*

G

GO	Óxido de grafeno *Graphene oxide*
GOx	Glucosa oxidasa *Glucose oxidase*

H

HB	Hemoglobina *Hemoglobin*
HD	Diluyente de HRP-avidina *HRP-avidin diluent*
HER2	Factor de crecimiento epidérmico humano 2 *Human epidermal growth factor receptor 2*
hIg	Inmunoglobulina humana *Human immunoglobulin*
hIgA	Inmunoglobulina A humana *Human immunoglobulin A*
hIgG	Inmunoglobulina G humana *Human immunoglobulin G*
hIgM	Inmunoglobulina M humana *Human immunoglobulin M*
His	Histidina *Histidine*
His-tag	Etiqueta de polihistidinas (6×His) *Polyhistidine tag*
His-tag *isolation*-MBs	Micropartículas magnéticas con un complejo de Co^{+2}-NTA capaz de inmovilizar biomoléculas conjugadas con His-tag *Co^{+2}-NTA complex able to immobilize His-tag conjugated biomolecules magnetic beads*
HLA	Antígenos de linfocitos humanos *Human lymphocyte antigens*
HNPCC	No-poliposis colorrectal hereditaria *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*
HOOC-MBs	Micropartículas magnéticas carboxiladas *Carboxylic acid magnetic beads*
HQ	Hidroquinona *Hydroquinone*
HRP	Peroxidasa de rábano *Horseradish peroxidase*

HS-NTA	N-[Nα,Nα-Bis(carboximetil)-L-lisina]-12-mercaptododecanamida *N-[Nα,Nα-Bis(carboxymethyl)-L-lysine]-12-mercaptododecanamide*

I

IDA	Ácido iminodiacético *Iminodiacetic acid*
Ig	Inmunoglobulina *Immunoglobulin*
IgA	Inmunoglobulina A *Immunoglobulin A*
IgD	Inmunoglobulina D *Immunoglobulin D*
IgE	Inmunoglobulina E *Immunoglobulin E*
IgG	Inmunoglobulina G *Immunoglobulin G*
IgM	Inmunoglobulina M *Immunoglobulin M*
IL-13Rα2	Receptor α-2 de la interleucina-13 *Interleukin-13 receptor α-2*
IR	Infrarrojo *Infrared*
IUPAC	Unión internacional de Química Pura y Aplicada *International Union of Pure and Applied Chemistry*

L

La/SSB	Factor La de protección contra exonucleasas de unión a RNA pequeño *Protective factor La against small RNA-binding exonucleases*
La/SSB-Abs	Autoanticuerpos frente a la proteína La/SSB *Anti-La/SSB protein autoantibodies*
LB	Langmuir y Blodgett *Langmuir and Blodgett*
LE	Lupus eritematoso *Lupus erythematosus*
LETM	Mielitis transversa longitudinal extensa *Longitudinally extensive transverse myelitis*
LOD	Límite de detección *Limit of detection*
LOQ	Límite de cuantificación *Limit of quantification*

M

MBs	Micropartículas magnéticas *Magnetic beads*
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico *2-(N-morpholino)ethanosulfonic acid*
MIP	Polímeros de impronta molecular *Molecular imprinted polymers*
MMP	Metaloproteinasa de matriz *Matrix metalloproteinase*
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz 9 *Matrix metalloproteinase-9*
MOFs	Estructuras metalorgánicas *Metal organic frameworks*
MS	Esclerosis múltiple *Multiple sclerosis*
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple *Multi-walled carbon nanotubes*

N

NA	Neutravidina *Neutravidin*
NA-MBs	Micropartículas magnéticas de neutravidina *Neutravidin coated magnetic beads*
NfL	Cadena ligera del neurofilamento *Neurofilament light chain*
NIH	Institutos nacionales de salud de EE.UU. *National Institutes of Health*
NHS	N-hidroxisuccinimida *N-hydroxysuccinimide*
NHSS	N-hidroxisulfosuccinimida *N-hydroxysulfosuccinimide*
NK	Célula natural asesina *Natural killer cell*
NMO	Neuromielitis óptica *Neuromyelitis optica*
NP-40	Tensioactivo polioxietileno no iónico *Non-ionic polyoxyethylene surfactant*
NPs	Nanopartículas *Nanoparticles*
NTA	Ácido nitrilotriacético *Nitrilotriacetic acid*

P

p-ABA	Ácido 4-aminobenzoico *4-Aminobenzoic acid*
PAGE	Electroforesis de gel de poliacrilamida *Polyacrylamide gel electrophoresis*
PAMP	Patrones moleculares asociados a los patógenos *Pathogen-associated molecular patterns*
PB	Disolución reguladora fosfato *Phosphate buffer*
PBC	Cirrosis biliar primaria *Primary biliary cirrhosis*
PBS	Disolución reguladora fosfato salina *Phosphate-buffered saline*
PBST	Disolución PBS suplementada con Tween 20® *PBS suplemented with Tween 20®*
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa *Polymerase chain reaction*
PFBB	Disolución PBS bloqueante libre de proteínas *Protein-free blocking buffer*
PM	Polimiositis *Polymyositis*
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato *Phorbol 12-myristate 13-acetate*
PMMA	Polimetilmetacrilato *Polymethylmethacrilate*
POC	Punto de atención *Point of care*
PR	Receptor de progesterona *Progesterone receptor*
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones *Pattern recognition receptors*
PVDF	Fluoruro de polivinilideno *Polyvinylidene fluoride*

Q

QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo *Quartz crystal microbalance*
QD	Puntos cuánticos *Quantum dots*

R

RA	Artritis reumatoide *Rheumatoid Arthritis*
R_{CT}	Resistencia a la transferencia de carga *Charge transfer resistance*
RE	Electrodo de (pseudo)referencia *(Pseudo)reference electrode*
rGO	Óxido de grafeno reducido *Reduced graphene oxide*
rIgG/*mIgG*	Inmunoglobulina G de ratón *Mouse immunoglobulin G*
RNA	Ácido ribonucleico *Ribonucleic acid*
Ro/SSA	Proteína de unión a RNA Y *Y RNA-binding protein*
Ro/SSA-Abs	Autoanticuerpos frente a la proteína Ro/SSA *Anti-Ro/SSA protein autoantibodies*
ROC	Característica operativa del receptor *Receiver operating characteristic*
R_S	Resistencia óhmica *Resistance of solution*
RSD	Desviación estándar relativa *Relative standard deviation*

S

S	Señal específica *Specific signal*
SAM	Monocapas autoensambladas *Self-assembled monolayer*
SAW	Onda acústica superficial *Surface acoustic wave*
SD/SB	Diluyente de muestra *Sample diluent*
SDS	Dodecilsulfato sódico *Sodium dodecylsulphate*
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico *Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis*
SEM	Microscopía electrónica de barrido *Scanning electron microscopy*
SLE	Lupus eritematoso sistémico *Systemic lupus erythematosus*
smRNP-Abs	Ribonucleoproteína Smith del Core *Ribonucleoprotein Smith Core*
smRNP-Abs	Autoanticuerpos frente a la smRNP *Anti-Smith ribonucleprotein autoantibodies*
SNC	Sistema nervioso central *Central nervous system*
SNP	Sistema nervioso periférico *Peripheral nervous system*
SPCE	Electrodo serigrafiado de carbono *Screen-printed carbon electrode*
SP_NCE	Electrodo serigrafiado de carbono con N electrodos de trabajo *Screen-printed carbon electrode with N working electrodes*
SPE	Electrodo serigrafiado *Screen-printed electrode*
SP_NE	Electrodo serigrafiado con N electrodos de trabajo *Screen-printed electrode with N working electrodes*
SPR	Resonancia de plasmón superficial *Surface plasmon resonance*
SS	Síndrome de Sjögren *Sjögren's Syndrome*
SSc	Síndrome de CREST *CREST Syndrome*

T

TA/RT	Temperatura ambiente *Room temperature*
TACI	Receptor activador transmembrana e interaccionador del ligando ciclifilina *Transmembrane activator and cyclophylin ligand interactor*
TCR	Receptor de linfocitos T *T cell receptor*
TDP-43	Proteína humana de unión al DNA de respuesta transactiva de 43 kDa *Transactive response DNA binding protein of 43 kDa*
TEM	Microscopía electrónica de transmisión *Transmision electronic microscopy*
TMB	3,3´,5,5´-tetrametilbenzidina *3,3´,5,5´-tetramethylbenzidine*
TNBC	Cáncer de mama triple negativo *Triple negative breast cancer*
TNF	Factor de necrosis tumoral *Tumour necrosis factor*
TNFα	Factor α de necrosis tumoral *Tumour necrosis factor α*
TNM	Tumor, ganglios y metástasis *Tumour, nodes and metastasis*
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano *Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane*

U

UCM	Universidad Complutense de Madrid *University Complutense of Madrid*
U1RNP70	Subunidad 70k de la ribonucleoproteína U1 nuclear pequeña *Small nuclear U1 ribonucleoprotein subunit 70*
U1RNP70-Abs	Autoanticuerpos frente a U1RNP70 *Anti-U1RNP70 autoantibodies*
UV	Ultravioleta *Ultraviolet*

V

ν	Velocidad de barrido *Scan speed*

W

WB	*Western blot*
WB_X	Disolución de lavado *Wash buffer*
WE	Electrodo de trabajo *Working electrode*
W_0	Resistencia de difusión (elemento Warburg) *Diffusion resistance (Warburg element)*

CONTRIBUCIÓN, DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

La significancia y calidad de las investigaciones llevadas a cabo durante esta Tesis Doctoral han resultado en la publicación de 8 artículos científicos, como primera autora en todos ellos, en revistas de medio–alto impacto, 6 de ellos indexados en JCR: 4 en Q1 y 2 en Q2. Estos artículos de investigación se enumeran a continuación, al igual que se aportan al final de esta Memoria. Es importante destacar también que el artículo número 8 fue destacado en portada de revista.

Publicaciones científicas

1. **B. Arévalo**, V. Serafín, M. Sánchez-Paniagua, A. Montero-Calle, R. Barderas, B. López-Ruíz, S. Campuzano*, P. Yáñez-Sedeño*, J. M. Pingarrón. Fast and sensitive diagnosis of autoimmune disorders through amperometric biosensing of serum anti-dsDNA autoantibodies. *Biosensors and Bioelectronics*, 160 (2020) 112233. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112233.
   Factor de impacto (2020): 10.618
   Posición en JCR (2020): 3/83 (Chemistry, analytical) – T1-Q1-D1.

2. **B. Arévalo**[a], A. ben-Hassine[a], A. Valverde, V. Serafín, A. Montero-Calle, N. Raouafi, J. Camps, M. Arenas, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño*, S. Campuzano*, J. M. Pingarrón. Electrochemical immunoplatform to assist in the diagnosis and classification of breast cancer through the determination of matrix-metalloproteinase-9. *Talanta*, 225 (2021) 122054. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.122054. [a]*Igual contribución*.
   Factor de impacto (2021): 6.556
   Posición en JCR (2021): 11/87 (Chemistry, analytical) – T1-Q1-D2.

3. **B. Arévalo**, M. Blázquez, V. Serafín, A. Montero-Calle, M. Calero, A. Valverde, R. Barderas, S. Campuzano*, P. Yáñez-Sedeño*, J. M. Pingarrón. Unraveling autoimmune and neurodegenerative diseases by amperometric serological detection of antibodies against aquaporin-4. *Bioelectrochemistry*, 144 (2022) 108041. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2021.108041.
   Factor de impacto (2021): 5.760
   Posición en JCR (2021): 81/297 (Biochemistry & molecular biology) – D1-T1-Q2.

4. **B. Arévalo**, M. Blázquez-García, A. Valverde, V. Serafín, A. Montero-Calle, G. Solís-Fernández, R. Barderas, S. Campuzano*, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. Binary MoS_2 nanostructures as nanocarriers for amplification in multiplexed electrochemical immunosensing: simultaneous determination of B cell activation factor and proliferation-induced signal immunity related cytokines. *Microchimica Acta*, 189 (2022) 143. DOI: 10.1007/s00604-022-05250-4.
   Factor de impacto (2021): 6.402
   Posición en JCR (2021): 13/87 (Chemistry, analytical) – D1-T1-Q1.

5. **B. Arévalo**, M. Blázquez-García, A. Valverde, V. Serafín, A. Montero-Calle, G. Solís-Fernández, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño*, S. Campuzano*, J. M. Pingarrón. Simultaneous electrochemical immunosensing of relevant cytokines to diagnose and track cancer and autoimmune diseases. *Bioelectrochemistry*, 146 (2022) 108157. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108157.
   Factor de impacto (2022): 5.0
   Posición en JCR (2021): 84/285 (Biochemistry & molecular biology) – D1-T1-Q2.

6. **B. Arévalo**, V. Serafín, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas*, P. Yáñez-Sedeño*, S. Campuzano*, J. M. Pingarrón. Early and differential autoimmune diseases diagnosis by interrogating specific autoantibody signatures with multiplexed electrochemical bioplatforms. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 13 (2023) 100325. DOI: 10.1016/j.biosx.2023.100325.
   Revista de acceso abierto y reciente creación sin indexar todavía en JCR.

7. **B. Arévalo**, V. Serafín, M. Garranzo-Asensio, A. Montero-Calle, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño*, S. Campuzano*, J. M. Pingarrón. Anti-double stranded DNA antibodies: Electrochemical isotyping in autoimmune and neurological diseases. *Analytica Chimica Acta*, 1257 (2023) 341153. DOI: 10.1016/j.aca.2023.341153.
   Factor de impacto (2022): 6.2
   Posición en JCR (2022): 8/86 (Chemistry, analytical) – D1-T1-Q1.

8. **B. Arévalo**, M. Blázquez-García, A. Valverde, V. Serafín, P. Yáñez-Sedeño*, S. Campuzano*, J. M. Pingarrón*. First electrochemical bioplatforms to determine anti-centromere B antibodies: critical comparison between integrated and magnetic bead-assisted strategies using His-tag chemistry. *Sensors & Diagnostics*, (2023). DOI: 10.1039/d2sd00193d.
   Revista de acceso abierto y reciente creación sin indexar todavía en JCR.
   Artículo destacado en Portada.

Asimismo, durante estos años de carrera investigadora también se han realizado estudios paralelos en los mismos y otros ámbitos clínicos que han derivado en 8 publicaciones científicas más, 4 de ellas como primera autora. 7 de los artículos fueron desarrollados en el Grupo de Investigación de Electroanálisis y (Bio)Sensores Electroquímicos (GEBE) del departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, relacionadas con hormonas de fertilidad, enfermedades neurodegenerativas, procesos alérgicos por intolerancias alimentaria, mientras que el artículo número 16 surgió de la estancia internacional realizada en el Grupo de Investigación *Nanobioelectronics* dirigido por el Prof. Joseph Wang del departamento de *NanoEngineering* del centro *Jacobs School of Engineering* de la Universidad California-San Diego, relacionado con la diabetes. A excepción de la publicación número 13, todas ellas fueron indexadas en JCR. Además, los artículos 12, 13 y 15 fueron destacados en las portadas de sus revistas.

9. V. Serafín[a], **B. Arévalo**[a], G. Martínez-García, J. Aznar-Poveda, J. A. López-Pastor, J. F. Beltrán-Sánchez, A. J. García-Sánchez, J. García-Haro, S. Campuzano*, P. Yáñez-Sedeño*, J. M. Pingarrón. Enhanced determination of fertility hormones in saliva at disposable immunosensing platforms using a custom designed field-portable dual potentiostat. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 299 (2019) 126934. DOI: 10.1016/j.snb.2019.126934. *[a]Igual contribución*.
   Factor de impacto (2019): 7.1
   Posición en JCR (2020): 4/86 (Chemistry, analytical) – D1-T1-Q1.

10. **B. Arévalo**, V. Serafín, S. Campuzano*, P. Yáñez-Sedeño*, J. M. Pingarrón. Multiplexed determination of fertility-related hormones in saliva using amperometric immunosensing. *Electroanalysis*, 33 (2021) 2096-2104. DOI: 10.1002/elan.202100129.
   Factor de impacto (2021): 3.077
   Posición en JCR (2021): 46/87 (Chemistry, analytical) – D2-T2-Q3.

11. **B. Arévalo**, V. Serafín, S. Campuzano*, P. Yáñez-Sedeño*, J. M. Pingarrón. Electrochemical immunosensor for the determination of prolactin in saliva and breast milk. *Microchemical Journal*, 169 (2021) 106589. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106589.
   Factor de impacto (2021): 5.304
   Posición en JCR (2021): 17/87 (Chemistry, analytical) – D1-T1-Q1.

12. **B. Arévalo**, V. Serafín, J. F. Beltrán-Sánchez, J. Aznar-Poveda, J. A. López-Pastor, A. J. García-Sánchez, J. García-Haro, S. Campuzano*, P. Yáñez-Sedeño*, J. M. Pingarrón. Simultaneous determination of four fertility-related hormones in saliva using disposable multiplexed immunoplatforms coupled to a custom-designed and field-portable potentiostat. *Analytical Methods*, 13 (2021) 3471. DOI: 10.1039/d1ay0107ac.
Factor de impacto (2021): 3.532
Posición en JCR (2021): 34/87 (Chemistry, analytical) – D1-T2-Q2.
Artículo destacado en Portada.

13. A. Valverde[a], A. Montero-Calle[a], **B. Arévalo**, P. San Segundo-Acosta, V. Serafín, M. Alonso-Navarro, G. Solís-Fernández, J. M. Pingarrón*, S. Campuzano*, R. Barderas*. Phage-derived and aberrant HaloTag peptides immobilized on magnetic microbeads for amperometric biosensing of serum autoantibodies and Alzheimer's disease diagnosis. *Analysis & Sensing*, 1 (2021) 161-165. [a]*Igual contribución*.
Revista pendiente de indexar.
Artículo destacado en Portada.

14. M. Blázquez-García, **B. Arévalo**, V. Serafín, S. Benedé, L. Mata, P. Galán-Malo, I. Segura-Gil, M. D. Pérez, J. M. Pingarrón, S. Campuzano*. Ultrasensitive detection of soy traces by immunosensing of glycinin and β-conglycinin at disposable electrochemical platforms. *Talanta*, 241 (2022) 123226. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123226.
Factor de impacto (2022): 6.1
Posición en JCR (2022): 9/86 (Chemistry, analytical) – D1-T1-Q1.

15. A. Valverde[a], J. M. Gordón-Pidal[a], A. Montero-Calle, **B. Arévalo**, V. Serafín, M. Calero, M. Moreno-Guzmán, M. A. López, A. Escarpa*, P. Yáñez-Sedeño*, R. Barderas*, S. Campuzano*, J. M. Pingarrón*. Paving the way for reliable Alzheimer's disease blood diagnosis by quadruple electrochemical immunosensing. *ChemElectroChem*, 9 (2022) e202200055.
Factor de impacto (2022): 4.0
Posición en JCR (2022): 14/30 (Electrochemistry) – D5-T2-Q2.
Artículo destacado en Portada.

16. P. Nandhakumar, C. Muñoz San Martín, **B. Arévalo**, S. Ding, M. Lunker, E. Vargas, O. Djassemi, S. Campuzano, J. Wang*. Redox cycling amplified electrochemical lateral-flow immunoassay: Toward decentralized sensitive insulin detection. *ACS Sensors*, 8 (2023) 3892-3901.
Factor de impacto (2022): 8.9
Posición en JCR (2022): 4/86 (Chemistry, analytical) – D1-T1-Q1.

Los trabajos de investigación realizados durante esta Tesis Doctoral han resultado en 22 comunicaciones en congresos y reuniones de investigación científica nacionales e internacionales. Cabe destacar que una comunicación tipo póster (número 14) fue reconocida con premio a la mejor comunicación tipo póster.

Comunicaciones presentadas en eventos y reuniones científicos

1. **B. Arévalo**. *Handheld biosensors at the crossroads of early autoimmune disorders diagnosis*. Comunicación oral-flash presentada por B. Arévalo en la III Edition of Brain Wars: The future is in your hands, online (27 de noviembre de 2020).

2. **B. Arévalo**, A. ben-Hassine, A. Valverde, V. Serafín, A. Montero-Calle, N. Raouafi, J. Camps, M. Arenas, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Emerging handheld immunoplatform for aggressive breast cancer discrimination*. Comunicación póster presentada por B. Arévalo en el 3rd European Biosensor Symposium, online (9–12 de marzo de 2021).

3. V. Serafín, **B. Arévalo**, M. Sánchez-Paniagua, A. Montero-Calle, R. Barderas, B. López-Ruíz, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Faster and sensitive amperometric biosensor for detection of autoimmune disorders through serum autoantibodies determination*. Comunicación oral presentada por V. Serafín en el 41st Meeting of the Electrochemistry Group of the Spanish Royal Society of Chemistry (RSEQ), París, Francia (6–9 de julio de 2021).

4. **B. Arévalo**, A. Valverde, V. Serafín, A. Montero-Calle, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Electrochemical immunosensor for diagnosis of neurodegenerative diseases*. Comunicación oral-flash presentada por B. Arévalo en la V Jornada de Promoción de la Investigación Básica para Estudiantes de Ciencias e Ingenierías, Madrid, España (8 de septiembre de 2021).

5. **B. Arévalo**, A. Valverde, V. Serafín, M. Sánchez-Paniagua, A. Montero-Calle, R. Barderas, B. López-Ruíz, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Unravelling autoimmune diseases with novel electrochemical bioplatforms*. Comunicación póster presentada por B. Arévalo en el RSEQ Symposium 2021, online (27–30 de septiembre de 2021).

6. **B. Arévalo**. *Electrochemical biosensor able to diagnose and shed light on cancer and autoimmune diseases*. Comunicación oral presentada por B. Arévalo en la 5ª Convocatoria EDUCM PhDay Complutense, Madrid, España (7 de octubre de 2021).

7. **B. Arévalo**, A. Valverde, M. Blázquez, A. Montero-Calle. V. Serafín, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Unmasking cancer and autoimmune diseases by amperometric immunosensing of candidate transmembrane cytokines*. Comunicación oral presentada por B. Arévalo en la IV Edition of Brain Wars: The future is in your hands, online (19 de noviembre de 2021).

8. **B. Arévalo**. I Edición Divulgando con el JIQ en 3 minutos, vídeo (11 de febrero de 2022).

9. **B. Arévalo**. *Desarrollo de herramientas analíticas sensibles y rápidas para la detección y seguimiento de enfermedades neurodegenerativas.* Comunicación oral-flash presentada por B. Arévalo en Tesis en 3 minutos, Madrid, España (19 de mayo de 2022).

10. **B. Arévalo**, A. Valverde, M. Blázquez-García, A. Montero-Calle, V. Serafín, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Uncovering autoimmune disorders by electrochemical biosensors*. Comunicación póster presentada por B. Arévalo en el 18th International Conference on Electroanalysis (ESEAC) 2022, Vilna, Lituania (5–9 de junio de 2022).

11. V. Serafín, **B. Arévalo**, M. Blázquez-García, A. Valverde, A. Montero-Calle, G. Solís-Fernández, R. Barderas, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Binary MoS_2 hybrid nanocarriers for efficient immunosensing of cancer and autoimmune diseases candidate biomarkers*. Comunicación póster presentada por V. Serafín en el Matrfured'22 International Conference on Chemical Sensors, Visegrád, Hungría (12–17 de junio de 2022).

12. **B. Arévalo**, M. Blázquez-García, A. Valverde, V. Serafín, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *First electrochemical immunoplatforms for interrogating anti-centromere antibodies, markers of immune abnormalities*. Comunicación oral presentada por B. Arévalo en el 3rd Workshop Electrobionet "Electrochemical sensors and biosensors" y TransNanoAvansens, Madrid, España (23–24 de junio de 2022).

13. **B. Arévalo**, M. Blázquez-García, A. Valverde, A. Montero-Calle, V. Serafín, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Researching and linking autoimmune diseases and cancer with electrochemical biosensors.* Comunicación oral presentada por B. Arévalo en el 3rd Workshop Electrobionet "Electrochemical sensors and biosensors" y TransNanoAvansens, Madrid, España (23–24 de junio de 2022).

14. **B. Arévalo**, A. Valverde, M. Blázquez García, A. Montero Calle, V. Serafín, R. Barderas, P. Yáñez Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Multiplexed electrochemical biosensors for autoimmune diseases discovery*. Comunicación póster presentada por B. Arévalo en la XXXVIII Reunión Bienal de la RSEQ, Granada, España (27–30 de junio de 2022).
    Premio a mejor comunicación póster.

15. V. Serafín, **B. Arévalo**, M. Blázquez-García, A. Valverde, A. Montero-Calle, G. Solís-Fernández, R. Barderas, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Unmasking cancer and autoimmune diseases by exploiting binary MoS_2 nanostructures as nanocarriers for signal amplification in a dual electrochemical immunoplatform*. Comunicación póster presentada por V. Serafín en la I Reunión Científica del Grupo Especializado en Ciencia y Tecnologías (Bio)Analíticas (GCTbA 2022), Granada, España (29 de junio de 2022).

16. **B. Arévalo**. *Visibilizando enfermedades autoinmunes con biosensores electroquímicos*. Comunicación oral presentada por B. Arévalo en el VI Simposio Anual en Química Avanzada (SAQA), Madrid, España (20 de julio de 2022).

17. V. Serafín, **B. Arévalo**, M. Blázquez-García, A. Valverde, M. Garranzo-Asensio, A. Montero-Calle, G. Solís-Fernández, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Novel hybrid nanocarriers for amplification in multiplexed electrochemical immunodetection to unravel autoimmune disease and cancer*. Comunicación póster presentada por V. Serafín en la X International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology (NYNA), Ciudad Real, España (5–8 de septiembre de 2022).

18. S. Campuzano, R. Barderas, E. Povedano, R. M. Torrente-Rodríguez, A. Montero-Calle, G. Solís-Fernández, M. Gamella, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, A. Valverde, **B. Arévalo**, V. Serafín, M. Pedrero, J. M. Pingarrón. *State-of-the-art electroanalytical biotools knocking at the door of the long-awaited precision medicine*. Comunicación oral presentada por S. Campuzano en el 73rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, online (12–16 de septiembre de 2022).

19. **B. Arévalo**. *Herramientas bio-electroquímicas para desenmascarar enfermedades autoinmunes*. Comunicación oral presentada por B. Arévalo en la 6ª Convocatoria EDUCM PhDay Complutense, Madrid, España (6 de octubre de 2022).

20. S. Campuzano, R. Barderas, E. Povedano, R.M. Torrente-Rodríguez, A. Montero-Calle, G. Solís-Fernández, M. Gamella, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, A. Valverde, **B. Arévalo**, V. Serafín, M. Pedrero, J. M. Pingarrón. *Herramientas (nano)bioelectroanalíticas: acercando al presente la medicina personalizada del futuro.* Comunicación plenaria presentada por S. Campuzano en el V Congreso Colombiano de Electroquímica, online (4–8 octubre de 2022).

21. **B. Arévalo**. *Inmunoplataformas electroquímicas que explotan la química del His-tag en formatos integrados y asistidos por el empleo de micropartículas magnéticas para la determinación de anticuerpos de relevancia clínica.* Comunicación oral presentada por B. Arévalo en la Jornada científica sobre nuevas plataformas sensoras miniaturizadas Electrobionet, Burgos, España (25 de noviembre de 2022).

22. V. Serafín, **B. Arévalo**, A. Montero-Calle, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, S. Campuzano. *Early and differential diagnosis of chronic diseases by multiplexed electrochemical interrogation of the humoral immune response*. Comunicación oral presentada por V. Serafín en la II Reunión Científica del Grupo Especializado en Ciencia y Tecnologías (Bio)Analíticas, Zaragoza, España (27–28 de junio de 2023).

Igualmente, los trabajos de investigación paralelos realizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han resultado en 11 comunicaciones a eventos y reuniones de investigación científica nacionales e internacionales. Cabe destacar que una comunicación tipo póster (número 24) fue reconocida con premio a la mejor comunicación tipo póster.

23. **B. Arévalo**, V. Serafín, G. Martínez-García, J. Aznar-Poveda, J. A. López-Pastor, J. F. Beltrán-Sánchez, A. J. García-Sánchez, J. García-Haro, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Development of an electrochemical immunosensing platform for the simultaneous determination of fertility-related hormones in saliva*. Comunicación oral presentada por B. Arévalo en la II Edition of Brain Wars: The future is in your hands, Madrid, España (18 de octubre de 2019).

24. **B. Arévalo**, V. Serafín, J. F. Beltrán-Sánchez, J. Aznar-Poveda, A. J. García-Sánchez, J. García-Haro, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño y J. M. Pingarrón. *Electrochemical multiplatform for the detection of fertility-related hormones in saliva*. Comunicación póster presentada por B. Arévalo en el 41st Meeting of the Electrochemistry Group of the Spanish Royal Society of Chemistry, París, Francia (6–9 de julio de 2021).
Premio a mejor comunicación póster.

25. A. Valverde, **B. Arévalo**, V. Serafín, A. Montero-Calle, R. Barderas, M. Calero, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Electrochemical immunosensing platforms for early diagnosis and follow-up of neurodegenerative disorders*. Comunicación oral presentada por A. Valverde en el RSEQ Symposium 2021, online (27–30 de septiembre de 2021).

26. M. Blázquez-García, **B. Arévalo**, V. Serafín, S. Benedé, L. Mata, P. Galán-Malo, I. Segura-Gil, M. D. Pérez, J. M. Pingarrón, S. Campuzano. *Helping people with food allergy: Electrochemical immunoplatforms capable of detecting trace amounts of soy in foods*. Comunicación oral presentada por M. Blázquez-García en la IV Edition of Brain Wars: The future is in your hands, online (19 de noviembre de 2021).

27. M. Blázquez-García, **B. Arévalo**, V. Serafín, S. Benedé, L. Mata, P. Galán-Malo, I. Segura-Gil, M. D. Pérez, J. M. Pingarrón, S. Campuzano. *Detection of traces of one of the "big eight" food allergens using a disposable multi-format bioelectroanalytical tool*. Comunicación oral-flash presentada por M. Blázquez-García en la VI Jornada de Promoción de la Investigación Básica para Estudiantes de Ciencias e Ingenierías, Madrid, España (2–3 de junio de 2022).

28. A. Valverde, J. M. Gordón-Pidal, A. Montero-Calle, **B. Arévalo**, V. Serafín, M. Calero, M. Moreno-Guzmán, M. A. López, A. Escarpa, P. Yáñez-Sedeño, R. Barderas, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Reliable Alzheimer's disease diagnosis by quadruple electrochemical immunosensing in blood*. Comunicación póster presentada por A. Valverde en el 18th International Conference on Electroanalysis (ESEAC) 2022, Vilna, Lituania (5–9 junio de 2022).

29. A. Valverde, J. M. Gordón-Pidal, **B. Arévalo**, A. Montero-Calle, P. San Segundo-Acosta, G. Solís-Fernández, V. Serafín, M. Moreno-Guzmán, M. A. López, M. Calero, A. Escarpa, P. Yáñez-Sedeño, R. Barderas, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Reliable blood-based diagnosis of Alzheimer's disease by exploiting conventional and novel bioreceptors in multiplexed electrochemical immunoplatforms*. Comunicación oral presentada por A. Valverde en el 3rd Workshop Electrobionet "Electrochemical sensors and biosensors" y TransNanoAvansens, Madrid, España (23–24 de junio de 2022).

30. A. Valverde, A. Montero-Calle, **B. Arévalo**, P. San Segundo-Acosta, V. Serafín, M. Alonso-Navarro, G. Solís-Fernández, J. M. Pingarrón, S. Campuzano, R. Barderas. *Diagnosis of Alzheimer's disease by amperometric biosensing of serum autoantibodies using phage-derived peptides*. Comunicación póster presentada por A. Valverde en la XXXVIII Reunión Bienal de la RSEQ, Granada, España (27–30 junio de 2022).

31. M. Blázquez García, **B. Arévalo**, V. Serafín, S. Benedé, L. Mata, P. Galán Malo, I. Segura Gil, M.D. Pérez, J. M. Pingarrón, S. Campuzano. *Fast and sensitive electrochemical immunoplatforms for detecting traces of soy in food*. Comunicación póster presentada por M. Blázquez-García en la XXXVIII Reunión Bienal de la RSEQ, Granada, España (27–30 junio de 2022).

32. V. Serafín, M. Blázquez-García, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Benedé, E. Molina, M. Gamella, **B. Arévalo**, L. Mata, P. Galán-Malo, I. Segura-Gil, J. M. Pingarrón y S. Campuzano. *Electroanalytical biotools to advance food allergy at different molecular levels*. Comunicación oral presentada por V. Serafín en el 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Ankara, Turquía (2–6 de julio de 2023).

33. M. Blázquez-García, V. Serafín, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Benedé, E. Molina, M. Gamella, **B. Arévalo**, L. Mata, P. Galán-Malo, I. Segura-Gil, J. M. Pingarrón, S. Campuzano. *Tracking lesser-known allergenic proteins and carbohydrates with electrochemical bioplatforms*. Comunicación oral presentada por M. Blázquez-García en la II Reunión Científica del Grupo Especializado en Ciencia y Tecnologías (Bio)Analíticas, Zaragoza, España (27–28 de junio de 2023).

PUBLICACIONES – PUBLISHED PAPERS

A continuación se incluyen los PDFs de las publicaciones en las que han derivado los resultados de las investigaciones abordadas en esta Tesis Doctoral.

Biosensors and Bioelectronics 160 (2020) 112233

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-Ruíz [b], Susana Campuzano [a,**], Paloma Yáñez-Sedeño [a,*], José M. Pingarrón [a]

[a] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria S/N, 28040, Madrid, Spain
[b] Department of Chemistry in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria S/N, 28040, Madrid, Spain
[c] Chronic Disease Progamme, UFIEC, Institute de Salud Carlos III, 28220, Majadahonda, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Electrochemical biosensor
anti-dsDNA autoantibodies
Magnetic microbeads
Screen-printed carbon electrodes
rheumatoid Arthritis

ABSTRACT

This work reports the first amperometric biosensor involving the use of neutravidin-functionalized magnetic microbeads (NA-MBs) modified with a biotinylated-anti-dsDNA (b-dsDNA) as efficient magnetic microcarriers to selectively capture anti-dsDNA autoantibodies (IgG, IgA and IgM AAbs) present in the sera of patients with rheumatoid arthritis (RA). Subsequently, the attached anti-dsDNA AAbs are detected with a mixture of conventional HRP-labeled secondary antibodies (HRP-anti-human IgG/IgM/IgA mixture). The biorecognition event is monitored by amperometric transduction using the hydroquinone (HQ)/H_2O_2 system upon capturing the modified MBs on the surface of screen-printed carbon electrodes (SPCEs). The developed bioplatform exhibits a linear calibration plot ranging from 1 to 200 IU mL^{-1} with a LOD of 0.3 IU mL^{-1} for anti-dsDNA AAbs standards. In addition, the biosensor allows performing the determination of the anti-dsDNA AAbs levels directly in 100-times diluted serum samples from patients diagnosed with RA and in just 75 min. The obtained results are in agreement with those provided by an ELISA kit and allow discrimination between positive and negative samples.

1. Introduction

Autoimmune diseases are characterized by the presence of autoantibodies (AAbs) that react against own antigenic structures. Among AAbs, a prominent place is that of antinuclear antibodies (ANAs) that recognize autologous cellular components (nuclear and cytoplasmic). ANAs are reactive against histones, nucleosomes, single (ss) and double (ds) strand DNA, and other nuclear antigens and have been widely used for the diagnosis of autoimmune disease (Conigliaro et al., 2016; Bizzaro et al., 2018). Belonging to ANAs, AAbs to native desoxyribonucleic acids are well-recognized diagnostic markers of Systemic Lupus Erythematosus (SLE), and their serum concentration is positively correlated to the severity of the disease. These antibodies were later found in patients with other inflammatory autoimmune diseases, as rheumatoid arthritis (RA), chronic active hepatitis or pancreatic cirrhosis (Cabiedes and Nuñez-Alvarez, 2010; Bai et al., 2017; Infantino et al., 2018; Wang and Xia, 2019). Additionally, different studies showed the increased level of anti-dsDNA AAbs in patients with RA treated with biological compounds (Eriksson et al., 2005; Yukawa et al., 2011).

A variety of methods for the detection of anti-dsDNA AAbs are described in the literature. The indirect immunofluorescence test is the reference method to screen for ANAs in patients with autoimmune diseases (Karamehic et al., 2007; Coople et al., 2012; Bizarro et al., 2018). Nevertheless, this technique requires complex instrumentation, is not compatible with decentralized analysis or point-of-care applications and is prone to false positive results. Methods using enzyme linked inmmunosorbent assays (ELISAs) for AAbs against dsDNA have been reported also (Janyapoon et al., 2005; Biesen et al., 2011), and, nowadays, different ELISA kits applicable for human serum or plasma are commercially available. For example, the anti-dsDNA AAbs ELISA kit of Creative Diagnostics is an indirect solid phase immunoassay involving well-coated human recombinant double-stranded DNA (dsDNA) and

* Corresponding author.
** Corresponding author.
E-mail addresses: susanacr@ucm.es (S. Campuzano), yseo@quim.ucm.es (P. Yáñez-Sedeño).
[1] These authors have contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112233
Received 20 March 2020; Received in revised form 19 April 2020; Accepted 20 April 2020
Available online 23 April 2020
0956-5663/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

peroxidase-labeled IgG/M/A. This kit provides a non-linear calibration plot between 12.5 and 200 UI mL^{-1} anti-dsDNA with RSD values of 6.4% and 12.4% for intra-assays and inter-assays, respectively. The total assay time is 75 min. It is worth to remark that, although the ELISA methodology is long adopted in centralized laboratories, this technique is not compatible with multiplexed determinations and its implementation requires relatively expensive instrumentation (ELISA plate readers), hardly portable and miniaturizable.

In this context, the excellent inherent analytical characteristics of electrochemical biosensors, such as high sensitivity and selectivity, have positioned them as an attractive alternative for the detection of clinically relevant analytes. However, in the particular case of anti-dsDNA human antibodies, only one electrochemical biosensor has been reported to date (Rubin et al., 2014). It is a flow-through biosensor involving immobilization of native dsDNA on a porous membrane coupled to an eight-electrodes array. The biosensor provided a LOD value for anti-dsDNA human IgGs of 10 μg mL^{-1}. The assay time was 30 min and the biosensor was employed to perform the determination in 200 μL of 50-times diluted human serum samples of patients diagnosed with SLE. However, the preparation of the dsDNA coated membrane took ~16 h which is an important limitation of that strategy. Moreover, it is also important to mention that quantitative levels of anti-dsDNA antibodies in the samples were not provided but only the measured electrochemical currents. More recently, another electrochemical biosensor prepared by constant potential deposition of dsDNA onto SPCE has been reported for the determination of mouse (not human) anti-dsDNA antibodies (Fagúndez et al., 2018). This biosensor is able to perform the determination in a single 30-min step with a LOD of 8 μg mL^{-1} and was used for the determination in adult mouse 80-times diluted serum samples. It is important to note that both biosensors determined a single immunoglobulins (Igs) isotype (IgG) of anti-dsDNA antibodies and required a high amount of dsDNA to modify the porous membrane (90 μg) (Rubin et al., 2014) or the SPCE (20 μg) (Fagúndez et al., 2018).

This paper reports a fast and simple amperometric biosensing approach for the reliable determination of the three most common isotypes of Igs (IgG, IgM and IgA) AAbs against dsDNA in human serum samples. The biosensor involves for the first time the use of neutravidin-functionalized magnetic microparticles (NA-MBs) modified with a small amount of biotinylated-human dsDNA (b-dsDNA, 100 ng) prepared in the lab from human plasmid, as efficient magnetic microcarriers to selectively capture the target AAbs present in sera. Subsequently, the attached AAbs are detected with a commercial mixture of conventional HRP-labeled secondary antibodies for human IgG, IgA and IgM. The biorecognition event is monitored using amperometric transduction at −0.20 V (*vs* the Ag pseudoreference electrode) with the hydroquinone (HQ)/H_2O_2 system upon capturing the modified MBs on the surface of screen-printed carbon electrodes (SPCEs). The performance of the methodology was evaluated using anti-dsDNA AAbs standards provided in a commercial ELISA kit. In addition, the biosensor was successfully applied to quantify the serum levels of these AAbs in patients diagnosed with RA.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus

Screen-printed carbon electrodes (SPCEs) (DRP-110, DropSens) consisting of a 4-mm diameter carbon working electrode, a carbon counter electrode, and an Ag pseudoreference electrode, were used as electrochemical transducers. A specific cable connector (DRP-CAC, DropSens, S.L.) acted as interface between the SPCEs and the potentiostat. Amperometric measurements were carried out with a potentiostat model CHI812B (CH Instruments, Inc.) operated by the CHI812B software. A Bunsen AGT-9 Vortex, a Thermomixer MT100 constant temperature incubator shaker (Universal Labortechnik) and a magnetic separator DynaMag-2 Magnet (Thermo Fisher Scientific) were also employed. The modified MBs were captured onto the SPCEs surface by a neodymium magnet (AIMAN GZ) embedded in a homemade poly (methyl methacrylate) (PMMS) casing. All measurements were carried out at room temperature.

2.2. Reagents and solutions

Neutravidin-modified magnetic microparticles (NA-MBs, Ø = 1 μm, 10 mg mL^{-1}) were from SpeedBeads™, GE Healthcare and Streptavidin-modified magnetic microparticles (Strept-MBs, Ø = 2.8 μm, 10 mg mL^{-1}) were from Invitrogen-ThermoFisher™. Standards, controls of anti-dsDNA AAbs (prepared in a serum/buffer matrix), a mixture of polyclonal rabbit anti-human IgG, anti-human IgM and anti-human IgA antibodies labeled with horseradish peroxidase (HRP-anti-human IgG/IgM/IgA mixture), sample buffer (Tris, NaN_3 <0.1% (w/w)) and washing buffer (PBS, NaN_3 < 0.1% (w/w)) were provided in the anti-dsDNA AAbs ELISA Kit purchased from Creative Diagnostics (Cat. No. DEIA 1681). Bovine serum albumin (BSA 100%, Type VH, Gerbu Biotechnik, GmbH), hydrogen peroxide (30% (v/v)), hydroquinone (HQ), human serum albumin (HSA), hemoglobin (HB), human IgG and human serum lyophilized powder (from clotted whole blood) were from Sigma-Aldrich. Other buffer solutions used were a 0.05 mol L^{-1} phosphate buffer solution, pH 6.0 (PB) and a 0.01 mol L^{-1} Tris−HCl (Scharlab) of pH 7.5 containing 1 mM EDTA and 2 mM NaCl (B&W buffer).

2.3. Procedures

2.3.1. Synthesis of biotinylated dsDNA from human plasmids (b-dsDNA)

Linearized 5′ biotinylated double-stranded DNA (b-dsDNA) was obtained by PCR using T7 biotinylated forward primer (5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′) and T7 terminator reverse primer (5′-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3′), with p53_GST, pANT7_cHalo or pDONR221 vectors as DNA template (Garranzo-Asensio et al., 2019, 2020). The final reaction volume (50 μL) contained 1 M betaine, 0.2 mM dNTP mix, 1x HF enzyme buffer, 0.5 μM forward primer, 0.5 μM reverse primer, 0.01 U μL^{-1} phusion high-fidelity enzyme (Thermo Fisher Scientific) and 125 ng of the corresponding vectors. The amplification program was: a denaturing hold of 5 min at 98 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 98 °C and 3 min at 68 °C, and a final hold of 10 min at 72 °C. Then, two 50 μL PCRs were purified together by dsDNA precipitation with 2 vol of ethanol 100% and 11 μL of 3 M sodium acetate pH 5.0 during 30 min at -80 °C followed by centrifugation at 4 °C and 13,200 rpm during 15 min. Then, the supernatant was discarded and the precipitated dsDNA was cleaned twice with 500 μL of 70% ethanol during 20 min at -80 °C and, subsequently, centrifuged at 4 °C and 13, 200 rpm during 15 min. Then, the supernatant was discarded and the precipitated linearized 5′ b-dsDNA was resuspended in 30 μL of nuclease-free water and quantified with the NanoDrop 2000C (Thermo Scientific).

PCRs and purified dsDNA quality were verified by visualization onto a 0.7% agarose gel electrophoresis run at 120 V during 40 min and revealed with the UVP Transilluminator. The obtained results demonstrated that prepared b-dsDNA had no contamination with ssDNA, thus ensuring quantification only of anti-dsDNA AAbs (Makowski and Ramsby, 2003; Riboldi et al., 2005).

2.3.2. Isolation and enzyme labeling of the anti-dsDNA AAbs at b-dsDNA-NA-MBs

5 μL of NA-MBs were incubated with 25 μL of 100 ng b-dsDNA for 30 min. After washing 2 times with 50 μL of wash buffer, the resulting b-dsDNA-NA-MBs were incubated with 25 μL of the standard/control or serum sample (prepared/diluted in sample buffer) for 30 min. After two additional washings, the anti-dsDNA AAbs attached to the MBs were enzymatically labeled by incubation for 30 min with 75 μL of a HRP-anti-human IgG/IgM/IgA mixture. After two washing steps, the

modified MBs were resuspended in 45 μL of 0.05 mol L^{-1} PB pH 6.0 to perform the amperometric measurements.

All incubation steps were carried out under continuous stirring at 950 rpm and 25 °C, while washing operations were made using 50 μL of the B&W buffer for the incubation of b-dsDNA, while other washings were carried out with the wash buffer (provided in the commercial ELISA kit). Between each incubation step, the microtube containing the MBs suspension was placed on the magnetic separator for 2 min and then the supernatant was removed.

2.3.3. Amperometric measurements

A bare SPCE was positioned in the homemade PMMA casing with an encapsulated neodymium magnet and the 45 μL suspension of the modified MBs mentioned above were pipetted onto the working electrode (WE) surface. The SPCE/casing ensemble was connected to the potentiostat and immersed into an electrochemical cell containing 10 mL of 0.05 M PB solution (pH 6.0) supplemented with 1.0 mM fresh HQ. Amperometry in stirred solutions was carried out by applying a detection potential of −0.20 V (*vs* the Ag pseudoreference electrode) and adding 50 μL of a 0.1 M freshly prepared H_2O_2 solution. All the amperometric signals given through the manuscript corresponded to the difference between the steady state and the background currents and error bars were estimated as triple of the standard deviation of three replicates. Unless otherwise indicated, the presented data correspond to the average of at least three replicates and the confidence intervals were calculated for $\alpha = 0.05$.

3. Results and discussion

Fig. 1 shows schematically the developed methodology. It is based on the efficient recognition of three immunoglobulin (Ig) isotypes (IgG, IgM and IgA) capable of recognizing human dsDNA using commercial NA-MBs modified with b-dsDNA prepared in the laboratory. After enzymatic tagging of the captured human Igs with HRP-conjugated secondary antibodies for each type of Ig, the modified MBs were captured on the SPCE working electrode and amperometric transduction was performed using the H_2O_2/HQ system. The cathodic current variation was proportional to the total concentration of the three Ig isotypes.

The reliability of the assay was tested by comparing the amperometric responses measured in the absence (B) and in the presence (S) of a standard provided in the commercial ELISA kit containing a total concentration of the three anti-dsDNA antibody isotypes of 50 IU mL^{-1}. The b-dsDNA-NA-MBs and NA-MBs (control without immobilized b-dsDNA) were used as well as the positive and negative controls provided in the ELISA kit using the b-dsDNA-NA-MBs. Discrimination of the anti-dsDNA AAbs presence was only possible when b-dsDNA-NA-MBs were used providing S/B ratios of 10.4 and 0.87 for the 50 IU mL^{-1} anti-dsDNA standard when using b-dsDNA-NA-MBs and NA-MBs, respectively. Moreover, the positive and negative controls provided in the commercial ELISA kit gave S/B values of 17.5 and 1.1 using the b-dsDNA-NA-MBs.

A comparison in terms of S/B ratio values was made using streptavidin-functionalized MBs (Strept-MBs) instead of NA-MBs as solid supports. The S/B ratio for the 50 IU mL^{-1} anti-dsDNA AAbs standard was 7.0 and 9.3, respectively, for Strept-MBs and NA-MBs. This result is in agreement with those reported by other authors (Zhao et al., 1993; Nguyen et al., 2012; Serafin et al., 2019), and can be attributed to the higher affinity of NA toward biotin, although a more comprehensive study would require comparing MBs of the same size and the same company. Accordingly, NA-MBs was selected as the appropriate solid substrate for developing the methodology.

3.1. Optimization of the experimental variables

The influence of other determining working variables was tested. Firstly, the influence of the size of b-dsDNA fragment immobilized on the NA-MBs on the assay performance was evaluated by comparing the amperometric responses provided in the absence and in the presence of 25 IU mL^{-1} anti-dsDNA AAbs standard. Different b-dsDNA fragments with lengths between 2.5 and 6 kilobases (see Fig. 2a)) were obtained using as PCR template, p53_cGST, pANT7_cHalo and pDONR221 human plasmids.

Fig. 2b) shows as the larger S/B ratios were achieved using the shortest b-dsDNA fragment prepared (p53_cGST human plasmid). This effect may be attributed to increased roll-up of longer immobilized b-dsDNA which makes it difficult the recognition for anti-dsDNA antibodies. Therefore, such shorter b-dsDNA was selected to develop the biosensing methodology.

Fig. 3 shows the results obtained for the test of other variables involved in the construction of HRP-anti-human IgG/IgM/IgA-anti-dsDNA AAbs-b-dsDNA-NA-MB/SPCEs biosensor. The variables checked were: loading (a) and incubation time (b) of b-dsDNA; number of steps involved (c); incubation time with anti-dsDNA AAbs standards (d) and volume (e) and incubation time (f) with HRP-anti-human IgG/IgM/IgA mixture. Larger S/B values measured in absence and in the presence of 25 IU mL^{-1} anti-dsDNA AAbs standard was taken as the criterion for selecting each variable.

As it is shown in Fig. 3a), the S/B values increased with the b-dsDNA loading immobilized onto NA-MBs up to 100 ng (amount selected for further work) and decreased drastically for larger loadings, probably due to hindered recognition by the antibodies when a high concentration of b-dsDNA was immobilized. A clear trend was not observed for the effect of the b-dsDNA incubation time with the NA-MBs (Fig. 3b)), but higher S/B value was observed for 30 min, setting this value for further studies. Since the approach involves the selective capture of anti-dsDNA human Igs isotypes and their further labeling with the mixture of HRP-labeled secondary antibodies, the performance of two different protocols involving one or two steps from the preparation of b-dsDNA-NA-MBs was evaluated. In the two-steps assay, the b-dsDNA-NA-MBs were firstly incubated with 25 μL of the anti-dsDNA AAbs standard (25 IU mL^{-1}, 30 min) followed by incubation with 100 μL of HRP-anti-human IgG/IgM/IgA mixture (15 min). In the one-step assay, the b-dsDNA-

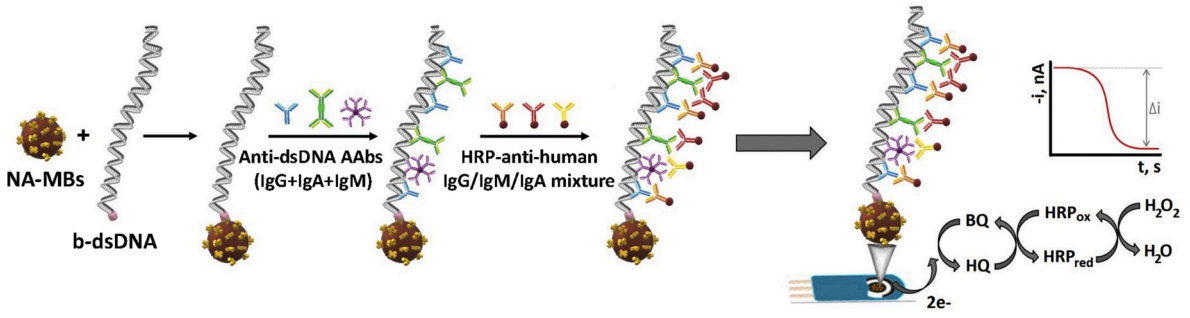


Fig. 1. Schematic display of the different steps involved in the preparation of the biosensor developed for the determination of anti-dsDNA AAbs as well as the used amperometric transduction.

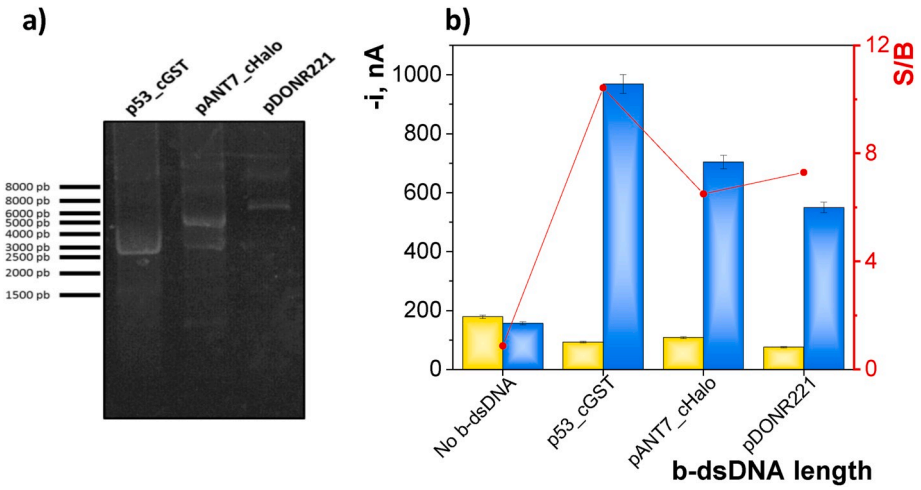


Fig. 2. Gel electrophoresis of b-dsDNAs obtained by PCR using as template the indicated human plasmids (a). Effect of the b-dsDNA fragment length immobilized on the NA-MBs on the amperometric responses measured in the absence (yellow bars) and in the presence (blue bars) of 25 IU mL^{-1} anti-dsDNA AAbs standards, and the corresponding S/B values (red circles) (b). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

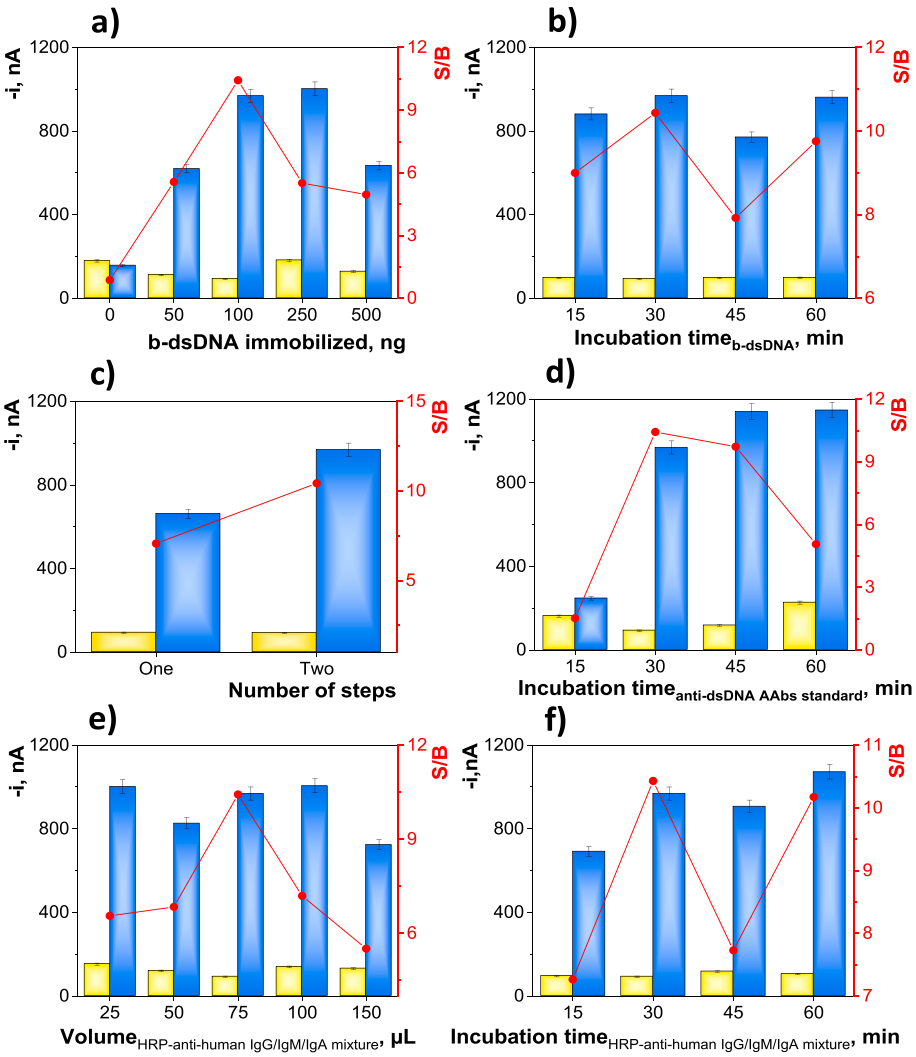


Fig. 3. Effect on the amperometric responses measured with the biosensors in the absence (yellow bars) and in the presence (blue bars) of 25 IU mL^{-1} anti-dsDNA AAbs standards of b-dsDNA loading (a) and incubation time (b), number of steps involved in the preparation of the biosensor (c), incubation time with anti-dsDNA AAbs (d) and volume (e) and incubation time (f) of HRP-anti-human IgG/IgM/IgA mixture, The resulting S/B values are shown as red circles. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Neutravidin-MBs were 45-min incubated with a mixture solution containing 25 µL of the anti-dsDNA antibodies standard and 100 µL of HRP-anti-human IgG/IgM/IgA mixture. Fig. 3c) shows as S/B values of 7.1 and 10.4 were obtained for the assays with one or two steps, respectively, which can be attributed to a poorer recognition of the immobilized b-dsDNA when target Igs are marked with their corresponding

HRP-labeled secondary antibodies. Therefore, the protocol was implemented in two steps to get higher sensitivity. Nevertheless, it is important to note that a one-step simpler protocol is also possible, although slightly sacrificing sensitivity, thus rendering the developed approach more compatible with automatization.

The effect of the b-dsDNA-NA-MBs incubation time with the anti-dsDNA AAbs standards to ensure the efficient capture of the target Igs is shown in Fig. 3d). As it can be seen, larger S/B value was obtained for 30 min incubation. Longer times provoked a significant decrease in the S/B ratio due to the significant increase in the non-specific current. The effect of the volume and incubation time of the HRP-anti-human IgG/IgM/IgA mixture used to label the capture Igs is shown in Fig. 3e) and f), respectively. Larger S/B values were obtained using a volume of 75 μL and an incubation time of 30 min, which were selected for further work. While similar S/B values were obtained for incubation times longer than 30 min, the lower S/B values for volumes larger than 75 μL can be attributed to a less efficient recognition process when the volume ratio between incubation solution and MBs suspension is very high. Table S1 (in the Supporting Information) summarizes the ranges studied for the tested experimental variables and the values selected for further work. Other experimental variables such as the detection potential, the HQ/H_2O_2 concentration, the pH/composition of the supporting electrolyte solution and the NA-MBs amount were optimized previously (Eguilaz et al., 2010; Conzuelo et al., 2012; Gamella et al., 2012; Serafín et al., 2019).

3.2. Analytical characteristics for the determination of anti-dsDNA AAbs

The calibration plot constructed with the biosensors prepared under the selected experimental conditions for anti-dsDNA AAbs standards is displayed in Fig. 4a) together with some of the recorded amperograms (Fig. 4b). A good correlation (R^2 = 0.993) was found between the variation in the cathodic current and the concentration of anti-dsDNA antibodies from 1 to 200 IU mL^{-1}. The regression equation was -i (nA) = (17.6 ± 0.3) [anti-dsDNA AAbs] (nM) + (273 ± 44). The LOD value was estimated according to the 3 × s_b criterion, where s_b was calculated as the standard deviation (n = 10) for measurements carried out in the absence of anti-dsDNA AAbs. The calculated LOD was 0.3 IU mL^{-1} (equivalent to 24.1 μg mL^{-1} anti-dsDNA human IgGs considering the weight of these immunoglobulins corresponding to one IU (Humphrey and Batty, 1974)).

When comparing these analytical characteristics with those claimed for the only electrochemical biosensor reported for the determination of anti-dsDNA human AAbs (Rubin et al., 2014), one can note that the LOD is slightly higher (24.1 vs 10 μg mL^{-1}) and the test time is slightly longer (45 vs 30 min). However, the biosensor reported in this work does not need time-consuming protocols to immobilize the dsDNA in a porous membrane and it uses 900 times less dsDNA (100 ng vs 90 μg). In addition, the developed biosensor was used to determine the three anti-dsDNA AAbs isotypes (IgG + IgA + IgM). Moreover, the biosensor reported here provides a similar sensitivity and assay time (starting from the preparation of the ds-DNA modified support) than those of commercial ELISAs. However, the biosensor involves a linear signal-to-concentration dependence instead of 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates. Importantly, the biosensor has important advantages derived from the electrochemical detection and the use of SPCEs including affordable cost and compatibility with multiplexed detection and point-of-care use.

Table S2 (in the Supporting information) provides a rough snap shot of the available methodologies for the determination of anti-dsDNA human AAbs compared to the one developed in this work. As it can be seen, most are ELISAs, which provide non-linear calibration plots, require 100 μL sample/reagents volume and relatively expensive instrumentation, and are of limited applicability in centralized settings.

The reproducibility of the amperometric responses was evaluated through the comparison of the current provided by five different biosensors prepared in the same manner on same or different days for 50 IU mL^{-1} anti-dsDNA AAbs. The relative standard deviation (RSD) values obtained were 3.2 and 4.3%, respectively, thus indicating the good reproducibility of the protocols used to prepare the biosensors and perform the amperometric transduction.

3.3. Selectivity

The effect of potentially interfering compounds present in serum (HSA, BSA, HB and human IgGs) on the biosensor response was tested. Fig. 5 shows the measured amperometric responses at the concentrations levels indicated in the Figure caption as well as in the absence (Blank) and the presence of 50 IU mL^{-1} anti-dsDNA AAbs. As can be seen, BSA gave a similar signal to that of the blank. However, HSA and HB showed a slight interference, the latter one probably because of the HB endogenous peroxidase activity (Grigorieva et al., 2013). As expected, a high signal was obtained for human IgGs considering the fundamentals of the developed assay. As it is discussed in the next section, the interference of HB is negligible when working with 100-times diluted samples and that of human IgGs which do not recognize dsDNA can be easily corrected.

3.4. Determination of anti-dsDNA AAbs in serum from RA patients

The practical applicability of the developed biosensing platform was evaluated by determining the anti-dsDNA IgG, IgM and IgA isotypes

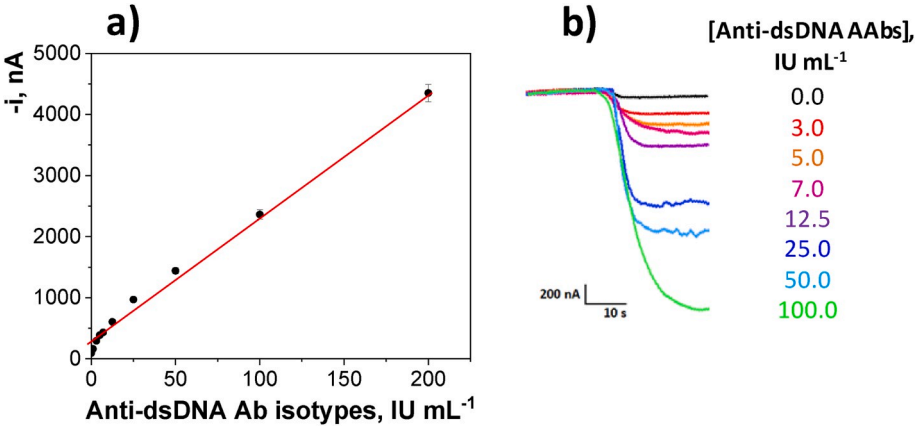


Fig. 4. Calibration plot for anti-dsDNA AAbs standards constructed with the developed biosensor (a). Amperometric responses provided by the biosensors for different anti-dsDNA AAbs concentrations (b).

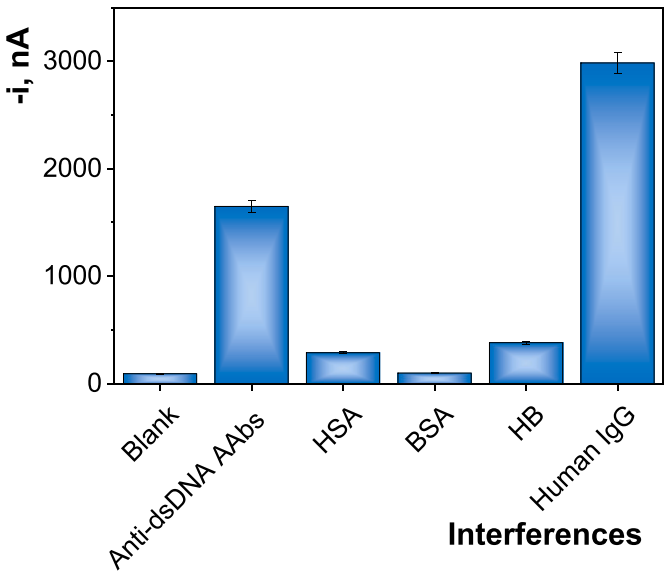


Fig. 5. Amperometric responses provided by the developed biosensors in the absence (blank signal) and in the presence of 50 IU mL^{-1} anti-dsDNA AAbs, 50 mg mL^{-1} HSA, 5 mg mL^{-1} BSA, 5 mg mL^{-1} HB and 1 mg mL^{-1} of human IgG standards.

levels in serum of healthy individuals and patients diagnosed with RA. The potential existence of matrix effect was checked by comparing the slope values of the calibration plots constructed with buffered standard solutions and in diluted human serum samples from healthy individuals. The slope values for both calibration plots were not statistically different (17.6 ± 0.3 nA mL IU^{-1} and 17 ± 2 nA mL IU^{-1}; $t_{exp} = 0.07 < t_{tab} = 2.776$) when working with 100-time diluted samples. However, the intercept value of the calibration plot constructed in a diluted serum sample from a healthy individual was about 4-times higher than that expected considering the anti-dsDNA AAbs endogenous concentration. To elucidate whether this is due to the presence of human Igs (as discussed in section 3.3) or to some endogenous peroxidase in the serum, the amperometric responses obtained for 100-fold diluted serum samples using b-dsDNA-NA-MBs and NA-MBs (with no immobilized b-dsDNA) in the absence and in the presence of HRP-anti-human IgG/IgM/IgA mixture were compared. Results shown in Fig. S1 (in the Supporting Information) and Fig. 5 led us to assign this interference to the high concentration of human Igs present in serum of adult individuals: 0.7−4.0 (IgA), 7−16 (IgG) and 0.4−0.23 (IgM) mg mL^{-1} (Gonzalez-Quintela et al., 2008). Therefore, the determination of 100 times-diluted serum samples was made simply by interpolating into the calibration plot prepared with anti-dsDNA AAbs standards (Fig. 4) the amperometric measurements obtained after subtracting the one recorded for a commercial synthetic human serum sample. Table 1 summarizes the obtained results according to this protocol as well as the comparison with those provided by the ELISA test. As expected, a significantly higher level of anti-dsDNA AAbs was found in patients with RA with respect to the levels for healthy individuals. The results are in agreement with the cut-off value of 25 IU mL^{-1} established to discriminate between positive and negative samples for anti-dsDNA IgG, IgA and IgM isotypes, thus allowing a clear discrimination between healthy individuals and RA patients. Table 1 shows also the good agreement between the biosensing and the ELISA methodologies. The paired samples t-test demonstrated that no significant differences existed for the results provided by the two methods ($\alpha = 0.05$, p-values of 0.36 and 0.28 for healthy individuals and RA patients, respectively), with a correlation plot for the results obtained by both methods with slope and intercept values of (1.03 ± 0.03) and (-21 ± 38) IU mL^{-1}, respectively.

When the biosensors were applied to the controls supplied in the commercial ELISA kit, and the amperometric measurements for the undiluted controls were interpolated into the calibration plot constructed with standards (Fig. 4), the calculated contents were 5.3 and 73 IU mL^{-1} anti-dsDNA AAbs. These results are consistent with the ranges indicated in the Quality Control Certificate enclosed to the purchased ELISA kit (Positive Control < 10 IU mL^{-1} and Negative Control: 60−90 IU mL^{-1}), which confirmed the suitability of the measurements carried out with the bioplatform.

Table 1
Concentration of anti-dsDNA AAbs (IgG + IgM + IgA isotypes) (in IU mL^{-1}) found in the serum samples analyzed with the developed biosensor and the ELISA test.

Sample		Biosensor	$RSD_{n=3}$, %	ELISA	$RSD_{n=3}$, %
Healthy volunteers	1	8 ± 2	1.1	8 ± 1	4.4
	2	13 ± 3	3.8	15 ± 3	3.2
	3	19 ± 4	3.4	16 ± 6	5.4
AR patients	4	1002 ± 45	4.4	1105 ± 59	5.3
	5	1772 ± 93	5.3	1739 ± 75	4.3
	6	2426 ± 54	2.2	2311 ± 135	5.8

Mean value ± $ts/\sqrt{n}$ ($n = 3$; $\alpha = 0.05$).

4. Conclusions

This paper describes the first biosensing strategy implemented on the surface of MBs for the determination of anti-dsDNA human AAbs. The method proposes the use of NA-MBs modified with b-dsDNA, prepared in the laboratory by PCR from human plasmid DNA, for the efficient capture of human anti-dsDNA IgG, IgM and IgA class AAbs. The three Igs isotypes captured on the b-dsDNA-NA-MBs are enzymatically labeled with a mixed solution of HRP-conjugated secondary antibodies. Amperometric detection is carried out upon the capture of the magnetic bioconjugates on the surface of the SPCEs. The method provides a linear range between 1 and 200 IU mL^{-1} with a LOD value of 0.3 IU mL^{-1} for anti-dsDNA AAbs standards and is used to determine anti-dsDNA AAbs in 100-times diluted serum samples from RA patients in only 75 min. The low amount of b-dsDNA (100 ng) and the short time required for its immobilization on the NA-MBs (30 min) together with the possibility of providing quantitative levels in serum of anti-dsDNA human Igs are competitive advantages of the developed biosensors. Moreover, the biosensor shows also advantages with respect to the ELISA method in terms of cost and possibility of performing multiplexed determinations at the point-of-care by non-specialized personnel. In addition, the developed methodology can easily be adapted to the individual determination of each Ig isotype simply by labelling with the corresponding secondary antibody or to the determination of other disease-relevant autoantibodies by immobilizing the appropriate antigens on the MBs surface. Therefore, the developed biosensors offer the prospect of greatly expand autoantibody analysis, a hallmark of autoimmune and cancer diseases, into the practical routine at both primary care and subspecialty decentralized settings within clinically actionable times.

Declaration of interest statement

This paper reports a fast and simple amperometric biosensing approach for the reliable determination of the three most common isotypes of Igs (IgG, IgM and IgA) AAbs against dsDNA in human serum samples. The method proposes the use of NA-MBs modified with b-dsDNA, prepared in the laboratory by PCR from human plasmid DNA, for the efficient capture of anti-dsDNA human Igs isotypes which are enzymatically labeled with a mixed solution of HRP-conjugated secondary antibodies. The cathodic current variation occurring upon the capture of the resultant magnetic bioconjugates on the surface of the SPCEs provides a linear range between 1 and 200 IU mL^{-1} with a LOD value of 0.3 IU mL^{-1} for anti-dsDNA AAbs standards. The low amount of b-dsDNA (100 ng) and the short time required for the immobilization on the NA-MBs (30 min) together with the possibility of providing

quantitative levels in serum of anti-dsDNA human Igs are competitive advantages of the developed biosensors. Moreover, the biosensor shows also advantages with respect to the ELISA method in terms of cost and possibility of performing multiplexed determinations at the point-of-care by non-specialized personnel. In addition, the developed methodology can be applied to the individual determination of the three types of human Igs against ds-DNA simply by labelling with the secondary antibody for the isotype of interest instead of using the mixture solution of the three secondary antibodies. The methodology can be easily transferred to the determination of other disease-relevant autoantibodies by convenient immobilization of the appropriate antigens on the MBs surface. Therefore, the developed biosensors offer the prospect of greatly expand autoantibody analysis, a hallmark of autoimmune and cancer diseases, into the practical routine at both primary care and subspecialty decentralized settings within clinically actionable times.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

Beatriz Arévalo: Conceptualization, Investigation, Writing - review & editing, Writing - original draft, Funding acquisition. **Verónica Serafín:** Conceptualization, Investigation, Writing - review & editing, Writing - original draft. **Marta Sánchez-Paniagua:** Conceptualization, Investigation, Writing - review & editing, Writing - original draft. **Ana Montero-Calle:** Investigation, Resources. **Rodrigo Barderas:** Supervision, Resources, Writing - review & editing, Writing - original draft, Funding acquisition. **Beatriz López-Ruíz:** Conceptualization, Writing - review & editing, Writing - original draft. **Susana Campuzano:** Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing, Writing - original draft, Funding acquisition. **Paloma Yáñez-Sedeño:** Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing, Writing - original draft, Funding acquisition. **José M. Pingarrón:** Writing - review & editing, Writing - original draft, Funding acquisition.

Acknowledgements

The financial support of RTI2018-096135-B-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades) and CTQ2015-64402-C2-1-R (Spanish Ministerio de Economía y Competitividad), Research Projects, PI17CIII/00045 Grant from the AES-ISCIII Program and the TRANSNANOAVANSENS-CM Program from the Comunidad de Madrid (Grant S2018/NMT-4349) are gratefully acknowledged. A.M-C. is supported by a FPU predoctoral contract supported by the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112233.

References

Bai, Y., Tong, Y., Liu, Y., Hu, H., 2017. Clin. Exp. Immunol. 191, 1–10.
Biesen, R., Dahnrich, C., Rosemann, A., Barkhudarova, F., Rose, T., Jakob, O., Bruns, A., Backhaus, M., Stocker, W., Burmester, G.-R., Schlumberger, W., Egerer, K., Hiepe, F., 2011. Arthritis Res. Ther. 13, R26. https://doi.org/10.1186/ar3250.
Bizzaro, N., Brusca, I., Previtali, G., Grazia Alessio, M., Daves, M., Platzgummer, S., Cinquanta, L., Paura, G., Infantino, M., Manfredi, M., Faricelli, R., Bassetti, D., Musso, M., Deleonardi, G., Trevisan, M.T., Radice, A., Liguori, M., Imbastaro, T., Pesente, F., Fabris, M., Tonutti, E., 2018. Autoimmun. Rev. 17, 541–547.
Cabiedes, J., Nuñez-Alvarez, C.A., 2010. Reumatol. Clínica 6, 224–230.
Conigliaro, P., Chimenti, M.S., Triggianese, P., Sunzini, F., Novelli, L., Perricone, C., Perricone, R., 2016. Autoimmun. Rev. 15, 673–683.
Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Pinacho, D.G., Reviejo, A.J., Marco, M.P., Pingarrón, J.M., 2012. Biosens. Bioelectron. 36, 81–88.
Copple, S.S., Giles, S.R., Jaskowski, T.D., Gardiner, A.E., Wilson, A.M., Hill, H.R., 2012. Am. J. Clin. Pathol. 137, 825–830.
Eguílaz, M., Moreno-Guzmán, M., Campuzano, S., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., 2010. Biosens. Bioelectron. 26, 517–522.
Eriksson, C., Engstrand, S., Sundqvist, K.-G., Rantapaa-Dahlqvist, S., 2005. Ann. Rheum. Dis. 64, 403–407.
Fagúndez, P., Brañas, G., Cairoli, E., Laiz, J., Tosar, J.P., 2018. Analyst 143, 3874–3882.
Gamella, M., Campuzano, S., Conzuelo, F., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., 2012. Electroanalysis 24, 2235–2243.
Garranzo-Asensio, M., Guzmán-Aránguez, A., Povés, C., Fernández-Aceñero, M.J., Montero-Calle, A., Ceron, M.A., Fernandez-Diez, S., Rodríguez, N., Gómez de Cedrón, M., Ramírez de Molina, A., Domínguez, G., Barderas, R., 2019. Sci. Rep. 9, 13547. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49960-x.
Garranzo-Asensio, M., San Segundo-Acosta, P., Povés, C., Fernández-Aceñero, M.J., Martínez-Useros, J., Montero-Calle, A., Solís-Fernández, G., Sanchez-Martinez, M.C., Rodríguez, N., Cerón, M.A., Fernandez-Diez, S., Domínguez, G., de los Ríos, V., Peláez-García, A., Guzmán-Aránguez, A., Barderas, R., 2020. J. Proteonomics. 214, 103635. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103635.
Gonzalez-Quintela, A., Alende, R., Gude, F., Campos, J., Rey, J., Meijide, L.M., Fernández-Merino, C., Vidal, C., 2008. Clin. Exp. Immunol. 151, 42–50.
Grigorieva, D.V., Gorudko, I.V., Sokolov, A.V., Kosmachevskaya, O.V., Topunov, A.F., Buko, I.V., Konstantinova, E.E., Cherenkevich, S.N., Panasenko, O.M., 2013. Bull. Exp. Biol. Med. 155, 118–121.
Humphrey, J.H., Batty, I., 1974. Immunochemistry 11, 759.
Infantino, M., Manfredi, M., Merone, M., Grossi, V., Benucci, M., Gobbi, L., Bandinelli, F., Damiani, A., Soda, P., 2018. Immunol. Res. 66, 340–347.
Janyapoon, K., Jivakanont, P., Surbrsing, R., Siriprapapan, W., Tachawuttiwat, T., Korbsrisate, S., 2005. Pathology 37, 63–68.
Karamehic, J., Subasic, D., Gavrankapetanovic, F., Zecevic, L., Eminovic, I., Memic, S., Seric, N., Drace, Z., 2007. Med. Arh. 61, 16–19.
Makowski, G.S., Ramsby, M.L., 2003. Ann. Clin. Lab. Sci. 33, 142–148.
Nguyen, T.T., Sly, K.L., Conboy, J.C., 2012. Anal. Chem. 84, 201–208.
Riboldi, P., Gerosa, M., Moroni, G., Radice, A., Allegri, F., Sinico, A., Tincani, A., Meroni, P.L., 2005. Autoimmunity 38, 39–45.
Rubin, R.L., Wall, D., Konstantinov, K.N., 2014. Biosens. Bioelectron. 51, 177–183.
Serafín, V., Arevalo, B., Martinez-Garcia, G., Aznar-Poveda, J., Lopez-Pastor, J.A., Beltran-Sanchez, J.F., Garcia-Sanchez, A.J., Garcia-Haro, J., Campuzano, S., Yañez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., 2019. Sensor. Actuator. B Chem. 299, 126934. https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126934.
Wang, X., Xia, Y., 2019. Front. Immunol. 10, 1–14.
Yukawa, N., Fujii, T., Kondo-Ishikawa, S., Yoshifuji, H., Kawabata, D., Nojima, T., Ohmura, K., Usui, T., Mimori, T., 2011. Arthritis Res. Ther. 13, R213. https://doi.org/10.1186/ar3546.
Zhao, S., Walker, D.S., Reichert, W.M., 1993. Langmuir 9, 3166–3173.

Talanta 225 (2021) 122054

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Electrochemical immunoplatform to assist in the diagnosis and classification of breast cancer through the determination of matrix-metalloproteinase-9

Beatriz Arévalo [a,1], Amira ben Hassine [b,1], Alejandro Valverde [a], Verónica Serafín [a], Ana Montero-Calle [c], Noureddine Raouafi [b], Jordi Camps [d], Meritxell Arenas [d], Rodrigo Barderas [c], Paloma Yáñez-Sedeño [a,**], Susana Campuzano [a,*], José M. Pingarrón [a]

[a] Analytical Chemistry Dept., Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, E-28040, Madrid, Spain
[b] University of Tunis El Manar, Tunis Faculty of Science, Sensors and Biosensors Group, Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, 2092, Tunis El Manar, Tunisia
[c] Chronic Disease Programme, UFIEC, Instituto de Salud Carlos III, 28220, Majadahonda, Madrid, Spain
[d] Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovirai Virgili, Reus, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Electrochemical immunosensor
MMP-9
Cell lysates
Serum
Breast cancer
TNBC

ABSTRACT

Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is a zinc-dependent endopeptidase that promotes angiogenesis, tumor growth, metastasis and cell invasion through the degradation of extracellular matrix. This work reports a magnetic microbeads (MBs)-based sandwich immunoassay for the amperometric determination of MMP-9 at screen-printed carbon electrodes (SPCEs). The suitable capture antibody (cAb) is immobilized onto carboxylic MBs to selectively capture the antigen which is sandwiched with a biotinylated detector antibody (biotin-dAb) further conjugated with a commercial streptavidin-horseradish peroxidase (Strep-HRP) polymer. This immunoplatform provides great analytical characteristics in terms of selectivity and sensitivity, achieving a LOD value of 2.4 pg mL^{-1} for standards in buffered solutions. Although this value is similar to those reported for some other approaches described so far, the method described here is simpler involving a single 30 min incubation step which makes it ideal for automation or implementation in POC devices. Moreover, the method was assayed for the accurate determination of endogenous MMP-9 in both cancer cell lysates and serum samples of patients diagnosed with different subtypes of breast cancer (BC) after a simple dilution. The results obtained show that the disposable and affordable immunoplatform developed is able not only to discriminate BC patients from healthy individuals but also to do it for the worst outcome triple negative (TNBC) subtype.

1. Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of zinc-dependent endopeptidases that play a critical role in different diseases and pathological processes. They are responsible for remodeling the extracellular matrix, a necessary process for a variety of physiological events [1]. Dysregulation of MMPs has been observed in diverse diseases from cancer to autoimmune disorders where these enzymes have been found to directly contribute to disease progression [2]. Regarding human cancers, MMPs can influence tumors' environment by promoting angiogenesis, tumor growth and metastasis [3]. Importantly, MMPs expression is tied to tumor aggressiveness, stage, and patient prognosis [4]. In particular, MMP-9, belonging to the gelatinase subgroup, is also involved in cancer cell invasion [5] and can exert pro-angiogenic activities by releasing and activating pro-angiogenic factors such as transforming growth factor-beta (TGF-β) or vascular endothelial growth factor (VEGF) [6,7]. Significantly higher levels of MMP-9 have been detected in serum from colorectal cancer (CRC) patients [8], and the MMP-9 profile has been used for cancer diagnosis [9]. In addition to cancer, MMP-9 has been identified as a peripheral biomarker of

* Corresponding author.
** Corresponding author.
E-mail addresses: yseo@quim.ucm.es (P. Yáñez-Sedeño), susanacr@quim.ucm.es (S. Campuzano).
[1] These authors have contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122054
Received 3 November 2020; Received in revised form 14 December 2020; Accepted 15 December 2020
Available online 27 December 2020
0039-9140/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

neuroinflammation in multiple sclerosis (MS) [10] and increased levels of MMP-9 have been found in ischemic stroke patients [11]. Moreover, MMP-9 has been shown to act as a proximal biomarker for cardiac remodeling [12].

A number of colorimetric ELISA kits using sandwich-type formats are commercially available for the determination of MMP-9. For instance, human MMP-9 DY911 from R&D Systems provides a logarithmic calibration plot over the 31.3 to 2000 pg mL^{-1} range in an assay lasting 4 h 40 min. Invitrogen MMP-9 Human ELISA kit from Thermo Fisher Scientific allows a logarithmic calibration between 0.23 and 15.0 ng mL^{-1} with a time-to-result of 3 h 10 min. Regarding electrochemical sensors, various methods with different biorecognition elements have been reported for the determination of MMP-9. Lee et al. [13] described a reference electrode-free electrochemical biosensor consisting of a redox reporter labeled peptide with MMP-9 cleavage site and methylene blue conjugated at the N-terminal immobilized onto Au electrodes. In the presence of the analyte, an electroactive MB-peptide fragment is released from the electrode which influenced electrical tunneling current and provided measurements suitable to detect MMP-9 at concentrations as low as 7 pmol L^{-1}. Ruiz-Vega et al. [14] reported an electrochemical magneto-immunosensor for the detection of MMP-9 in plasma which involved carboxyl-magnetic microbeads as the support for the immobilization of capture antibodies and a biotinylated detection antibody conjugated to poly-HRP as a signal amplifier. The electrochemical responses were measured amperometrically at −0.05 V *vs.* Ag pseudo reference electrode using 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine (TMB) as the redox mediator. Although this immunosensor provided a linear response between 0.03 and 2 ng mL^{-1}, and a LOD value of 13 pg mL^{-1}, it showed a 20% overestimation of the MMP-9 concentration in comparison with the ELISA methodology when it was applied to plasma samples of patients who suffered an ischemic stroke. More recently, the same group used the same immunoassay scheme to develop a paper-microfluidics on screen-printed electrodes that allowed MBs washing and electrochemical detection on-chip thus reducing user intervention [15]. Biela et al. [10] used electrochemical impedance spectroscopy for the determination of MMP-9 by implementing a biosensor using interdigitated gold electrodes coated with oxidized dextran and subsequent cross-linking with peptides containing specific cleavage sites for MMP-9. In the presence of the enzyme, the films were degraded resulting in a change in the impedance proportional to MMP-9 over the 50–400 ng mL^{-1} range with a LOD value of 15 ngmL^{-1}. Very recently, Shabani et al. [16] have reported a label-free electrochemical biosensor for the rapid (35 min) determination of MMP-9 by immobilizing the capture antibody onto a gold-coated substrate modified with zinc oxide nanoparticles by spin-coating and ZnO nanorods. The biosensor provided a LOD of 150 pg mL^{-1} and the results in the analysis of three human serum samples were in good agreement with those obtained by ELISA. Nevertheless, this impedimetric immunosensor required a fabrication time of ~12 h.

In this work, we describe a simple, rapid and sensitive electrochemical MBs-based immunosensor for the determination of MMP-9. Similar to work reported by Ruiz-Vega et al. [14] the approach involves the use of carboxylated MBs as support to immobilize the anti-MMP-9 capture antibody (cAb) and a sandwich-like configuration with a biotinylated detection antibody (biotin-dAb) enzymatically labeled with a streptavidin-horseradish peroxidase (Strep-HRP) polymer. Amperometric detection at SPCEs using the H_2O_2/hydroquinone (HQ) system is employed. The developed immunoplatform exhibits analytical characteristics competitive with ELISA kits in terms of sensitivity, simplicity and assay time. In addition, the immunoplatform also shows important advantages with respect to the MBs-based immunosensor previously described [14] and allows the accurate determination of the endogenous MMP-9 in cellular lysates and serum samples from patients diagnosed with different BC subtypes.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Carboxylic acid-modified-magnetic beads (HOOC-MBs, Dynabeads®, M-270 2.8 μm Ø, ~2×10^9 beads mL^{-1}) were purchased from Invitrogen-Thermo Fisher. N-(3-dimethyl-aminopropyl)-N′-ethyl-carbodiimide (EDC), N-hydroxysulfosuccinimide (NHSS), ethanolamine, hydroquinone (HQ) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (30% v/v) were provided by Sigma-Aldrich. 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), sodium chloride, potassium chloride, sodium di-hydrogen phosphate, disodium hydrogen phosphate and Tris-hydroxymethyl-aminomethane-HCl (Tris-HCl) were purchased from Scharlab.

Water purified by the Milli-Q purification system (18.2 MΩ cm) was used for the preparation of buffer solutions: 0.025 mol L^{-1} MES buffer pH 5.0; 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer solution (PB) pH 8.0; 0.1 mol L^{-1} Tris-HCl pH 7.2; 0.01 mol L^{-1} phosphate buffer saline solution (PBS) pH 7.5; and 0.05 mol L^{-1} phosphate buffer (PB) solution pH 6.0. Commercial Pierce™ Protein-Free Blocking Buffer (PFBB) was purchased from Thermo Scientific (Ref: 37584).

Mouse anti-human MMP-9 capture antibody (cAb), biotinylated goat anti-human MMP-9 detection antibody (biotin-dAb) and recombinant human MMP-9 standard were from the Human MMP-9 DuoSet ELISA from R&D Systems (Cat. No. DY911). Strep-HRP conjugate used as an enzymatic tracer was from Roche (Ref: 11089153001).

Solutions used for activation and blocking steps of the HOOC-MBs were an EDC/NHSS mixture solution (50 mg mL^{-1} each, in MES buffer pH 5.0) and an ethanolamine solution (1.0 mol L^{-1} prepared in PB solution pH 8.0), respectively. Solutions for the amperometric detection, 0.1 mol L^{-1} H_2O_2 and 0.1 mol L^{-1} HQ, were freshly prepared in phosphate buffer solution pH 6.0.

Human total E-cadherin (E-CDH) standard from the Human Total E-Cadherin DuoSet IC ELISA (Ref: DYC4225, Bio-Techne R&D Systems, S.L.U.), human IL-13sRα2 standard from the Human IL-13sRα2 DuoSet ELISA (Ref:DY614, Bio-Techne R&D Systems, S.L.U.), human hemoglobin (HB, Ref: H7379) and IgG from human serum (Ref: I2511) from Sigma-Aldrich were used to carrying out selectivity tests.

Molecular biology and/or cell culture grade phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, from Sigma Aldrich), brefeldin A (BFA, from Abcam) and dimethyl sulfoxide (DMSO from Merck) were used for culturing MDA-MB-436 cells.

2.2. Apparatus and electrodes

A magnetic concentrator DynaMag-2 (12321, Dynabeads®, Invitrogen-Thermofisher Scientific), a Bunsen AGT-9 Vortex, a Thermo-Shaker MT100 (Universal Labortechnik), a P-Selecta (Cencom) centrifuge, a Crison model Basic 20+ pH-meter, an Elmasonic S-60 (Elma) ultrasonic bath and a magnetic stirrer MS01 (ElMI, Ltd.) were employed.

All amperometric measurements were made at room temperature using a model CHI812B potentiostat (CH Instruments, Inc.) controlled by the CHI812B software. Screen-printed carbon electrodes (SPCEs, DRP110, 4-mm Ø) and a specific cable connector (DRP-CAC), both from Metrohm-DropSens, were used. The measurements were performed in stirring solutions using 10 mL glass electrochemical cells from Pobel, where the SPCEs placed on a home-made polymethylmethacrylate (PMMA) casing with an embedded neodymium magnet (AIMAN GZ) were immersed.

ELISA absorbance readings were done in a Sunrise™ Tecan microplate reader with the Magellan V 7.1 software.

2.3. Preparation of the magnetic immunoconjugates

A 3-μL aliquot of the commercial HOOC-MBs suspension was washed twice for 10 min with 50 μL MES buffer (25 °C, 950 rpm) in a 1.5 mL microcentrifuge tube. After each washing/incubation step, the MBs were

placed in the magnetic separator for 3 min before removing the supernatant. The surface carboxylic groups of the MBs were activated by incubating with 25 μL of a freshly prepared EDC/NHSS solution for 35 min (25 °C, 950 rpm). Thereafter, the activated MBs were modified with the capture antibody (cAb) by incubation for 15 min in 25 μL of a 25 μg mL^{-1} cAb solution (25 °C, 950 rpm). Next, the cAb-MBs were incubated with 25 μL 0.1 mol L^{-1} ethanolamine during 60 min (25 °C, 950 rpm) to block the residual activated groups. After washing of the cAb-MBs with 0.1 mol L^{-1} Tris-HCl buffer (pH 7.2) and twice with PBS, the modified MBs were stored at 4 °C in filtered PBS until their use.

The sandwich immunoassay was implemented by incubating the cAb-MBs during 30 min in 25 μL of a mixture solution, prepared in PFBB, containing the MMP-9 standard or the sample to analyze, 1 μg mL^{-1} biotinylated detection antibody (biotin-dAb) and 1/2500 diluted Strep-HRP (25 °C, 950 rpm). The MBs bearing the sandwich immunocomplexes were washed twice with PFBB and re-suspended in 50 μL of 0.05 mol L^{-1} PB solution (pH 6.0) to make the amperometric measurements.

2.4. Amperometric detection

Each amperometric measurement was made with a new SPCE which was placed on the PMMA casing with the embedded neodymium magnet. The 50 μL of the final modified MBs suspension were deposited on the working electrode surface and the casing-electrode assembly was immersed in the measuring cell containing 10 mL of 0.05 mol L^{-1} PB (pH 6.0) and 100 μL of freshly prepared 0.1 mol L^{-1} HQ solution. The amperometric detection was carried out by applying a constant potential of −0.2 V *vs*. Ag pseudo-reference electrode under stirring conditions. Whenever the background current was stabilized (~50 s), 50 μL of recently prepared 0.1 mol L^{-1} H_2O_2 were added to the measuring cell solution and the current variation was recorded until the steady-state was reached. The amperometric responses were calculated as the difference between the steady-state and the background currents and the given values were the mean value of three replicates with the error bars estimated as triple of the standard deviation of each set of replicas ($\alpha = 0.05$).

2.5. Analysis of biological samples

The developed amperometric immunoassay was applied to the analysis of triple negative breast cancer (TNBC) MDA-MB-436 cell lysates. The cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) cell repository. In order to stimulate cells and induce MMP-9 expression, they were grown according to established protocols in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin and streptomycin, and 2.5 mmol L^{-1} L-glutamine (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in the absence or in the presence of 10 ng mL^{-1} DMSO (as a control because it is the solvent in which PMA and BFA are prepared), 10 ng mL^{-1} PMA or 10 ng mL^{-1} + 3 μg mL^{-1} PMA + BFA [17] and lysed and analyzed following the protocols previously described [18,19].

Moreover, the amperometric immunoassay was used for the analysis of circulating MMP-9 in serum samples from healthy individuals (Control) and from patients diagnosed with the four BC subtypes (Luminal A, Luminal B, HER2+ and TNBC). The serum samples were provided by Hospital Universitari de Sant Joan (Tarragona, Spain), after approval of the Institutional Ethical Review Boards and getting written informed consent from patients, and were used accomplishing all the ethical issues and relevant guidelines and regulations. The samples were stored at −80 °C until use.

The determination of MMP-9 was carried out in both cases by applying the standard additions method by adding MMP-9 standards over the 0–5000 pg mL^{-1} range to 0.5 μg cell lysate or 50-times diluted serum samples.

3. Results and discussion

As it is shown in Scheme 1, the developed methodology is based on an immunoassay strategy assisted by the use of modified MBs and involving the formation of enzyme-conjugated Strep-HRP sandwich type immunocomplexes and amperometric transduction with the H_2O_2/HQ system upon capturing the magnetic bioconjugates on the SPCE working electrodes surfaces. The variation of the cathodic current measured (attributed to the enzymatic reduction of the enzymatic substrate mediated by HQ) is proportional to the concentration of MMP-9.

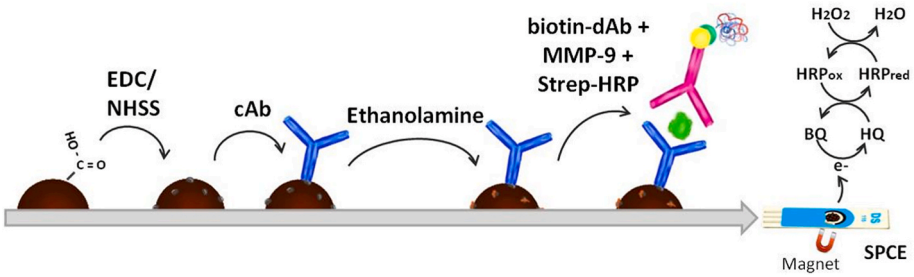
3.1. Optimization of the experimental variables

The effect of the experimental variables involved in the construction and performance of the developed immunosensor for MMP-9 is shown Fig. 1. The tested variables were: (a) cAb loading and (b) time for cAb incubation, (c) incubation steps involved in the sandwich immunoassay, (d) incubation time in the one-step protocol, (e) biotin-dAb concentration, and (f) Strep-HRP dilution. The selection criterion for each variable was the larger ratio between the amperometric responses measured with the immunosensor in the presence (S, grey bars) of 2500 pg mL^{-1} MMP-9 standard solution and in its absence (B, white bars) (S/B ratio in red). The tested range for each variable and the selected values are summarized in Table 1.

The influence of cAb loading on the immunosensor response was tested by incubating the activated HOOC-MBs in cAb solutions with concentrations ranging between 2.5 and 50.0 μg mL^{-1} during 30 min (25 °C, 950 rpm). Fig. 1a shows that cAb concentrations lower than 25.0 μg mL^{-1} provided small amperometric responses due to the limited loading of cAb. However, cAb concentrations larger than 25.0 μg mL^{-1} resulted in lower responses due to the poorer antigen recognition occurring for large antibody loadings due to steric hindrance [20]. Therefore, a concentration of 25.0 μg mL^{-1} cAb was selected for further work. Regarding the time required for cAb immobilization, this variable was tested by incubating the activated MBs with a 25.0 μg mL^{-1} cAb solution over periods ranging between 15 and 90 min (25 °C, 950 rpm). As it can be seen in Fig. 1b, a larger S/B ratio was observed for 15 min incubation. The decrease observed for the S/B ratio with long incubation times corroborates the smaller immunorecognition process efficiency for large concentrations of immobilized cAb.

Regarding the number of incubation steps used to form the sandwich immunocomplexes onto the cAb-MBs, the different protocols evaluated are compared in Fig. 1c: A) by incubating the cAb-MBs sequentially with each of the reagents independently: 1) 60 min in MMP-9 standard, 2) 30 min in 1 μg mL^{-1} biotin-dAb and 3) 30 min in 1/1000 Strep-HRP solutions, respectively; B) by carrying out two successive incubations of the cAb-MBs 1) with the MMP-9 standard solution during 60 min and 2) 30 min in a 1 μg mL^{-1} biotin-dAb and 1/1000 Strep-HRP mixture solution or C) 1) 60 min in a 1 μg mL^{-1} biotin-dAb and MMP-9 standard mixture solution and 2) 30 min in a 1/1000 Strep-HRP solution; and D) application of a single 60-min step by incubating the cAb-MBs with a mixture solution consisting of 1 μg mL^{-1} biotin-dAb, MMP-9 standard and 1/1000 Strep-HRP. Fig. 1c shows as the larger S/B ratio was obtained using the one-step protocol (protocol D), which can be attributed to an improved efficiency in the immunorecognition and labeling reactions when all reagents were in a homogeneous solution. This 1-step working protocol also simplifies and shortens the analysis. The incubation time of this single incubation step was evaluated from 15 to 60 min. Fig. 1d shows that a higher S/B ratio was obtained for 30 min, which was selected for further work.

The biotin-dAb concentration was tested over the 0.0 and 2.5 μg mL^{-1} range. Fig. 1e shows as 1.0 μg mL^{-1} biotin-dAb provided a larger S/B ratio. A biotin-dAb concentration higher than 1.0 μg mL^{-1} provoked an increase in the non-specific signal and a decrease in the specific signal, thus leading to a sharp decrease in the S/B ratio. This behavior is attributed to stronger non-specific adsorption and steric hindrance.



Scheme 1. Schematic diagram of the immunoassay strategy assisted by the use of MBs and the sequence of reactions involved in the amperometric transduction at SPCEs for the determination of MMP-9.

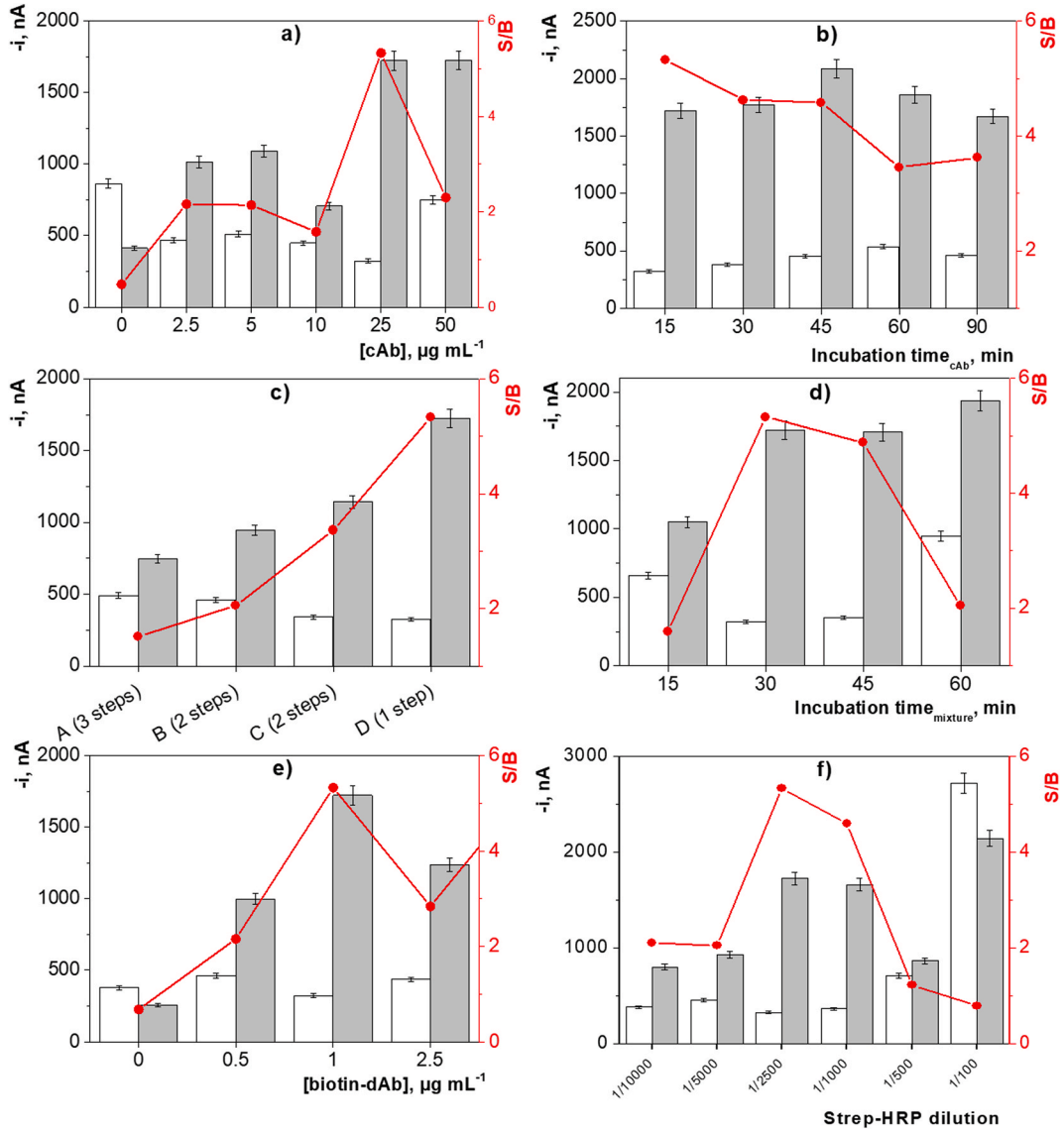


Fig. 1. Optimization of the experimental variables involved in the preparation of the immunosensor for MMP-9: cAb loading (a) and time for cAb incubation (b), number of incubation steps to form the sandwich immunocomplexes (c), incubation time with the MMP-9, biotin-dAb and Strep-HRP mixture solution (d), biotin-dAb concentration (e), and Strep-HRP dilution (f). Comparison of the amperometric responses obtained in the absence (B; white bars) and in the presence of 2500 pg mL^{-1} (S; grey bars) MMP-9 standard solutions and the resulting S/B ratio (in red). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

The effect of the Strep-HRP concentration was tested using dilutions between 1/10000 and 1/100. As Fig. 1f shows, a larger S/B ratio was obtained working with intermediates dilutions (1/2500−1/1000). Larger dilutions provoked that the limited concentration of enzymatic tracer did not allow good discriminations, while small dilutions gave rise to an unacceptable increase in the non-specific adsorptions. A 1/2500 dilution was selected for further work.

Other experimental variables used in the development of the

Table 1
Optimization of the different experimental variables affecting the performance of the amperometric MBs-based immunoassay for the determination of MMP-9.

Variable	Studied range	Selected value
Loading of cAb, μg mL^{-1}	2.5–50.0	25.0
Time for cAb incubation, min	15–90	15
Incubation steps	1–3	1
Incubation time forthe one-step protocol, min	15–60	30
biotin-dAb concentration, μg mL^{-1}	0.5–2.5	1.0
Strep-HRP dilution	1/10000–1/100	1/2500

immunosensor are the amount of HOOC-MBs, the applied potential (−0.2 V *vs*. Ag pseudoreference electrode), the pH and composition of the supporting electrolyte and the concentrations of H_2O_2 and HQ, were taken from previous works [21,22]. The selected pH value, 6.0, agrees with the optimum pH range (6.0–6.5) reported for HRP [23].

3.2. Calibration plot for MMP-9

Fig. 2a displays the calibration graph obtained by plotting the variation in the measured cathodic current *vs.* the MMP-9 standard solution concentration using the MBs-based sandwich immunosensors. It becomes apparent that two different linear ranges appear: from 8.0 to 75 pg mL^{-1} (Fig. 2b, R^2 = 0.9995; slope: 3.68 ± 0.08 mL nA pg^{-1} and intercept: 320 ± 4 nA) and from 75 to 10000 pg mL^{-1} (Fig. 2c, R^2 = 0.9999; slope: 0.491 ± 0.004 mL nA pg^{-1} and intercept: 518 ± 17 nA). This behaviour has been previously reported for other immunosensors [24,25] and can be attributed to the limited amount of cAb immobilized on MBs, which causes sensitivity to decrease when large antigen concentrations are determined. Limit of detection (LOD) and quantification (LQ) values of 2.4 and 8.0 pg mL^{-1} were estimated as 3 × s_b/m and 10 × s_b/m, respectively (s_b was taken as the standard deviation of ten measurements obtained in the absence of MMP-9, and m is the slope of the calibration plot obtained for the lower concentrations (Fig. 2b)).

A relative standard deviation (RSD) value of 3.8% was calculated from 10 measurements of 750 pg mL^{-1} MMP-9, indicating good reproducibility of the whole assay, including the formation of the sandwich immunocomplexes onto the MBs and the amperometric detection at SPCEs.

It is important to note that the achieved LOD value, in the low pg mL^{-1} level (2.4 pg mL^{-1}), is similar to that reported by Ruiz-Vega et al. (13 pg mL^{-1}) [14] but using a more simple protocol (it does not require the 1 h preparation of the immuno-modified Poly-HRP conjugate, and the incubation of the activated HOOC-MBs with the cAb takes 35 min instead of 2 h). On the other hand, when compared with the impedimetric immunosensor reported recently by Shabani et al. [16], the immunosensor reported in this work provides an LOD value more than 60 times lower (2.4 *vs.* 150 pg mL^{-1}) and requires 2 h and 10 min for the preparation of the blocked cAb-MBs versus the 12 h needed for the preparation of the impedimetric immunosensor. All these features make the proposed immunoplatform more suitable for future implementation into POC devices using simpler and shorter protocols.

3.3. Storage stability of the magnetic immunoconjugates

To assess the storage stability of cAb-MBs and evaluate the possibility of shortening the assay time using previously prepared magnetic immunoconjugates, several batches of cAb-MBs were prepared at the same time and stored in 0.01 mol L^{-1} PBS of pH 7.5 at 4 °C in microcentrifuge tubes. Different immunosensors were prepared each control day using the stored immunoconjugates and amperometric measurements both in the absence and in the presence of 5000 pg mL^{-1} MMP-9 were performed. The results, displayed in Fig. 3, showed no significant differences in the amperometric responses measured upon 15 days of storage under the above-mentioned conditions.

3.4. Selectivity

The selectivity of the developed MBs-based immunosensor was evaluated by comparing the amperometric signals measured for 0 and 4000 pg mL^{-1} MMP-9 standards in the absence and in the presence of non-target proteins with relevance in cancer and neurodegenerative disorders as well as of other compounds commonly found in serum samples at the concentration levels expected in healthy individuals. Fig. 4 shows that significantly higher responses were obtained for MMP-9 solutions prepared in the presence of some non-target proteins (tau,

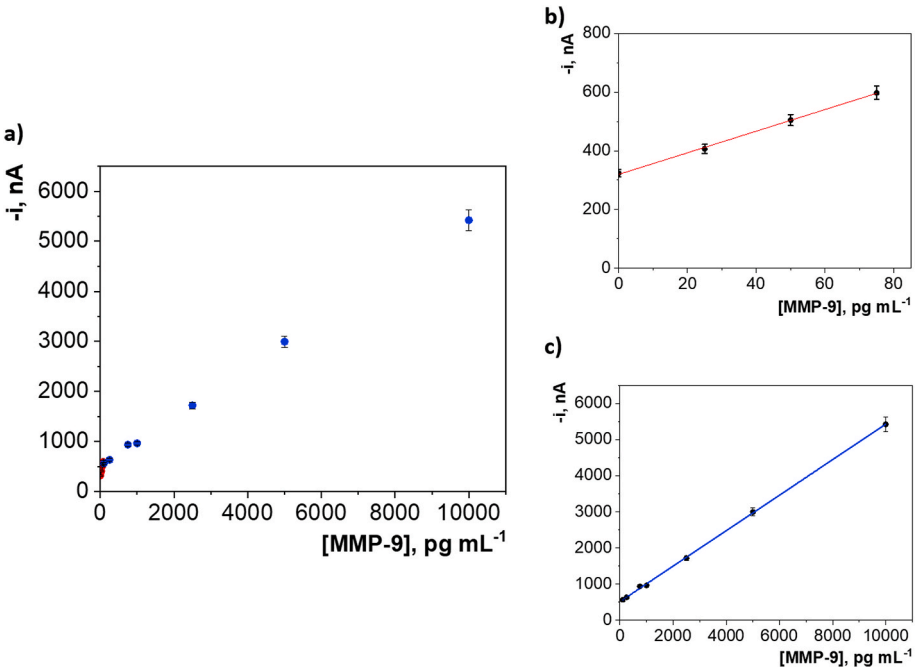


Fig. 2. a) Calibration plot constructed for the amperometric determination of MMP-9 using the developed MBs-based sandwich immunosensor. Linear ranges for b) lower (8.0–75 pg mL^{-1}) and c) higher (75–10000 pg mL^{-1}) MMP-9 concentrations.

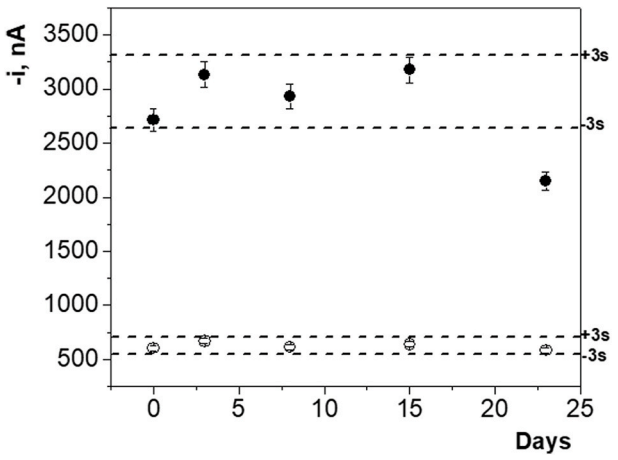


Fig. 3. Storage stability of cAb-MBs immunoconjugates used for the preparation of the amperometric immunosensor for MMP-9. Measurements were made in the absence (empty circles) and in the presence (filled circles) of 5000 pg mL^{-1} MMP-9 standards. Control limits (striped lines) were set as ±3s of the mean value of three measurements obtained the first day of the study for each standard concentration.

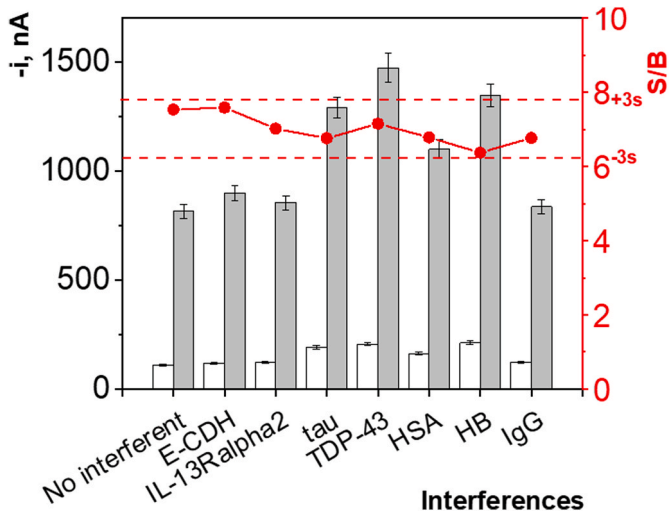


Fig. 4. Effect of the presence of 60 ng mL^{-1} of E-CDH, 10 ng mL^{-1} IL-13Rα2, 5 pg mL^{-1} tau, 1 ng mL^{-1} TDP-43, 5 mg mL^{-1} HSA, 5 mg mL^{-1} HB and 1 mg mL^{-1} anti-human IgG (IgG) on the amperometric responses provided with the developed MBs-based immunosensors for 0 (white bars) and 4000 (grey) pg mL^{-1} MMP-9 standards.

TDP-43) and serum proteins (HSA and HB). Nevertheless, good discrimination was found between the presence and absence of the biomarker in all cases, with the S/B values staying within the ±3s limits. This leads us to conclude that the presence of these interfering compounds will not pose a significant problem for the further determination of the target MMP-9 in clinical samples. The HB interference can be attributed to its well-documented endogenous peroxidase behavior [26]. However, the interference of HSA has been reported in the literature [27] but, at present, no scientific explanation of this as well as of the larger response obtained in the presence of tau and TDP-43 can be made.

3.5. Applicability to the analysis of cellular lysates and serum from BC patients

The clinical usefulness of the developed immunosensor was evaluated by testing the MMP-9 expression in lysates from MDA-MB-436 cells growth in: 1) DMSO, 2) PMA and 3) PMA + BFA as detailed in section 2.5.

The potential existence of matrix effect was checked by comparing the slope values of the calibration plots constructed with MMP-9 buffered standard solutions and with cellular lysates (0.5 μg) treated with DMSO, PMA and PMA + BFA respectively. The Student t-test showed that the slope values for the calibration plots were not significantly different (t_{exp} values of 0.582, 3.195, respectively which were lower than the t_{tab} = 4.303), thus confirming the absence of matrix effect. However, taking into account the low MMP-9 concentration in this small amount of lysate, the determination was made using the standard additions method in the presence 0.5 μg of cellular lysate by adding increasing concentrations of standard solutions (after subtracting the signal obtained in the absence of MMP-9). It is important to mention here that a smaller than expected increase in the amperometric responses were observed when sample amounts larger than 0.5 μg were used. This was attributed to a Hook effect occurring when the amount of the endogenous target MMP-9 exceeds largely that of the cAb immobilized on the MBs. Table 2 summarizes the obtained results, which are in agreement with those provided by Western Blot (WB) (Fig. 5a) and those reported in the literature, indicating that the treatment with PMA - a protein kinase C ligand - markedly stimulates MMP-9 expression to different degrees dependent upon the specific cell line [17]. It is important to note that the presence of BFA does not seem to have much effect on these cells, probably because the target matrix metalloproteinase is not highly secreted and remains intracellular.

The determination of MMP-9 in serum samples was accomplished by using the standard additions method because of the complexity and inter-individual variability observed in some samples. Quantification was made in 50-times diluted with PFBB blocking buffer serum samples with increasing concentrations (0–5000 pg mL^{-1}) of MMP-9 standards added (R^2 = 0.9998, with 0.59 ± 0.05 mL nA pg^{-1} and 396 ± 23 nA, as slope and intercept values, respectively for a representative healthy single serum sample), after subtracting the blank signal obtained with no MMP-9. The results obtained with the immunosensor, plotted by type of patients in Fig. 6a and compared with those provided by the MMP-9 DuoSet commercial ELISA in Fig. 6b, are summarized in Table 3. As it can be observed, in general, the MBs-based immunosensor provides more reproducible results (see ± ts/√n values in Table 3) than the ELISA method. However, there are no significant differences between the results provided by both methodologies, $t_{exp} < t_{tab} = 2.776$; α = 0.05 with slope and intercept values of the correlation plot displayed in Fig. 6b of 0.98 ± 0.02 and 1.9 ± 2.5 including the unit and the zero values, respectively. It is worth noting here than the biosensor reported in Ref. [14] showed a 20% overestimation of the MMP-9 concentration in comparison with the ELISA methodology when it was applied to plasma samples of patients who suffered an ischemic stroke. Moreover, the results provided by the proposed immunoplatform are in quite good agreement with the ranges reported by other authors for BC patients (69.4 ± 44.8 ng mL^{-1}) and healthy controls (19.5 ± 8.5 ng mL^{-1}) and with the cut-off value established for MMP-9 in serum (>50 ng mL^{-1}) [28]. It is important to note that none of the patients considered for the study have metastases or relapses, where higher levels of MMP-9 would be expected [29]. Data plotted in Fig. 6a demonstrate a very low variability between the contents found in each group of patients and the

Table 2
MMP-9 concentration determined with the developed MBs-based immunosensors in cellular lysates samples treated with DMSO, PMA and PMA + BFA.

Lysates of MDA-MB-436 growth in:	[MMP-9][a], pg $μg^{-1}$
DMSO	3 ± 2
PMA	62 ± 4
PMA + BFA	55 ± 6

[a] Mean value ± ts/√n (n = 3; α = 0.05).

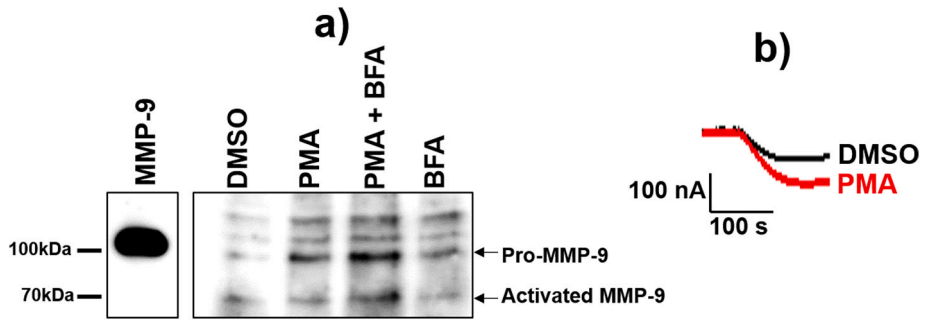


Fig. 5. a) Assessment of MMP-9 expression in MDA-MB-436 cells by WB: 10 μg of each tested lysate was separated by10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes and probed with the indicated antibodies. b) Real amperometric responses recorded with the developed MBs-based immunosensors for 0.5 μg lysates of MDA-MB-436 cultured in the presence of DMSO and PMA.

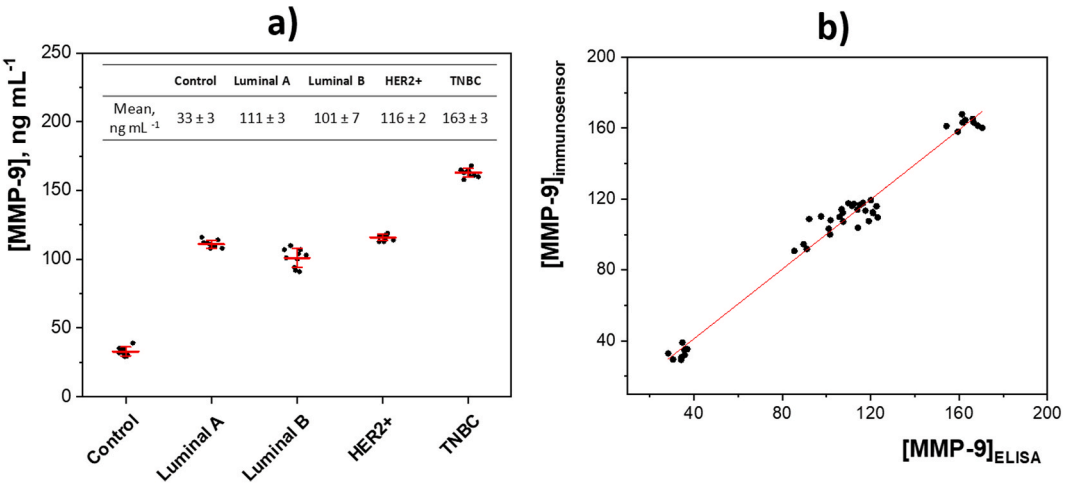


Fig. 6. a) MMP-9 concentrations (in ng mL^{-1}) found with the developed MBs-based immunosensor in serum samples grouped into pools of healthy individuals (Control), and patients diagnosed with the four BC subtypes. b) Correlation plot obtained by comparing the concentrations found with the MBs-based immunosensor and the ELISA kit in the 15 serum samples analyzed (three replicates per determination).

Table 3
Serum MMP-9 levels[a] (in ng mL^{-1}) found in serum samples from healthy individuals (control group), and patients diagnosed with different BC subtypes.

Group		Sample	Immunosensor	ELISA	t_{exp}
Healthy individuals	Control	1	36 ± 9	36 ± 3	0.172
		2	31 ± 4	31 ± 8	0.002
		3	33 ± 8	35 ± 2	1.178
BC patients	Luminal A	4	109 ± 3	99 ± 15	2.738
		5	113 ± 3	108 ± 6	2.629
		6	110 ± 6	118 ± 11	2.719
	Luminal B	7	92 ± 5	89 ± 7	1.818
		8	104 ± 9	107 ± 15	0.973
		9	107 ± 8	105 ± 8	0.777
	HER2+	10	116 ± 8	120 ± 6	1.678
		11	117 ± 1	115 ± 5	2.074
		12	115 ± 6	115 ± 14	0.046
	TNBC	13	163 ± 7	161 ± 15	0.688
		14	161 ± 6	165 ± 12	1.266
		15	164 ± 10	161 ± 12	0.176

[a] Mean value ± $ts/\sqrt{n}$ (n = 3; α = 0.05).

possibility to discriminate clearly healthy subjects from BC patients. Moreover, the significantly higher expression of MMP-9 found in TNBC samples, which is in agreement also with recent findings [30], demonstrates the practical usefulness of the proposed MBs-based immunosensors to identify the TNBC subtype, the most invasive one with the highest probability of early recurrence.

All these results demonstrate the reliability and accuracy of the developed MBs-based immunosensor for the determination of MMP-9 using a very simple and rapid protocol (a single 30-min incubation step once the cAb-MBs are prepared). It should also be emphasized that the developed immunoplatform requires a smaller amount of samples (0.5 *vs.* 10 μg of cell lysates and 0.5 *vs.* 100 μL serum) and a considerably shorter test time than that demanded by other methodologies (~14 h WB and 5 h 20 starting from the cAb-coated plate by the MMP-9 DuoSet commercial ELISA).

4. Conclusions

This work reports a MBs-based immunosensor, based on a sandwich format and amperometric detection at SPCEs using the H_2O_2/HQ system, that allows the sensitive, selective and accurate determination of MMP-9 using a simple 30-min incubation protocol. This simplicity does not affect the sensitivity and entails significantly less user manipulation which makes the immunosensor competitive with other electrochemical immunosensors recently reported in terms of easier automation and an adequate operation in POC settings with minimal technical requirements. It is also important to highlight that the results obtained in

the analysis of cell lysates and serum samples from patients diagnosed with different BC subtypes, after just a dilution, are in agreement with those provided by conventional methodologies. Importantly, the quantitative results obtained suggest potential, in addition to BC diagnosis, for identifying the TNBC subtype with a very poor overall prognosis. The unique features in terms of simplicity, sensitivity, disposable character, affordable cost and applicability in decentralized environments, make the proposed immunoplatforms as a very attractive complement to clinically established methodologies for BC prediction and prognostic.

Credit author statement

Beatriz Arévalo: Conceptualization, Investigation, Writing, Review & Editing - original draft. Amira ben Hassine: Conceptualization, Investigation, Writing, Review & Editing - original draft. Alejandro Valverde: Conceptualization, Investigation, Writing, Review & Editing - original draft. Verónica Serafín: Conceptualization, Investigation, Writing, Review & Editing - original draft. Ana Montero-Calle: Investigation, Resources, Review & Editing - original draft. Noureddine Raouafi: Resources, Review & Editing - original draft and Funding acquisition. Jordi Camps: Resources, Review & Editing - original draft and Funding acquisition. Meritxell Arenas: Resources, Review & Editing - original draft and Funding acquisition. Rodrigo Barderas: Conceptualization, Supervision, Resources, Review & Editing - original draft and Funding acquisition. Susana Campuzano: Conceptualization, Supervision, Writing, Review & Editing - original draft and Funding acquisition. Paloma Yáñez-Sedeño: Conceptualization, Supervision, Writing, Review & Editing - original draft and Funding acquisition. José M. Pingarrón: Review & Editing - original draft and Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The financial support of RTI2018-096135-B-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades) and PID2019-103899RB-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación), Research Projects, PI17CIII/00045 and PI20CIII/00019 grants from the AES-ISCIII Program and the TRANSNANOAVANSENS-CM Program from the Comunidad de Madrid (Grant S2018/NMT-4349) are gratefully acknowledged. A.B.H. acknowledges the ISP-funded network “ANEC” for the financial support and the University of Tunis El Manar for the mobility grant “boursed’alternance”. A.V. acknowledges a predoctoral contract from Universidad Complutense de Madrid. A.M-C. is supported by a FPU predoctoral contract supported by the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

References

[1] J. Cathcart, A. Pulkoski-Gross, J. Cao, Targeting matrix metalloproteinases in cancer: bringing new life to old ideas, Genes Dis 2 (2015) 26–34, https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.12.002.
[2] R. Roy, J. Yang, M.A. Moses, Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer, J. Clin. Oncol. 27 (2009) 5287–5297, https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.5556.
[3] M. Egeblad, Z. Werb, New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, Nat. Rev. Canc. 2 (2002) 161–174, https://doi.org/10.1038/nrc745.
[4] P. Vihinen, V.M. Kähäri, Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets, Int. J. Canc. 99 (2002) 157–166, https://doi.org/10.1002/ijc.10329.
[5] H. Huang, Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances, Sensors 18 (2018) 3249, https://doi.org/10.3390/s18103249.
[6] Q. Yu, I. Stamenkovic, Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis, Genes Dev. 14 (2000) 163–176, https://doi.org/10.1101/gad.14.2.163.
[7] E. Hadler-Olsen, J.-O. Winberg, L. Uhlin-Hansen, Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets, Tumor Biol. 34 (2013) 2041–2051, https://doi.org/10.1007/s13277-013-0842-8.
[8] N.G. Hurst, D.D. Stocken, S. Wilson, C. Keh, M.J. Wakelam, T. Ismail, Elevated serum matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) concentration predicts the presence of colorectal neoplasia in symptomatic patients, Br. J. Canc. 97 (2007) 971–977, https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603958.
[9] S. Wilson, M.J. Wakelam, R.F. Hobbs, A.V. Ryan, J.A. Dunn, V.D. Redman, F. Patrick, L. Colbourne, A. Martin, T. Ismail, Evaluation of the accuracy of serum MMP-9 as a test for colorectal cancer in a primary care population, BMC Canc. 6 (2006) 258, https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-258.
[10] A. Biela, M. Watkinson, U.C. Meier, D. Baker, G. Giovannoni, C.R. Becer, S. Krause, Disposable MMP-9 sensor based on the degradation of peptide cross-linked hydrogel films using electrochemical impedance spectroscopy, Biosens. Bioelectron. 68 (2015) 660–667, https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.01.060.
[11] M. Castellanos, R. Leira, J. Serena, J.M. Pumar, I. Lizasoain, J. Castillo, A. Dávalos, Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke, Stroke 34 (2003) 40–46, https://doi.org/10.1161/01.STR.0000046764.57344.31.
[12] G.V. Halade, Y.-F. Jin, M.L. Lindsey, Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation, Pharmacol. Ther. 139 (2013) 32–40, https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.03.009.
[13] J. Lee, J.Y. Yun, W.C. Lee, S. Choi, J. Lim, H. Jeong, D.-S. Shin, Y.J. Park, A reference electrode-free electrochemical biosensor for detecting MMP-9 using a concentric electrode device, Sensor. Actuator. B Chem. 240 (2017) 735–741, https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.026.
[14] G. Ruiz-Vega, A. García-Robaina, M. Ben Ismail, H. Pasamar, T. García-Berrocoso, J. Montaner, M. Zourob, A. Othmane, F.J. del Campo, E. Baldrich, Detection of plasma MMP-9 within minutes. Unveiling some of the clues to develop fast and simple electrochemical magneto-immunosensors, Biosens. Bioelectron. 115 (2018) 45–52, https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.05.020.
[15] G. Ruiz-Vega, T. García-Berrocoso, J. Montaner, E. Baldrich, Paper microfluidics on screen-printed electrodes for simple electrochemical, Sensor. Actuator. B Chem. 298 (2019) 126897, https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126897.
[16] E. Shabani, M.J. Abdekhodaie, S.A. Mousavi, F. Taghipour, ZnO nanoparticle/nanorod-based label-free electrochemical immunoassay for rapid detection of MMP-9 biomarker, Biochem. Eng. J. 164 (2020) 107772, https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107772.
[17] M.W. Roomi, J.C. Monterrey, T. Kalinovsky, M. Rath, A. Niedzwiecki, Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines, Oncol. Rep. 21 (2009) 1323–1333, https://doi.org/10.3892/or_00000358.
[18] R.M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, M. Pedrero, M. Farchado, E. Vargas, F.J. Manuel de Villena, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas, J.M. Pingarrón, Electrochemical sensor for rapid determination of fibroblast growth factor receptor 4 in raw cancer cell lysates, PloS One 12 (2017), e0175056, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175056.
[19] A. Valverde, E. Povedano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, P. Yáñez-Sedeño, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Electrochemical immunosensorfor IL-13 Receptor α2 determination and discrimination of metastatic colon cancer cells, Biosens. Bioelectron. 117 (2018) 766–772, https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.017.
[20] U. Eletxigerra, J. Martínez-Perdiguero, R. Barderas, J.M. Pingarrón, S. Campuzano, S. Merino, Surface plasmon resonance immunosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum and raw cancer cell lysates, Anal. Chim. Acta 905 (2016) 156–162, https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.020.
[21] M. Eguílaz, M. Moreno-Guzmán, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes, Biosens. Bioelectron. 26 (2010) 517–522, https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.060.
[22] F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, D.G. Pinacho, A.J. Reviejo, M.P. Marco, J. M. Pingarrón, Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk, Biosens. Bioelectron. 36 (2012) 81–88.
[23] D. Schomberg, M. Salzmann, D. Stephan, Enzyme Handbook 7 (1993) 1–6. EC 1.11.1.7.
[24] H. Afsharad, B. Khalilzadeh, H. Tajalli, M. Mollabashi, F. Navaeipour, M. R. Rashidi, A sandwich type immunosensor for ultrasensitive electrochemical quantification of p53 protein based on gold nanoparticles/graphene oxide, Electrochim. Acta 188 (2016) 153–164.
[25] S. Guerrero, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Design of electrochemical immunosensors using electro-click chemistry. Application to the detection of IL-1β cytokine in saliva, Bioelectrochemistry 133 (2020) 107484, https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107484.
[26] D.V. Grigorieva, I.V. Gorudko, A.V. Sokolov, O.V. Kosmachevskaya, A.F. Topunov, I.V. Buko, E.E. Konstantinova, S.N. Cherenkevich, O.M. Panasenko, Measurement of plasma hemoglobin peroxidase activity, Bull. Exp. Biol. Med. 155 (2013) 118–121, https://doi.org/10.1007/s10517-013-2095-3.
[27] R.N. Zhao, Z. Feng, Y.N. Zhao, L.P. Jia, R.N. Ma, W. Zhang, L. Shang, Q.-W. Xue, H.-S. Wang, A sensitive electrochemical aptasensor for Mucin1 detection based on catalytic hairpin assembly coupled with PtPdNPs peroxidase-like activity, Talanta 200 (2019) 503–510, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.012.

[28] Z.-S. Wu, Q. Wu, J.-H. Yang, H.-Q. Wang, X.-D. Ding, F. Yang, X.-C. Xu, Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer, Int. J. Canc. 122 (2008) 2050–2056, https://doi.org/10.1002/ijc.23337.
[29] E.M. Yousef, M.R. Tahir, Y. St-Pierre, L.A. Gaboury, MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer, BMC Canc. 14 (2014) 609. http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/609.
[30] R.-X. Wang, S. Chen, L. Huang, Z.-M. Shao, Predictive and prognostic value of Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in neoadjuvant chemotherapy for triple-negative breast cancer patients, BMC Canc. 18 (2018) 909, https://doi.org/10.1186/s12885-018-4822-7.

Bioelectrochemistry 144 (2022) 108041

Contents lists available at ScienceDirect

Bioelectrochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioelechem

Unraveling autoimmune and neurodegenerative diseases by amperometric serological detection of antibodies against aquaporin-4

Beatriz Arévalo [a], Marina Blázquez [a], Verónica Serafín [a], Ana Montero-Calle [b], Miguel Calero [b,c], Alejandro Valverde [a], Rodrigo Barderas [b], Susana Campuzano [a,*], Paloma Yáñez-Sedeño [a,*], José M. Pingarrón [a]

[a] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28014-Madrid, Spain
[b] Chronic Disease Programme, UFIEC, Institute of Health Carlos III, Majadahonda, 28220-Madrid, Spain
[c] Alzheimer's Center Reina Sofía Foundation –CIEN Foundation and CIBERNED, Institute of Health Carlos III, Majadahonda, 28220-Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 31 October 2021
Received in revised form 28 November 2021
Accepted 8 December 2021
Available online 13 December 2021

Keywords:
Aquaporin-4 antibodies
Electrochemical bioplatform
Autoimmune diseases
Serum

ABSTRACT

This work reports the first electroanalytical bioplatform to date for the determination of antibodies against aquaporin-4 (AQP4-Abs), whose serum level is considered as relevant biomarker for certain autoimmune diseases. The bioplatform relies on the use of magnetic microparticles modified with the biotinylated protein for the capture of specific antibodies. The captured IgGs are enzymatically labelled with a secondary antibody conjugated to the horseradish peroxidase (HRP) enzyme. Amperometric transduction is performed using the H_2O_2/hydroquinone (HQ) system, which results in a cathodic current variation directly proportional to the concentration of the target antibodies. The evaluation of the analytical and operational characteristics of the developed bioplatform shows that it is competitive in terms of sensitivity with the only biosensor reported to date as well as with the commercially available ELISA kits. The achieved limit of detection value is 8.8 pg mL^{-1}. In addition, compared to ELISA kits, the developed bioplatform is advantageous in terms of cost and point of care operation ability. The bioplatform was applied to the analysis of control serum samples with known AQP4-Abs contents as well as of sera from healthy individuals and patients diagnosed with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Alzheimer (AD) diseases, providing results in agreement with the ELISA methodology.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In an allergic reaction, a viral or bacterial infection, and in many other diseases, when certain self-antigens (nucleic acids, proteins, nuclear molecules, receptors, or other functional cell components) are altered due to overexpression or some aberrant modification, the immune system reacts by producing self-reactive antibodies against them, called natural antibodies or autoantibodies.

The level of autoantibodies in serum (mostly immunoglobulins G, IgGs) plays a key role in the diagnosis and classification of a large number of disorders and illnesses. Autoantibody levels can be used for the early detection of the disease, since several longitudinal cohort studies showed that patients can carry autoantibodies years before the manifestation of clinical symptoms [1,2], thus having a strong predictive value. Moreover, autoantibody concentration can be employed for monitoring the evolution of the disease, since once cure occurred, the production of autoantibodies should progressively decrease to the basal level of healthy individuals. It is important to note that autoantibodies are more stable than their specific antigens in blood, and they are indicative of very low concentrations of the target antigens due to amplification by the immune system.

The important advantages as biomarkers of autoantibodies have driven the search for new specific autoantigens to aid in the minimally invasive diagnosis and monitoring of prevalent chronic diseases.

In the case of autoimmune diseases such as Graves' disease, systemic lupus erythematosus (SLE), multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), or neurological disease disorders (NDDs) that are thought to be linked with autoimmune diseases, including a heterogeneous group of chronic disorders like Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), or dementia with Lewy bodies (DLB), protein misfolding, aggregation and dysregulation of specific autoantigens and corresponding self-antibodies are demonstrated key factors for disease development and evolution [3].

* Corresponding authors.
E-mail addresses: susanacr@quim.ucm.es (S. Campuzano), yseo@quim.ucm.es (P. Yáñez-Sedeño).

https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.108041
1567-5394/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Autoantibodies against nuclear antigens, cyclic citrullinated peptide, thrombin, rheumatoid factor, thyrotropin receptor and aquaporin-4 have been found to be associated with autoimmune diseases.

Aquaporin-4 protein (AQP4) is a protein belonging to the aquaporin family (with 13 members, AQP0-12), expressed by astrocytes as a long (M−1) or short (M−23) isoform [4]. AQP4 is the most expressed AQP in the mammalian brain and is considered of crucial importance in facilitating the removal of waste products from the brain [5,6]. AQP4 has been proposed as the main autoimmune target of neuromyelitis optica (NMO), also known as Devic syndrome, an immune-mediated neurological disease affecting the spinal cord and optic nerves [7]. Autoantibodies against AQP4 (called NMO-IgGs or AQP4-Abs) are involved in the immunopathogenesis of NMO and are highly specific serum marker to differentially diagnose NMO and MS [5,8–19]. Interestingly, an AQP4-Abs seropositive status has also been associated with other autoimmune diseases such as autoimmune thyroiditis and SLE [20]. Indeed, recent works indicate that some patients with juvenile SLE develop AQP4-Abs and may be at risk for developing a neurologic clinical phenotype [21].

All these precedents show the interest of AQP4-Abs determination as a powerful tool for the differential diagnosis of NMO and as a biomarker in a variety of autoimmune diseases and NDDs. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits based on different immunoassay formats are commercially available (detailed information and characteristics in **Table S1** in the Supporting Information) for determining AQP4-Abs. However, these methods require specialized instrumentation which restricts their application to centralized environments.

Within this context, electrochemical biosensors are an interesting alternative due to their affordable cost, simplicity of use, and compatibility with point-of-care (POC) operation. In fact electrochemical biosensors have recently demonstrated to be competitive tools for the identification, validation and determination of autoantibodies against tumor-associated antigens in serum [22] or in exosomes released from tumor cells or tissues [23] using HaloTag fusion proteins, as well as of relevance in Alzheimer's disease using phage-displayed or aberrant peptides as bioreceptors [24]. However, to our knowledge only one biosensor appears in the literature for the determination of AQP4-Abs. It involves the use of a carbon nanotube field-effect transistor (CNT-FET) functionalized with AQP4 extracellular loop peptides and achieves a LOD value of 1 ng mL^{-1} [25]. However, the biosensor was only applied to the antibodies determination in a supplemented commercial human serum sample, and not in real samples from patients.

Here we report the first magnetic microbeads (MBs)-based bioplatform for the determination of AQP4-Abs. The developed strategy involves the use of MBs functionalized with streptavidin (Strept-MBs) and modified with biotinylated-AQP4 (b-AQP4) for the selective capture of immunoglobulins against this protein. The detection of IgG attached to the AQP4-b-Strep-MBs is performed by labelling with a secondary antibody conjugated to the HRP enzyme (HRP-antihIgG) and amperometry after capturing the resulting magnetic bioconjugates (HRP-antihIgG-Abs-AQP4-b-Strept-MBs) on the working electrode of a screen-printed carbon electrode (SPCE). In the presence of the H_2O_2/HQ system, the measured cathodic current variation is directly proportional to the concentration of AQP4-Abs. Under the selected experimental conditions, the developed bioplatform was employed for the determination of AQP4-Abs in serum controls with known concentration of target Abs and in serum samples from patients diagnosed with autoimmune diseases (SLE) and NDDs (AD).

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Biotin-AQP4 conjugate (b-AQP4) and AQP4-Abs standard (100 ng mL^{-1}), sample diluent, HRP-avidin diluent and wash buffer were components of the human AQP4 Abs ELISA kit from Cusabio (Cat. No. CSB-E13568h). HRP-labelled goat anti-human IgG-HRP (HRP-antihIgG, 1 mg mL^{-1}) was from Abcam (Cat. No. ab97225). Streptavidin-modified magnetic microparticles (Strep-MBs, 2.8 μm Ø, 10 mg mL^{-1}, Ref: 11205D) were purchased from Invitrogen-Thermo Fisher™. Sodium chloride, potassium chloride, sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate and Tris-hydroxymethyl-aminomethane-HCl (Tris-HCl) were purchased from Scharlab. Hydroquinone (HQ), and hydrogen peroxide (H_2O_2, 30% w/v) were purchased from Sigma-Aldrich. Bovine serum albumin (BSA 100%, Type VH, Cat. No. 90604–29-8) was from Gerbu Biotechnik, GmbH. Human hemoglobin (HB, Cat. No. H7379), albumin from human serum (HSA, Cat. No. A1653), IgG from human serum (hIgG, Ref: I2511) all from Sigma-Aldrich, and anti-dsDNA Abs standard (Cat. No. DEIA 1681) from Creative Diagnostics, were used for selectivity studies.

Positive and negative serum control samples were provided in the AQP4-Abs ELISA Version 2 Kit from RSR Limited.

Water purified by the Milli-Q purification system (18.2 MΩ cm) was used for the preparation of all solutions. The used buffers included: B&W buffer pH 7.5 (0.01 mol L^{-1} Tris-HCl pH 7.5 containing 1 mmol L^{-1} EDTA and 2 mmol L^{-1} NaCl), 0.01 mol L^{-1} phosphate buffer saline solution (PBS) pH 7.5 and 0.05 mol L^{-1} phosphate buffer (PB) solution pH 6.0.

The solutions used to perform the amperometric detection: 0.1 mol L^{-1} H_2O_2 and 0.1 mol L^{-1} HQ, were freshly prepared in phosphate buffer solution pH 6.0.

2.2. Apparatus and electrodes

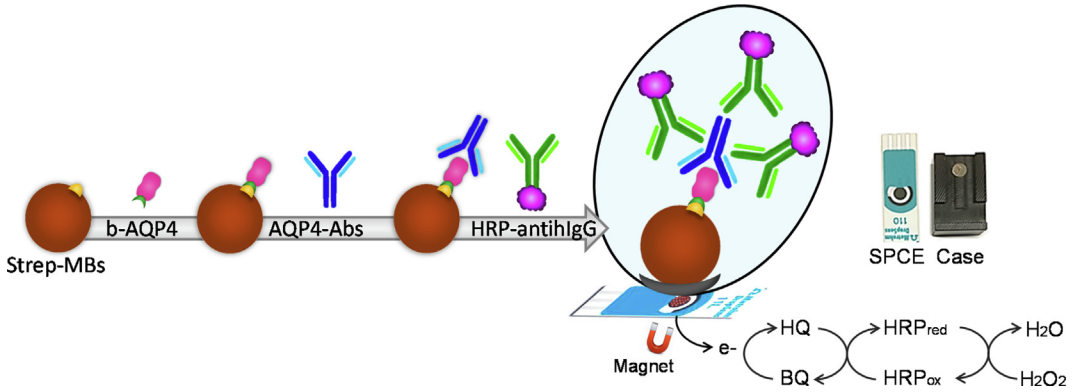
A magnetic concentrator DynaMag-2 (Cat. No. 12321D, Dynabeads®, Invitrogen-Thermofisher Scientific), a Bunsen AGT-9 Vortex, a Thermo-Shaker MT100 (Universal Labortechnik), a P-Selecta (Cencom) centrifuge, a Crison model Basic 20 + pH-meter, an Elmasonic S-60 (Elma) ultrasonic bath and a magnetic stirrer MS01 (ElMI, Ltd.) were employed.

All the amperometric measurements were made at room temperature using a model CHI812B (CH Instruments, Inc.) potentiostat controlled by the CHI812B software. Screen-printed carbon electrodes (SPCEs, DRP110, 4-mm Ø) and a specific cable connector (DRP-CAC) from Metrohm-DropSens were used. The measurements were performed in stirring solutions using 10 mL glass electrochemical cells from Pobel, where the SPCEs placed on a homemade polymethylmethacrylate (PMMA) casing with a neodymium magnet (AIMAN GZ) embedded were immersed.

ELISA absorbance readings were made in a Sunrise™ Tecan microplate reader with the Magellan V 7.1 software.

2.3. Preparation of the magnetic immunoconjugates

The protocol for the preparation of immunoconjugates on the MBs (scheme shown in Scheme 1), including washing and incubation steps, was performed in 1.5 mL microcentrifuge tubes which were placed in the magnetic concentrator for 2 min before removing the supernatant. A 5-μL aliquot of the Strep-MBs suspension was washed twice with 50 μL of B&W buffer and modified with b-AQP4 by incubation for 30 min (37 °C, 950 rpm) with 25 μL of the b-AQP4 solution, 100-fold diluted in B&W buffer. After washing twice with 0.01 mol L^{-1} PBS solution, AQP4-b-Strep-MBs were



Scheme 1. Schematic diagram of the bioconjugate preparation and amperometric transduction steps involved in the determination of AQP4-Abs with the developed bioplatform.

incubated for 60 min (37 °C, 950 rpm) with 25 μL of the AQP4-Abs standard or the serum sample (in sample diluent). Upon washing twice with PBS solution, the Abs-AQP4-b-Strep-MBs were enzymatically labelled by incubation with 25 μL of 2,500-fold diluted (in HRP-avidin diluent) HRP-antihIgG solution for 30 min (37 °C, 950 rpm). The resulting magnetic bioconjugates were washed twice with PBS solution and resuspended in 50 μL of 0.05 mol L^{-1} PB solution (pH 6.0) to carry out the amperometric transduction.

2.4. Amperometric detection

Once the SPCE was placed on the homemade PMMA casing with the embedded neodymium magnet, the 50 μL modified MBs suspension were cast onto the working electrode surface. Then, the casing-electrode assembly was connected through the specific cable to the potentiostat and was immersed in the electrochemical cell containing 10 mL of 0.05 mol L^{-1} PB (pH 6.0) and 100 μL of freshly prepared 0.1 mol L^{-1} HQ solution. A constant potential of −0.20 V vs. Ag pseudo-reference electrode was applied under stirring conditions. Upon stabilization of the background current (approximately 100 s), 50 μL 0.1 mol L^{-1} H_2O_2 enzymatic substrate (freshly prepared in PB, pH 6.0) were added to the cell, and the cathodic current variation occurring by the enzymatic reduction of H_2O_2 mediated by HQ was recorded until the steady state was reached. Amperometric signals were calculated as the difference between such steady state currents and the background currents. The given values are the mean value of three replicates and the error bars were estimated as three times the standard deviation of each set of replicates (α = 0.05).

2.5. Analysis of serum samples

The developed immunosensing bioplatform was used to analyze serum samples from control subjects. Sera from AD patients were provided by Institute of Health Carlos III, after approval of the Institutional Ethical Review Boards and with the written informed consent of all participating individuals. Sera from SLE patients were purchased from Central BioHub. All the experiments were performed accomplishing all the ethical issues and relevant guidelines and regulations of the involved institutions. The samples were stored at −80 °C until use. Once the absence of matrix effect was verified for samples diluted 2,500 times or more, the determination was made by simple interpolation of the signals obtained for the 2,500-diluted samples into the calibration graph constructed with the AQP4-Abs standards.

3. Results and discussion

Scheme 1 illustrates the employed methodology involving an immunoassay strategy assisted by the use of Strep-MBs functionalized with b-AQP4 for the selective capture of AQP4-Abs. The target Abs were detected, prior enzymatic labelling with a secondary antibody and magnetic capture on the surface of the SPCE working electrodes, by amperometry using H_2O_2 as enzymatic substrate and HQ as redox mediator. The measured cathodic current variation, attributed to HQ-mediated enzymatic reduction of the substrate, was directly proportional to the concentration of AQP4-Abs.

3.1. Optimization of the experimental variables

The influence of the following key variables on the bioplatform performance was evaluated: b-AQP4 dilution (a) and incubation time (b) for immobilization on Strep-MBs, AQP4-Abs incubation time for their capture on AQP4-b-Strep-MBs (d), HRP-antihIgG dilution (e) and incubation time (f) for enzymatic labelling of the captured AQP4-Abs, as well as the number of incubation steps used for capturing and enzymatic labelling of AQP4-Abs on AQP4-b-Strep-MBs (c). The amperometric responses provided by the immunoplatforms in the absence (blank, B) and in the presence of 2.5 ng mL^{-1} AQP4-Abs standards (signal, S) and the S/B ratio were compared (Fig. 1). Moreover, the experimental variables involved in the amperometric transduction (detection potential, pH of the supporting electrolyte and H_2O_2 and HQ concentrations) were those optimized in previous works [26–28].

As can be deduced, larger S/B ratios were obtained when Strep-MBs were modified by incubation in a 100 times diluted b-APQ4 solution for 30 min (Fig. 1**a and 1b**, respectively). The lower S values obtained with larger b-APQ4 concentrations (Fig. 1**a**) can be attributed to steric hindrance when large antigen concentrations are immobilized on Strep-MBs [29]. It is important to highlight the lack of discrimination (S/B ∼ 1) found in the absence of b-AQP4, in agreement with the rationale of the methodology. Key to the simplicity and the time lasted by the assay is to evaluate whether capture and labelling of the target AQP4-Abs can be performed in a single step or should be done in different steps. Fig. 1**c** shows as the S/B ratio was notably better when the capture of the target Abs and their enzymatic labelling was carried out in independent steps, which can be attributed to the less efficient capture of the target Abs when they are labelled with the secondary antibody. Therefore, the 2-steps protocol was selected for further work. Fig. 1**d** shows that a 60 min incubation time is suitable for an efficient capture of AQP4-Abs, with worse S/B ratios for longer incubation possibly due to aggregation phenomena. Fur-

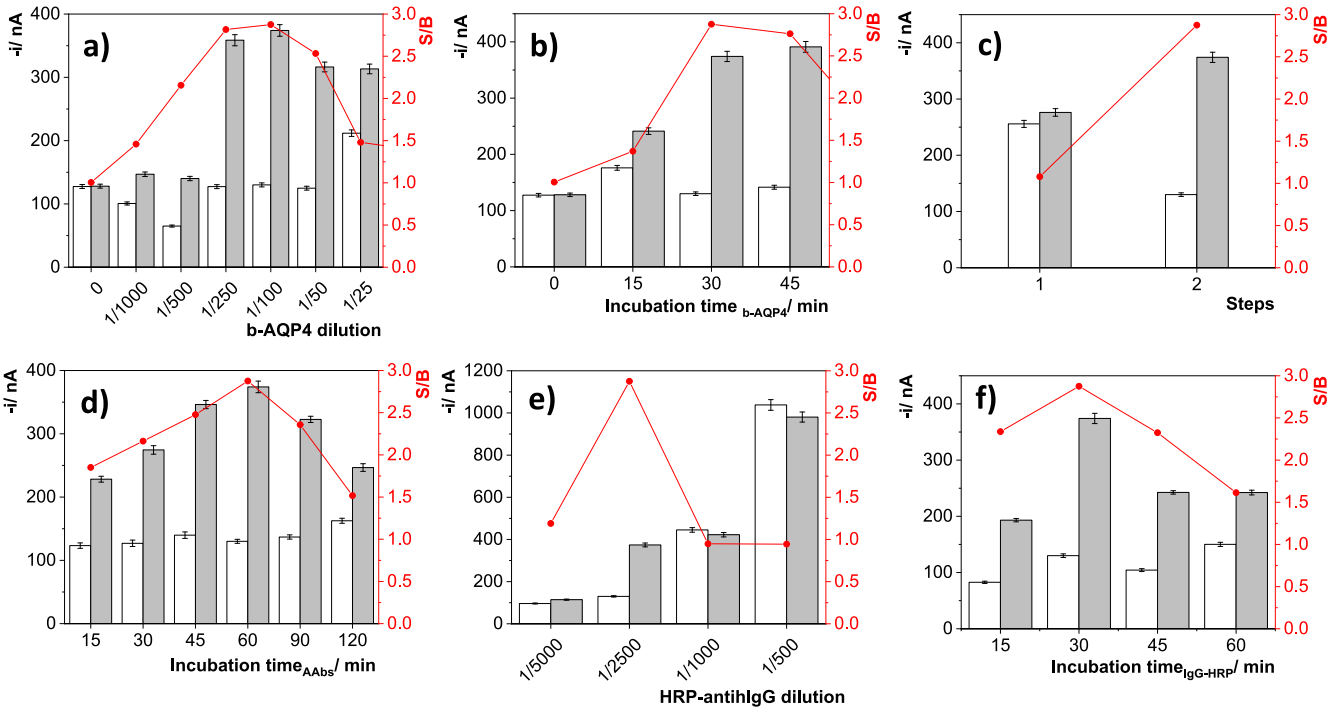


Fig. 1. Dependence of the amperometric responses provided by the developed bioplatforms in the absence (blank, B, white bars) and in the presence of 2.5 ng mL^{-1} AQP4-Abs standards (signal, S, grey bars) as well as the corresponding S/B ratio with the b-AQP4 dilution (a) and incubation time (b) for their immobilization on Strep-MBs, number of incubation steps: (1) capture and labelling of the target AQP4-Abs in a single step or (2) in two successive independent incubation steps (c), AQP4-Abs incubation time for their capture on AQP4-b-Strep-MBs (d), HRP-antihIgG dilution (e) and incubation time (f) for enzymatic labelling of the captured AQP4-Abs.

thermore, larger S/B ratios were found for enzymatic labelling of the captured AQP4-Abs on AQP4-b-Strep-MBs by incubation with a 1/2,500 diluted HRP-antihIgG solution (Fig. 1**e**) for 30 min (Fig. 1**f**). The optimized variables and the selected values are summarized in Table 1. Accordingly, the determination of AQP4-Abs starting from the prepared AQP4-b-Strep-MBs requires 2 incubation steps and 90 min.

3.2. Analytical and operational characteristics of the bioplatform

The analytical and operational characteristics of the developed bioplatform for the amperometric determination of AQP4-Abs standards were evaluated. The calibration graph displayed in Fig. 2 exhibits a linear dependence of the cathodic current variation with the logarithm of the AQP4-Abs standard concentration over the 0.03 to 2.5 ng mL^{-1} range (r^2 = 0.993; slope = (96 ± 4) nA^{-1}; intercept = (332 ± 4) nA). Concentrations larger than 2.5 ng mL^{-1} provoked a drastic decrease in the amperometric response attributed to the high-dose Hook effect due to the saturation of the b-AQP4 and the HRP-antihIgG by the high analyte concentration [30].

The values of the limits of detection and quantification, were estimated according to the 3 × s_b/m and 10 × s_b/m criteria, where s_b was the standard deviation of 10 amperometric measurements in the absence of AQP4-Abs, and m is the slope of the calibration graph. The calculated values were 8.8 and 29.2 pg mL^{-1}, respectively.

Table 1
Optimization of the experimental variables for the preparation of the HRP-antihIgG-Abs-AQP4-b-Strep-MBs bioconjugates used for the amperometric determination of AQP4-Abs.

Variable	Tested range	Selected value
b-AQP4 dilution	1/1,000–1/10	1/100
b-AQP4 incubation time, min	15–60	30
AQP4-Abs incubation time, min	15–120	60
HRP-antihIgG dilution	1/5,000–1/500	1/2,500
HRP-antihIgG incubation time, min	15–60	30
Incubation steps	1–2	2

The amperometric responses for 0.5 ng mL^{-1} AQP4-Abs standard obtained with 10 bioplatforms prepared from different HRP-antihIgG-Abs-AQP4-b-Strep-MBs batches resulted in a relative standard deviation (RSD) value of 2.4 %, which confirmed the reproducibility of the protocols used for the implementation of the bioassay format on the MBs and for the amperometric transduction at the SPCEs.

The comparison of the amperometric responses for 0 and 2.5 ng mL^{-1} AQP4-Abs obtained with bioplatforms prepared from AQP4-b-Strep-MBs stored in filtered PBS at 4 °C (**Figure S1** in the Supporting Information) allows deducing that the bioconjugates were stable for 21 days. Therefore, during this period it is feasible to prepare the bioplatforms from stored AQP4-b-Strep-MBs, thus allowing the determination can be accomplished using two incubation protocols and lasting only 90 min.

The lack of similar strategies reported in the literature limits the comparison of the developed bioplatform analytical performance to that claimed for the commercial ELISA kits summarized in **Table S1** (in the Supporting Information). Such comparison allows us to deduce that the bioplatform is competitive in terms of sensitivity (LOD 44 times lower than the most sensitive Cusabio ELISA kit which involves the same immunoreagents that the developed bioplatform), assay time (90 min starting from AQP4-b-Strep-MBs vs. 1 h 20 min-4 h 20 min) and affordable and easy to use instrumentation. In addition, the developed bioplatform achieves a considerably smaller LOD than the only reported biosensor for the determination of AQP4-Abs (8.8 pg mL^{-1} vs. 1 ng mL^{-1} [25]). This makes the bioplatform particularly suitable for analysing and evaluating the potential of these antibodies as reliable markers in diseases where their concentration is small.

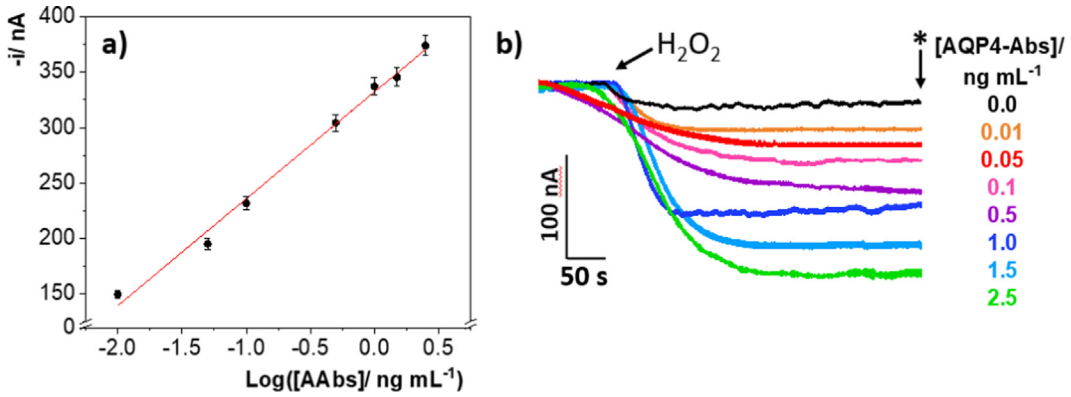


Fig. 2. Calibration plot constructed with the developed bioplatform for the amperometric determination of AQP4-Abs standards (a). Real amperograms recorded (b). *: point where the current was measured.

3.3. Selectivity

In order to test the bioplatform suitability for the determination of AQP4-Abs in serum, we evaluated the effect of the presence of other major serum components (hIgG, HSA) or that may be present (HB and dsDNA-Abs) on the amperometric responses provided by the bioplatforms for 0 and 2.5 ng mL^{-1} AQP4-Abs in the absence and in the presence of such potential interfering compounds. Fig. 3 shows as significantly larger currents were only obtained in the presence of hIgG, which can be attributed to the non-specific adsorption of hIgG on the Strep-MBs. In fact, a similar behaviour was previously observed for a bioplatform developed for the determination of antibodies against dsDNA [31]. However, it is important to note that the discrimination between the presence and absence of AQP4-Abs (S/B ratio) was not significantly affected. In addition, the high sensitivity achieved with the developed bioplatform allows the use of highly diluted serum samples (1/2,500), which led to no significant differences in the S/B ratio for such serum dilution level (Fig. 3).

3.4. Determination in control serum samples and in sera from patients diagnosed with autoimmune and NDDs

The accuracy of the developed bioplatforms was tested by analysing one negative and two positive (I and II) control serum samples provided in the AQP4-Abs ELISA Version 2 Kit from RSR Limited. The measurements obtained with the bioplatform for the undiluted controls were interpolated into a calibration constructed with the standards (1.5, 5, 20, 40, 80 U mL^{-1} AQP4-Abs) provided in the kit. The results obtained (α = 0.05, n = 3) are given in Table 2 and confirmed an excellent accuracy of the results provided by the developed bioplatform.

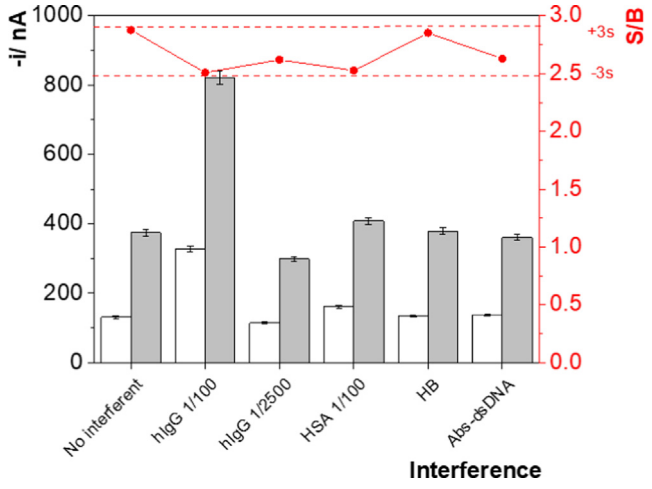


Fig. 3. Comparison of the amperometric responses provided by the developed bioplatforms for 0 and 2.5 ng mL^{-1} AQP4-Abs prepared in the absence and in the presence of 0.01 mg mL^{-1} and 0.0004 mg mL^{-1} hIgG, 0.5 mg mL^{-1} HSA, 5 mg mL^{-1} HB and 25 IU mL^{-1} dsDNA-Abs. Bars 1/100 and 1/2,500 correspond to the measurements for hIgG and HSA solutions with the concentrations existing in 100 and 2,500 times-diluted serum samples.

In addition, the bioplatforms were applied to the analysis of serum samples from healthy individuals and from patients diagnosed with SLE and AD. The potential existence of matrix effect in these samples was tested. The comparison of the slope value corresponding to the calibration plots constructed with standards (96 ± 4 nA^{-1}) with that constructed in 2,500-fold diluted sera (mean slope value = 91 ± 7 nA^{-1}) using the Student's t-test (t_{exp} = 0.310 < t_{tab} = 2.776) indicated that no apparent matrix effect occurred under the mentioned conditions [32]. It is important to note that according to the experimental results, there was a matrix effect working with lower dilutions of the samples. Therefore, the concentration of endogenous AQP4-Abs in the diluted serum samples could be calculated from the simple interpolation of the responses obtained for the samples into the calibration prepared with standards (Fig. 3). Fig. 4 shows the obtained results and these are compared in **Table S2** (in the Supporting Information) with those resulting from using the same immunoreagents with the ELISA method. The statistical comparison (t_{exp} was in all cases lower than t_{tab} = 2.776, α = 0.05; n = 4 [33]) and the correlation plot (r^2 = 0.999; slope = 1.000 ± 0.002; intercept = 4 ± 8) confirmed that similar results were obtained using both methodologies.

The obtained results demonstrated that the determination of AQP4-Abs in serum with the developed bioplatform allowed discrimination between healthy individuals and patients diagnosed with AD and SLE. Moreover, such discrimination was also possible between SLE (with a notably larger AQP4-Abs endogenous content, in agreement with an autoimmune disease) and AD patients. Although there are no data in the literature on the AQP4-Abs concentration in AD patients, the elevated level found may be justified by the altered distribution and expression of AQP4 reported in AD populations and animal models [34,35]. The obtained results support the suitability of the developed bioplatform to validate the

Table 2
AQP4-Abs concentration (in U mL^{-1}) determined with the developed bioplatform (n = 3) in control serum samples provided in the AQP4-Abs ELISA Version 2 Kit.

Control sample	Bioplatform	Specified in the commercial kit
Negative	0.15 ± 0.02; RSD = 5.6%	0.15
Positive I	12.0 ± 0.9; RSD = 4.3%	12.0
Positive II	28 ± 3; RSD = 5.6%	28

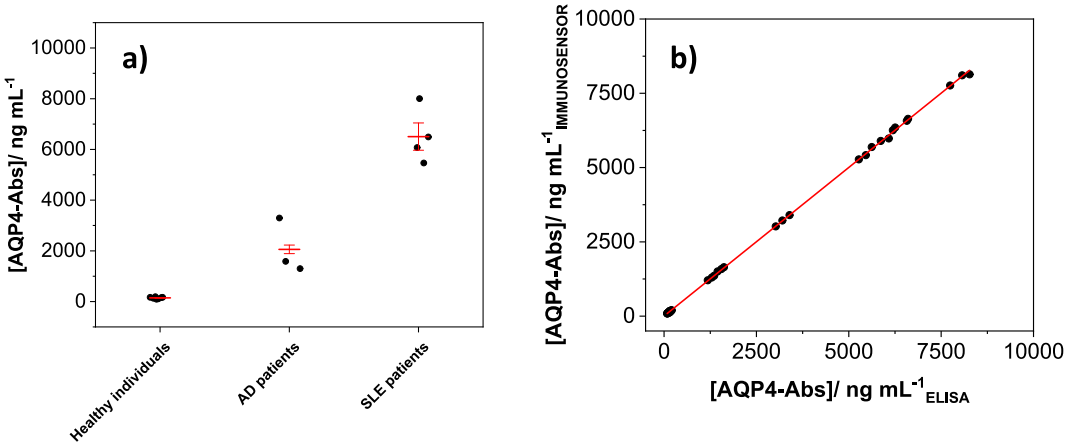


Fig. 4. AQP4-Abs concentrations obtained with the developed bioplatform for serum samples grouped into pools of healthy individuals and AD and SLE patients (a). Correlation plot between the AQP4-Abs concentrations obtained with the bioplatform and the ELISA method in the serum samples (b).

clinical potential of AQP4-Abs as a new target in relevant diseases, such as SLE and AD, where the AQP4-Abs concentration in serum is considerably smaller than that reported for NMO. In fact, the cut-off value established for NMO in serum is 3.0 U mL^{-1} or 260.9 μg mL^{-1} [36,37] with concentrations reported for patients as high as 13.984 ± 5.981 mg mL^{-1} [38]). It is important to note that not all commercially available ELISA kits possess the sufficient sensitivity to allow measurements for low AQP4-Abs concentrations (**Table S1** in the Supporting Information).

4. Conclusions

This work reports the first electrochemical bioplatform described to date for the determination of AQP4-Abs. The strategy is based on the selective capture of the Abs on MBs modified with the b-AQP4, the enzymatic labelling of the attached IgGs with an HRP-antihIgG and the amperometric transduction using the H_2O_2/HQ system after magnetic capture of the resulting bioconjugates on SPCEs. The developed bioplatform provides results with a high reproducibility and selectivity, and exhibits a better sensitivity than that claimed for the only biosensor reported to date for the determination of these specific antibodies, as well as that reported for commercially available ELISA kits. The suitability and applicability of the developed bioplatform has been demonstrated for the analysis of certified and real serum samples from healthy individuals and patients diagnosed with AD and SLE diseases, allowing clear discrimination between the 3 subject groups and providing results in agreement with those obtained by applying an ELISA method using the same immunoreagents. The excellent sensitivity achieved makes the bioplatform ideal for the diagnosis of diseases both showing high levels of these antibodies (such as NMO where AQP4-Abs are already clinically accepted diagnostic biomarkers), and others with less deregulation. The simplicity, affordable cost, reduced testing time and point-of-care applicability also make the developed bioplatform very promising for use by low-skilled personnel in decentralized or under-resourced settings.

CRediT authorship contribution statement

Beatriz Arévalo: Methodology, Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **Marina Blázquez:** Methodology, Investigation. **Verónica Serafín:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing. **Ana Montero-Calle:** Investigation, Resources. **Miguel Calero:** Conceptualization, Supervision, Resources, Funding acquisition. **Alejandro Valverde:** Methodology, Investigation. **Rodrigo Barderas:** Conceptualization, Supervision, Resources, Funding acquisition. **Susana Campuzano:** Conceptualization, Supervision, Resources, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Paloma Yáñez-Sedeño:** Conceptualization, Supervision, Resources, Writing – review & editing, Funding acquisition. **José M. Pingarrón:** Supervision, Resources.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The financial support of RTI2018-096135-B-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia, Innovacion y Universidades), PID2019-103899RB-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación) Research Project and the TRANSNANOAVANSENS-CM Program from the Comunidad de Madrid (Grant S2018/NMT-4349) are gratefully acknowledged. R.B. acknowledges the financial support of the PI17CIII/00045 and PI20CIII/00019 grants from the AES-ISCIII program. B. Arévalo acknowledges a predoctoral contract from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovacion y Universidades (PRE2019-087596). A.M-C. acknowledges a FPU predoctoral contract supported by the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.108041.

References

[1] R. Barderas, R. Villar-Vázquez, M.J. Fernández-Aceñero, I. Babel, A. Peláez-García, S. Torres, J.I. Casal, Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis, Sci Rep. 3 (2013) 2938, https://doi.org/10.1038/srep02938.
[2] I.K. Macdonald, C.B. Parsy-Kowalska, C.J. Chapman, Autoantibodies: opportunities for early cancer detection, Trends Cancer 3 (3) (2017) 198–213.
[3] H.S. Gleerup, S.G. Hasselbalch, A.H. Simonsen, Biomarkers for Alzheimer's Disease in Saliva: A Systematic Review, Dis. Markers 2019 (2019) 1–11.
[4] S. Mader, A. Lutterotti, F. Di Pauli, B. Kuenz, K. Schanda, F. Aboul-Enein, M. Khalil, M.K. Storch, S. Jarius, W. Kristoferitsch, T. Berger, M. Reindl, C. Kleinschnitz, Patterns of antibody binding to Aquaporin-4 isoforms in Neuromyelitis Optica, PLoS ONE 5 (5) (2010) e10455, https://doi.org/10.1371/journal.pone.001045510.1371/journal.pone.0010455.g00110.1371/journal.pone.0010455.g00210.1371/journal.pone.0010455.g00310.1371/journal.pone.0010455.t00110.1371/journal.pone.0010455.t002.

[5] J.S. Tzartos, C. Stergiou, K. Kilidireas, P. Zisimopoulou, T. Thomaidis, S.J. Tzartos, J.-I. Kira, Anti-Aquaporin-1 autoantibodies in patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders, PLoS ONE 8 (9) (2013) e74773, https://doi.org/10.1371/journal.pone.007477310.1371/journal.pone.0074773.g00110.1371/journal.pone.0074773.g00210.1371/journal.pone.0074773.g00310.1371/journal.pone.0074773.g00410.1371/journal.pone.0074773.g00510.1371/journal.pone.0074773.g00610.1371/journal.pone.0074773.g00710.1371/journal.pone.0074773.g00810.1371/journal.pone.0074773.g00910.1371/journal.pone.0074773.t001.

[6] M. Valenza, R. Facchinetti, L. Steardo, C. Scuderi1. Altered waste disposal system in aging and Alzheimer's disease: Focus on astrocytic Aquaporin-4. Front. Pharmacol. 10 (2019) 1656. doi: 10.3389/fphar.2019.01656.

[7] S. Shahmohammadi, R. Doosti, A. Shahmohammadi, S.E. Mohammadianinejad, M.A. Sahraian, A.R. Azimi, M.H. Harirchian, N. Asgari, A. Naser Moghadasi, Autoimmune diseases associated with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: A literature review, Mult. Scler. Relat. Disord. 27 (2019) 350–363.

[8] V.A. Lennon, T.J. Kryzer, S.J. Pittock, A.S. Verkman, S.R. Hinson, IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel, J. Exp. Med. 202 (4) (2005) 473–477.

[9] M. Bradl, D.H. Lassmann, Int. MS Journal/MS Forum. 15 (3) (2008) 75–78.

[10] S. Jarius, D. Franciotta, F. Paul, K. Ruprecht, R. Bergamaschi, P.S. Rommer, R. Reuss, C. Probst, W. Kristoferitsch, K.P. Wandinger, B. Wildemann, Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: frequency, origin, and diagnostic relevance, J. Neuroinflammation 7 (2010) 52, https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-52.

[11] S. Jarius, B. Wildemann, AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance, Nat. Rev. Neurol. 6 (7) (2010) 383–392.

[12] N. Isobe, T. Yonekawa, T. Matsushita, K. Masaki, S. Yoshimura, J. Fichna, S. Chen, J. Furmaniak, B.R. Smith, J.-I. Kira, Clinical relevance of serum Aquaporin-4 antibody levels in Neuromyelitis Optica, Neurochem. Res. 38 (2013) 997–1001.

[13] S. Jarius, B. Wildemann, Aquaporin-4 Antibodies (NMO-IgG) as a Serological Marker of Neuromyelitis Optica: A Critical Review of the Literature, Brain Pathol. 23 (6) (2013) 661–683.

[14] J. Kitley, P. Waters, M. Woodhall, M.I. Leite, A. Murchison, J. George, W. Küker, S. Chandratre, A. Vincent, J. Palace, Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders with Aquaporin-4 and Myelin-Oligodendrocyte Glycoprotein antibodies: A comparative study, JAMA Neurol. 71 (3) (2014) 276–283, https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5857.

[15] S. Jarius, K. Ruprecht, I. Kleiter, N. Borisow, N. Asgari, K. Pitarokoili, F. Pache, O. Stich, L.-A. Beume, M.W. Hümmert, C. Trebst, M. Ringelstein, O. Aktas, A. Winkelmann, M. Buttmann, A. Schwarz, H. Zimmermann, A.U. Brandt, D. Franciotta, M. Capobianco, J. Kuchling, J. Haas, M. Korporal-Kuhnke, S.T. Lillevang, K. Fechner, K. Schanda, F. Paul, B. Wildemann, M., Reindl in cooperation with the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 1: Frequency, syndrome specificity, influence of disease activity, long-term course, association with AQP4-IgG, and origin, J. Neuroinflammation 13 (2016) 279, https://doi.org/10.1186/s12974-016-0717-1.

[16] L. Hirt, M. Price, C. Benakis, J. Badaut, Aquaporins in neurological disorders, Clin. Transl. Neurol. January–June (2018) 1–7. doi: 10.1177/2514183X17752902.

[17] S. Mader, L. Brimberg, Aquaporin-4 water channel in the brain and its implication for health and disease, Cells 8 (2019) 90, https://doi.org/10.3390/cells8020090.

[18] B. Elnady, S.M. Fathy, T. Elkhouly, S. Ganeb, Neuromyelitis optica spectrum standstill in rheumatic systemic autoimmune diseases, Egyptian Rheumatology and Rehabilitation 47 (2020) 15, https://doi.org/10.1186/s43166-020-00018-1.

[19] H. Prüss, Autoantibodies in neurological disease, Nat Rev Immunol. 21 (12) (2021) 798–813, https://doi.org/10.1038/s41577-021-00543-w.

[20] O. Schmetzer, E. Lakin, B. Roediger, A. Duchow, S. Asseyer, F. Paul, N. Siebert, Anti-aquaporin 4 IgG Is Not Associated With Any Clinical Disease Characteristics in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder, Front. Neurol. 12 (2012), https://doi.org/10.3389/fneur.2021.635419 635419.

[21] E. Moraitis, Y. Stathopoulos, Y. Hong, M. Al-Obaidi, K. Mankad, Y. Hacohen, D. Sen, C. Hemingway, D. Eleftheriou, Aquaporin-4 IgG antibody-related disorders in patients with juvenile systemic lupus erythematosus, Lupus 28 (10) (2019) 1243–1249.

[22] M. Garranzo-Asensio, A. Guzmán-Aránguez, E. Povedano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, C. Poves, M.J. Fernandez-Aceñero, A. Montero-Calle, G. Solís-Fernández, S. Fernandez-Diez, J. Camps, M. Arenas, E. Rodríguez-Tomàs, J. Joven, M. Sanchez-Martinez, N. Rodriguez, G. Dominguez, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, S. Campuzano, R. Barderas, Multiplexed monitoring of a novel autoantibody diagnostic signature of colorectal cancer using HaloTag technology-based electrochemical immunosensing platform, Theranostics 10 (7) (2020) 3022–3034.

[23] A. Montero-Calle, I. Aranguren-Abeigon, M. Garranzo-Asensio, C. Poves, M.J. Fernández-Aceñero, J. Martínez-Useros, R. Sanz, J. Dziaková, J. Rodriguez-Cobos, G. Solís-Fernández, E. Povedano, M. Gamella, R.M. Torrente-Rodríguez, M. Alonso-Navarro, V. de los Ríos, J.I. Casal, G. Domínguez, A. Guzman-Aranguez, A. Peláez-García, J.M. Pingarrón, S. Campuzano, R. Barderas, Multiplexed Biosensing Diagnostic Platforms Detecting Autoantibodies to Tumor-Associated Antigens from Exosomes Released by CRC Cells and Tissue Samples Showed High Diagnostic Ability for Colorectal Cancer, Engineering 7 (10) (2021) 1393–1412.

[24] A. Valverde, A. Montero-Calle, B. Arévalo, P. San Segundo-Acosta, V. Serafín, M. Alonso-Navarro, G. Solís-Fernández, J.M. Pingarrón, S. Campuzano, R. Barderas, Phage-Derived and Aberrant HaloTag Peptides Immobilized on Magnetic Microbeads for Amperometric Biosensing of Serum Autoantibodies and Alzheimer's Disease Diagnosis, Analysis & Sensing 1 (4) (2021) 161–165.

[25] M. Son, D. Kim, K.S. Park, S. Hong, T.H. Park, Detection of aquaporin-4 antibody using aquaporin-4 extracellular loop-based carbon nanotube biosensor for the diagnosis of neuromyelitis optica, Biosens. Bioelectron. 78 (2016) 87–91.

[26] M. Eguílaz, M. Moreno-Guzmán, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes, Biosens. Bioelectron. 26 (2010) 517–522.

[27] F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, D.G. Pinacho, A.J. Reviejo, M.P. Marco, J.M. Pingarrón, Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk, Biosens. Bioelectron. 36 (2012) 81–88.

[28] B. Esteban-Fernández de Ávila, V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J.P. Salvador, M.P. Marco, J.M. Pingarrón, Ultrasensitive amperometric magnetoimmunosensor for human C-reactive protein quantification in serum, Sensors Actuators, B Chem. 188 (2013) 212–220.

[29] U. Eletxigerra, J. Martinez-Perdiguero, R. Barderas, J.M. Pingarrón, S. Campuzano, S. Merino, Surface plasmon resonance immunosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum and raw cancer cell lysates, Anal. Chim. Acta 905 (2016) 156–162.

[30] J.Y. Park, L.J. Kricka, in: The Immunoassay Handbook, Elsevier, 2013, pp. 403–416, https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00027-0.

[31] B. Arévalo, V. Serafín, M. Sánchez-Paniagua, A. Montero-Calle, R. Barderas, B. López-Ruíz, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Fast and sensitive diagnosis of autoimmune disorders through amperometric biosensing of serum anti-dsDNA autoantibodies, Biosens. Bioelectron. 160 (2020) 112233, https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112233.

[32] J.M. Andrade, M.G. Estévez-Pérez, Statistical comparison of the slopes of two regression lines: A tutorial, Anal. Chim, Acta 838 (2014) 1–12.

[33] J.N. Miller, J.C. Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 6th Ed, Pearson Education Limited, 2010 ISBN-10: 0273730428.Miller and Miller, 2010.

[34] P. Moftakhar, M.D. Lynch, J.L. Pomakian, H.V. Vinters, Aquaporin expression in the brains of patients with or without cerebral amyloid angiopathy, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 69 (12) (2010) 1201–1209.

[35] C. Yang, X. Huang, X. Huang, H. Mai, J. Li, T. Jiang, X. Wang, T. Lü, G. Arendash, Aquaporin-4 and Alzheimer's Disease, Journal of Alzheimer's Disease 52 (2) (2016) 391–402.

[36] A. Gahlen, A.-K. Trampe, S. Haupeltshofer, M. Ringelstein, O. Aktas, A. Berthele, B. Wildemann, R. Gold, S. Jarius, I. Kleiter. Aquaporin-4 antibodies in patients treated with natalizumab for suspected MS. Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm. Jul 4 (4) (2017) e363. DOI: 10.1212/NXI.0000000000000363.

[37] M. Tampoia, L. Abbracciavento, G. Barberio, M. Fabris, N. Bizzaro, Bizzaro and Study Group on Autoimmune Diseases of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine, Italy. A new M23-based ELISA assay for anti-aquaporin 4 autoantibodies: diagnostic accuracy and clinical correlation, Auto Immun Highlights 10 (1) (2019), https://doi.org/10.1186/s13317-019-0115-7.

[38] Y. Chen, R. Li, A.M. Wu, Y.Q. Shu, Z.Q. Lu, X.Q. Hu, The complement and immunoglobulin levels in NMO patients, Neurol. Sci. 35 (2) (2014) 215–220, https://doi.org/10.1007/s10072-013-1481-y.

Microchimica Acta (2022) 189:143
https://doi.org/10.1007/s00604-022-05250-4

ORIGINAL PAPER

Binary MoS_2 nanostructures as nanocarriers for amplification in multiplexed electrochemical immunosensing: simultaneous determination of B cell activation factor and proliferation-induced signal immunity-related cytokines

Beatriz Arévalo[1] · Marina Blázquez-García[1] · Alejandro Valverde[1] · Verónica Serafín[1] · Ana Montero-Calle[2] · Guillermo Solís-Fernández[2] · Rodrigo Barderas[2] · Susana Campuzano[1] · Paloma Yáñez-Sedeño[1] · José M. Pingarrón[1]

Received: 7 December 2021 / Accepted: 23 February 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

A dual immunosensor is reported for the simultaneous determination of two important immunity-related cytokines: BAFF (B cell activation factor) and APRIL (a proliferation-induced signal). Sandwich-type immunoassays with specific antibodies (cAbs) and a strategy for signal amplification based on labelling the detection antibodies (dAbs) with binary MoS_2/MWCNTs nanostructures and using horseradish peroxidase (HRP) were implemented. Amperometric detection was carried out at screen-printed dual carbon electrodes (SPdCEs) through the hydroquinone HQ/H_2O_2 system. The developed dual immunosensor provided limit of detection (LOD) of 0.08 and 0.06 ng mL^{-1} for BAFF and APRIL, respectively, and proved to be useful for the determination of both cytokines in cancer cell lysates and serum samples from patients diagnosed with autoimmune diseases and cancer. The obtained results agreed with those found using ELISA methodologies.

Keywords Dual immunoplatform · BAFF · APRIL · MoS_2/MWCNTs · Amperometry · Serum · SLE · CRC

Introduction

BAFF (B cell activating factor) and APRIL (a proliferation-inducing ligand) are molecules similar to tumor necrosis factor mainly expressed on B lymphocytes that show structural similarities and interact with three receptors of the TNF family specifically and redundantly: BAFF-R joins BAFF, BCMA joins APRIL and also BAFF with weaker affinity, and TACI joins BAFF and APRIL equally well [1]. Both are type II membrane proteins, and the former is released after being cleaved at the furin protease site as a biologically active and soluble 17 kDa cytokine [2]. APRIL is also formulated as a membrane-bound protein, which is broken down by furin as a soluble trimeric cytokine [3]. B cells play a pivotal role in autoimmunity not only by producing autoantibodies but also by modulating immune responses via the formation of cytokines and chemokines. The BAFF/APRIL system promotes B cell survival and differentiation, and therefore such cytokines are involved in the pathogenesis of autoimmune diseases. For instance, elevated blood or tissue levels of these biomolecules are frequently observed in patients of systemic lupus erythematosus (SLE) [4], lupus nephritis [5], Sjögren disease [6], or rheumatoid arthritis (RA) [7]. Regarding SLE, BAFF and APRIL serum levels correlate positively with disease activity and other markers, such as the level of serum anti-dsDNA antibodies. In addition, an elevated serum BAFF concentration (equal or greater than 2 ng mL^{-1}) predicts the occurrence of moderate to severe SLE flares in patients receiving treatment [4]. On the other hand, increased serum levels of these two cytokines have also been associated with tumor growth and invasion in certain malignancies such as breast cancer [8].

✉ Susana Campuzano
susanacr@quim.ucm.es

✉ Paloma Yáñez-Sedeño
yseo@quim.ucm.es

[1] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

[2] Chronic Disease Programme, UFIEC, Institute of Health Carlos III, 28220 MajadahondaMadrid, Spain

Published online: 14 March 2022

Despite their importance for monitoring autoimmune diseases which affect large population, no immunosensors for these cytokines have been reported in the literature. Nevertheless, various colorimetric ELISA kits are commercially available for the single determination of BAFF or APRIL. These kits provide logarithmic calibrations over the pg mL^{-1} or ng mL^{-1} range and require assay times lasting around 4 h. Examples are the Quantikine ELISA Human BAFF/TNFSF13B Immunoassay with a claimed minimum detection dose (MDD = $\bar{x} \pm 2s$) of 6.44 pg mL^{-1} and dynamic range between 62.5 and 4000 pg mL^{-1} BAFF, and Human APRIL/TNFSF13 Quantikine ELISA Kit DAPR00 Immunoassay, in the range between 0.2 and 10 ng mL^{-1} and MDD = 0.015 ng mL^{-1} APRIL.

On the other hand, 2D materials, mainly graphene, have been widely used in the last years for technological applications. However, recently, transition metal dichalcogenides (TMDs) have replaced graphene in some applications due to their unique physico-chemical properties. Among TMDs, MoS_2 is widely used in bioelectronics because of its biocompatibility, semiconductivity, and intrinsic peroxidase-like catalytic activity [9]. Electrochemical biosensors prepared with sheets [10, 11], nanoparticles [12], or MoS_2 quantum dots [13] have been reported. Furthermore, the poor intrinsic conductivity of MoS_2 has been improved by preparation of hybrids or composites with carbon nanomaterials to enhance the electron transfer reaction at the interface [14]. Various electrochemical biosensors involving hybrids of MoS_2 and graphene oxide (GO) [15, 16] or carbon nanotubes (CNTs) [17] have been reported.

In this work, MoS_2 composite materials with multi-walled carbon nanotubes (MoS_2/MWCNTs), reduced graphene oxide (MoS_2/rGO), and a mixture of both nanomaterials (MoS_2/rGO/MWCNTs) have been synthesized to select the most appropriate to be used as carrier tag for signal amplification. Characterization of the resulting composite materials and a comparative evaluation of their electrochemical behavior led us to choose MoS_2/MWCNTs, since it exhibited the highest pseudo-peroxidase activity and excellent electrochemical characteristics.

Accordingly, a rapid and highly sensitive dual immunosensor for the simultaneous amperometric determination of BAFF and APRIL at screen-printed dual carbon electrodes (SPdCEs) is presented for the first time in this paper. The specific capture antibodies were covalently immobilized by employing carbodiimide/hydroxysuccinimide chemistry on the surface of the modified working electrodes after electrochemically grafting the diazonium salt of 4-aminobenzoic acid (*p*-ABA), which resulted in covalent binding of the 4-carboxyl phenyl moieties on the carbon surfaces. Sandwich-type immunoassays were implemented using MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAbs as carrier labels for signal amplification. In these nanocarriers the acid-treated MWCNTs provided the required functional groups to immobilize a large number of HRP and dAb molecules, and MoS_2 contributed to improve sensitivity due to its pseudo-peroxidase activity. Amperometric measurements at $E_{app} = -0.20$ V vs. Ag pseudo-reference electrode in the presence of H_2O_2 and hydroquinone (HQ) were employed to follow the extension of affinity reactions. The developed dual immunosensor successfully tackled the determination of the two target cytokines in cancer cell lysates and serum samples from healthy subjects and patients diagnosed with SLE and colorectal cancer (CRC).

Experimental

Reagents, solutions and samples

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs; ϕ 30 ± 15 nm, 95% purity) were supplied by NanoLab, Brighton, MA. Before use, CNTs were chemically shortened and carboxylated by treatment with nitric and sulfuric acids (v/v 1:3) under ultrasound for 5 h. The resulting product was centrifuged at 4000 rpm for 10 min and washed repeatedly with deionized water up to pH 7 and dried under nitrogen [18]. Graphene oxide (NIT.GO.M.140.10) from Nanoinnova Technologies was also used. Ammonium heptamolybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}{\cdot}4\ H_2O$), thiourea, N-(3-dimethyl-aminopropyl)-N'-ethylcabodiimide (EDC), N-hydroxysulfosuccinimide (NHSS), biotin, streptavidin, *p*-aminobenzoic acid (*p*-ABA), sodium nitrite, peroxidase from horseradish (HRP) (Ref. P8250-25KU), streptavidin from *Streptomyces avidinii* (Strep) (Ref. S4762-5MG), hydroquinone (HQ), and hydrogen peroxide (H_2O_2, 30% w/v) were purchased from Sigma-Aldrich. Neutravidin (Neu) was from Thermo Fisher Scientific (Ref. 31,000). Sodium chloride, potassium chloride, sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, and tris-hydroxymethyl-aminomethane-HCl (Tris–HCl) were from Scharlab. Anti-BAFF-biotin capture antibodies (b-cAb_{BAFF}), anti-BAFF detection antibodies (dAb_{BAFF}), and human BAFF/BLyS standard were from the Human BAFF/BLyS/TNFSF13B DuoSet ELISA from R&D Systems (Cat. No. DY124-05), and anti-APRIL-biotin capture antibodies (cAb_{APRIL}), anti-APRIL detection antibodies (dAb_{APRIL}), and human APRIL standard were from the Human APRIL/TNFSF13 DuoSet ELISA from R&D Systems (Cat. No. DY884B). Biotin was from Gerbu (Lot. 280,611).

Selectivity was checked against human hemoglobin (HB, Cat. No. H7379), albumin from human serum (HSA, Cat. No. A1653), IgG from human serum (hIgG, Ref: I2511), all of them from Sigma-Aldrich, human cadherin-17 from Origene (CDH-17, Ref: TP720740), human neurofilament-L from Cell Signaling Technology® (NfL, Cat. No.

99175), recombinant human tau-441 from BioLegend® (TAU), recombinant human TAR DNA-binding protein 43 from Abcam (TDP-43, Cat. No. ab224788), and human IL-13sRα2 (Ref: DY614) and human TNF (Ref: DY210) from R&D Systems.

Sera from CRC patients and from healthy individuals were obtained through the IdISSC biobank after approval of the Institutional Ethical Review Boards of the Hospital Clínico San Carlos and the Institute of Health Carlos III, and with the written informed consent of all participating individuals, whereas sera from SLE patients were purchased from Central BioHub. All serum samples were stored at − 80 °C, until use. All the experiments with these samples were performed accomplishing all the ethical issues and relevant guidelines and regulations of the involved institutions.

SW480 and SW620 (from the American Type Culture Collection (ATCC) cell repository) and KM12C, KM12SM, and KM12L4a (from I. Fidler's laboratory, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX) cells were grown and lysed as reported previously [19, 20].

Water purified by the Milli-Q purification system (18.2 MΩ cm) was used for the preparation of all solutions. The used buffers included B&W buffer pH 7.5 (0.01 mol L^{-1} Tris–HCl pH 7.5 containing 1 mmol L^{-1} EDTA and 2 mmol L^{-1} NaCl), 0.01 mol L^{-1} phosphate buffer saline solution (PBS) pH 7.5, and 0.05 mol L^{-1} phosphate buffer (PB) solution pH 6.0. The solutions used to perform the amperometric detection, 0.1 mol L^{-1} H_2O_2 and 0.1 mol L^{-1} HQ, were freshly prepared in phosphate buffer solution pH 6.0.

The 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution from Thermo Scientific™ (Cat. No. 34028) was also used.

Apparatus and electrodes

All the amperometric measurements were made at room temperature using a CHI812B (CH Instruments, Inc.) potentiostat controlled by the CHI812B software. A μAutolab type III potentiostat (Ecochemie) controlled by FRA2 software electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was employed for other electrochemical measurements.

Screen-printed carbon electrodes (SPCEs, DRP-110), with a 4 mm-Ø carbon working electrode, and dual SPCEs (DRP-X1110) consisted of two elliptic carbon working electrodes with a surface area of 5.6 mm^2 were from Metrohm-DropSens. These electrodes include a carbon counter electrode and an Ag pseudo-reference electrode. The specific cable connectors (DRP-CAC and DRP-BICAC) used as interface between the SPCEs and dual SPCEs, respectively, and the potentiostat were also from Metrohm-DropSens. The measurements were made in stirred solutions using 10-mL glass electrochemical cells from Pobel. A Crison model Basic 20 + pH meter, a P-Selecta Ultrasons ultrasonic bath, a Heidolph Reax Top homogenizer for small samples, and an MPW-65R centrifuge from MPW (Med. Instruments) were also employed. Scanning electron microscopy (SEM) was made with a JEOM 7600 electron microscope operating at 5 kV. The transmission electron microscopy (TEM) characterization was performed using a JEM 2100 PLUS microscope operating at 100 kV. Raman analysis was performed in a NT-MDT NTEGRA Spectra spectrometer, equipped with a Solar TII MS5004i monochromator and an Andor iDUS DU-420 CCD detector. The excitation source is a laser of 532-nm wavelength and 22 mW. ELISA absorbance readings were made in a Sunrise™ Tecan microplate reader with the Magellan V 7.1 software.

Procedures

Preparation of MoS_2/MWCNTs

The MoS_2/MWCNTs composite was prepared by the hydrothermal route [21, 22]: 2.5 mg carboxylated MWCNTs (c-MWCNTs) suspended in 20 mL deionized water were ultrasonically stirred for 30 min to obtain a homogeneous dispersion. Then, 33 mg of ammonium heptamolybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}{\cdot}4\,H_2O$) and 60 mg thiourea were added and, after stirring for 30 min at 800 rpm, the resulting solution was transferred to a Teflon-lined stainless-steel reactor and kept into an oven at 200 °C for 24 h. Once cooling down to room temperature (60 min approximately), the black precipitate was collected by centrifugation, washed three times with 10 mL ethanol, other three times with 10 mL water, and dried during 24 h at 37 °C. For comparison purposes, MoS_2, MoS_2/rGO, and MoS_2/rGO/MWCNTs were also prepared by applying similar procedures to that described above with no carbon nanomaterials, with 3.0 mg GO, or with 3.0 mg GO plus 2.5 mg c-MWCNTs, respectively.

Stock solutions containing 1 mg mL^{-1} MoS_2/MWCNTs were prepared by suspending the product in 10 mM PBS of pH 7.5 and stirring ultrasonically to obtain a homogeneous dispersion. Similarly, solutions from the other MoS_2-based materials were prepared. The resulting dispersions were stored at room temperature in the dark.

Preparation of MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAbs

MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAbs carrier tags were prepared through a similar protocol to that reported previously for the preparation of other nanocarriers involving MWCNTs hybrids [18, 23, 24]. Briefly, 500 μL of 0.1 mg mL^{-1} MoS_2/MWCNTs was centrifuged at 14,000 rpm during 10 min and the remaining product was incubated in the darkness under continuous stirring for 6 h at room temperature with 200 μL of a 400 mM EDC and 100 mM NHSS mixture solution prepared in 100 mM PBS pH 7.4. The resulting

solution was centrifuged at 14,000 rpm during 5 min and the product washed three times with 10 mM PBS pH 7.4. Activated MoS_2/MWCNTs were conjugated during 24 h at 4 °C under continuous stirring with a mixture solution prepared in 100 mM PBS pH 7.4 containing 10 mg mL^{-1} HRP and 6 µg mL^{-1} dAb_{BAFF} to prepare MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb_{BAFF} conjugates. A similar procedure was used with 10 mg mL^{-1} HRP and 5 µg mL^{-1} dAb_{APRIL} to prepare MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb_{APRIL} labels. The as-prepared carriers were centrifuged at 14,000 rpm during 5 min, washed three times with 10 mM PBS pH 7.4, re-suspended in 500 µL of 100 mM PBST pH 7.4, and stored at 4 °C until their use.

Preparation of the electrochemical scaffold

The scheme depicted in Fig. 1 shows how both single and dual SPCEs were functionalized by reductive electrochemical grafting with *p*-ABA following the protocol reported previously [25] with slight modifications. In a first step, diazonium salt was prepared by adding dropwise 2 mM $NaNO_2$ aqueous solution to a 1 mg mL^{-1} *p*-ABA solution prepared in 1 M HCl and cooling with ice (38 mL $NaNO_2$ for each 2 mL *p*-ABA solution). The reaction was allowed proceeding for 7 min under stirring. Thereafter, each electrode was immersed into the diazonium salt solution and ten successive voltammetric cycles over the 0 to − 1.0 V range ($\nu = 200$ mV s^{-1} vs. the Ag pseudo-reference electrode) were scanned. Finally, the modified SPCEs were washed thoroughly with Milli-Q water and dried at room temperature.

Preparation of the immunosensors

The carboxylic groups of grafted SPCEs were activated by dropping 10 µL of a fresh 100 mM each EDC and NHSS mixture solution in 25 mM MES buffer of pH 5.0 on the working electrode surfaces and left to react for 30 min. After washing with the 25 mM MES buffer of pH 5.0, 3 µL of a 600 or 400 µg mL^{-1} Neu solution prepared in the same MES buffer was placed onto the SPdCE working electrodes for the preparation of BAFF and APRIL immunosensors, respectively, allowing incubation for 30 min. The electrode was rinsed with 10 mM PBS pH 7.4 and, subsequently, the biotinylated capture antibodies (cAb_{BAFF} or cAb_{APRIL}) were immobilized by adding 3 µL of 100 ng mL^{-1} or 5 µg mL^{-1},

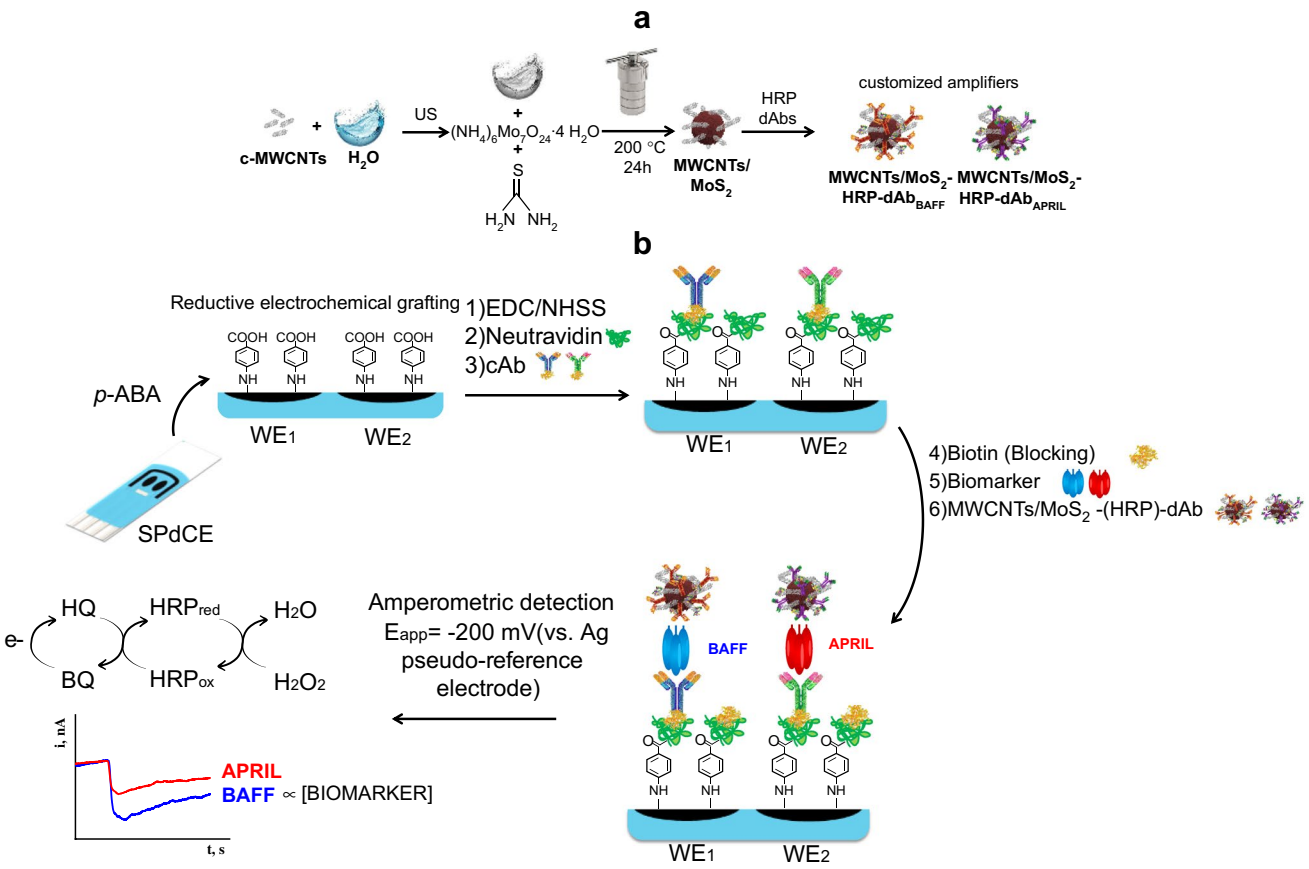


Fig. 1 Schematic display of the different steps involved in the preparation of the MWCNTs/MoS_2(-HRP)-dAb nanocarriers (**a**) and of the dual immunosensor constructed for the determination of BAFF and APRIL biomarkers using amperometric transduction (**b**)

respectively, prepared in 10 mM PBS pH 7.4 and incubating for 30 min. Then, a blocking step was carried out by adding 10 µL of a 2 mg mL^{-1} biotin solution prepared in the same PBS and incubated during 15 min. After washing with BB, 3 µL of the APRIL or BAFF standard solutions or the samples prepared in BB solution were placed onto each working electrode and incubated for 30 min. After rinsing with BB, 3 µL of the MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb bioconjugate suspension were dropped onto the electrode surface and incubated for 30 min. The resulting immunosensing platform was washed again with 10 mM PBS pH 7.4 and kept with a 25 µL drop of the same buffer until the electrochemical measurements were made. All incubation steps involved in the immunosensor fabrication were performed at room temperature in a humid environment to prevent drop evaporation.

Amperometric measurements

The amperometric measurements were carried out by immersing the modified electrode into the measuring cell containing 10 mL of 50 mM PB pH 6.0 and 100 µL of a fresh solution of 100 mM HQ prepared in the same buffer. The measurements were carried out under stirring by applying − 0.20 V vs. the Ag pseudo-reference electrode. Once the background current was stabilized (~ 50 s), 50 µL of a 100 mM H_2O_2 solution prepared daily in 50 mM PB pH 6.0 were added and the variation in the cathodic current due to the HRP reduction of H_2O_2 mediated by HQ, reaching the steady state in ~ 100 s, was recorded. The analytical responses given through the text correspond to the difference between the steady state and the background currents. They are the mean values of three replicates, and the error bars displayed were estimated as three times the standard deviation of each set of replicates ($\alpha = 0.05$).

Figure 1 shows a scheme of the steps involved in the preparation of the dual immunosensor as well as the reactions occurring in the amperometric detection.

Statistical analysis

ROC analysis was performed using GraphPad Prism 9 ROC curve analysis functionality using Wilson/Brown method and a 95% confidence interval, and R (Version 4.1.1) using "Epi" and "ModelGood" packages.

Results and discussion

Characterization of MoS_2 hybrids

The morphology of MoS_2 hybrids was characterized by scanning electron microscopy (SEM). Figure 2 shows some representative images of the bare nanomaterials (Fig. 2a–c), MoS_2/MWCNTs (Fig. 2d), MoS_2/rGO/MWCNTs (Fig. 2e),

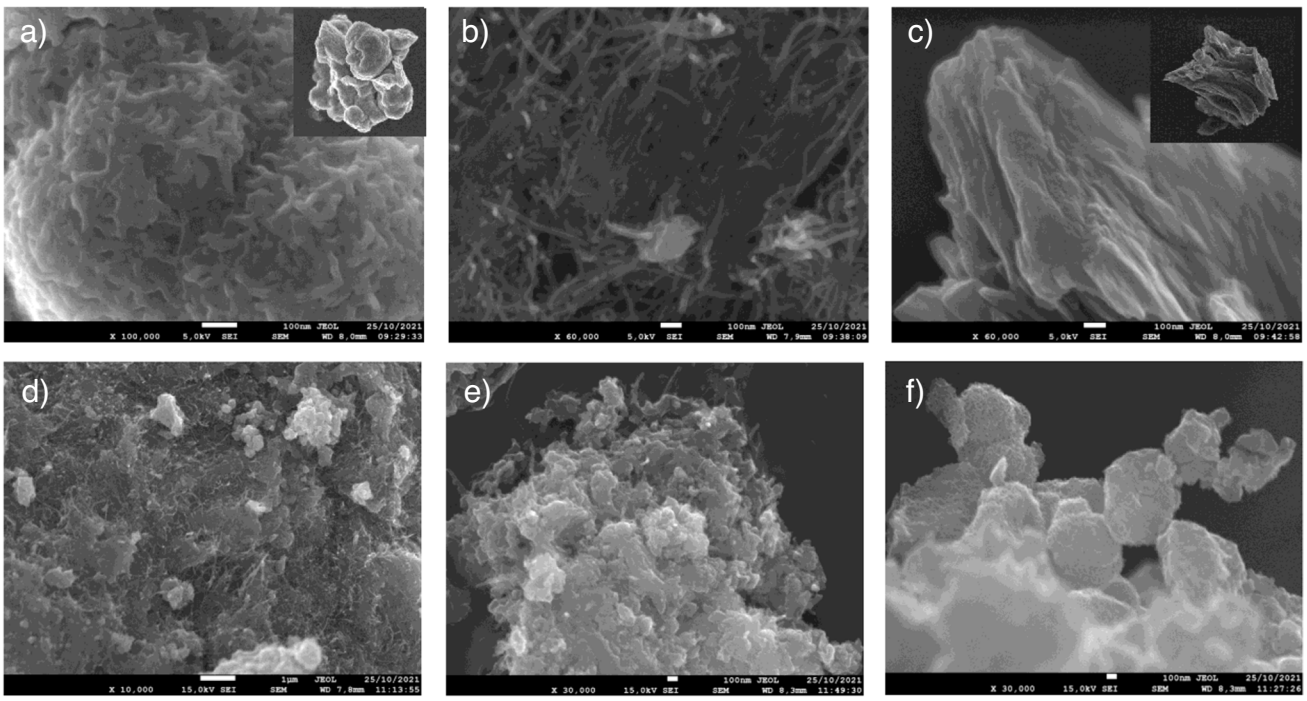


Fig. 2 SEM images of (**a**) MoS_2 (inset at higher magnification), (**b**) o-MWCNTs, (**c**) GO (inset at higher magnification), (**d**) MoS_2/MWCNTs, (**e**) MoS_2/rGO/MWCNTs, and (**f**) MoS_2/GO

and MoS_2/rGO (Fig. 2f) nanocomposites. Figure 2a displays two SEM images at different magnification levels of MoS_2 obtained through the hydrothermal synthesis showing the formation of aggregates consisting of many sheets tightly stacked together [26]. MoS_2/MWCNTs (Fig. 2d) shows a two-dimensional structure of carbon nanotubes (see Fig. 2b) with some decorating nanoparticles, presumably MoS_2. Interconnections between MoS_2 nanoparticles through carbon nanotubes and the high porosity suggest a good electrochemical behavior for this material. Regarding MoS_2/rGO/MWCNTs (Fig. 2e), the SEM image shows a large amount of MoS_2 nanoaggregates deposited onto the three-dimensional network formed by carbon nanomaterials [22]. However, when this morphology is compared with that of MoS_2/rGO (Fig. 2f), a quite different structure is observed since MoS_2 nanoparticles grew in a laminar way on the rGO sheets (see Fig. 2c), with no globular nanostructures, thus making difficult to distinguish between both materials. In summary, MoS_2 composites prepared with carbon nanotubes mostly maintain the bare material structure providing rough surface morphology in the form of nanoaggregates, while in the presence of GO, the synthesized MoS_2 appears as well-dispersed sheets on rGO substrate.

Transmission electron microscopy (TEM) was also used to investigate the structure of MoS_2 nanocomposites. As Fig. 3 shows, bare MoS_2 appears in the form of aggregated layers, this structure being preserved in the MoS_2/MWCNTs nanocomposite, where some nanotubes can also be observed (Fig. 3b). In the MoS_2/rGO composite (Fig. 3c), MoS_2 nanosheets appear scattered onto rGO sheets. It has been reported that MoS_2/rGO composites could acquire a 3D architecture caused by self-assembling during the hydrothermal process, in which reduction of GO can drive to partial overlapping or coalescing of the sheets [27]. Furthermore, a more complex structure showing MoS_2 aggregates and some carbon nanotubes onto the rGO can be observed for MoS_2/rGO/MWCNTs (Fig. 3d).

Figure 4 compares the vibrational Raman spectra of MWCNTs, MoS_2/MWCNTs, and MoS_2/rGO/MWCNTs nanocomposites at a λ_{exc} of 532 nm. As can be seen, the spectra of the MoS_2/MWCNTs and MoS_2/rGO/MWCNTs nanomaterials displayed the vibration peak characteristic of MoS_2: the E^1_{2g}, due to the in-plane opposing motions of S and Mo atoms, and the A_{1g} peak, which represents the out-of-plane relative motion of S atoms [28]. Moreover, a higher frequency shift was observed in the D and G bands of the MoS_2/rGO/MWCNTs spectrum compared to that of MoS_2/MWCNTs, indicating a substantial interaction between the MWCNTs, MoS_2, and the rGO layers [29]. In addition, the peaks associated with LA(M), E_{1g}, E^1_{2g}, and A_{1g} modes of MoS_2, shifted from 267, 295, 392, and 431 cm^{-1} in the MoS_2/MWCNTs to 264, 292, 387, and 430 cm^{-1} for the MoS_2/rGO/MWCNTs. The band observed at 359 cm^{-1} in both MoS_2 nanocomposites should be associated with O–Mo-O bending modes of bridging oxygen in MoO_3 [30]. Furthermore, G, D, and D′ bands have been

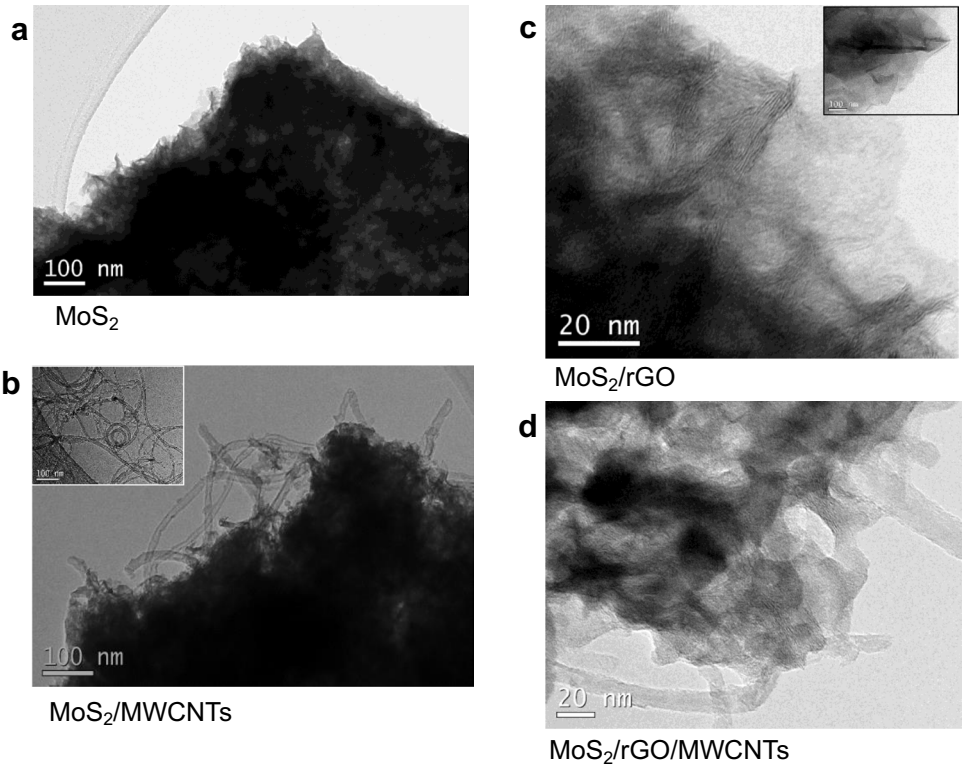


Fig. 3 TEM images of: **a** MoS_2, **b** MoS_2/MWCNTs (inset: o-MWCNTs), **c** MoS_2/GO (inset: GO), and **d** MoS_2/rGO/MWCNTs

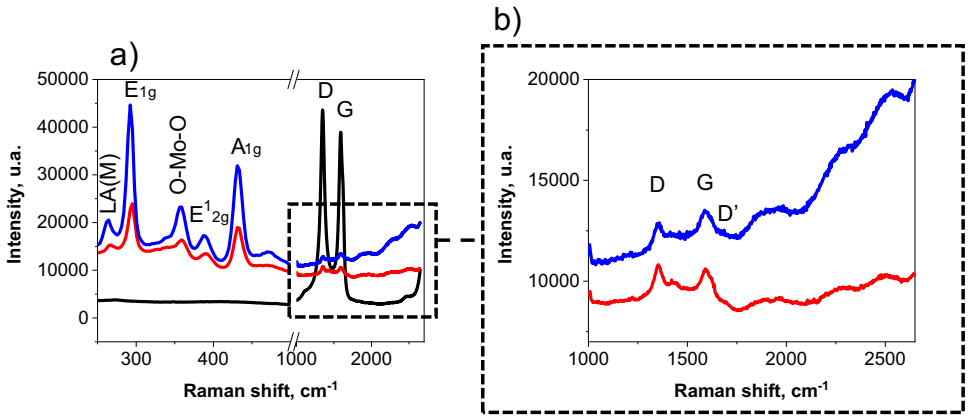


Fig. 4 (**a**) Raman spectra and (**b**) zoom at high frequencies of MWCNTs (black), MoS_2/MWCNTs (red), and MoS_2/rGO/MWCNTs (blue) nanocomposites at $\lambda_{exc} = 532$ nm

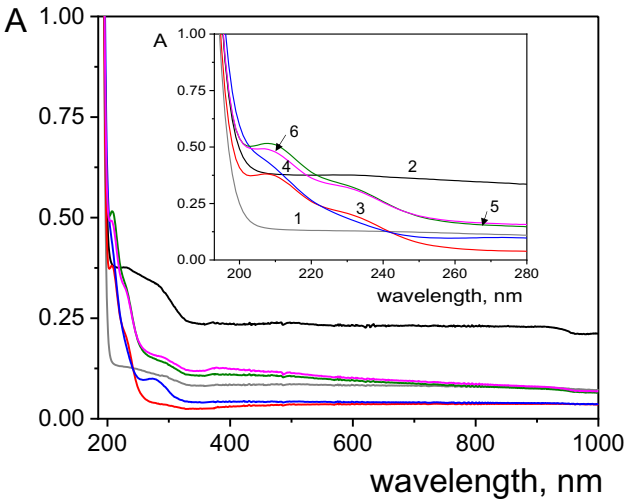


Fig. 5 UV spectra of (1) GO, (2) o-MWCNTs, (3) MoS_2, (4) MoS_2/rGO, (5) MoS_2/MWCNTs, and (6) MoS_2/rGO/MWCNTs

previously reported and attributed to defects in the processed MWCNTs [21].

UV–Vis spectroscopy was used to verify the formation of MoS_2 hybrids (Fig. 5). Absorbance spectra from aqueous dispersions of the synthesized nanocomposites (30 µg mL^{-1}) and the bare nanomaterials were recorded. No bands appeared in the range of scanned wavelengths for rGO (curve 1) or MWCNTs (curve 2). However, the MoS_2 spectrum (curve 3) showed two absorption bands at 210 and 230 nm that also appeared in the MoS_2/MWCNTs (curve 5) and MoS_2/rGO/MWCNTs (curve 6) spectra. However, these bands are much poorly defined in the MoS_2/rGO spectrum (curve 4) probably due to an encapsulation effect of MoS_2 by rGO [16].

In order to evaluate the peroxidase-like catalytic activity of the MoS_2-based nanomaterials, the TMB/H_2O_2 system was employed as substrate. Figure 6 shows as the colorless solution developed a clearly and almost immediate visible blue color corresponding to the oxidized TMB in the presence of MoS_2/MWCNTs. The blue color is due to the formation of a radical in the decomposition of hydrogen peroxide, which acts as an oxidant [31]. This same behavior was observed using other peroxidase substrates, OPD (o-phenylenediamine) and ABTS. These results show the higher ability of MoS_2 to exhibit its intrinsic properties in composites prepared without rGO, due to the absence of encapsulation that occurs in the presence of flat graphene sheets [16]

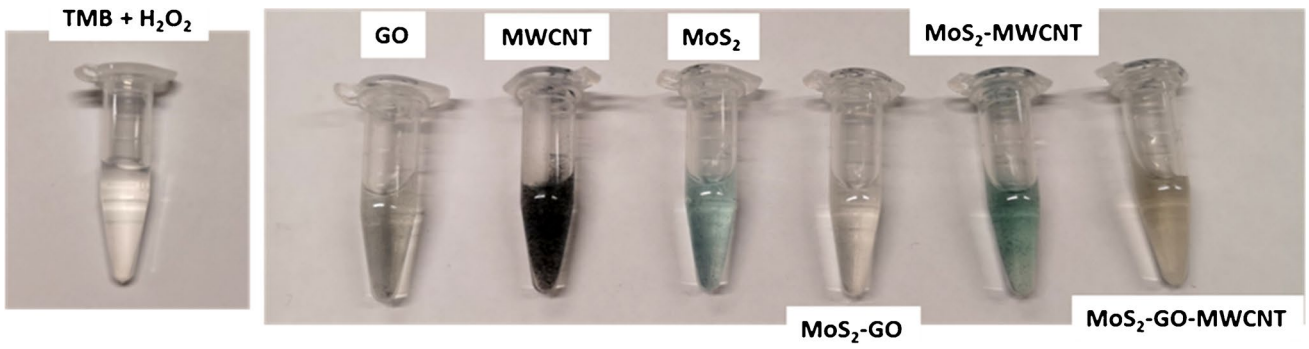


Fig. 6 Photographs showing the peroxidase activity of MoS_2 nanocomposites in 250 µL of the TMB/H_2O_2 ready to use commercial solution

Electrochemical characterization of MoS_2 nanomaterials

SPCEs were modified by dropping 5 µL of the as-prepared dispersions of MoS_2 nanomaterials onto the working electrode surfaces and allowing drying. Then, cyclic voltammograms (CVs) and electrochemical impedance spectra (EIS) from 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ in 0.1 M KCl solutions were recorded (Fig. 7). As it can be seen, no significant voltammetric differences were apparent for all the electrodes, with similar anodic and cathodic i_p, E_p, and ΔE values in the electroactivity range of the redox probe. However, Nyquist spectra exhibited significantly lower electron transfer resistance (R_{CT}) values for the electrodes modified with carbon nanotubes/MoS_2 hybrids (MoS_2/MWCNTs and MoS_2/rGO/MWCNTs). This behavior can be attributed to a better conductivity of these composites due to the presence of carbon nanotubes, since such behavior was not observed for the electrode modified with MoS_2 and rGO. Probably, as SEM and TEM images suggested, the carbon nanotube hybrids possess a more porous nanostructure that increases the specific surface of the electrode providing more active sites for target molecules. The larger differences observed using EIS compared with CV are probably due to the different rationale and mode of application of the two techniques. Whereas cyclic voltammetry involves large potential perturbations, in EIS the system is only infinitesimally perturbed with respect to the steady state.

Optimization of the experimental variables involved in the preparation of the dual immunosensor

According to the scheme depicted in Fig. 1, the SPdCE was functionalized by electrografting with *p*-ABA, and the modified electrodes (*p*-ABA/SPdCE) were activated with EDC/NHSS for the covalent immobilization of Neu (Neu-Phe-SPdCE). Then, the biotinylated capture antibodies, cAb_{BAFF} and cAb_{APRIL}, were immobilized on the respective working electrode and a sandwich configuration for each biomarker was implemented with MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb_{BAFF} or MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb_{APRIL} carrier tags.

The effect of the experimental variables involved in the preparation of MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb_{BAFF} (or -dAb_{APRIL}) carrier tags and the cAb_{BAFF}-Neu-Phe-SPdCE (or cAb_{APRIL}-) bioelectrodes, on the amperometric responses provided by the resulting MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb_{BAFF}-BAFF-cAb_{BAFF}-Neu-Phe-SPdCE or MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb_{APRIL}-APRIL-cAb_{APRIL}-Neu-Phe-SPdCE, was evaluated. Larger ratio between the currents measured with the as-prepared immunosensors in the presence (S) of 5 ng mL^{-1} or 4 ng mL^{-1} BAFF or APRIL standards, respectively, or in the absence (B) of the target compounds was taken as the selection criterion for each tested variable. The optimization studies implied the evaluation of (a) MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb_{BAFF} (or -dAb_{APRIL}) loadings, and those of dAb_{BAFF} (or dAb_{APRIL}) and HRP onto the MoS_2/MWCNTs nanocomposite; (b) selection between Strep or Neu binding protein immobilized onto Phe-SPdCEs; (c) loading and incubation time of Neu onto Phe-SPdCEs; (d) concentration and incubation time of biotinylated capture antibodies (cAbs) onto Neu-Phe-SPdCEs; (e) type, concentration, and incubation time of the blocking agent; (f) incubation time of BAFF or APRIL cytokines onto cAb-Neu-Phe-SPdCEs; and (g) incubation time of the corresponding nanocarrier tag onto BAFF-cAb_{BAFF}-Neu-Phe-SPdCE or APRIL-cAb_{APRIL}-Neu-Phe-SPdCE. The results of these studies are shown in the Supplementary Material (Figs. S1–S5) and summarized in Table 1. Moreover, the experimental conditions used for the modification of SPdCEs by grafting from the electrochemically generated *p*-ABA cation radical were the same as optimized previously [32]. The detection potential of − 0.20 V vs. Ag pseudo-reference electrode was also previously selected for the same catalytic system [33].

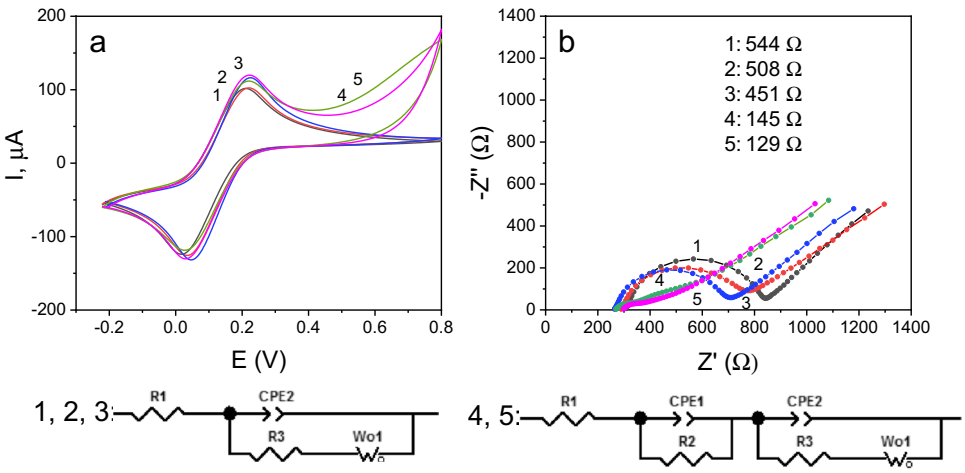


Fig. 7 Cyclic voltammograms (**a**) and Nyquist plots (**b**) recorded for 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ in 0.1 M KCl solutions for (1) bare SPCE, (2) MoS_2/SPCE, (3) MoS_2/GO/SPCE, (4) MoS_2/MWCNTs/SPCE, and (5) MoS_2/GO/MWCNTs/SPCE. **a** $\nu = 50$ mV s^{-1} and **b** range of frequencies: 10^5–0.04 Hz; open circuit. The equivalent circuits used to adjust the experimental results are shown below

Table 1 Optimization of the experimental variables affecting the preparation and functioning of the dual immunosensor developed for the simultaneous determination of BAFF and APRIL cytokines

	BAFF		APRIL	
Variable	Tested range	Selected value	Tested range	Selected value
MWCNTs/MoS_2 loading, mg mL^{-1}	0.05–0.4	0.1	0.05–0.4	0.2
dAb loading, μg mL^{-1}	0–9	6	0–20	5
HRP loading, mg mL^{-1}	0.25–2	1	0.5–3	1
Affinity	Strep or Neu	Neu	Strep or Neu	Neu
Neutravidin loading, μg mL^{-1}	0–800	600	0–800	400
Neutravidin incubation time, min	15–60	15	15–60	30
cAb, ng mL^{-1} (BAFF); μg mL^{-1} (APRIL)	0–500	100	0–10	5
cAb incubation time, min	15–60	30	5–60	15
Blocking mixture*	A–D	D	A–D	D
Biotin loading, mg mL^{-1}	1–5	2	1–5	2
Biotin incubation time, min	15–60	15	15–60	15
Target protein incubation time, min	15–60	30	15–60	30
MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb incubation time, min	15–60	30	10–60	15

*(A) 2 mg mL^{-1} biotin, (B) 2% casein + 2 mg mL^{-1} biotin, (C) 2% BSA, and (D) 2% casein + 1% BSA + 3 mg mL^{-1} biotin.

Electrochemical characterization of the immunosensors

The stepwise immunosensors' preparation were monitored by EIS using 5 mM $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ as redox probe. Figures S6a-d shows representative Nyquist plots and the equivalent circuits for the modified SPCE and the corresponding immunosensors. As can be seen, after modification of the SPCE with *p*-ABA there was a large increase in the electron transfer resistance, R_{CT}, from 972 to 3862 Ω (Fig. S6a) because of electrostatic repulsion between the anionic redox probe and the surface-confined $-COO^-$ groups of the modified electrode surface at the measuring pH. On the contrary, there was a drastic decrease in the R_{CT} value (not shown) after activation with EDC/NHSS due to the neutralization of these $-COO^-$ groups. Then, the R_{CT} value remained relatively low after immobilization of Neu protein (2015 Ω and 1809 Ω, green curves in Figs. S6a and c, respectively). The impedance spectra corresponding to the immobilization of the immunoreagents are displayed in Figure S6b and d. As expected, an increase in the electron transfer resistance occurred upon immobilization of the biotinylated capture antibodies (cAb_{BAFF} or cAb_{APRIL}), with R_{CT} values of 2196 Ω (BAFF) and 2076 Ω (APRIL), due to the resistance to electron transfer produced by the partially insulating layer created by these biomolecules on the electrode surface. In the case of the BAFF immunosensor (blue curve in Fig. S6b), the Nyquist diagram is somewhat distorted, while two semicircles are clearly observed in the APRIL spectrum (blue curve in Fig. S6d). This behavior can be attributed to the existence of two distinct layers on the surface of the electrode which is more evident in the case of APRIL because of the larger concentration of capture antibody (5 μg mL^{-1} vs. 100 ng mL^{-1}). In both cases, the resistance increased after incubation with the antigen solutions (brown curves in Figs. S6c and d) because of hindered interfacial electron transfer by the immobilized proteins, with R_{CT} values of 2326 Ω (BAFF) and 2368 Ω (APRIL). However, a remarkable decrease was observed upon incubation with the MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb nanocarrier tag (purple curves in Figs. S6c and d), with $R_{CT\,(BAFF)} = 2225$ Ω and $R_{CT\,(APRIL)} = 2187$, which is most likely due to the higher conductivity of the resulting surface.

The obtained Nyquist plots can be defined by two different equivalent circuits as shown in Figure S6. The spectra of Figures S6a and c fitted well with the R1(C2[R3W1]) circuit, whereas the spectra in Figures S6b and d should be explained by a more complex scheme with at least two RC semi-circuits. The R_{CT2} value, corresponding to the second semicircle of the Nyquist plot, represented the electron transfer across the immobilized substances including biotinylated capture antibodies, the antigens, and the MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb nanocarrier tag.

Analytical characteristics for the simultaneous determination of BAFF and APRIL

Figure 8 shows the calibration plots obtained with the dual immunosensor for BAFF and APRIL standard solutions. The relationships between currents (Δi) and the logarithm of the biomarker concentration provide linear ranges from 0.24 to 120 ng mL^{-1} ($r^2 = 0.999$) (BAFF) and 0.19 to 25 ng mL^{-1} ($r^2 = 0.997$) (APRIL), fitting the equations: Δi, nA = (244 ± 3) log [BAFF, ng mL^{-1}] + (487 ± 3)

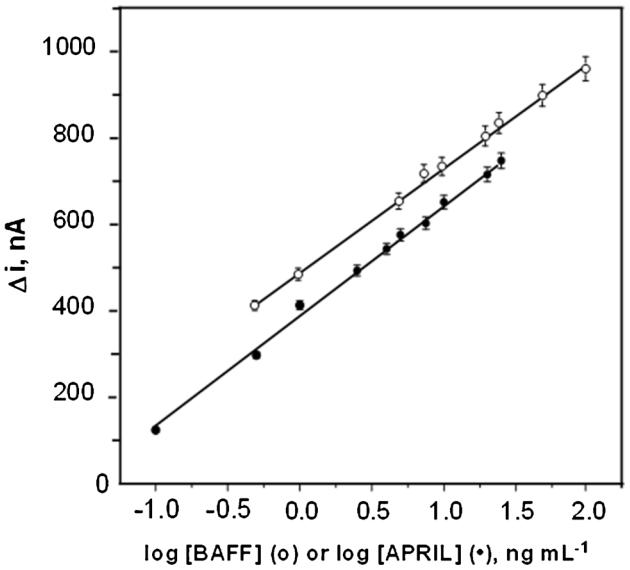


Fig. 8 Calibration plots constructed with the dual immunosensor for BAFF (white points) and APRIL (black points) using MoS_2/MWCNTs(-HRP)-dAb as carrier tags for the amperometric measurements at −0.20 V vs. Ag pseudo-reference electrode. Other working conditions are summarized in Table 1

and Δi, nA = (258 ± 5) log [APRIL, ng mL^{-1}] + (389 ± 4). These calibration data were compared with those obtained by constructing calibrations using MWCNTs(-HRP)-dAb, i.e., without MoS_2 incorporated to the carbon nanotubes, or HRP-IgG-dAb, i.e., without MoS_2 and MWCNTs.

In the first case, remarkably lower slope values, 86 ± 7 nA per decade of concentration (BAFF) and 179 ± 8 nA per decade of concentration (APRIL), were found over the same dynamic ranges with $r^2 = 0.991$ and 0.993, respectively. The higher sensitivity achieved with the bioplatforms constructed with carrier tags involving MoS_2 nanoparticles highlights their favorable contribution to enhance conductivity and their intrinsic pseudo-peroxidase activity that reinforces that of HRP. Furthermore, in absence of MoS_2 and carbon nanotubes, the slope values are even lower, 39 ± 3 nA per decade of concentration (BAFF) ($r^2 = 0.990$) and 140 ± 6 nA per decade of concentration (APRIL) ($r^2 = 0.994$), due to the loss of the large specific surface area provided by carbon nanotubes to immobilize large amounts of detection antibodies, HRP, and MoS_2 nanoparticles, and to promote fast and efficient electron transfer.

Limit of detection, LOD (0.08 ng mL^{-1} BAFF and 0.06 ng mL^{-1} APRIL), and limit of quantification, LQ (0.26 ng mL^{-1} BAFF and 0.19 ng mL^{-1} APRIL) values, were calculated according to the 3 s_b/m and 10 s_b/m criteria, where s_b was estimated as the standard deviation for ten amperometric measurements without target protein and m was the slope of the corresponding standard calibration plot (Fig. 8). The reproducibility of the measurements provided by the immunoplatforms was assessed by comparing the amperometric signals provided for 10 ng mL^{-1} of BAFF or 2.5 ng mL^{-1} of APRIL standards with 5 different immunosensors prepared in the same manner on both the same day (relative standard deviation, RSD, values of 2.9 and 2.4%, respectively) and different days (RSD of 3.6 and 3.3%, respectively). These results confirm the good reproducibility of the protocols involved both in the preparation of the immunosensors and in the amperometric measurements.

These analytical characteristics are compared with those claimed for the commercial ELISA kits. The kits that use the same immunoreagents (see "Experimental" section) provide logarithmic calibration plots with linear ranges from 39.1 to 2500 pg mL^{-1} BAFF and from 31.2 to 2000 pg mL^{-1} APRIL. Although these ranges start from lower concentrations, the immunoplatforms cover larger ranges. In addition, the kit protocols do not inform about the detection limits or precision levels. Other kits from the same company (see "Introduction" section) provide linear ranges between 62.5 and 4000 pg mL^{-1} BAFF with a minimum detection dose (MDD = $\bar{x} \pm 2s$) of 6.44 pg mL^{-1}, and between 0.2 and 10 ng mL^{-1} APRIL with MDD = 0.015 ng mL^{-1}. RSD values range between 3.4 and 11.6% (BAFF) and 3.8 and 8.5% (APRIL) for intra-assays and inter-assays, respectively. All these immunoassays require 4 h 30 min to be implemented. Therefore, it is worth highlighting the lower RSD values obtained with the dual immunosensor, as well as the shorter assay time. Indeed, the method reported in this paper allows the simultaneous determination of both cytokines in approximately 1 h 30 min counting since the cAbs were immobilized (similarly to that reported for the ELISA methods) onto the SPdCEs, i.e., in a three times shorter assay time than that required for the single determination of one biomarker by ELISA. In addition, the achieved sensitivities for both cytokines are perfectly adequate for the analysis of clinical samples where the expected concentrations are in the ng mL^{-1} range. So, levels in serum of healthy patients of 0.8 ng mL^{-1} BAFF [34] and 4 ng mL^{-1} APRIL [35] have been reported.

In addition, the stability of both immunoplatforms ($cAb_{BAFF/APRIL}$-Neu-Phe-SPdCE, stored in a humid chamber) and bionanoconjugates (MWCNTs/MoS_2-(HRP)-$dAb_{BAFF/APRIL}$ resuspended in PBST) stored after their preparation at 4 °C was assessed by comparing the amperometric responses they provided in the absence and presence of BAFF (10 ng mL^{-1}) or APRIL (4 ng mL^{-1}) standards. According to these studies, the prepared bionanoconjugates were stable for at least 3 months (Figure S7a) and the immunoplatforms during 33 days (Fig. 7Sb), providing during these periods amperometric responses included within the limits of control set at ± 3 times the standard deviation of three measurements performed on the day of their preparation (day 0).

Selectivity

The selectivity of the dual immunoplatform was checked by comparison of the currents measured for 0- and 10-ng mL^{-1} BAFF or 0- and 4-ng mL^{-1} APRIL standards, in absence or in the presence of various non-target proteins coexisting in serum as well as other biomarkers for autoimmune diseases and cancer at the concentration they found in healthy individuals. The results displayed in Fig. 9 proved that there were no significant differences in the S/B ratios for all proteins tested, falling in all cases within the range of $\pm 3\times$ standard deviation of the current measured in the absence of interferent (the corresponding Δi values, in nA, are given in Table S1 of the Supplementary Information).

The possible cross-talking between the two close bioelectrodes, WE1 (BAFF immunosensing surface) and WE2 (APRIL immunosensing surface), at the dual SPCE was evaluated. Figure S8 in the Supplementary Information compares the amperometric currents measured with the dual immunosensor in solutions containing varying concentrations of BAFF and APRIL standards, ensuring the absence of cross-talking between immunosensing surfaces due to the presence of the non-target cytokine.

Application to the analysis of cancer cell lysates and serum samples

The developed immunosensors were applied to the analysis of the two target cytokines in CRC cell lysates with different metastatic potential and in serum samples from healthy individuals and from patients diagnosed with SLE and CRC.

Table S2 in the Supplementary Information shows a statistical comparison of the slope values of the calibration plots constructed for both analytes using standards prepared in the different matrices. As it can be seen, no apparent matrix effect was found for the determination of the two biomarkers for ten-fold diluted serum samples and 0.5 µg of cell extract.

Accordingly, the determination of both cytokines in the different analyzed samples was carried out simply by interpolation of the amperometric responses provided by the immunosensors in the calibration plots constructed with standard solutions of the cytokines (Fig. 8). The results obtained as well as those provided by the ELISA methodologies for the single determination of each cytokine are summarized in Table 2.

The obtained results revealed a higher expression of BAFF and APRIL in cells with higher metastatic potential (KM12SM, KM12L4a, and SW620), in agreement with the role played by these cytokines in the tumorigenesis and metastasis of CRC [36–38].

Similarly, the results obtained in serum samples demonstrate the significantly higher expression of both cytokines in patients with SLE and CRC compared to healthy individuals. Figure 10 displays the results by patient group showing that it is possible to clearly discriminate patients with these important pathologies from healthy individuals by interrogating these cytokines. It is important to note that, in general, the serum level of APRIL is larger than that of BAFF in the three groups of analyzed patients.

The obtained results agree with those reported in the literature on the hyperexpression of these cytokines for SLE [39–42] and CRC [37, 43–46] patients.

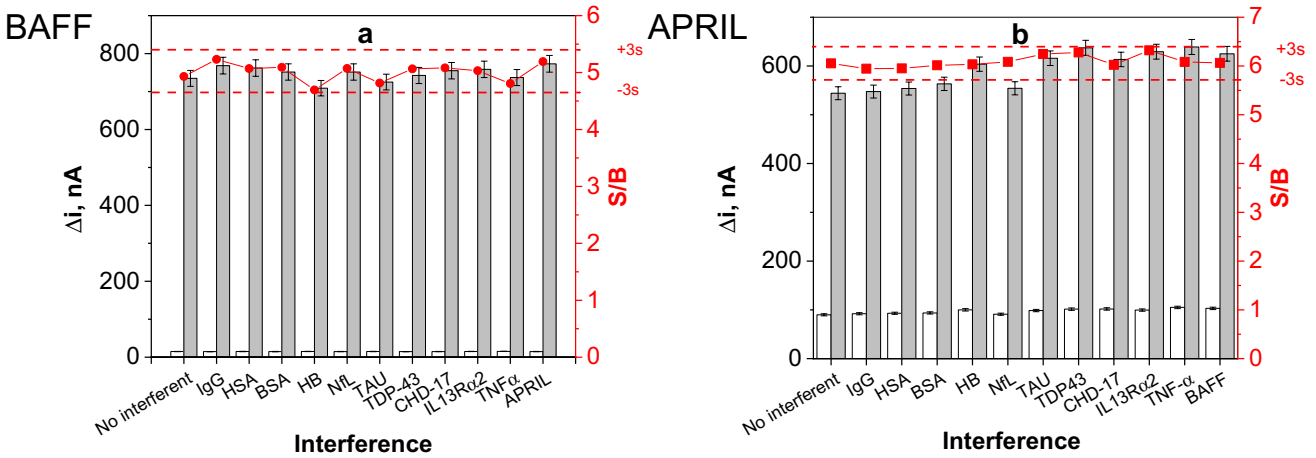


Fig. 9 Amperometric responses measured with the dual immunosensor for 0- (white bar) and 10-ng mL^{-1} BAFF or 4-ng mL^{-1} APRIL (grey bar) standards prepared in absence and in the presence of 1 mg mL^{-1} hIgG, 50 mg mL^{-1} HSA, 5 mg mL^{-1} BSA, 5 mg mL^{-1} HB, 30 pg mL^{-1} NfL, 5 pg mL^{-1} TAU, 1 ng mL^{-1} TDP-43, 500 ng mL^{-1} CDH-17, 10 ng mL^{-1} IL13Rα2, 100 pg mL^{-1} TNFα, 4 ng mL^{-1} APRIL, or 1 ng mL^{-1} BAFF

Table 2 Concentrations of BAFF and APRIL (in ng mL^{-1}) determined using the developed dual immunosensors and the ELISA methods for their single determination in cell extracts and serum samples

Sample	Cell/individual	BAFF			APRIL		
		Immunosensor*	ELISA*	t_{exp}**	Immunosensor*	ELISA*	t_{exp}**
Cell extracts	KM12C	1.7 ± 0.1; 2.5	1.9 ± 0.3; 5.4	0.314	1.7 ± 0.1; 3.0	1.7 ± 0.3; 6.1	0.001
	KM12SM	5.00 ± 0.03; 2.4	5.3 ± 0.6; 4.8	0.348	7.0 ± 0.6; 3.4	8 ± 1; 7.5	0.828
	KM12L4a	3.2 ± 0.2; 2.0	3.1 ± 0.3; 4.5	0.070	4.5 ± 0.4; 3.5	4.2 ± 0.5; 4.6	0.324
	SW480	0.90 ± 0.07; 3.2	1.1 ± 0.2; 8.0	0.275	0.81 ± 0.05; 2.4	0.8 ± 0.1; 5.1	0.043
	SW620	2.6 ± 0.2; 2.5	2.8 ± 0.4; 6.1	0.309	3.1 ± 0.2; 2.9	3.4 ± 0.5; 6.2	0.385
Serum	Healthy	0.45 ± 0.05; 3.6	0.49 ± 0.09; 7.1	0.057	2.2 ± 0.1; 2.1	2.2 ± 0.2; 3.5	0.026
		0.29 ± 0.03; 3.8	0.29 ± 0.05; 6.9	0.011	1.70 ± 0.08; 1.9	1.7 ± 0.2; 4.5	0.051
		0.32 ± 0.03; 3.5	0.34 ± 0.04; 5.2	0.004	2.2 ± 0.2; 1.5	2.2 ± 0.3; 5.3	0.050
		0.22 ± 0.02; 3.8	0.23 ± 0.04; 7.7	0.005	1.70 ± 0.06; 1.4	1.6 ± 0.3; 7.3	0.149
		0.37 ± 0.04; 4.8	0.39 ± 0.05; 5.0	0.027	1.9 ± 0.2; 3.6	2.2 ± 0.3; 5.3	0.395
		0.14 ± 0.05; 2.8	0.12 ± 0.02; 7.0	0.015	1.8 ± 0.1; 3.3	1.8 ± 0.3; 6.4	0.007
		0.26 ± 0.02; 3.6	0.30 ± 0.06; 7.9	0.043	2.0 ± 0.2; 3.6	1.9 ± 0.3; 6.1	0.052
		0.57 ± 0.07; 4.8	0.7 ± 0.1; 6.2	0.110	1.6 ± 0.2; 4.5	1.6 ± 0.3; 7.4	0.162
	SLE	1.9 ± 0.2; 4.4	1.9 ± 0.3; 5.6	0.027	6.7 ± 0.4; 2.3	7.2 ± 0.8; 4.4	0.573
		1.20 ± 0.09; 3.1	1.2 ± 0.2; 5.9	0.065	6.4 ± 0.5; 3.2	6 ± 1; 6.6	1.021
		2.0 ± 0.1; 2.8	2.1 ± 0.3; 6.0	0.125	7.0 ± 0.3; 1.8	6 ± 1; 6.8	0.703
		1.4 ± 0.1; 3.5	1.4 ± 0.2; 6.6	0.012	7.0 ± 0.3; 2.0	6.3 ± 0.6; 3.9	0.893
	CRC	3.1 ± 0.2; 5.0	3.6 ± 0.6; 6.4	0.652	7.5 ± 0.6; 3.2	7.3 ± 0.7; 3.7	0.233
		4.3 ± 0.8; 3.1	4.2 ± 0.7; 6.6	0.044	7.8 ± 0.6; 3.4	8.2 ± 0.6; 3.0	0.449
		2.9 ± 0.2; 3.3	3.1 ± 0.5; 6.0	0.321	4.8 ± 0.3; 2.2	4.8 ± 0.5; 4.0	0.002
		4.5 ± 0.4; 3.3	4.9 ± 0.6; 4.8	0.518	8.1 ± 0.7; 3.6	7.9 ± 0.7; 3.4	0.148

*Mean value $\pm t \times s/\sqrt{n}$; RSD, %, $n = 3$, $\alpha = 0.05$.

**$t_{exp} < t_{tab}$ of 4.303 ($n = 3$, $\alpha = 0.05$).

In addition, the BAFF concentrations found agree with those reported by other authors for SLE patients and healthy individuals (1.47 ± 1.54 vs. 0.517 ± 0.18 ng mL^{-1} [40]) and (3.19 ± 4.26 vs. 0.97 ± 0.21 ng mL^{-1} [41]) as well as with the cut-off value established at 1429.4 pg mL^{-1} [42].

The statistical analysis of the results provided by the developed immunoplatforms against those obtained by the ELISA methods for the single determination of both cytokines showed an excellent correlation (Fig. 11), thus confirming the accuracy of the results provided by the dual immunosensor.

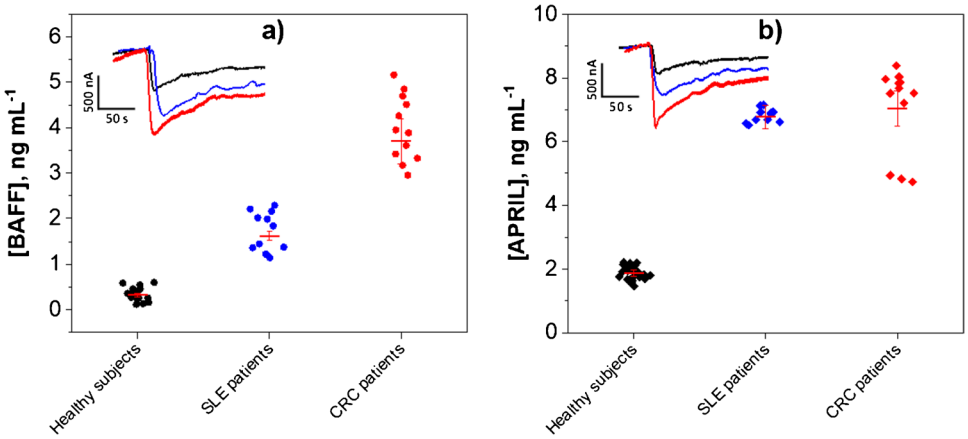


Fig. 10 BAFF (**a**) and APRIL (**b**) concentrations determined with the dual immunosensors for serum samples grouped into pools of healthy individuals and SLE and CRC patients. Real amperograms obtained for representative serum samples of a healthy individual and patients diagnosed with SLE and CRC are displayed

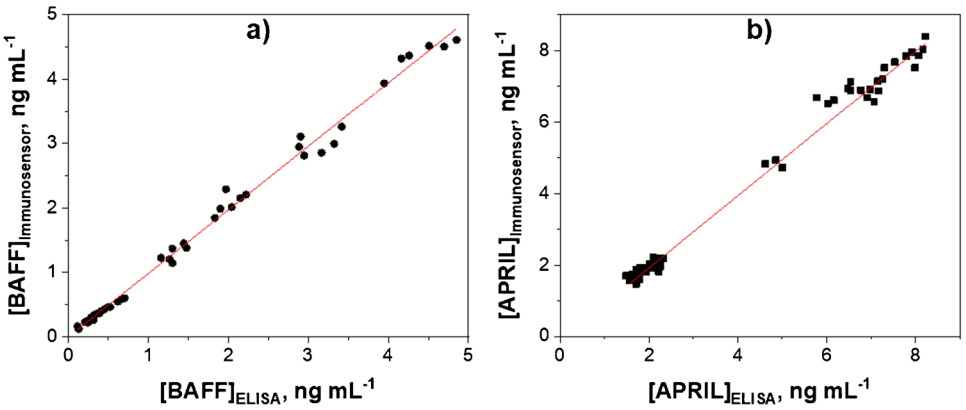


Fig. 11 Correlation plots between the BAFF (**a**) and APRIL (**b**) concentrations determined with the developed dual inmunosensors and the ELISA methodologies for both the analyzed cellular lysates and serum samples. The three replicates made for each sample are included in the plots

To further deepen in the potential of the developed bioplatforms for diagnosing patients with SLE and CRC by amperometric determination of the two target cytokines, and to establish the best cut-off values that allow reliably discriminating between the three groups of patients analyzed, the results obtained were plotted on the ROC curves shown in Figure S9. According to them for the comparison between healthy individuals and SLE or CRC patients the area under the curve was 100%. When comparing SLE patients to healthy, a maximum cut-off with 100% specificity and 100% sensitivity was achieved for a concentration of BAFF equal to 0.885 ng mL^{-1}. Similarly, CRC patients versus healthy individual comparison had a best cut-off with 100% specificity and also 100% sensitivity for 1.735 ng mL^{-1}. Finally, for the comparison of SLE versus CRC patients, maximum sensitivity and specificity, 100% for both, were achieved at a cut-off of 2.45 ng mL^{-1} of BAFF.

In the case of APRIL, equivalent 100% sensitivity and specificity were achieved for the comparison of SLE and CRC patients against the healthy individuals for 4.3 ng mL^{-1} and 3.5 ng mL^{-1}, respectively. However, no significant differences could be found between SLE and CRC patient APRIL levels.

Conclusions

This work reports the first bioplatforms for the simultaneous determination of BAFF and APRIL, two relatively newly described cytokines of great relevance in autoimmune and cancer diseases. The immunoplatform, implemented in an integrated format, involved the use of *p*-aminobenzoic acid-grafted, screen-printed carbon electrodes to allow the efficient immobilization of the capture antibodies, and the use of MWCNTs decorated with MoS_2 nanoparticles as nanocarriers of the detector antibodies and HRP to carry out the electrochemical signal amplification. An amperometric transduction at − 0.20 V (vs. Ag pseudo-reference electrode) using SPdCE in the presence of the hydroquinone/H_2O_2 system allowed an excellent sensitivity (LOD values of 0.08 and 0.06 ng mL^{-1} for BAFF and APRIL, respectively) to be achieved as well as a great selectivity, and operational and storage stability ($cAb_{BAFF/APRIL}$-Neu-Phe-SPdCE ≥ 30 days; MWCNTs/MoS_2-(HRP)-$dAb_{BAFF/APRIL}$ ≥ 100 days). The dual immunoplatform allowed the accurate determination of both target cytokines in cancer cell lysates (0.5 µg/determination) and serum samples (10 times diluted) of patients diagnosed with SLE and CRC without matrix effect. These pioneering results demonstrate the potential of these dual immune platforms as well as their competitiveness against commercially available ELISA methodologies for the single determination of the target biomarkers, to be easily transferable to the clinic for their simplicity, affordable cost, reduced assay time, and point-of-care and multiplexed operation. These results open a new avenue to assist in the management of these patients and to further investigate the role played by these cytokines in these or other prevalent diseases.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s00604-022-05250-4.

Author contribution Beatriz Arévalo: methodology, investigation, writing — review and editing — original draft. Marina Blázquez: methodology, investigation, review and editing — original draft. Alejandro Valverde: methodology, investigation, review and editing — original draft. Verónica Serafín: methodology, investigation, writing — review and editing — original draft. Ana Montero-Calle: investigation, resources, review and editing original draft. Guillermo Solís-Fernández: investigation, resources, review and editing original draft. Rodrigo Barderas: conceptualization, supervision, resources, review and editing original draft, funding acquisition. Susana Campuzano: conceptualization, supervision, resources, writing, review and editing original draft, funding acquisition. Paloma Yáñez-Sedeño: conceptualization, supervision, resources, writing, review and editing original draft, funding acquisition. José M. Pingarrón: supervision, resources, review and editing original draft.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. Financial support was provided by Spanish Ministerio de Ciencia, Innovacion y Universidades (RTI2018-096,135-B-I00), Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación

(PID2019-103899RB-I00) Research Project, and the TRANSNANOAVANSENS-CM Program from the Comunidad de Madrid (Grant S2018/NMT-4349). Financial support of the PI17CIII/00045 and PI20CIII/00019 grants from the AES-ISCIII program was also provided to R. B. A predoctoral contract from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovacion y Universidades (PRE2019-087,596) was provided to B. Arévalo. A FPU predoctoral contract supported by the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte was provided to A. M.-C. G. S.-F. is recipient of a predoctoral contract (grant number 1193818 N) supported by The Flanders Research Foundation (FWO).

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

1. Bossen C, Schneider P (2006) BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. Semin Immunol 18:263–275
2. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J (2003) BAFF and APRIL: a tutorial on B cell survival. Annu Rev Immunol 21:231
3. Kimberley FC, Hahne M, Medema JP (2009) APRIL hath put a spring of youth in everything. Relevance of APRIL for survival. J Cell Physiol 218:1
4. Vincent FB, Morand EF, Schneider P, Mackay F (2014) The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. Nat Rev Rheumatol 10:365
5. Kang SA, Fedoriw Y, Brenneman EK, Truong YK, Kikly K, Vilen BJ (2017) BAFF induces tertiary lymphoid structures and positions T cells within the glomeruli during lupus nephritis. J Immunol 198:2602
6. Varin M-M, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, Pers J-O (2010) B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: Focus on BAFF. Autoinmmun Rev 9:604
7. Shabgah AG, Shariati-Sarabi Z, Tavakkol-Afshari J, Mohammadi M (2019) The role of BAFF and APRIL in rheumatoid arthritis. J Cell Physiol 234:17050
8. Pelekanou V, Notas G, Athanasouli P, Alexakis K, Kiagiadaki F, Peroulis N, Kalyvianaki K, Kampouri E, Polioudaki H, Theodoropoulos P, Tsapis A, Castanas E, Kampa M (2018) BCMA (TNFRSF17 induces APRIL and BAFF mediated breast cancer cell stemness. Front Oncol 8:301
9. Zadeh KK, Ou J (2016) Biosensors based on two-dimensional MoS_2. ACS Sensors 1:5–16
10. Ganatra R, Zhang Q (2014) Few-layer MoS_2: a promising layered semiconductor. ACS Nano 8:4074
11. Dalila RN, Arshad MK, Gopinath SCB, Norhaimi WMW, Fathil MFM (2019) Current and future envision on developing biosensors aided by 2D molybdenum disulfide (MoS_2) productions. Biosens Bioelectron 132:248
12. Wang T, Zhu H, Zhuo J, Zhu Z, Papakonstantinou P, Lubarsky G, Lin J, Li M (2013) Biosensor based on ultrasmall MoS_2 nanoparticles for electrochemical detection of H_2O_2 released by cells at the nanomolar level. Anal Chem 85:10289–10295
13. Lin D, Su Z, Wei G (2018) Three-dimensional porous reduced graphene oxide decorated with MoS_2 quantum dots for electrochemical determination of hydrogen peroxide. Mater Today Chem 7:76
14. Kudr J, Adam V, Zitka O (2019) Fabrication of graphene/molybdenum disulfide composites and their usage as actuators for electrochemical sensors and biosensors. Molecules 24:3374
15. Venkatesan A, Rathi S, Lee IY, Park J, Lim D, Kang M, Joh HI, Kim GH, Kannan ES (2017) Molybdenum disulfide nanoparticles decorated reduced graphene oxide: highly sensitive and selective hydrogen sensor. Nanotechnol 28:365501
16. Yoon J, Lee T, Bharate BG, Jo J, Oh B-K, Choi J-W (2017) Electrochemical H_2O_2 biosensor composed of myoglobin on MoS_2 nanoparticle-graphene oxide hybrid structure. Biosens Bioelectron 93:14
17. Lin Y, Chen X, Lin Y, Zhou Q, Tang D (2015) Non-enzymatic sensing of hydrogen peroxide using a glassy carbon electrode modified with a nanocomposite made from carbon nanotubes and molybdenum disulfide. Microchim Acta 182:1803
18. Serafín V, Valverde A, Martínez-García G, Martínez-Periñán E, Comba F, Garranzo-Asensio M, Barderas R, Yáñez-Sedeño P, Campuzano S, Pingarrón JM (2019) Graphene quantum dots-functionalized multi-walled carbon nanotubes as nanocarriers in electrochemical immunosensing. Determination of IL-13 receptor α2 in colorectal cells and tumor tissues with different metastatic potential. Sens Actuators B Chem 284:711–722
19. Torrente-Rodríguez RM, Ruiz-ValdepeñasMontiel V, Campuzano S, Pedrero M, Farchado M, Vargas E, Manuel de Villena FJ, Garranzo-Asensio M, Barderas R, Pingarrón JM (2017) Electrochemical sensor for rapid determination of fibroblast growth factor receptor 4 in raw cancer cell lysates. PLoS One 12:e0175056
20. Valverde A, Povedano E, Ruiz-Valdepeñas Montiel V, Yáñez-Sedeño P, Garranzo-Asensio M, Barderas R, Campuzano S, Pingarrón JM (2018) Electrochemical immunosensor for IL-13 receptor α2 determination and discrimination of metastatic colon cancer cells. Biosens Bioelectron 117:766–772
21. Koroteev VO, Bulusheva LG, Asanov IP, Shlyakhova EV, Vyalikh DV, Okotrub AV (2011) Charge transfer in the MoS_2/carbon nanotube composite. J Phys Chem C 115:21199
22. Govindasamy M, Mani V, Chen S-M, Karthik R, Manibalan K, Umamaheswari R (2016) MoS_2 flowers grown on graphene/carbon nanotubes: a versatile substrate for electrochemical determination of hydrogen peroxide. Int J Electrochem Sci 11:2954
23. Sánchez-Tirado E, González-Cortés A, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2018) Magnetic multiwalled carbon nanotubes as nanocarrier tags for sensitive determination of fetuin in saliva. Biosens Bioelectron 113:88–94
24. Valverde A, Serafín V, Montero-Calle A, González-Cortés A, Barderas R, Yáñez-Sedeño P, Campuzano S, Pingarrón JM (2020) Carbon/inorganic hybrid nanoarchitecture as carrier for signaling in electrochemical immunosensors. First biosensor for inflammatory and metastatic processes biomarker RANK-ligand. ChemElectroChem 7:810–820
25. Martínez-García G, Agüí L, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2016) Multiplexed electrochemical immunosensing of obesity-related hormones at grafted graphene-modified electrodes. Electrochim Acta 202:209–215
26. Xing LW, Ma ZF (2016) A glassy carbon electrode modified with a nanocomposite consisting of MoS_2 and reduced graphene oxide

for electrochemical simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. Microchim Acta 183:257–263
27. Song H, Tang A, Xu G, Liu L, Yin M, Pan Y (2018) One-step convenient hydrothermal synthesis of MoS_2/rGO as a high-performance anode for sodium-ion batteries. Int J Electrochem Sci 13:4720–4730
28. Shen P, Yang X, Du M, Zhang H (2021) Temperature and laser-power dependent Raman spectra of MoS_2/RGO hybrid and few-layered MoS_2. Physica B 604:412693
29. Basu AK, Sah AN, Pradhan A, Bhattacharya S (2019) Poly-L-lysine functionalized MWCNT-rGO nanosheets based 3-d hybrid structure for femtomolar level cholesterol detection using cantilever based sensing platform. Sci Rep 9:3686
30. Singh S, Sharma S (2021) MoS_2/multiwalled carbon nanotubes based composite for room-temperature ammonia sensing. Proc in press, Mater Today. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.364
31. Zheng J, Song D, Chen H, Xua J, Alharbi NS, Hayat T, Zhang M (2020) Enhanced peroxidase-like activity of hierarchical MoS_2-decorated N-doped carbon nanotubes with synergetic effect for colorimetric detection of H_2O_2 and ascorbic acid. Chinese Chem Lett 31:1109
32. Ojeda I, Lopez-Montero J, Moreno-Guzmán M, Janegitz BC, González-Cortés A, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2012) Electrochemical immunosensor for rapid and sensitive determination of estradiol. Anal Chim Acta 743:117–124
33. Eguílaz M, Moreno-Guzmán M, Campuzano S, González-Cortés A, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2010) An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes. Biosens Bioelectron 26:517–522
34. Kryštůfková O, Hulejová H, Mann HF, Pecha O, Půtová I, Ekholm L, Lundberg IE, Vencovský J (2018) Serum levels of B-cell activating factor of the TNF family (BAFF) correlate with anti-Jo-1 autoantibodies levels and disease activity in patients with anti-Jo-1 positive polymyositis and dermatomyositis. Arthritis Res Ther 20:158
35. Treamtrakanpon W, Tantivitayakul P, Benjachat T, Somparn P, Kittikowit W, Eiam-ong S, Leelahavanichkul A, Hirankarn N, Avihingsanon Y (2012) APRIL, a proliferation-inducing ligand, as a potential marker of lupus nephritis. Arthritis Res Ther 14:R252
36. Lascano V, Zabalegui LF, Cameron K, Guadagnoli M, Jansen M, Burggraaf M, Versloot M, Rodermond H, van der Loos C, Carvalho-Pinto CE, Kalthoff H, Medema JP, Hahne M (2012) The TNF family member APRIL promotes colorectal tumorigenesis. Cell Death Differ 19:1826–1835
37. Wang G, Wang F, Ding W, Wang J, Jing R, Li H, Wang X, Wang Y, Ju S, Wang H (2013) APRIL induces tumorigenesis and metastasis of colorectal cancer cells via activation of the PI3K/Akt pathway. PLoS ONE 8(1): e55298
38. Warakomska M, Tynecka M, Lemancewicz D, Grubczak K, Dzieciol J, Moniuszko M, Eljaszewicz A, Bolkun L (2021) The effects of BAFF and APRIL signaling on non-small cell lung cancer cell proliferation and invasiveness. Oncol Lett 22(4):728
39. Stohl W, Metyas S, Tan S-M, Cheema GS, Oamar B, Xu D, Roschke V, Wu Y, Baker KP, Hilbert DM (2003) B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 48(12):3475–3486
40. Fawzy SM, Gheita TA, El-Nabarawy E, El-Demellawy HH, Shaker OG (2011) Serum BAFF level and its correlations with various disease parameters in patients with systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. Egypt Rheumatol 33:45–51
41. Salazar-Camarena DC, Ortiz-Lazareno PC, Cruz A, Oregon-Romero E, Machado-Contreras JR, Muñoz-Valle JF, Orozco-López M, Marín-Rosales M, Palafox-Sánchez CA (2015) Association of BAFF, APRIL serum levels, BAFF-R, TACI and BCMA expression on peripheral B-cell subsets with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. Lupus 0:1–11.
42. Vasconcellos A, Marken J, Wang T, Lood C, Giltiay NV (2017) Increased levels of BAFF in SLE patients correlates with neutrophil activation and autoantibody production [abstract]. Arthritis Rheumatol 69 (suppl 10). https://acrabstracts.org/abstract/increased-levels-of-baff-in-sle-patients-correlates-with-neutrophil-activation-and-autoantibody-production/. Accessed July 11,2021.
43. Hahne M, Kataoka T, Schroter M, Hofmann K, Irmler M, Bodmer JL, Schneider P, Bornand T, Holler N, French LE, Sordat B, Rimoldi D, Tschopp J (1998) APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. J Exp Med 188:1185–1190
44. Moreaux J, Veyrune J-L, De Vos J, Klein B (2019) APRIL is overexpressed in cancer: link with tumor progression. BMC Cancer 9:83
45. Calu V, Ionescu A, Stanca L, Geicu OI, Iordache F, Pisoschi AM, Serban AI, Bilteanu L (2021) Key biomarkers within the colorectal cancer related inflammatory microenvironment. Sci Rep 11:7940
46. Kampa M, Notas G, Stathopoulos EN, Tsapis A, Castanas E (2020) The TNFSF members APRIL and BAFF and their receptors TACI, BCMA, and BAFFR in oncology, with a special focus in breast cancer. Front Oncol 10:827

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Bioelectrochemistry 146 (2022) 108157

Contents lists available at ScienceDirect

Bioelectrochemistry

journal homepage: www.journals.elsevier.com/bioelectrochemistry

Simultaneous electrochemical immunosensing of relevant cytokines to diagnose and track cancer and autoimmune diseases

B. Arévalo [a], M. Blázquez-García [a], A. Valverde [a], V. Serafín [a], A. Montero-Calle [b], G. Solís-Fernández [b], R. Barderas [b], P. Yáñez-Sedeño [a,*], S. Campuzano [a,*], J.M. Pingarrón [a]

[a] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain
[b] Chronic Disease Programme, UFIEC, Institute of Health Carlos III, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Dual immunoplatform
B-cell activating factor
Proliferation-inducing ligand
Amperometric detection
Human serum
Colorectal cancer
Systemic Lupus Erythematosus

ABSTRACT

This work reports the first dual magnetic beads (MBs) assisted immunoplatform for the simultaneous determination of BAFF (B cell activation factor) and APRIL (a proliferation-induced ligand), two cytokines related to immunity and tumour invasion, growth and metastasis. The electrochemical immunoplatform involves sandwich-type immunoassays implemented on magnetic microparticles functionalized with neutravidin (NA-MBs) or carboxylic groups (HOOC-MBs), and amperometric detection ($E_{app} = -0.20$ V vs. Ag pseudo-reference electrode) at screen-printed dual carbon electrodes (SPdCE) using the H_2O_2/hydroquinone (HQ) system. The developed immunosensors provide improved sensitivity, with LOD values of 0.33 and 16.4 pg mL^{-1} for BAFF and APRIL, respectively, and much shorter assay time that those claimed for ELISA kits and allow their simultaneous determination. The dual immunosensor permits discrimination between healthy individuals and patients diagnosed with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) or colorectal cancer (CRC) through the determination of both cytokines in 100-times diluted human sera with results in agreement with those provided by the individual ELISA methodologies.

1. Introduction

The human immune system, “innate, adaptive and passive”, is responsible for recognizing and attacking potentially pathogenic agents or its own antigens when they are dysregulated in aberrant expression or modification to defend the organism. Unfortunately, sometimes there is an excessive recognition that generates autoimmunity and, consequently, autoimmune diseases. Despite the heterogeneity and complexity of these diseases, the mechanisms of autoimmune damage, including previous factors, are common among them. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a prototypical chronic systemic disease characterized by the loss of immune tolerance to self-antigens, in which autoantibody production is the hallmark of the health disorder. In this disease, unlimited hyperactivation of the immune system leads to overproduction of autoantibodies, deposition of immune complexes and release of inflammatory cytokines [1,2], which contributes to tissue inflammation and organ damage [3,4].

It has been revealed an inflammatory connection between autoimmune diseases and cancer with an increased risk of developing malignant tumours in autoimmune disorders and vice versa [5]. In this sense, it is interesting to note that many tumours show overproduction of several immunosuppressive cells and cytokines [6]. As both are chronic diseases, their social impact and mortality are high, and they are considered a priority in terms of public health and use of health system resources. These findings highlight the need for reliable and preferably minimally invasive screening tools in the early stages of SLE and particularly deadly cancers, such as colorectal cancer (CRC), to apply the most appropriate therapy and improve patient outcomes and quality of life.

As stated above, inflammatory processes are closely related to cytokines, small proteins that regulate and influence the immune response generated by both innate and adaptive immune cells [7]. The release of proinflammatory cytokines leads to the activation of immune cells and the production and release of other cytokines [8]. B-cell activating factor (BAFF; also known as BLyS, TNFSF-13b) and a proliferation-inducing ligand (APRIL; also known as TNFSF-13a) are cytokines of the tumour necrosis factor (TNF) superfamily which promote and regulate the growth, maturation, survival, and differentiation of B cells, and are

* Corresponding authors.
E-mail addresses: yseo@quim.ucm.es (P. Yáñez-Sedeño), susanacr@quim.ucm.es (S. Campuzano).

https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108157
Received 29 March 2022; Received in revised form 2 May 2022; Accepted 10 May 2022
Available online 14 May 2022
1567-5394/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

involved in the pathogenesis of autoimmune diseases [9,10] and in the aggressiveness of cancers [11]. All this background draws attention to the interest of having tools that allow the reliable and simultaneous determination of BAFF and APRIL to improve accuracy in the diagnosis of autoimmune and oncological diseases. These target cytokines are usually determined by ELISA techniques or by state-of-the-art methodologies such as Simoa™. The former requires multiple steps and prolonged incubation, while Simoa has a high cost. Both techniques employ bulky equipment and are limited to laboratory settings [https://www.lsbio.com/elisakits/human-baff-tnfsf13b-sandwich-elisa-elisa-kit-ls-f2612/2612] [https://www.rndsystems.com/products/human-baff-blys-tnfsf13b-quantikine-elisa-kit_dblys0b#product-datasheets] [https://www.abcam.com/human-april-elisa-kit-ab119505.html] [https://www.lsbio.com/elisakits/human-tnfsf13-april-sandwich-elisa-elisa-kit-ls-f26628/26628].

Electrochemical biosensors are increasingly competitive with the before mentioned methodologies for the determination of clinical biomarkers because they combine the advantages of simplicity, affordable cost, reduced analysis time and versatility for profiling multiple or multi-omics biomarkers at the point-of-care [12–14]. However, despite their importance, only one electrochemical immunosensor has been reported so far for these target cytokines. Indeed, our research group recently developed an electrochemical immunosensor for the simultaneous determination of BAFF and APRIL which provided LOD values of 80 and 60 pg mL^{-1}, respectively, and was applied to the determination of both cytokines in cell extracts and serum samples from patients diagnosed with CRC and SLE. The immunosensing platform involved SPdCEs modified with grafted *p*-aminobenzoic acid for the immobilization of the capture antibodies and signal amplification by means of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) functionalized with MoS_2 as the carrier tag of detection antibodies and enzymatic tracer for signal amplification [15]. Despite the good analytical features, the preparation of such platform is somewhat complicated and time consuming. Therefore, it is important providing tools more compatible with the current clinical practice in terms of simplicity and short preparation and testing times. It has been demonstrated in recent years the simplicity of the preparation protocols and short assay times as well as the improved sensitivity and low matrix effects exhibited by electrochemical biosensors involving MBs and transduction at disposable electrodes, particularly in the determination of biomarkers related with chronic diseases (e.g., cancer, neurodegenerative and autoimmune diseases) [12]. Accordingly, we have exploited in this work the use of MBs coupled to electrochemical transduction on disposable electrodes to implement a dual immunoplatform that resulted competitive with the previous one not only in terms of simplicity but also in sensitivity, features that make it more appropriate for routine use in the hospital by any user.

The immunoplatform presented in this work involves MBs functionalized with neutravidin or carboxylic groups (NA-MBs or HOOC-MBs) for the respective immobilization of biotin-anti-BAFF (b-cAb_{BAFF}) or anti-APRIL (cAb_{APRIL}) capture antibodies followed by selective capture of the target cytokines and the use of a secondary detection antibody enzymatically labelled with anti-mouse immunoglobulin-horseradish peroxidase (HRP-anti-mouse IgG) or streptavidin-horseradish peroxidase (Strep-HRP), respectively. The resulting modified MBs were captured onto the working electrode surface (WE1 or WE2) of SPdCE to carry out the amperometric transduction conducted at − 0.20 V (vs. Ag pseudo-reference electrode) in the presence of H_2O_2/HQ system. The constructed dual immunoplatform was used for the determination of both cytokines in cancer cell extracts and serum samples from healthy individuals and patients diagnosed with SLE and CRC.

2. Experimental

2.1. Apparatus and electrodes

A magnetic concentrator DynaMag-2 (12321, Dynabeads®) from Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, a Bunsen AGT-9 Vortex, and a Thermo-shaker MT100 from Universal Labortechnik were used along with a P-Selecta (Gencom) centrifuge, a Crison model Basic 20 + pH-meter, and an Elmasonic S-60 (Elma) ultrasonic bath. A Heidolph Reax Top homogenizer for small samples and an MPW-65R centrifuge from MPW (Med. Instruments) were also used.

Amperometric measurements were performed at room temperature in stirred solutions using a model CHI812B (CH Instruments, Inc.) potentiostat controlled by the CHI812B software. Electrochemical cells were 10 mL glass cells from Pobel where the SPCEs or SPdCEs placed on a homemade polymethylmethacrylate (PMMA) casing with an embedded neodymium magnet (AIMAN GZ) were immersed.

Screen-printed carbon electrodes (SPCEs, DRP-110), with a 4 mm-Ø carbon working electrode, and dual SPCEs (SPdCEs, DRP-X1110) with two elliptic carbon working electrodes with a surface area of 6.3 mm^2 were used. Both electrode types include a carbon counter electrode and an Ag pseudo-reference electrode. Specific cable connectors (DRP-CAC and DRP-BICAC) used as interface between the SPCEs and SPdCEs, respectively, were from Metrohm-DropSens. ELISA absorbance readings were made in a Sunrise™ Tecan microplate reader with the Magellan V 7.1 software.

2.2. Reagents, solutions and samples

Neutravidin-modified magnetic microparticles (NA-MBs, Ø = 1 μm, 10 mg mL^{-1}) were purchased from SpeedBeads™, GE Healthcare. Carboxylic acid-modified magnetic beads (HOOC-MBs, Dynabeads®, M−270, Ø = 2.8 μm, ~2×10^9 beads mL^{-1}) were from Invitrogen-Thermo Fisher. SEM images of these commercial MBs provided by the companies that commercialize them are displayed in **Figure S1** in the Supporting Information. N-(3-dimethyl-aminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide (EDC), N-hydroxysulfo-succinimide (NHSS), ethanolamine, hydroquinone (HQ) and hydrogen peroxide (H_2O_2, 30% w/v) were provided from Sigma-Aldrich. Sodium chloride, potassium chloride, sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) and tris-hydroxymethyl-aminomethane-HCl (Tris-HCl) were from Scharlab.

Biotinylated capture (b-cAb_{BAFF}) and detection (dAb_{BAFF}) anti-BAFF-antibodies and human BAFF/BLyS standard were from the Human BAFF/BLyS/TNFSF13B DuoSet ELISA kit from R&D Systems (Cat. No. DY124-05). Capture (cAb_{APRIL}), and biotinylated detector (b-dAb_{APRIL}) anti-APRIL antibodies and human APRIL standard were from the Human APRIL/TNFSF13 DuoSet ELISA kit from R&D Systems (Cat. No. DY884B). HRP-anti-mouse IgG was from Abcam (Ref. ab97265) and streptavidin-HRP (Strep-HRP) was from Roche Diagnostics GmbH (Ref. 11089153001).

IgG from human serum (hIgG, Ref: I2511), human serum albumin (HSA, Cat. No. A1653), and human hemoglobin (HB, Cat. No. H7379) were from Sigma-Aldrich. Bovine serum albumin (BSA 100%, Type VH, Cat. No. 90604–29-8) from Gerbu Biotechnik, GmbH, neurofilament-L from Cell Signaling Technology® (NfL, Cat. No. #99,175), recombinant human tau-441 from BioLegend® (TAU), recombinant human TAR DNA-binding protein 43 from Abcam (TDP-43, Cat. No. ab224788), cadherin-17 from Origene (CDH-17, Ref: TP720740), and human IL-13Rα2 (IL-13Rα2, Cat. No. DY614), recombinant human MMP-9 (MMP-9, Cat. No. DY911) and human TNF (TNF-α, Cat. No. DY210) from R&D were the tested compounds for selectivity studies.

Serum and cell lysates samples were stored at − 80 °C. Sera from healthy individuals and SLE patients were purchased from Central Bio-Hub, and sera from CRC patients were provided by Institute of Health Carlos III after approval of the Institutional Ethical Review Boards and with the written informed consent of all participating individuals. All the experiments with these samples were performed accomplishing all the ethical issues and relevant guidelines and regulations of the involved institutions. SW480 and SW620 (from the American Type Culture Collection (ATCC) cell repository), and KM12C, KM12SM and KM12L4a (from I. Fidler's laboratory, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX) cells were grown and lysed as described previously [16,17].

All solutions were prepared using water purified by the Milli-Q purification system (18.2 MΩ cm). The used buffers included: 10 mM phosphate buffer saline solution (PBS) pH 7.4; 25 mM MES buffer pH 5.0; 100 mM phosphate buffer solution (PB) pH 8.0; 100 mM Tris-HCl buffer and 50 mM phosphate buffer (PB) solution pH 6.0. Commercial Blocker™ Casein in PBS blocking buffer (BB) was purchased from Thermo Scientific (Ref: 37528). The solutions used to perform the amperometric detection: 0.1 mol L^{-1} H_2O_2 and 0.1 mol L^{-1} HQ were freshly prepared in phosphate buffer solution pH 6.0. 1-Step™ Ultra TMB-ELISA substrate solution from Thermo Scientific (Cat. No. 34028) was used to apply the ELISA methodology.

2.3. Procedures

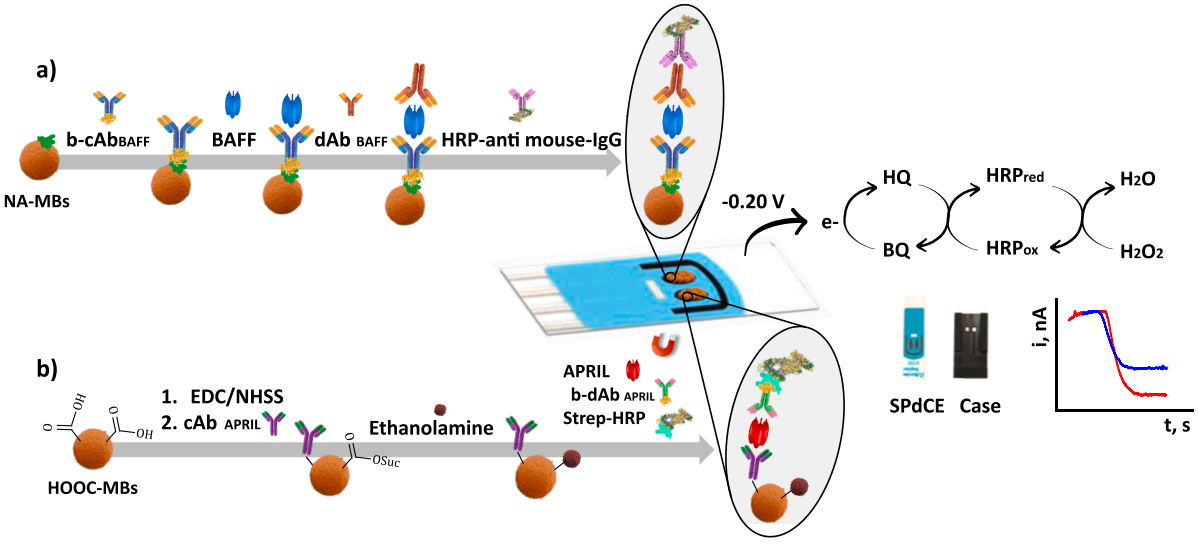
2.3.1. Preparation of the magnetic immunoconjugates

The protocol for the preparation of the immunoconjugates onto the functionalized MBs for the dual amperometric determination is schematized in **Schematic 1**. All washing and incubation steps were carried out in 1.5 mL microcentrifuge tubes. After each step, the tubes with the MBs suspension were placed in the magnetic concentrator for 2 min to remove the corresponding supernatant. The preparation of BAFF conjugates (**Schematic 1a**) involved the use of a 3 μL-aliquot of NA-MBs suspension which was washed twice with 50 μL of 10 mM PBS buffer solution (pH 7.4). Thereafter, the NA-MBs were incubated for 15 min (25 °C, 950 rpm) with 25 μL of 100 ng mL^{-1} b-cAb_{BAFF} prepared in 10 mM PBS buffer solution (pH 7.4). After washing twice with BB, the modified MBs were stored at 4 °C in filtered PBS until their use. The sandwich immunoassay was implemented by incubating the b-cAb_{BAFF}-NA-MBs immunoconjugates for 45 min (25 °C, 950 rpm) with 25 μL of a solution containing the BAFF standard prepared in BB or the sample to analyse. After washing twice with BB, the modified BAFF-b-cAb_{BAFF}-NA-MBs were incubated during 30 min (25 °C, 950 rpm) with 25 μL of 1 μg mL^{-1} dAb_{BAFF} prepared in BB. Upon washing twice with BB, the dAb-$_{BAFF}$-BAFF-b-cAb_{BAFF}-NA-MBs were incubated for 15 min (25 °C, 950 rpm) with 25 μL of 1 μg mL^{-1} HRP-anti-mouse-IgG. The resulting magnetic immunoconjugates (HRP-anti-mouse-IgG-dAb_{BAFF}-BAFF-b-cAb_{BAFF}-NA-MBs) were washed twice with BB and resuspended in 50 or 5 μL of 50 mM PB solution (pH 6.0) to perform the amperometric measurements at the single SPCE or dual SPdCE, respectively.

The protocol for the determination of APRIL was schematized in **Schematic 1b**. A 3 μL-aliquot of the commercial HOOC-MBs suspension was washed twice with 50 μL of 25 mM MES buffer (pH 5.0) during 10 min (25 °C, 950 rpm). Thereafter, the carboxylic groups were activated by incubating with 25 μL of a 50 mg mL^{-1} mixture solution of EDC/NHSS prepared in 25 mM MES buffer (pH 5.0) for 35 min (25 °C, 950 rpm). After washing twice with 25 mM MES buffer (pH 5.0), the activated HOOC-MBs were incubated for 30 min (25 °C, 950 rpm) with 25 μL of 7.5 μg mL^{-1} cAb_{APRIL} prepared in 25 mM MES buffer (pH 5.0). After two washing steps with 25 mM MES buffer (pH 5.0), the cAb_{APRIL}-MBs were blocked by with 25 μL of 1 M ethanolamine solution prepared in 100 mM PB solution (pH 8.0) to avoid non-specific interactions through the residual activated carboxylic groups. After washing once with 100 mM Tris-HCl buffer solution (pH 7.2) and twice with 10 mM PBS buffer solution (pH 7.4), the cAb_{APRIL}-MBs were stored at 4 °C in 50 μL of filtered PBS until their use. The sandwich immunoassay was implemented on the modified MBs by incubating 25 μL of a mixture solution containing the APRIL standard or the sample to analyse, 0.5 μg mL^{-1} b-dAb_{APRIL} and 1,000-times diluted Strep-HRP prepared in BB for 30 min (25 °C, 950 rpm). The resulting magnetic immunoconjugates (Strep-HRP-b-dAb_{APRIL}-APRIL-cAb_{APRIL}-MBs) were washed twice with BB and resuspended in 50 or 5 μL of 50 mM PB solution (pH 6.0) to carry out the single or dual amperometric measurements, respectively.

2.3.2. Amperometric measurements

The amperometric measurements were performed with commercial disposable electrodes (SPCE or SPdCE for single or dual determination, respectively) placed on the appropriate PMMA casing with one or two embedded neodymium magnets. The 50 or 5 μL aliquots of the final modified MBs suspension were deposited and magnetically captured on the corresponding working electrode surface of the SPCE or SPdCE, respectively. The ensemble SPCE- or SPdCE-PMMA casing was immersed into the measuring cell containing 10 mL of 50 mM PB pH 6.0 and 100 μL of a fresh 100 mM HQ solution prepared in the same buffer.



Schematic 1. Schematic display of the different steps involved in the preparation of the developed dual immunoplatform for a) BAFF and b) APRIL biomarkers, as well as the reactions implied in the amperometric transduction.

The amperometric measurements were recorded under stirring by applying − 0.20 V vs. the Ag pseudo-reference electrode upon adding 50 μL of 100 mM H_2O_2 solution prepared daily in 50 mM PB (pH 6.0) until the steady state was reached. The variation in the cathodic current resulting from the HRP-catalysed reduction of H_2O_2 mediated by HQ, which is initially in the quinone oxidized form, was recorded. The analytical responses given through the text correspond to the difference between the steady state and the background currents. They are the mean values of three replicates, and the error bars displayed were estimated as three times the standard deviation of each set of replicates ($\alpha = 0.05$).

3. Results and discussion

As **Schematic 1** displays, the developed methodology involved two immunoassay strategies for the determination of BAFF and APRIL using modified MBs with selective capture antibodies and involving the formation of sandwich type immunocomplexes tagged enzymatically with HRP-conjugated secondary antibody or Strep-HRP, respectively. The subsequent magnetic capture of the modified MBs on the working electrode surface of the disposable electrodes allowed the amperometric transduction with the H_2O_2/HQ system.

3.1. Optimization of the experimental variables involved in the preparation of the dual immunoplatform

The effect of the experimental variables involved in the preparation of HRP-anti-mouse-IgG-dAb_{BAFF}-BAFF-b-cAb_{BAFF}-NA-MBs and HRP-Strep-b-dAb_{APRIL}-APRIL-cAb_{APRIL}-MBs immunoconjugates on the amperometric responses of both immunosensors were evaluated. Considering the sandwich type configurations, the optimization criterion was the largest ratio between the currents measured with the immunosensor in the presence of 250 pg mL^{-1} or 5 ng mL^{-1} BAFF or APRIL standards, respectively, (S) or in the absence of the target proteins (B). Regarding BAFF, the tested variables were: (a) MBs type; (b) b-cAb_{BAFF} concentration and (c) incubation time; (d) incubation steps involved in the sandwich immunoassay; (e) BAFF incubation time; (f) dAb_{BAFF} concentration and (g) incubation time, and (h) HRP-anti-mouse IgG concentration and (i) incubation time. The results obtained are displayed in **Figure S2** and discussed in the Supporting Information. Furthermore, the effect of the experimental variables involved in the preparation of APRIL immunoconjugates and the functioning of the magnetically assisted immunosensor are displayed in **Figure S3** and discussed also in the Supporting Information. These variables were: (a) cAb_{APRIL} concentration and (b) incubation time; (c) incubation steps involved in the sandwich immunoassay formation; (d) b-dAb_{APRIL} concentration, (e) Strep-HRP dilution and (f) one step incubation time. The results of the optimization studies are summarized in Table 1. Other experimental conditions involved in the preparation and functioning of the immunosensors, such as the amount of MBs, the applied potential (−0.20 V vs. Ag pseudo-reference electrode) or the concentration of the H_2O_2/HQ system were taken from previous works [18–20].

Table 1
Optimization of the experimental variables involved in the preparation and operation of the dual immunosensor for the simultaneous determination of BAFF and APRIL.

Target cytokine	Variable	Checked range	Selected value
BAFF	MBs type	HOOC or NA-MBs	NA-MBs
	[b-cAb_{BAFF}], ng mL^{-1}	0 – 500	100
	b-cAb_{BAFF} incubation time, min	0 – 60	15
	Incubation steps	1 – 3	3
	BAFF incubation time, min	15 – 60	45
	[dAb_{BAFF}], μg mL^{-1}	0.0 – 3.0	1.0
	dAb_{BAFF} incubation time, min	15 – 60	30
	[HRP-anti-mouse IgG], μg mL^{-1}	0.5 – 2.0	1.0
	HRP-anti-mouse IgG incubation time, min	15 – 60	15
APRIL	[cAb_{APRIL}], μg mL^{-1}	0 – 100	7.5
	cAb_{APRIL} incubation time, min	0 – 60	30
	Incubation steps	1 – 3	1
	[b-dAb_{APRIL}], μg mL^{-1}	0.25 – 1.50	0.50
	Strep-HRP dilution	1/2,500 – 1/250	1/1,000
	One step incubation time, min	15 – 60	30

3.2. Analytical characteristics of the simultaneous determination of BAFF and APRIL

Once the experimental variables for the amperometric determination of both cytokines were selected, the analytical and operational characteristics of the dual immunosensor were evaluated. **Fig. 1a** compares the responses obtained at single SPCEs and SPdCEs in the absence and in the presence of 25 pg mL^{-1} BAFF and 1 ng mL^{-1} APRIL standards. As it can be observed, the currents recorded at the SPdCE were about 70 and 56 % smaller than those obtained at SPCE, which is due to the lower surface area of the working electrodes in the SPdCE (6.3 mm^2 each), approximately half than that for the SPCE (12.6 mm^2). However, no significant differences in the S/B ratios were found for the single or dual platform.

The feasibility of the dual methodology was evaluated by measurements in mixture solutions containing different concentrations of both target cytokines after capturing the prepared bioconjugates onto each working electrode surface of the SPdCE. **Fig. 1b** shows as no significant cross-talking between WE1 and WE2 occurred in presence of the corresponding non-target protein. These results confirmed the high selectivity of the immunoreagents involved in the development of the dual immunosensor, allowing the simultaneous determination of BAFF and APRIL cytokines.

Calibration plots were constructed for BAFF and APRIL standard solutions using the working conditions selected for each cytokine (**Fig. 2**). The plot of the steady state current vs. BAFF concentration (**Fig. 2a1**) exhibited a linear range from 1.1 to 100 pg mL^{-1} ($R^2 = 0.999$) with slope and intercept values of 3.38 ± 0.05 mL nA pg^{-1} and 72 ± 2 nA, respectively. **Fig. 2b1** displays the relationship between the cathodic current and the logarithm of APRIL concentration with a linear range extending from 0.05 to 20 ng mL^{-1} ($R^2 = 0.995$) fitting the equation: -i (nA) = (229 ± 10) × log ([APRIL], ng mL^{-1}) + (318 ± 9). The respective detection limits (LOD), 0.33 pg mL^{-1} and 0.016 ng mL^{-1}, and quantification limits (LQ), 1.1 pg mL^{-1} and 0.05 ng mL^{-1}, for BAFF and APRIL, respectively, were calculated as 3 × s_b/m and 10 × s_b/m, respectively, where s_b was the standard deviation of five measurements obtained in the absence of BAFF and APRIL, and m is the slope of the corresponding calibration plot. The different calibration dependences (linear or semi-logarithmic), linear ranges and LOD values observed for the two target cytokines arise from the different immunoreagents and enzymatic labelling strategies used for their determination. It is important to keep in mind that while multiple secondary binding antibodies may bind to a single primary antibody (BAFF determination) [21,22], the four-multivalence of streptavidin may cause cross-reaction of a single streptavidin conjugate molecule with multiple biotinylated detector antibodies (APRIL determination) [23,24].

Interestingly, the LOD values provided by the MBs-assisted dual immunoplatform are smaller than those reported using the only electrochemical immunoplatform described for the determination of these cytokines [15], 0.33 vs. 80 and 16 vs. 60 pg mL^{-1} for BAFF and APRIL, respectively. Moreover, although both immunoplatforms required the same assay time, the MBs-assisted one does not require the preparation or modification of nanomaterials, which makes it simpler and more appropriate for routine clinical application.

Reproducibility of the measurements was tested by measuring the

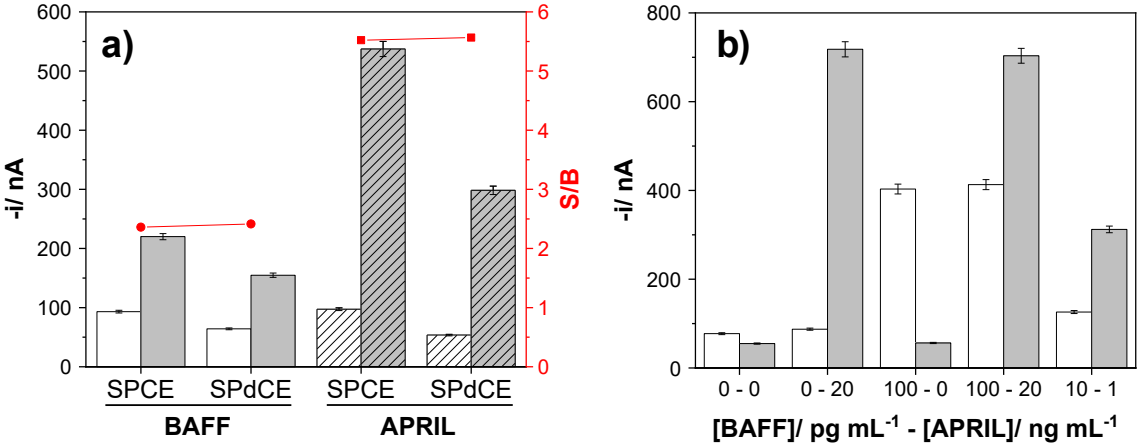


Fig. 1. (a) Comparison of the amperometric responses for 0 (white bars), 25 pg mL^{-1} (grey unstripped bars) BAFF and 1 ng mL^{-1} (grey stripped bars) APRIL standard solutions measured at single (SPCE) or dual (SPdCE) platforms; (b) amperometric responses measured with the dual immunoplatform for mixture solutions containing the indicated concentrations of BAFF (white bars) and APRIL (grey bars) standards.

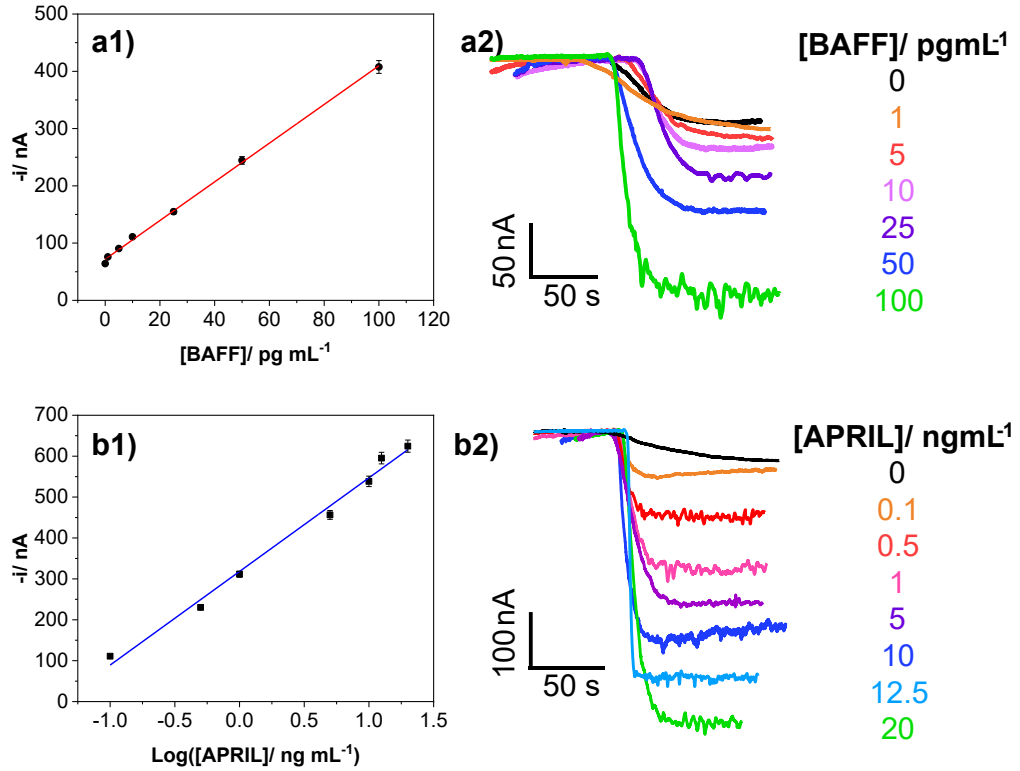


Fig. 2. Calibration plots constructed with the dual immunosensor for a1) BAFF and b1) APRIL standards using amperometric measurements at − 0.20 V vs. Ag pseudo-reference electrode. Real amperometric measurements recorded for different BAFF a2) and APRIL b2) concentrations.

amperometric responses provided by five different immunosensors prepared in the same manner and in the same (intra-assay) or different (inter-assay) days for 50 pg mL^{-1} BAFF and 1 ng mL^{-1} APRIL standard solutions. Relative standard deviation (RSD) values of 2.75 and 2.38 % (intra-assay) and 2.96 and 2.60 % (inter-assay) for BAFF and APRIL, respectively, were obtained, thus demonstrating the good reproducibility of both whole preparation protocols and the amperometric transduction involved in the developed dual immunoplatform.

The analytical characteristics obtained with the dual immunoplatform can be advantageously compared with those claimed for the commercially available ELISA kits for these cytokines. Some kits provide logarithmic plots with linear ranges from 39.1 to 2,500 pg mL^{-1} BAFF [rndsystems.com/products/human-baff-blys-tnfsf13b-duoset-elisa_dy124-05] and 31.2 to 2,000 pg mL^{-1} APRIL [rndsystems.com/products/human-april-tnfsf13-duoset-elisa_dy884b]. However, the ELISA kits do not report the detection limits or the precision levels of the method. Other kits from the same company provide linear ranges between 62.5 and 4,000 pg mL^{-1} BAFF with a minimum detection dose (MDD = $\bar{x} \pm 2s$) of 6.44 pg mL^{-1} [https://www.rndsystems.com/products/human-baff-blys-tnfsf13b-quantikine-elisa-kit_dblys0b#product-datasheets] and between 0.2 and 10 ng mL^{-1} APRIL, with MDD = 0.015 ng mL^{-1} [https://www.rndsystems.com/products/human-april-tnfsf13-quantikine-elisa-kit_dapr00]. However, the latter has been discontinued. Moreover, RSD values provided by these kits range between 3.4 and 3.8% (intra-assay) and 11.6 and 8.5% (inter-assay) for BAFF and APRIL respectively. The test time is considerably longer than that

needed using the dual immunoplatform (4 h 30 min vs. 1 h 30 min) counting since the blocking step of the ELISA kit. In addition, obviously, the dual bioplatform is not restricted to a single biomarker as occurs with the ELISA kits, allowing the simultaneous determination of both proteins in 1 h 30 min. Therefore, the developed dual immunoplatform exhibits an excellent sensitivity for BAFF and APRIL biomarkers, with a high reproducibility (in both cases below 3%) and a three times shorter assay time than that needed with the ELISA kits. All these advantages, in addition to the simplicity and low cost of the dual immunoplatform, and the possibility of being performed at the point-of-care (POC), show the competitiveness of the developed immunoplatform against other available methodologies. Furthermore, the achieved analytical characteristics allows its use for the determination of the cytokines in serum samples, where the expected concentrations in healthy individuals are about 0.8 ng mL^{-1} (BAFF) and 4 ng mL^{-1} (APRIL) [25,26] and are higher for patients with SLE or CRC.

3.3. Storage stability

The storage stability of b-cAb_{BAFF}-NA-MBs and cAb_{APRIL}-MBs was evaluated by preparing in the same day several batches of the MBs bioconjugates which were resuspended in 50 μL filtered 10 mM PBS buffer solution (pH 7.4) in 1.5 mL-microcentrifuge tubes and stored at 4 °C. Each control day the amperometric responses were measured with the prepared immunoplatforms in the absence and in the presence of 250 pg mL^{-1} and 1 ng mL^{-1} BAFF and APRIL standards solutions, respectively, using the stored immunoconjugates. The results obtained (**Figure S4** in the Supporting Information) showed a good storage stability of both immunoconjugates, with the responses keeping within the control limits (stripped lines), set as three times the standard deviation (±3s) of the measurements (n = 3) obtained on the day of the immunoconjugates preparation (Day 0), for approximately 30 days.

3.4. Selectivity

The selectivity of the immunosensors was evaluated by checking the effect of potentially interfering compounds which can be present in real clinical samples, at the concentration levels expected in healthy individuals, through the amperometric responses measured for 0 and 250 pg mL^{-1} BAFF or 1 ng mL^{-1} APRIL standards in absence or in the presence of the tested compound. **Fig. 3a** shows that only HSA and hIgG interfere with the determination of BAFF (a). This interference has been previously reported and was attributed to the coexistence of human anti-animal antibodies (HAAAs) in commercial hIgG and non-overly purified HSA [27,28], a hypothesis that is confirmed by the absence of interference in the presence of BSA. It is important to note that the interference of these two proteins in the determination of BAFF is no longer significant upon a 10-fold dilution. In addition, any other tested compound showed a significant interference for the determination of both cytokines, thus confirming the good selectivity of the used antibodies.

3.5. Application to the analysis of cancer cell lysates and serum samples.

The dual immunoplatform was applied to the analysis of the two target cytokines in serum samples from healthy individuals and from patients diagnosed with SLE and CRC as well as in CRC cell lysates with different metastatic potential. The possible existence of matrix effect in these types of samples was evaluated by statistical comparison, using Students' *t*-test, of the slope values of the calibration plots constructed with buffered solutions and in the different sample matrices. Table S1 (in the Supporting Information) shows that no significant matrix effect for the determination of both biomarkers occurred upon a 100-fold dilution of the serum samples and when amounts of cell extracts equal to or less than 0.5 μg were used. Therefore, under these conditions, the concentration of the endogenous content of BAFF and APRIL was calculated from the simple interpolation of the amperometric responses obtained for the samples into the calibration plots prepared with standard solutions of the two target cytokines (**Fig. 2**).

Fig. 4 and Table 2 summarize and compare the results obtained with the dual immunoplatform with those provided by the individual DuoSet commercial ELISA kits, involving the same immunoreagents as the developed immunoplatform, for each target cytokine. As it can be observed, no significant differences between the results obtained by each method occurred. Nevertheless, the developed dual immunoplatform provided more reproducible results than the ELISA methodology. Moreover, the excellent correlations between the results obtained by both methods (last row of Table 2 and **Figure S5** in the Supporting Information) demonstrated the accuracy of the results provided by the immunoplatform for the simultaneous determination of BAFF and APRIL in these challenging samples.

In the case of the analysis of cell lysates, the higher expression of both cytokines was produced in the cells with higher metastatic

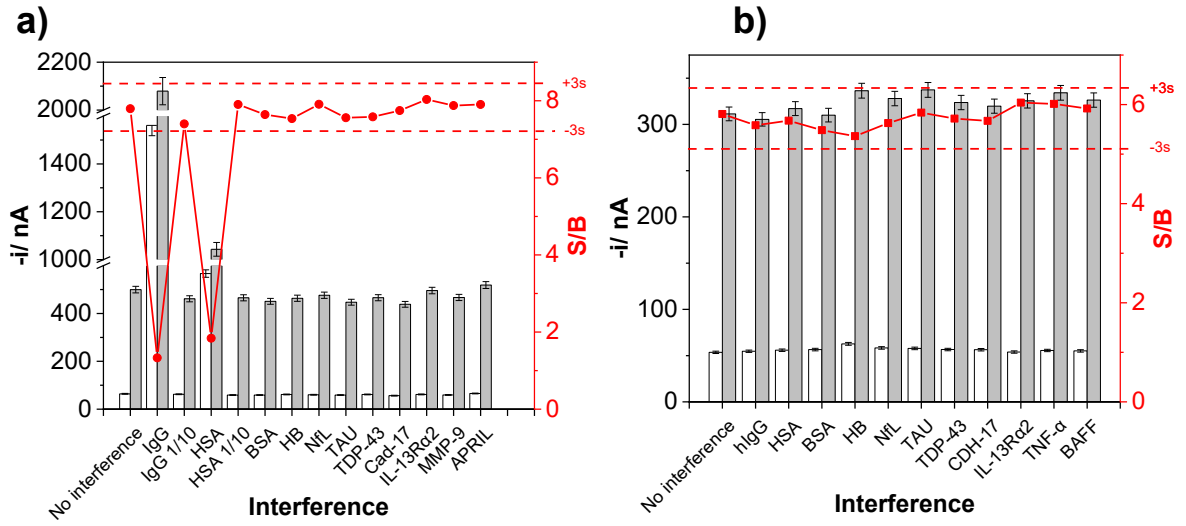


Fig. 3. Amperometric responses measured with the dual immunoplatform for 0 (white bar) and 250 pg mL^{-1} BAFF a) or 1 ng mL^{-1} APRIL b) (grey bar) standard solutions prepared in absence and in the presence of 1 mg mL^{-1} and 0.1 mg mL^{-1} (1/10) hIgG; 50 mg mL^{-1} and 5 mg mL^{-1} (1/10) HSA; 5 mg mL^{-1} BSA; 5 mg mL^{-1} HB; 30 pg mL^{-1} NfL; 5 pg mL^{-1} TAU; 1 ng mL^{-1} TDP-43; 500 ng mL^{-1} CDH-17; 10 ng mL^{-1} IL-13Rα2; 30 ng mL^{-1} MMP-9; 100 pg mL^{-1} TNF-α; 4 ng mL^{-1} APRIL or 1 ng mL^{-1} BAFF.

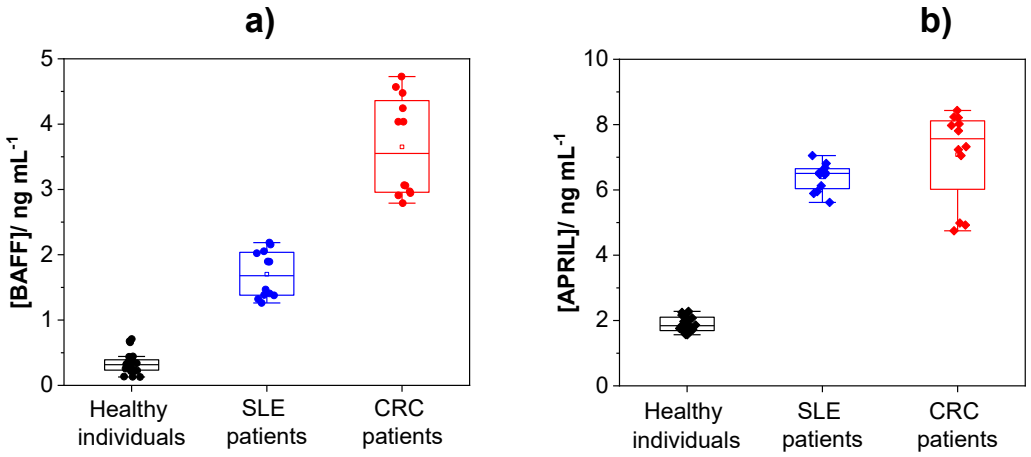


Fig. 4. Endogenous content of a) BAFF and b) APRIL determined with the dual immunoplatform in serum samples grouped into pools of healthy individuals and SLE and CRC patients.

Table 2
Endogenous content of BAFF and APRIL (in ng mL^{-1}) determined with the developed dual immunosensors and comparison with the results provided by the ELISA methodologies for their individual determination (mean values ± t × s/√n; n = 3, α = 0.05).

		BAFF					APRIL				
Sample	**Cell/Subject**	**Immunosensor**	**RSD, %**	**ELISA**	**RSD, %**	**t_{exp}***	**Immunosensor**	**RSD, %**	**ELISA**	**RSD, %**	**t_{exp}***
Cell extracts	KM12C	1.8 ± 0.1	2.6	1.9 ± 0.3	5.4	0.214	1.8 ± 0.1	2.5	1.7 ± 0.3	6.1	0.930
	KM12SM	5.0 ± 0.3	2.1	5.3 ± 0.6	4.8	0.397	7.0 ± 0.6	3.2	8 ± 1	7.5	0.794
	KM12L4a	3.4 ± 0.3	3.1	3.1 ± 0.3	4.5	0.328	4.3 ± 0.3	2.6	4.2 ± 0.5	4.6	0.130
	SW480	0.88 ± 0.07	3.2	1.1 ± 0.2	8.0	0.250	0.86 ± 0.05	2.4	0.8 ± 0.1	5.1	0.107
	SW620	2.8 ± 0.2	2.4	2.8 ± 0.4	6.1	0.056	3.0 ± 0.3	3.6	3.4 ± 0.5	6.2	0.378
Serum	Healthy	0.43 ± 0.03	2.5	0.49 ± 0.09	7.1	0.074	2.2 ± 0.2	3.1	2.2 ± 0.2	3.5	0.063
		0.31 ± 0.02	3.3	0.29 ± 0.05	6.9	0.025	1.7 ± 0.1	2.8	1.7 ± 0.2	4.5	0.052
		0.31 ± 0.03	3.9	0.34 ± 0.04	5.2	0.026	2.2 ± 0.2	2.9	2.2 ± 0.3	5.3	0.052
		0.22 ± 0.01	2.0	0.23 ± 0.04	7.7	0.010	1.7 ± 0.1	2.8	1.6 ± 0.3	7.3	0.123
		0.36 ± 0.05	3.1	0.39 ± 0.05	5.0	0.050	2.0 ± 0.2	3.1	2.2 ± 0.3	5.3	0.267
		0.13 ± 0.01	2.9	0.12 ± 0.02	7.0	0.008	1.8 ± 0.1	2.9	1.8 ± 0.3	6.4	0.006
		0.25 ± 0.2	3.0	0.30 ± 0.06	7.9	0.056	1.9 ± 0.1	3.0	1.9 ± 0.3	6.1	0.054
		0.68 ± 0.06	3.7	0.7 ± 0.1	6.2	0.016	1.6, ± 0.1	3.1	1.6 ± 0.3	7.4	0.112
	SLE	1.9 ± 0.2	3.8	1.9 ± 0.3	5.6	0.013	6.8 ± 0.6	3.4	7.2 ± 0.8	4.4	0.482
		1.3 ± 0.1	4.4	1.2 ± 0.2	5.9	0.092	5.8 ± 0.4	3.0	6 ± 1	6.6	0.056
		2.1 ± 0.2	3.3	2.1 ± 0.3	6.0	0.136	6.6 ± 0.4	2.8	6 ± 1	6.8	0.236
		1.4 ± 0.1	3.0	1.4 ± 0.2	6.6	0.031	6.4 ± 0.5	3.5	6.3 ± 0.6	3.9	0.148
	CRC	2.9 ± 0.3	4.6	3.6 ± 0.6	6.4	0.865	7.2 ± 0.3	1.9	7.3 ± 0.7	3.7	0.095
		4.1 ± 0.3	2.9	4.2 ± 0.7	6.6	0.165	8.0 ± 0.5	2.6	8.2 ± 0.6	3.0	0.186
		3.0 ± 0.2	2.6	3.1 ± 0.5	6.0	0.205	4.9 ± 0.3	2.5	4.8 ± 0.5	4.0	0.072
		4.6 ± 0.3	2.8	4.9 ± 0.6	4.8	0.383	8.2 ± 0.6	2.8	7.9 ± 0.7	3.4	0.322
Immunosensor vs. ELISA correlation plot		R^2 = 0.993; slope = (0.99 ± 0.01); intercept = (-0.01 ± 0.02)					R^2 = 0.990; slope = (0.99 ± 0.01); intercept = (-0.00 ± 0.06)				

*$t_{exp} < t_{tab}$ of 4.303 (n = 3, α = 0.05).

potential (KM12SM, KM12L4a and SW620). Accordingly, these cytokines are truly potential biomarkers of CRC tumorigenesis and metastasis [29,30].

Regarding the serum samples, the data displayed in **Fig. 4** and summarized in Table 2 agree with the hyperexpression of both cytokines in SLE [31,32] and CRC [33–35], with the cut-off values established for BAFF in serum of SLE patients [36,37] and with the reported data for both cytokines in the same samples using the only electrochemical immunosensor described to date (see correlation in **Figure S6**) [15].

The parameters of the ROC curves displayed in **Figure S7** (in the

Table 3
ROC Curves Data (in %) and cut-off values (in ng mL^{-1}) established with the immunoplatform for discriminating healthy individuals (HC) from SLE and CRC patients and non-metastatic vs. metastatic cells by interrogating BAFF and APRIL in serum samples and cell lysates, respectively.

	Serum samples									Non-metastatic vs. metastatic cells	
	BAFF			APRIL			BAFF + APRIL			BAFF	APRIL
	SLE vs. HC	CRC vs. HC	SLE vs. CRC	SLE vs. HC	CRC vs. HC	SLE vs. CRC	SLE vs. HC	CRC vs. HC	SLE vs. CRC		
AUC	100	100	100	100	100	75	100	100	100	100	100
Sensitivity	100	100	100	100	100	75	100	100	100	100	100
Specificity	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Cut-off	0.99	1.79	2.50	4.00	3.55	7.00	–	–	–	2.30	2.40
Cut-off [15]	0.885	1.735	2.45	4.3	3.5	–	–	–	–	–	–

Supporting Information) are summarized in Table 3. These data show quite well the ability of the developed immunoplatform to discriminate between the three groups of patients tested and between non-metastatic and metastatic cancer cells with maximal sensitivity and specificity (except in the case of discrimination between SLE and CRC patients through the determination of APRIL), as well as to establish the serum cut-off values for such discrimination. It is important to note that such cut-off values agree perfectly with those reported using the above mentioned immunosensor [15]. Importantly, the developed immunoplatform, unlike that reported previously, does allow distinguishing SLE and CRC patients through the determination of APRIL levels and the establishment of a cut-off value for it. To be noticed, the lowest correlation obtained between the immunoplatform using the MoS_2 nanocarriers and the MBs-assisted immunoplatform was found for the discrimination between SLE and CRC patients (**Figure S6** in the Supporting Information). Please, note that with the reported MoS_2 nanocarriers-based immunoplatform, no significant differences were found between serum APRIL levels of SLE and CRC patients and therefore it was not possible to establish a cut-off value for this marker to discriminate these two types of patients [15]. This has been possible with the MB-assisted immunoplatform developed in this work (see Table 3). To our knowledge this is the first time that cut-off values are established for these two cytokines allowing the discrimination of metastatic cells and non-metastatic cells with sensitivities and specificities of 100%.

4. Conclusions

This work reports the first MBs-based dual immunosensor for the simultaneous amperometric determination of BAFF and APRIL, two cytokines of high clinical relevance in autoimmune and cancer diseases. The strategy is based on sandwich-type formats implemented onto commercial functionalized magnetic microparticles with HRP-labelled immunocomplexes, and amperometric detection at SPdCEs using the H_2O_2/HQ system. The developed dual immunoplatform provides excellent analytical characteristics in terms of sensitivity and selectivity with LOD values of 0.33 pg mL^{-1} and 0.016 ng mL^{-1} for BAFF and APRIL, respectively, and allows the accurate determination of both cytokines without matrix effect in complex biological samples using just 0.5 μg of cancer cell lysates and 25 μL of 100-fold diluted serum samples. The obtained results confirm the possibility of discriminating between healthy individuals and patients diagnosed with SLE or CRC through the serum content of both cytokines, establishing the corresponding cut-off values. Furthermore, the developed methodology is competitive with that of commercial ELISA kits for the individual determination of the cytokines, involving simple working protocols with shorter assay times, and affordable cost for the determination of the endogenous content of target proteins in serum or lysates. These differential characteristics together with the universality of the methodology to be easily transferred to determinations of other proteins and implemented in bioplatforms with a higher degree of multiplexing and the possibility of performing the determinations in the field by any user make it a technology capable of meeting the demands of today's clinical practice to assist in the diagnosis of these patients at inpatient, outpatient or residential facilities and to further explore the role of these cytokines in these or other emergent diseases.

Funding

The financial support of RTI2018-096135-B-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia, Innovacion y Universidades), PID2019-103899RB-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación) Research Project and the TRANSNANOAVANSENS-CM Program from the Comunidad de Madrid (Grant S2018/NMT-4349) are gratefully acknowledged. R.B. acknowledges the financial support of PI20CIII/00019 grant from the AES-ISCIII program. B. Arévalo acknowledges a predoctoral contract from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (PRE2019-087596). A.V. acknowledges a PhD contract from Complutense University of Madrid. A.M−C. acknowledges a FPU predoctoral contract supported by the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

CRediT authorship contribution statement

B. Arévalo: Methodology, Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **M. Blázquez-García:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **A. Valverde:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **V. Serafín:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **A. Montero-Calle:** Investigation, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft. **G. Solís-Fernández:** Investigation, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft. **R. Barderas:** Conceptualization, Supervision, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft, Funding acquisition. **P. Yáñez-Sedeño:** Conceptualization, Supervision, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft, Funding acquisition. **S. Campuzano:** Conceptualization, Supervision, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft, Funding acquisition. **J.M. Pingarrón:** Supervision, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108157.

References

[1] T. Gharibi, J. Majidi, T. Kazemi, R. Dehghanzadeh, M. Motallebnezhad, Z. Babaloo, Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases, Immunobiology 221 (2016) 357–367.
[2] J.M. Anaya, Y. Shoenfeld, R. Cervera, Systemic lupus erythematosus 2014, Autoimmune Dis. 2014 (2014), 274323, https://doi.org/10.1155/2014/274323.
[3] D.C. Salazar-Camarena, P. Ortíz-Lazareno, M. Marín-Rosales, A. Cruz, F. Muñoz-Valle, R. Tapia-Llanos, G. Orozco-Barocio, R. Machado-Contreras, C.A. Palafox-Sánchez, BAFF-R and TACI expression on CD3+ T cells: Interplay among BAFF, APRIL and T helper cytokines profile in systemic lupus erythematosus, Cytokine 114 (2019) 115–127.
[4] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, Int. J. Cancer. 136 (2015) E359–E386.
[5] E. Giat, M. Ehrenfeld, Y. Shoenfeld, Cancer and autoimmune diseases, Autoimmun. Rev. 16 (10) (2017) 1049–1057.
[6] H. Zhao, L. Wu, G. Yan, Y. Chen, M. Zhou, Y. Wu, Y. Li, Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention, Sig. Transduct. Target Ther. 6 (2021) 263, https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5.
[7] S. Lee, K. Margolin, Cytokines in cancer immunotherapy, Cancers 3 (4) (2011) 3856–3893.
[8] S. Kany, J.T. Vollrath, B. Relja, Cytokines in inflammatory disease, Int. J. Mol. Sci. 20 (23) (2019) 6008, https://doi.org/10.3390/ijms20236008.
[9] J.P. Suso, I. Posso-Osorio, C.A. Jiménz, J. Naranjo-Escobar, F.E. Ospina, A. Sánchez, C.A. Cañas, G.J. Tobón, Profile of BAFF and its receptors' expression in lupus nephritis is associated with pathological classes, Lupus 27 (2018) 708–715.
[10] R. Magliozzi, D. Marastoni, M. Calabrese, The BAFF / APRIL system as therapeutic target in multiple sclerosis, Exp. Opin. Ther. Targets 24 (11) (2020) 1135–1145.
[11] K.H. Nowacka, E. Jabłońska, Role of the APRIL molecule in solid tumors, Cytokine Growth Factor Rev. 61 (2021) 38–44.
[12] S. Campuzano, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Electrochemical biosensing to assist multiomics analysis in precision medicine, Curr. Opin. Electrochem. 28 (2021), 100703, https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100703.
[13] M.R. Hasana, M.S. Ahommed, M. Daizy, M.S. Bacchu, M.R.Ali, M.R. Al-Mamun, M. Aly Saad Aly, M.Z.H. Khanad, S.I. Hossain, Recent development in electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection, Biosens. Bioelectron. X. 8 (2021) 100075, 10.1016/j.biosx.2021.100075.
[14] B. Gil Rosa, O.E.Akingbade, X. Guo, L. Gonzalez-Macia, M.A. Crone, L.P.Cameron, P. Freemont, K.-L. Choy, F. Güdere, E. Yeatman, D.J.Sharp, B. Li, Multiplexed

immunosensors for point-of-care diagnostic applications, Biosens. Bioelectron. 203 (2022) 114050, 10.1016/j.bios.2022.114050.
[15] B. Arévalo, M. Blázquez-García, A. Valverde, V. Serafín, A. Montero-Calle, G. Solís-Fernández, R. Barderas, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Binary MoS_2 nanostructures as nanocarriers for amplification in multiplexed electrochemical immunosensing. Simultaneous determination of B cell activation factor and a proliferation-induced signal immunity related cytokines, Microchim. Acta 189 143 (2022), https://doi.org/10.1007/s00604-022-05250-4.
[16] R.M. Torrente-Rodríguez, V.R.V. Montiel, S. Campuzano, M. Pedrero, M. Farchado, E. Vargas, F.J.M. de Villena, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas, J.M. Pingarron, Electrochemical sensor for rapid determination of fibroblast growth factor receptor 4 in raw cancer cell lysates, PLoS ONE 12 (4) (2017), e0175056, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175056.
[17] A. Valverde, E. Povedano, V.-V. Montiel, P. Yáñez-Sedeño, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Electrochemical immunosensor for IL-13 Receptor α2 determination and discrimination of metastatic colon cancer cells, Biosens. Bioelectron. 117 (2018) 766–772.
[18] M. Eguílaz, M. Moreno-Guzmán, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes, Biosens. Bioelectron. 26 (2) (2010) 517–522.
[19] B. Esteban-Fernández De Ávila, V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J. P. Salvador, M.P. Marco, J.M. Pingarrón, Ultrasensitive amperometric magnetoimmunosensor for human C-reactive protein quantification in serum, Sens. Actuators, B: Chem. 188 (2013) 212–220.
[20] V. Serafín, B. Arévalo, G. Martínez-García, J. Aznar-Poveda, J.A. Lopez-Pastor, J. F. Beltrán-Sánchez, A.J. Garcia-Sanchez, J. Garcia-Haro, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Enhanced determination of fertility hormones in saliva at disposable immunosensing platforms using a custom designed field-portable dual potentiostat, Sens. Actuators, B: Chem. 299 (2019), 126934, https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126934.
[21] G.R.H. Owen, L. Häkkinen, C. Wu, H. Larjava, A reproducible technique for specific labeling of antigens using preformed fluorescent molecular IgG-F(ab′)2 complexes from primary antibodies of the same species, Microsc. Res. Tech. 73 (2009) 623–630.
[22] D.J. MacPhee, Methodological considerations for improving Western blot analysis, J. Pharmacol. Toxicol. Methods 61 (2010) 171–177.
[23] M.J. González-Álvarez, E. Pérez-Ruiz, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, Effect of tags and labels on the performance of enzyme amplified electrochemical genomagnetic assays, Electroanalysis 25 (2013) 147−153.
[24] R. Miranda-Castro, N. de-los- Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, Understanding the factors affecting the analytical performance of sandwich-hybridization genosensors on gold electrodes, Electroanalysis 30 (2018) 1229−1240.
[25] O. Kryštufková, H. Hulejová, H.F. Mann, O. Pecha, I. Putová, L. Ekholm, I. E. Lundberg, J. Vencovský, Serum levels of B-cell activating factor of the TNF family (BAFF) correlate with anti-Jo-1 autoantibodies levels and disease activity in patients with anti-Jo-1positive polymyositis and dermatomyositis, Arthritis Res. Ther. 20 (1) (2018) 158, https://doi.org/10.1186/s13075-018-1650-8.
[26] W. Treamtrakanpon, P. Tantivitayakul, T. Benjachat, P. Somparn, W. Kittikowit, S. Eiam-ong, A. Leelahavanichkul, N. Hirankarn, Y. Avihingsanon, APRIL, a proliferation-inducing ligand, as a potential marker of lupus nephritis, Arthritis Res Ther. 14(6) (2012) R252, 10.1186/ ar4095.
[27] S.E.F. Melanson, M.J. Tanasijevic, P. Jarolim, Cardiac troponin assays: a view from the clinical chemistry laboratory, Circulation 116 (2007) 501–504.
[28] C. Muñoz-San Martín, M. Gamella, M. Pedrero, A. Montero-Calle, V. Pérez-Ginés, J. Camps, M. Arenas, R. Barderas, J.M. Pingarrón, S. Campuzano, Anticipating metastasis through electrochemical immunosensing of tumor hypoxia biomarkers, Anal. Bioanal. Chem 414 (2022) 399–412.
[29] V. Lascano, L.F. Zabalegui, K. Cameron, M. Guadagnoli, M. Jansen, M. Burggraaf, M. Versloot, H. Rodermond, C. van der Loos, C.E. Carvalho-Pinto, H. Kalthoff, J. P. Medema, M. Hahne, The TNF family member APRIL promotes colorectal tumorigenesis, Cell Death Differ. 19 (11) (2012) 1826–1835.
[30] M. Warakomska, M. Tynecka, D. Lemancewicz, K. Grubczak, J. Dzieciol, M. Moniuszko, A. Eljaszewicz, L. Bolkun, The effects of BAFF and APRIL signaling on non-small cell lung cancer cell proliferation and invasiveness, Oncology Lett. 22 (4) (2021) 728, https://doi.org/10.3892/ol. 2021.12989.
[31] W. Stohl, S. Metyas, S.M. Tan, G.S. Cheema, B. Oamar, D. Xu, V. Roschke, Y. Wu, K. P. Baker, D.M. Hilbert, B Lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: Longitudinal observations, Arthritis Rheum. 48 (2003) 3475–3486.
[32] A. Vaconcellos, J. Marken, T. Wang, C. Lood, N.V. Giltiay, Increased levels of BAFF in SLE patients correlates with neutrophil activation and autoantibody production [abstract], Arthritis Rheumatol. 69 (suppl. 10) (2017). https://acrabstracts.org/abstract/increased-levels-of-baff-in-sle-patients-correlates-with-neutrophil-activation-and-autoantibody-production/.
[33] J. Moreaux, J.L. Veyrune, J. de Vos, B. Klein, APRIL is overexpressed in cancer: Link with tumor progression, BMC Cancer 9 (2009) 83, https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-83.
[34] V. Calu, A. Ionescu, L. Stanca, O.I. Geicu, F. Iordache, A.M. Pisoschi, A.I. Serban, L. Bilteanu, Key biomarkers within the colorectal cancer related inflammatory microenvironment, Sci. Rep. 11 (2021) 7940, https://doi.org/10.1038/s41598-021-86941-5.
[35] M. Kampa, G. Notas, E.N. Stathopoulos, A. Tsapis, E. Castanas, The TNFSF members APRIL and BAFF and their receptors TACI, BCMA, and BAFFR in oncology, with a special focus in breast cancer, Front, Oncol. 10 (2020) 827, https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00827.
[36] S.M. Fawzy, T.A. Gheita, E. El-Nabarawy, H.H. El-Demellawy, O.G. Shaker, Serum BAFF level and its correlations with various disease parameters in patients with systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus, Egypt. Rheumatol. 33 (1) (2011) 45–51.
[37] D.C. Salazar-Camarena, P.C. Ortiz-Lazareno, A. Cruz, E. Oregon-Romero, J. R. Machado-Contreras, J.F. Muñoz-Valle, M. Orozco-López, M. Marín-Rosales, C. A. Palafox-Sánchez, Association of BAFF, APRIL serum levels, BAFF-R, TACI and BCMA expression on peripheral B-cell subsets with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus, Lupus 25 (2016) 582–592.

Biosensors and Bioelectronics: X 13 (2023) 100325

Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics: X

journal homepage: www.journals.elsevier.com/biosensors-and-bioelectronics-x

Early and differential autoimmune diseases diagnosis by interrogating specific autoantibody signatures with multiplexed electrochemical bioplatforms

Beatriz Arévalo [a], Verónica Serafín [a], María Garranzo-Asensio [b], Rodrigo Barderas [b,**], Paloma Yáñez-Sedeño [a,***], Susana Campuzano [a,*], José M. Pingarrón [a]

[a] Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain
[b] UFIEC, Instituto de Salud Carlos III, 28220, Majadahonda, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
ENAs-Abs
Quadruple electrochemical bioplatform
Magnetic beads
Screen-printed electrodes
Autoimmune diseases
Serum

ABSTRACT

This work reports the first bioplatform to assist in the early and reliable diagnosis of autoimmune diseases by quadruple determination of autoantibodies (Abs) produced against extractable nuclear antigens (ENAs): La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1snRNP70-Abs and smRNP-Abs. The bioplatform involves indirect immunoassays on the surface of magnetic microcarriers (independent batches for each of the target autoantibodies) and amperometric transduction using the H_2O_2/hydroquinone (HQ) system on a disposable multiple electrode platform. The magnetic microcarriers were modified with the corresponding antigens using His-tag and carbodiimide/succinimide chemistries and employed for the selective capture of the corresponding autoantibodies. Thereafter, they were enzymatically labelled with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) and magnetically captured on each of the working surfaces of the quadruple platform. The evaluation of the analytical and operational characteristics of the bioplatform for the amperometric determination of standards, performed under optimized experimental conditions, confirmed the bioplatform competitiveness in terms of sensitivity and point-of-care application compared to commercially available ELISA methodologies for the single determination of target Abs. The developed bioplatform was applied to the analysis of serum samples from healthy individuals and from patients with two prevalent autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, SLE, and Sjögren's syndrome, SS). The obtained results proved the potential of the bioplatform for the differential diagnosis of these two autoimmune diseases through the accurate, simple, and rapid multidetermination of the four target Abs.

1. Introduction

Almost 8% of the world's population is affected by one or more than 80 different autoimmune diseases, representing a huge social and health economic impact, greater than that of cancer (Orlov et al., 2020). In the last decade the incidence of these diseases has even increased which is attributed to genetic causes or environmental factors, such as lifestyle choices or pollution (Zharkova et al., 2017) (Barbero Mazzucca et al., 2021). It is important to note that the strong overlap of signs and symptoms among autoimmune diseases can be responsible for delays in diagnosis and appropriate treatment. According to a survey made by the Autoimmune Diseases Association, it takes up to 4.6 years and almost 5 visits to the doctor to receive a proper diagnosis of an autoimmune disease (Doghramji).

The onset and progression of autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (SS), rheumatoid arthritis (RA), multiple sclerosis (MS) or Alzheimer's disease (AD) appear to be associated with B- and T-cell abnormalities, protein misfolding and aggregation, and dysregulation of specific autoantigens and their corresponding autoantibodies (Abs). Among them, Abs against nuclear antigens (ANAs) and extractable nuclear antigens (ENAs) (ANAs-Abs and ENAs-Abs, respectively) should be highlighted (Alsubki

* Corresponding author.
** Corresponding author.
*** Corresponding author.
E-mail addresses: r.barderasm@isciii.es (R. Barderas), yseo@quim.ucm.es (P. Yáñez-Sedeño), susanacr@quim.ucm.es (S. Campuzano).

https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100325
Received 8 December 2022; Received in revised form 8 February 2023; Accepted 23 February 2023
Available online 5 March 2023
2590-1370/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

et al., 2020). However, it is important to note that these autoantibodies are also dysregulated in other clinical conditions such as cancer or acute tissue damage (Marshall et al., 2018). Hence, it is critical to know the role of autoantibodies, the actual significance of their presence in each disease, and to establish characteristic autoantibody signatures that allow early (patients can carry Abs many years before manifesting clinical symptoms (Bizzaro, 2008)) and unequivocal identification of each disease.

Currently, the diagnosis of highly heterogeneous autoimmune diseases is based on invasive biopsies that are not easily accessible to many patients (Zhang et al., 2021) and on the determination by laboratory testing of anti-nuclear antibody (ANA) patterns that react with antigens in the nucleus, nucleolus, cytoplasm, and mitotic cell apparatus (Kiriakidou and Ching, 2020). ANA testing has a high sensitivity, ranging from 90% to 95% in patients with SLE (Emlen and O'Neill, 1997), which the prototypical systemic autoimmune disease and one of the most heterogeneous diseases (Dörner and Furie, 2019). However, ANA tests show relatively low specificity, being positive in 30% of healthy controls (Damoiseaux and Tervaert, 2006) (Nagele et al., 2013), especially in elderly (Oke and Wahren-Herlenius, 2013). Therefore, these tests should be complemented by identification of autoantibodies against specific ENAs-Abs. Among them, La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1snRNP70-Abs and smRNP-Abs stand out due to their potential to be used as biomarkers for diagnosis, prognosis and monitoring of autoimmune diseases (Wu et al., 2017).

For example, smRNP-Abs, known as antibodies to Smith antigen, have been included in the serologic criteria for diagnosing patients with SLE because of their high sensitivity (Migliorini et al., 2005). These Abs are almost always associated with U1snRNP70-Abs used as follow-up biomarkers, because they develop later in the course of the disease and are also considered the serological hallmark of "mixed connective tissue disease" (MCTD) and Raynaud's phenomenon (Tani et al., 2014) (Migliorini et al., 2005). The presence of La/SSB-Abs and/or Ro/SSA-Abs is a hallmark of SS and SLE (Agmon-Levin et al., 2017). Ro/SSA-Abs identify pregnant women who are at increased risk of having a child with Neonatal Lupus Syndrome (NLS) (Gryka-Marton et al., 2021), and may also be the only autoantibodies present in a subset of asymptomatic patients with negative ANA tests (Hayashi et al., 2008).

Currently, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA, FEIA), indirect immunofluorescence (IIF) and Western blot (WB) are the most common methods employed in ANA testing for autoimmune disorders (Zhang et al., 2017) (Campuzano et al., 2019). However, these techniques are time-consuming, and require sophisticated instruments. Moreover, their sensitivity is limited, and they are sometimes only able to detect an autoimmune disease when an irreversible tissue damage has already occurred (Zhang et al., 2017). Considering these limitations, the development of novel and reliable techniques for Abs detection is very important for the early and reliable diagnosis of autoimmune diseases.

In this sense, electrochemical biosensors are currently considered as cutting-edge tools, competitive with well-established and/or state-of-the-art technologies, for the determination of clinical biomarkers due to their simplicity of handling, affordable cost, adequate sensitivity and compatibility with multiplexed and point-of-care determinations (Nguyen et al., 2015) (Campuzano et al., 2019). In addition, they have recently successfully incurred in the determination of relevant autoantibodies in cancer, neurodegenerative and autoimmune diseases (Garranzo-Asensio et al., 2020) (Montero-Calle et al., 2021) (Valverde et al., 2021) (Arévalo et al., 2020) (Arévalo et al., 2022a).

Being aware of the important social and economic repercussions of having tools that contribute to the early and reliable detection of autoimmune diseases, this work reports an electrochemical bioplatform for the simultaneous determination of four specific ENAs-Abs: La/SSB-Abs, Ro/SSA-Abs, U1snRNP70-Abs and smRNP-Abs. Although bioplatforms have been developed for the determination of multiple antibodies related to cancer (Garranzo-Asensio et al., 2020) (Montero-Calle et al., 2021) and Alzheimer's disease (Valverde et al., 2021), to our knowledge this is the first report for the multi-determination of autoantibodies related to autoimmune diseases. The developed bioplatform involves the use of antigen-specific modified magnetic microparticles (MBs) taking advantage of His-tag or carbodiimide/hydroxysuccinimide (EDC/NHS) chemistries, for the capture of the corresponding autoantibodies (IgGs) that are enzymatically labelled with HRP-conjugated secondary antibodies followed by amperometric transduction using the H_2O_2/HQ system on disposable platforms for quadruple detection. The bioplatform performance is compatible with clinical application and exhibits potential to discriminate between healthy individuals and patients diagnosed with autoimmune diseases through the simple and reliable determination of the four autoantibodies serum level in only 45 min.

2. Materials and methods

Apparatus and electrodes, Reagents and solutions and all the Procedures used (Implementation of indirect immunoassays on magnetic microsupports, Amperometric detection, Analysis of serum samples) are described in detail in the Supporting Information (SI).

3. Results and discussion

This work reports the first electrochemical bioplatform for the simultaneous determination of four ENAs-Abs: La/SSB-Abs, SSA-Abs, U1snRNP70-Abs and smRNP-Abs. Fig. 1 shows as the bioplatform is based on the use of MBs modified with the corresponding antigens by exploiting two different chemistries conditioned by the commercial availability of the antigens (His-Tag chemistry for La/SSB, Ro/SSA and U1snRNP70 or EDC/NHS chemistry for smRNP) for the capture of the corresponding Abs and the enzymatic labelling of the captured IgGs using an HRP-conjugated secondary antibody (HRP-anti-hIgG). The prepared magnetic immunoconjugates for each interrogated Abs were then captured on each working electrode of an SP_4CE, and the four amperometric responses were simultaneously monitored in the presence of the H_2O_2/HQ system. According to the used assay format, the cathodic current variations obtained from the enzymatic reduction of H_2O_2 mediated by HQ were directly proportional to the concentration of each type of target Abs.

To develop the multiplexed bioplatform providing the best analytical performance for the target Abs, we optimized independently the key variables involved in the preparation of the bioconjugates for the determination of each target Abs by performing their individual amperometric transduction on single SPCEs. The results of all these optimizations are presented and discussed in the SI (Figs. S1–S4 and Table S1).

3.1. Analytical and operational characteristics for quadruple determination of anti-ENAs Abs

Once the conditions for the preparation of the bioconjugates for each target Abs were selected, the possibility of simultaneous determination was evaluated by comparing the amperometric responses recorded at SPCEs and SP_4CEs. As expected, Fig. S5 (in the SI) shows that the amperometric responses were 70–85% smaller at the SP_4CEs compared to SPCEs, due to the SP_4CEs working electrode smaller surface area (6.8 *vs.* 12.6 mm^2). Nevertheless, no significant differences were observed in the S/B ratios (ratios of amperometric responses obtained in the presence, S, and absence, B, of target Abs standards) when performing single or quadruple measurements. The results obtained with the quadruple platform further confirmed the absence of cross-reactivity between adjacent working electrodes. All these results confirmed the feasibility of performing the simultaneous determination of the four target Abs on the same bioplatform with the advantages that this entails.

The analytical and operational characteristics achieved with the quadruple bioplatform were evaluated. Semi-logarithmic calibration graphs constructed under the previously selected working conditions for

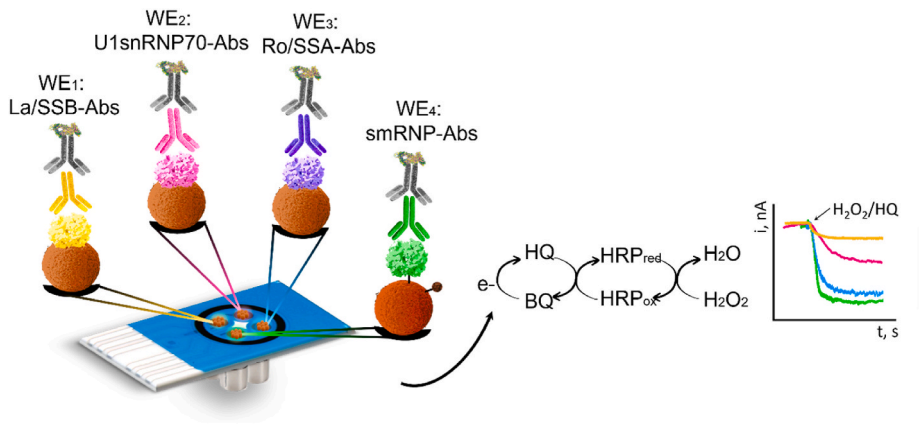


Fig. 1. Schematic diagram of the quadruple biosensing platform assisted by the use of MBs for the amperometric determination of La/SSB-Abs, U1snRNP70-Abs, Ro/SSA-Abs and smRNP-Abs.

the amperometric determination of standards of the four target Abs are displayed in Fig. 2, and the corresponding parameters summarized in Table 1.

The lack of bioelectroanalytical platforms reported in the literature for the determination of the target ENAs-Abs limits the comparison of the quadruple bioplatform analytical performance to that of claimed for ELISA kits commercialized for the single determination of these Abs. According to their specifications [https://www.4adi.com/product/pdf/3220-SSB-Human-anti-SS-B-IgG-ELISA-kit-manual.pdf] [https://www.4adi.com/product/pdf/3300-120-RNG-Human-Anti-RNP-70-IgG-ELISA-kit-manual.pdf] [https://www.4adi.com/product/pdf/3210-Anti-Sjogren-syndrome-typeA-antigen-ELISA-kit-manual.pdf][https://www.4adi.com/product/pdf/3300-110-SRG-Human-RNP-Sm-IgG-ELISA-kit-manual.pdf][http://img.creative-diagnostics.com/pdf/DEIA1688,SS-B.pdf] [https://www.creative-diagnostics.com/pdf/DEIA4147.pdf] [https://www.creative-diagnostics.com/pdf/DEIA1685.pdf], the ELISA kits achieve LODs of 1 U mL^{-1} for the four target Abs, which are between 100 and 20 times larger than those obtained with the quadruple bioplatform. It is important to remark that the linear ranges provided by the bioplatform for the determination of the four target Abs, comprising in most cases three orders of magnitude, are slightly wider but similar than those obtained with the commercial ELISA kits for their individual determination (1−200 U mL^{-1} according to the specifications of the commercial ELISA kits). Moreover, it should be noted that, although there is no considerable difference between the time involved in each determination, unlike ELISA kits, the bioplatform allows the simultaneous determination of the four Abs using affordable and applicable point-of-care instrumentation.

Table 1
Analytical features obtained when using the developed quadruple bioplatform for the simultaneous amperometric determination of the four target Abs.

	Target Abs			
Analytical characteristic	La/SSB	U1snRNP70	Ro/SSA	smRNP
Linear range, U mL^{-1}	0.05–50	0.1–100	0.1–100	0.2–100
Slope, nA per decade of concentration (U mL^{-1})	192 ± 3	108 ± 2	90 ± 2	66.5 ± 0.4
Intercept, nA	-1 ± 4	-23 ± 3	45 ± 2	42.0 ± 0.6
LOD[a], U mL^{-1}	0.01	0.03	0.04	0.05
LOQ**, U mL^{-1}	0.05	0.09	0.1	0.2
RSD, % (n = 5)	2.4 (10 U mL^{-1})	2.5 (25 U mL^{-1})	2.1 (25 U mL^{-1})	2.4 (25 U mL^{-1})

[a] 3 × s_b/m and **10 × s_b/m where s_b is the standard deviation of 10 blank measurements and m the calibration plot slope value.

It is also important to highlight that the achieved LOD values are significantly lower than the cut-off value established in the commercial

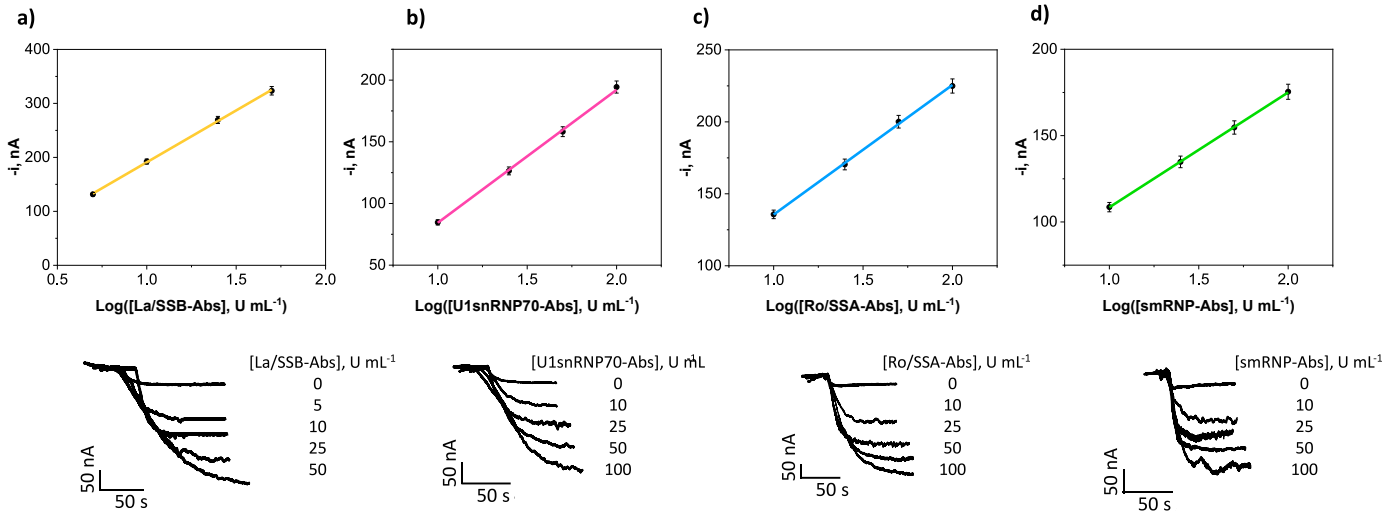


Fig. 2. Calibration graphs (top) and amperometric responses (bottom) obtained when using the quadruple bioplatform for measurements of standard solutions of La/SSB-Abs a), U1snRNP70-Abs b), Ro/SSA-Abs c) and smRNP-Abs d).

kits to consider a positive result probably related to a pathological state (25 U mL^{-1} for the four target Abs), thus allowing the developed bioplatform to be used for discrimination between negative and positive individuals to this type of Abs.

In addition, Table 1 shows as all the calculated RSD values are smaller than 3%. The values shown were obtained from the amperometric responses measured with 5 different quadruple bioplatforms for 10 U mL^{-1} La/SSB-Abs and 25 U mL^{-1} U1snRNP70-Abs, Ro/SSA-Abs and smRNP-Abs. Such RSD values confirmed the good reproducibility of the protocols used in the implementation of the bioassays on MBs and in the amperometric transduction at the SP_4CEs.

The storage stability of antigen-modified MBs kept at 4 °C in microcentrifuge tubes re-suspended in 50 μL 10 mM filtered PBS (pH 7.4) was evaluated. Fig. S6 (in the SI) shows the amperometric responses provided by the quadruple bioplatforms prepared each control day from the stored bioconjugates, in the absence and in the presence of the indicated concentration of target Abs. The obtained results confirmed the possibility of using the stored bioconjugates 35 days after their preparation without significant loss of sensitivity.

3.2. Selectivity

The behaviour of bioplatform was evaluated in the presence of other proteins and Abs which can coexist in the samples with the target Abs. The amperometric responses provided by the bioplatforms for 0 and 12.5 La/SSB-Abs, 50 U1snRNP70-Abs, 10 Ro/SSA-Abs and 25 smRNP-Abs U mL^{-1} standards were compared with those in the presence of the potential interferents at the expected concentrations in serum samples of healthy individuals.

Fig. S7 (in the SI) shows as only the presence of human IgG (hIgG) affected the determination of the four target Abs and human serum albumin (HSA) also affected that of smRNP-Abs. This behaviour was reported previously (Arévalo et al., 2020) (Arévalo et al., 2022a) (Arévalo et al., 2022b) (Muñoz-San Martín et al., 2022) and attributed to nonspecific adsorptions of hIgGs on the surface of MBs, which may also be persistent in the not sufficiently too purified HSA. Nevertheless, the interference practically disappeared for 100-fold smaller hIgG or HSA concentrations. Therefore, the analytical characteristics of the bioplatform for the determination of the four target Abs together with the established cut-off value in serum (25 U mL^{-1}), ensured the suitability of the bioplatform to analyze diluted samples where the concentrations of hIgGs and HSA do not affect the determination of the target Abs.

3.3. Diagnostic potential for the detection and discrimination of autoimmune diseases and versatility of the developed bioplatform

The bioplatform was applied to the determination of target Abs in serum samples, acquired from an online market (Central BioHub®), corresponding to four healthy individuals and four and six patients diagnosed with SLE and SS, respectively.

Previously, and to evaluate the accuracy of the results obtained with the bioplatform, the positive and negative controls (prepared in a serum/buffer matrix) provided in the commercial ELISA kits that supply the used immunoreagents were analyzed. Table S2 (in the SI) compares the obtained concentration values confirming the high accuracy of the results obtained with the bioplatform for the determination of the four autoantibodies.

The determination in serum implies a 1000-fold sample dilution. This dilution factor allowed the inclusion of the amperometric responses within the linear ranges of the calibrations obtained with standards (Fig. 2a) and avoided any matrix effect (Table S3 in the SI). Therefore, the endogenous content of the four target Abs in serum was determined by simple interpolation of the amperometric responses recorded for the diluted samples into such calibrations. The obtained results are depicted in Fig. 3a and summarized in Table 2. In addition, the results obtained by applying the individual ELISA methodologies for the determination of the target Abs are included in Table 2. Fig. 3b and Table S4 (in the SI) show the correlation between the results provided by the quadruple bioplatform and the ELISA method. As it can be deduced, no significant differences between both methods were apparent.

As expected, Fig. 3a shows as significantly larger concentrations of the four target Abs were observed for patients with autoimmune diseases compared to healthy individuals. Moreover, all the SLE and SS patients exhibited larger contents than the cut-off value established in serum (25

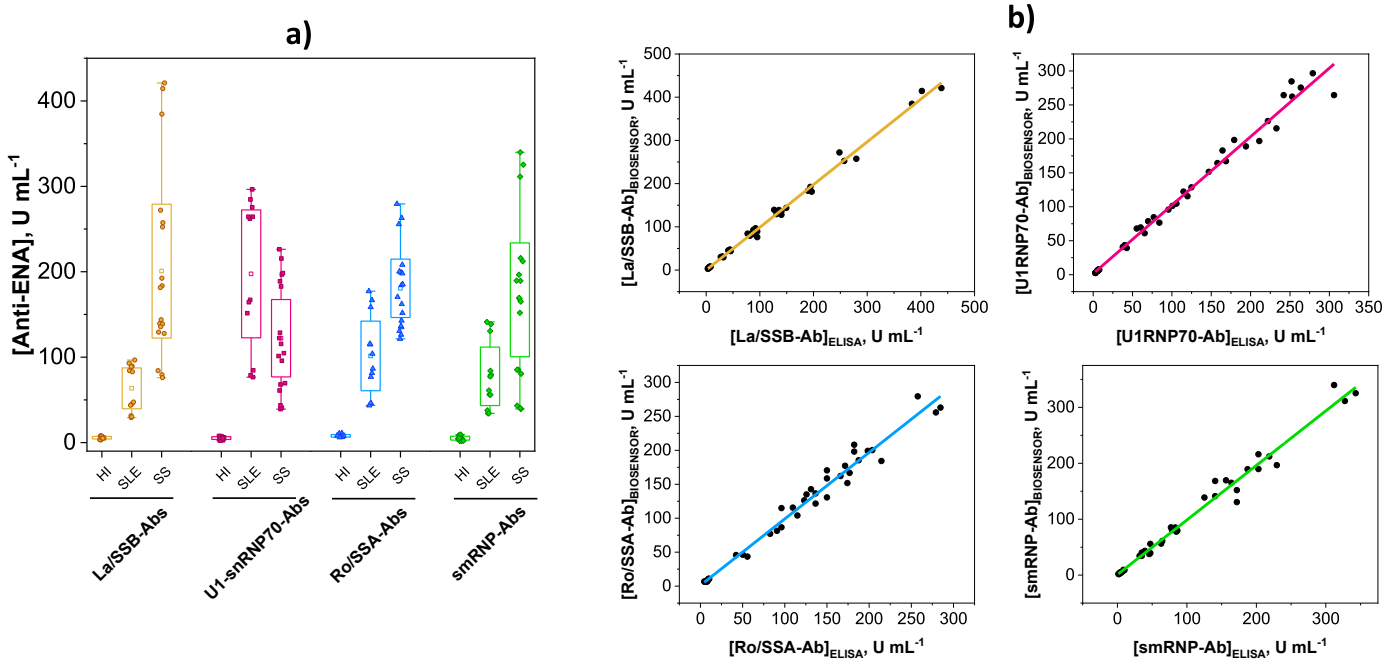


Fig. 3. Target Abs concentrations obtained with the quadruple bioplatform for serum samples grouped into pools of healthy individuals (4) and SLE (4) and SS patients (6) (a). Correlation plots between the concentrations obtained with the bioplatform and the ELISA methods available for their individual determination (b). All graphs include the values of the three replicates performed for each determination.

Table 2
Endogenous concentrations (in U mL^{-1}, mean value ± ts/$\sqrt{n}$; n = 3; α = 0.05) of the target autoantibodies obtained using the developed quadruple bioplatform as well as using the individual ELISA methodologies for serum samples of healthy individuals and patients diagnosed with SS and SLE.

		Bioplatform				ELISA			
		La/SSB-Abs	U1snRNP70-Abs	Ro/SSA-Abs	smRNP-Abs	La/SSB-Abs	U1snRNP70-Abs	Ro/SSA-Abs	smRNP-Abs
Healthy	1	6.4 ± 0.4	5.8 ± 0.6	10.6 ± 0.6	4.7 ± 0.4	6 ± 2	5.7 ± 0.8	10 ± 1	4.4 ± 0.9
	2	7.8 ± 0.5	7.5 ± 0.8	6.8 ± 0.5	9 ± 1	8 ± 2	7 ± 2	6.6 ± 0.9	9 ± 1
	3	3.3 ± 0.2	2.6 ± 0.7	7.9 ± 0.4	2 ± 0.3	3.5 ± 0.7	2.8 ± 0.4	8.1 ± 0.7	2.0 ± 0.5
	4	5.2 ± 0.3	5.3 ± 0.7	6.4 ± 0.4	5.2 ± 0.7	5 ± 1	5 ± 1	6.1 ± 0.9	6 ± 1
SLE	5	45 ± 5	80 ± 10	45 ± 4	58 ± 7	44 ± 6	77 ± 18	49 ± 9	58 ± 8
	6	93 ± 9	267 ± 18	82 ± 12	137 ± 14	92 ± 9	253 ± 27	90 ± 17	146 ± 36
	7	85 ± 8	282 ± 40	168 ± 12	35 ± 5	88 ± 10	279 ± 67	166 ± 35	38 ± 9
	8	30 ± 2	161 ± 21	111 ± 16	80 ± 8	30 ± 6	158 ± 27	107 ± 17	83 ± 10
SS	9[a]	80 ± 10	41 ± 5	266 ± 30	41 ± 5	85 ± 23	40 ± 6	274 ± 35	41 ± 8
	10	132 ± 16	122 ± 16	128 ± 17	84 ± 7	133 ± 17	120 ± 12	128 ± 18	80 ± 8
	11	261 ± 25	213 ± 37	161 ± 23	162 ± 22	262 ± 40	222 ± 27	163 ± 31	159 ± 28
	12	139 ± 10	66 ± 11	137 ± 15	183 ± 29	142 ± 17	60 ± 12	139 ± 24	182 ± 27
	13	407 ± 48	190 ± 19	197 ± 30	326 ± 35	409 ± 57	179 ± 37	198 ± 40	327 ± 39
	14	186 ± 14	101 ± 11	194 ± 20	208 ± 26	200 ± 36	101 ± 12	191 ± 28	217 ± 33

[a] According to Central BioHub specifications the concentrations of La/SSB-Abs and Ro/SSA-Abs in these samples are 76.0 and > 200 U mL^{-1}, respectively.

U mL^{-1} for all target Abs) by commercial ELISA kits.

The potential of the bioplatform and the selected Abs signature for the diagnosis and discrimination of the autoimmune diseases was checked by constructing ROC curves from the bioplatform results summarized in Table 2. Fig. S8 (in the SI) displays the resulting ROC curves with the corresponding parameters summarized in Table 3. These parameters show that the bioplatform allowed a full discrimination between healthy individuals and SS or SLE patients (AUC, specificity, and sensitivity 100% for each of the autoantibodies). In contrast, none of the single autoantibodies was able to discriminate SS from SLE patients, but with specificities above 66.7% and AUCs above 75%. However, in combination, the four autoantibodies against La/SSB, U1snRNP70, Ro/SSA and smRNP showed full ability to discriminate either healthy *vs.* SS or SLE individuals, or SS *vs.* SLE individuals. It is important to note that, to our knowledge, there is not any reported technology able to discriminate patients with SLE and SS. Indeed, the ELISA methodology routinely employed for the determination of single target Abs, is only claimed to discriminate healthy individuals from patients with autoimmune diseases, not for the differential diagnosis of the latter, which is considered particularly relevant for the personalized and efficient diagnosis of each patient.

The results in Table 3 also agreed with the presence of La/SSB-Abs and/or Ro/SSA-Abs being considered a hallmark of SS and SLE (Agmon-Levin et al., 2017), these 2 target Abs being the ones for which the best individual ROC curve parameters are obtained.

In addition, the analysis of the quantitative results obtained with the developed quadruple bioplatform by means of ROC curves allowed us to establish the cut-off values shown in the last row of Table 3 for each target Abs to discriminate patients with SLE or SE from healthy subjects or what is even more challenging between SS and SLE patients.

Moreover, the results of the experiments shown and discussed at the end of the SI (Figs. S9 and S10) are a proof of the bioplatform's versatility for the on-demand determination of 4–8 Abs (total Igs or individual isotypes) by simply changing the antigen immobilized on the MBs, the secondary antibody for the enzymatic labelling and the type of disposable electrochemical platform.

4. Conclusions

To assist in the early diagnosis and discrimination of autoimmune diseases, we report in this work the first electrochemical bioplatform for the multideterminación of Abs against four specific ENAs: La/SSB, U1snRNP70, Ro/SSA and smRNP. The bioplatform exploits the use of magnetic microcarriers modified with the corresponding antigens by means of His-tag or covalent EDC/NHS immobilization chemistry and amperometric transduction on quadruple disposable platforms.

The developed method exhibits an analytical performance in terms of sensitivity, selectivity, simplicity and quick response compatible with its clinical applicability for the determination of the four target antibodies in both centralized and point-of-care settings, and has been tested in a selected cohort of individuals including healthy subjects and patients diagnosed with SLE and SS. The obtained results demonstrate the potential of the bioplatform as well as of the biomarker signature selected for the differential diagnosis of these two autoimmune diseases of high and increasing prevalence, establishing cut-off values in serum for each of the targets Abs. Moreover, the versatility of the developed bioplatform for the determination of autoantibodies against other antigens (both total content of Igs or individual isotypes) was proved. These capabilities hold tremendous promise for demonstrating the diagnostic value of IgGs against certain antigens to assess the contribution of less studied isotypes, such as IgAs, and to identify characteristics molecular signatures that contribute to the early, reliable and minimally invasive diagnosis of autoimmune diseases.

Funding

The financial support of RTI2018-096135-B-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia, Innovacion y Universidades), PID2019-103899RB-I00 and PID2021-122457OB-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación) Research Project, PI17CIII/00045 and PI20CIII/00019 Grants from the

Table 3
Potential of the four target autoantibodies (1: La/SSB-Abs, 2: U1snRNP70-Abs, 3: Ro/SSA-Abs and 4: smRNP-Abs) considered individually or in combination to discriminate autoimmune diseases and serum cut-off values.

	Healthy *vs.* SS					Healthy *vs.* SLE					SS *vs.* SLE				
Parameter	1	2	3	4	All[a]	1	2	3	4	All[a]	1	2	3	4	All[a]
AUC	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	91.7	75	87.5	83.3	100
Sensitivity	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	50	75	100	100
Specificity	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83.3	100	100	66.7	100
Cut-off (U mL^{-1})	43.9	24.25	69.3	25.0	–	18.9	43.75	27.8	22.0	–	112.5	240.0	119.5	149.5	–

[a] Considering the results of the four target Abs together.

AES-ISCIII Program co-founded by FEDER funds and the TRANSNANOAVANSENS-CM Program from the Comunidad de Madrid (Grant S2018/NMT-4349) are gratefully acknowledged. B.A. acknowledges predoctoral contracts from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovacion y Universidades (PRE2019-087596). M.G-A. acknowledges the postdoctoral contract Margarita Salas for the requalification of the Spanish University System.

CRediT authorship contribution statement

Beatriz Arévalo: Methodology, Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **Verónica Serafín:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **María Garranzo-Asensio:** Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **Rodrigo Barderas:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Funding acquisition. **Paloma Yáñez-Sedeño:** Conceptualization, Supervision, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft, Funding acquisition. **Susana Campuzano:** Conceptualization, Supervision, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft, Funding acquisition. **José M. Pingarrón:** Supervision, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100325.

References

Agmon-Levin, N., Dagan, A., Peri, Y., Anaya, J.-M., Selmi, C., Tincani, A., Bizzaro, N., Stojanovich, L., Damoiseaux, J., Cohen Tervaert, J.W., Mosca, M., Cervera, R., Shoenfeld, Y., 2017. The interaction between anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies and anti-infectious antibodies in a wide spectrum of auto-immune diseases: another angle of the autoimmune mosaic. Clin. Exp. Rheumatol. 35, 929–935.

Alsubki, R., Tabassum, H., Alfawaz, H., Alaqil, R., Aljaser, F., Ansar, S., Al Jurayyan, A., 2020. Association between antinuclear antibodies (ANA) patterns and extractable nuclear antigens (ENA) in HEp-2 cells in patients with autoimmune diseases in Riyadh, Saudi Arabia. Intractable Rare Dis. Res 9 (2), 89–94. https://doi.org/10.5582/irdr.2020.03012.

Arévalo, B., Serafín, V., Sánchez-Paniagua, M., Montero-Calle, A., Barderas, R., López-Ruíz, B., Campuzano, S., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., 2020. Fast and sensitive diagnosis of autoimmune disorders through amperometric biosensing of serum anti-dsDNA autoantibodies. Biosens. Bioelectron. 160, 112233 https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112233.

Arévalo, B., Blázquez, M., Serafín, V., Montero-Calle, A., Calero, M., Valverde, A., Barderas, R., Campuzano, S., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., 2022a. Unraveling autoimmune and neurodegenerative diseases by amperometric serological detection of antibodies against aquaporin-4. Bioelectrochemistry 144, 108041. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.108041.

Arévalo, B., Blázquez-García, M., Valverde, A., Serafín, V., Montero-Calle, A., Solís-Fernandez, G., Barderas, R., Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S., Pingarrón, J.M., 2022b. Simultaneous electrochemical immunosensing of relevant cytokines to diagnose and track cancer and autoimmune diseases. Bioelectrochemistry 146, 108157. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108157.

Barbero Mazzucca, C., Raineri, D., Cappellano, G., Chiocchetti, A., 2021. How to tackle the relationship between autoimmune diseases and diet: well begun is half-done. Nutrients 13, 3956. https://doi.org/10.3390/nu13113956.

Bizzaro, N., 2008. The predictive significance of autoantibodies in organ-specific autoimmune diseases. Clin. Rev. Allergy Immunol. 34, 326–331. https://doi.org/10.1007/s12016-007-8059-5.

Campuzano, S., Pedrero, M., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., 2019. Electrochemical biosensors for autoantibodies in autoimmune and cancer diseases. Anal. Methods 11, 871–887. https://doi.org/10.1039/C8AY02742K.

Damoiseaux, J.G.M.C., Tervaert, J.W.C., 2006. From ANA to ENA: how to proceed? Autoimmun. Rev. 5, 10–17. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2005.05.007.

Doghramji, P.P. Screening and laboratory diagnosis of autoimmune diseases using antinuclear antibody immunofluorescence assay and specific autoantibody testing. Educational support provided by Quest Diagnostics, Inc. MI6203 12/2016.

Dörner, T., Furie, R., 2019. Novel paradigms in systemic lupus erythematosus. Lancet 393, 2344–2358. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30546-X.

Emlen, W., O'Neill, L., 1997. Clinical significance of antinuclear antibodies: comparison of detection with immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. Arthritis Rheum. 40, 1612–1618. https://doi.org/10.1002/art.1780400910.

Garranzo-Asensio, M., Guzmán-Aránguez, A., Povedano, E., Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Poves, C., Fernandez-Aceñero, M.J., Montero-Calle, A., Solís-Fernández, G., Fernández-Diez, S., Camps, J., Arenas, M., Rodríguez-Tomàs, E., Joven, J., Sánchez-Martínez, M., Rodríguez, N., Domínguez, G., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., Campuzano, S., Barderas, R., 2020. Multiplexed monitoring of a novel autoantibody diagnostic signature of colorectal cancer using HaloTag technology-based electrochemical immunosensing platform. Theranostics 10, 3022–3034. https://doi.org/10.7150/thno.42507.

Gryka-Marton, M., Szukiewicz, D., Teliga-Czajkowska, J., Olesinska, M., 2021. An overview of neonatal lupus with Anti-Ro characteristics. Int. J. Mol. Sci. 2021, 9281. https://doi.org/10.3390/ijms22179281.

Hayashi, N., Koshiba, M., Nishimura, K., Sugiyama, D., Nakamura, T., Morinobu, S., Kumagai, S., 2008. Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. Mod. Rheumatol. 18, 153–160. https://doi.org/10.3109/s10165-008-0028-1.

Kiriakidou, M., Ching, C.L., 2020. Systemic lupus erythematosus. Ann. Intern. Med. 172, ITC81–ITC96. https://doi.org/10.7326/AITC202006020.

Marshall, J.S., Warrington, R., Watson, W., Kim, H.L., 2018. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy Asthma Clin. Immunol. 14, 1–14. https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1.

Migliorini, P., Baldini, C., Rocchi, V., Bombardieri, S., 2005. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. Autoimmunity 38, 47–54. https://doi.org/10.1080/08916930400022715.

Montero-Calle, A., Aranguren-Abeigon, I., Garranzo-Asensio, M., Poves, C., Fernández-Aceñero, M.J., Martínez-Useros, J., Sanz, R., Dziaková, J., Rodriguez-Cobos, J., Solís-Fernández, G., Povedano, E., Gamella, M., Torrente-Rodríguez, R.M., Alonso-Navarro, M., de los Ríos, V., Casal, J.I., Domínguez, G., Guzmán-Aránguez, A., Peláez-García, A., Pingarrón, J.M., Campuzano, S., Barderas, R., 2021. Multiplexed biosensing diagnostic platforms detecting autoantibodies to tumor-associated antigens from exosomes released by CRC cells and tissue samples showed high diagnostic ability for colorectal cancer. Engineering 7, 1393–1412. https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.04.026.

Muñoz-San Martín, C., Gamella, M., Pedrero, M., Montero-Calle, A., Pérez-Ginés, V., Camps, J., Arenas, M., Barderas, R., Pingarrón, J.M., Campuzano, S., 2022. Anticipating metastasis through electrochemical immunosensing of tumor hypoxia biomarkers. Anal. Bioanal. Chem. 414, 399–412. https://doi.org/10.1007/s00216-021-03240-8.

Nagele, E.P., Han, M., Acharya, N.K., DeMarshall, C., Kosciuk, M.C., Nagele, R.G., 2013. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. PLoS One 8, e60726. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060726.

Nguyen, H.H., Park, J., Kang, S., Kim, M., 2015. Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. Sensors 15, 10481–10510. https://doi.org/10.3390/s150510481.

Oke, V., Wahren-Herlenius, M., 2013. Cutaneous lupus erythematosus: clinical aspects and molecular pathogenesis. J. Intern. Med. 273, 544–554. https://doi.org/10.1111/joim.12057.

Orlov, A.V., Pushkarev, A.V., Znoyko, S.L., Novichikhin, D.O., Bragina, V.A., Gorshkov, B.G., Nikitin, P.I., 2020. Multiplex label-free biosensor for detection of autoantibodies in human serum: tool for new kinetics-based diagnostics of autoimmune diseases. Biosens. Bioelectron. 159, 112187 https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112187.

Tani, C., Carli, L., Vagnani, S., Talarico, R., Baldini, C., Mosca, M., Bombardieri, S., 2014. The diagnosis and classification of mixed connective tissue disease. J. Autoimmun. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.01.008, 48–49, 46–49.

Valverde, A., Montero-Calle, A., Arévalo, B., San Segundo-Acosta, P., Serafín, V., Alonso-Navarro, M., Solís-Fernández, G., Pingarrón, J.M., Campuzano, S., Barderas, R., 2021. Phage-derived and aberrant HaloTag peptides immobilized on magnetic microbeads for amperometric biosensing of serum autoantibodies and Alzheimer's disease diagnosis. Analysis & Sensing 1, 161–165. https://doi.org/10.1002/anse.202100024.

Wu, H., Zeng, J., Yin, J., Peng, Q., Zhao, M., Lu, Q., 2017. Organ-specific biomarkers in lupus. Autoimmun. Rev. 16, 391–397. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.02.011.

Zhang, X., Zambrano, A., Lin, Z.-T., Xing, Y., Rippy, J., Wu, T., 2017. Immunosensors for biomarker detection in autoimmune diseases. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz 65, 111–121. https://doi.org/10.1007/s00005-016-0419-5.

Zhang, Y., Li, Y., Zhang, J., Chen, X., Zhang, R., Sun, G., Jiang, B., Fan, K., Li, Z., Yan, X., 2021. Nanocage-based capture-detection system for the clinical diagnosis of autoimmune disease. Small 17, 2101655. https://doi.org/10.1002/smll.202101655.

Zharkova, O., Celhar, T., Cravens, P.D., Satterthwaite, A.B., Fairhurst, A.-M., Davis, L.S., 2017. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. Rheumatology 56. https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew427 i55–i66.

Analytica Chimica Acta 1257 (2023) 341153

Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Anti-double stranded DNA antibodies: Electrochemical isotyping in autoimmune and neurological diseases

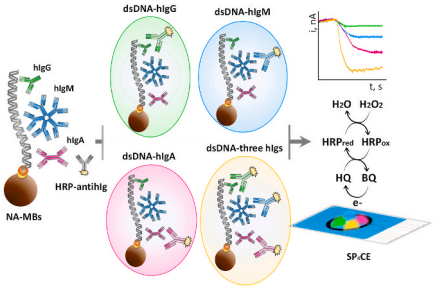
Beatriz Arévalo [a], Verónica Serafín [a], Maria Garranzo-Asensio [b], Ana Montero-Calle [b], Rodrigo Barderas [b], Paloma Yáñez-Sedeño [a,**], Susana Campuzano [a,*], José M. Pingarrón [a]

[a] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28014, Madrid, Spain
[b] Chronic Disease Programme, UFIEC, Institute of Health Carlos III, Majadahonda, 28220, Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- First bioplatform for isotyping of human anti-dsDNA antibodies (IgG, IgM, IgA and three Igs).
- Selective capture by magnetic microsupports modified with a laboratory-prepared biotinylated human dsDNA.
- Amperometric transduction at disposable screen-printed quadruple platforms.
- Quadruple determination within 1 h and 15 min.
- Analysis of serum samples from healthy individuals and from patients diagnosed with SLE and AD patients.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Handling Editor: Jing-Juan Xu

Keywords:
Electrochemical immunoplatform
Quadruple detection
dsDNA-Abs
Isotyping
Serum
SLE

ABSTRACT

This work reports the first amperometric biosensor for the simultaneous determination of the single or total content of the most relevant human immunoglobulin isotypes (hIgs) of anti-dsDNA antibodies, dsDNA-hIgG, dsDNA-hIgM, dsDNA-hIgA and dsDNA-three hIgs, which are considered relevant biomarkers in prevalent autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE) as well as of interest in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD). The bioplatform involves the use of neutravidin-functionalized magnetic microparticles (NA-MBs) modified with a laboratory-prepared biotinylated human double-stranded DNA (b-dsDNA) for the efficient capture of specific autoantibodies that are enzymatically labeled with horseradish peroxidase (HRP) enzyme using specific secondary antibodies for each isotype or a mixture of secondary antibodies for the total content of the three isotypes. Transduction was performed by amperometry (−0.20 V *vs.* the Ag pseudo-reference electrode) using the H_2O_2/hydroquinone (HQ) system after trapping the resulting magnetic bioconjugates on each of the four working electrodes of a disposable quadruple transduction platform (SP_4CEs). The bioplatform demonstrated attractive operational characteristics for clinical application and was employed to determine the individual or total hIgs classes in serum from healthy individuals and from patients diagnosed with SLE and AD. The target concentrations in AD patients are provided for the first time in this work. In addition, the results for SLE patients and control individuals agree with those obtained by applying ELISA tests as well as with the clinical ranges reported by other authors, using individual detection methodologies restricted to centralized settings or clinical laboratories.

* Corresponding author.
** Corresponding author.
E-mail addresses: yseo@quim.ucm.es (P. Yáñez-Sedeño), susanacr@quim.ucm.es (S. Campuzano).

https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341153
Received 21 February 2023; Received in revised form 21 March 2023; Accepted 27 March 2023
Available online 30 March 2023
0003-2670/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Introduction

Natural autoantibodies or autoantibodies (Abs) are immunoglobulins (Igs) found in the plasma of healthy individuals and directed against self-proteins. Immunoglobulin-mediated humoral immunity is essential for host defence against pathogens and toxins, and dysregulation of this process leads to immunodeficiency and autoimmune diseases such as Sjögren's syndrome, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus (SLE). The field of Abs-associated diseases has been expanded in the recent years to encompass, in addition to cancerous and autoimmune diseases, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) [1,2] and Parkinson's disease (PD) [3].

The effector functions of Abs are determined by their constant domain (Fc), which defines the antibody isotype and subclass. Autoantibodies can act as pathogenic molecules that mimic hormone stimulation of receptors, block neural transmission by binding to receptors, affect signalling pathways, lyse cells, and are associated with infections, neurodegeneration, autoimmunity and cancer, diseases characterized by the development of inflammatory processes [4,5]. These diseases can alter the isotype, structure, and function of Igs and consequently, their pathogenicity [6]. The B-cell response typically begins with the secretion of the pentameric IgM, after which a proportion of B cells undergoes the most prevalent and abundant isotype change and begin to produce IgG in serum, which is usually the most commonly used isotype in diagnostic tests showing personal specific signatures that tend to be stable over time [7], and in last step IgA, or IgE. It is also important to note that all these Ig isotypes appear years before the clinical manifestations of the diseases [8], so that their determination is of crucial importance for an early and reliable diagnosis or prognosis [9].

The serum level of Abs to nuclear antigens (ANAs-Abs) and, in particular of that bind to double-stranded DNA (dsDNA-Abs), is associated with a variety of rheumatologic diseases, mostly SLE, but also rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome or scleroderma and other conditions, including for example Graves' and Alzheimer's diseases [10,11]. In fact, these dsDNA-Abs represent one of the main diagnostic and classification criterion for SLE [12,13] and their hyperexpression is associated with multiple end-organ lesions in these patients, such as endothelial dysfunction in lupus nephritis, proatherogenic dyslipidaemia and accelerated atherosclerosis [13–15].

It is important to note that an accurate isotyping of these Abs is essential for a complete diagnosis, as it may have relevance in suggesting potentially common paths in response evolution, disease pathogenesis, and response to treatment [16]. For example, detection of dsDNA-hIgA seems to improve the ability to diagnose SLE and define the phenotype of lupus nephritis and active disease [12]. In contrast, dsDNA-hIgM might be protective for renal involvement [12,17,18], hIgG to hIgM (IgG/IgM) class ratio seems to be a significant parameter to distinguish patients with lupus nephritis from those without renal involvement [19], and dsDNA-hIgG induce cutaneous lupus erythematosus (CLE) [20].

These data support the hypothesis that clustering of dsDNA-Abs isotypes may help refine the diagnosis and prognosis of SLE [12]. Although these autoantibodies are more specific to autoimmune diseases, and particularly to SLE disorders, it is important to note that their association with inflammatory processes or the progression of neurodegenerative dementias has also been established [2,3,21].

A wide variety of methods have been reported for the determination of human dsDNA-Abs, mainly of the hIgG isotype, providing variable sensitivities depending on the bioassay setup, reagents and detection system used. Some of these methods involve fluorescence enzyme immunoassays (FEIA) [22,23] which, despite their good sensitivity, require complex instrumentation and cannot be miniaturized and transferred to point-of-care (POC) devices. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) have also been used and many are commercially available, with wells precoated with dsDNA strands [https://eaglebio.com/product/anti-dsdna-elisa-assay-kit/] [https://www.creative-diagnostics.com/dsDNA-Antibody-EIA-Kit-103850-462.htm]. These methods exhibit nonlinear calibration plots as well as variation coefficient values larger than 4% and, although they are widely used in centralized settings and clinical laboratories, they require specialized instrumentation and personnel and are not affordable in all settings.

Considering this background and the mentioned limitations, the opportunities offered by electroanalytical bioplatforms for the determination of clinical biomarkers in terms of simplicity, affordable cost, and POC applicability, have been applied to the single [24–26] or multiplexed [27,28] determination of hIgG Abs of relevance in autoimmune [24–26,28] and/or degenerative [27] diseases. This work expands the application of one of these previous works [24] to the development of a bioplatform for the quadruple determination of both the individual most prevalent isotypes (hIgG, hIgM and hIgA) and their total content (three hIgs) of human dsDNA-Abs. The bioplatform involves the simultaneous preparation of four neutravidin-modified commercial magnetic microcarriers batches on which a biotinylated dsDNA prepared in the laboratory from a human plasmid is immobilized and used to selectively capture the dsDNA-Abs. The bioconjugates were enzymatically labeled with HRP-conjugated secondary antibodies for hIgG, hIgA or hIgM, for the determination of each isotype, or with a mixture of the three secondary antibodies for the determination of the total content of the three hIgs classes. Each bioconjugates batch was trapped on one of the four working electrodes available at the disposable multi-transduction platform and the quadruple determination was performed by amperometry in the presence of the H_2O_2/hydroquinone (HQ) system and applying a potential of −0.20 V (vs. the Ag pseudo-reference electrode). After characterizing its analytical performance, the bioplatform was applied to the quadruple amperometric determination of the individual and total content of the three human dsDNA-Abs isotypes in serum samples from healthy subjects and from patients with SLE or AD.

2. Experimental section

2.1. Reagents and solutions

The dsDNA-Abs standards (prepared in a serum/buffer matrix), a mixture of horseradish peroxidase (HRP)-labeled rabbit polyclonal anti-human IgG, anti-human IgM and anti-human IgA antibodies (HRP-anti-human IgG/IgM/IgA mixture), sample buffer (5 × , Tris, NaN_3 < 0.1% (w/w)) and washing buffer (50 × , PBS, NaN_3 < 0.01% (w/w)) were supplied in the dsDNA Antibody ELISA Kit from Creative Diagnostics (Cat. No. DEIA1681). HRP-anti-human IgG (HRP-antihIgG, Cat. No. ab97225) was purchased from Abcam, HRP-anti-human IgM (HRP-antihIgM, Cat. No. 109-035-129) and HRP-anti-human IgA (HRP-antihIgA, Cat. No. 109-035-011) were from Jackson ImmunoResearch. Lyophilized human serum from clotted whole blood (Cat. No. S2257) purchased from Sigma Aldrich was used in the matrix effect studies.

Neutravidin-modified magnetic microparticles (NA-MBs, Ø = 1 μm, 10 mg mL^{-1}, Cat. No. GE78152104010350) were purchased from SpeedBeads™.

Human serum IgG (hIgG, Cat. No. I2511), human serum albumin (HSA, Cat. No. A1653) and human hemoglobin (HB, Cat. No. H7379) from Sigma-Aldrich were used for selectivity studies. Hydroquinone (HQ) and hydrogen peroxide (H_2O_2, 30% v/v), purchased from Sigma-Aldrich, were used for amperometric transduction.

Biotinylated dsDNA from human plasmid was prepared as previously reported [24].

Sodium chloride, potassium chloride, sodium dihydrogen phosphate, disodium hydrogen phosphate and Tris-hydroxymethyl-aminomethane-HCl (Tris-HCl) were from Scharlab. Purified water using the Milli-Q purification system (18.2 MΩ) was used to prepare all buffer solutions: 10 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 1 mM EDTA and 2 mM NaCl (B&W buffer) and 50 mM phosphate buffer (PB) solution pH 6.0 (measurement buffer). Commercial Blocker™ Casein in PBS (blocking buffer,

BB) was acquired from Thermo Fisher Scientific (Cat. No. 37528).

The solutions used to perform amperometric detection include 100 mM HQ and 100 mM H_2O_2 and were prepared fresh in 50 mM PB pH 6.0.

2.2. Apparatus and electrodes

All the amperometric measurements were performed at room temperature using a CHI812B potentiostat (CH Instruments, Inc.) controlled by CHI812B software, and employing screen-printed carbon electrodes (SPCEs) with one carbon working electrode (SPCE, DRP110, 4 mm Ø), a carbon auxiliary electrode and a Ag pseudo-reference electrode with its corresponding specific cable connector (DRP-CAC) and quadruple screen-printed carbon electrodes (SP_4CEs) with four carbon working electrodes (DRP-4W110, 2.95 mm Ø) with shared carbon auxiliary and Ag pseudo-reference electrodes and the specific cable connector (DRP-CONNECT4W), for single or quadruple determination respectively, supplied by Metrohm-DropSens S.L. Glass 10- or 20-mL electrochemical cells, and homemade polymethylmethacrylate (PMMA) housings with one or four neodymium magnets (AIMAN GZ) embedded where SPCEs or SP_4CEs were placed, were used to ensure stable and reproducible capture of magnetic bioconjugates on the working electrodes.

A DynaMag-2 magnetic concentrator (Cat. No: 12321D, Dynabeads®, Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific), a Bunsen AGT-9 vortexer, a MT100 Thermo-shaker (Universal Labortechnik), a Crison pH-meter model Basic 20+, a Heidolph Reax Top homogenizer for small samples, and an MPW-65R centrifuge (Med. Instruments) were also employed.

Spectrophotometric ELISA measurements were performed with a Sunrise™ Tecan microplate reader using the Magellan V 7.1 software.

2.3. Procedures

2.3.1. Preparation of the magnetic bioconjugates

The protocols for the modification of the magnetic microsupports with the b-dsDNA and their use for the selective capture of the dsDNA-Abs are similar to those reported previously [24] with changes regarding the enzymatic labeling of the captured dsDNA-Abs. Incubation and washing steps were carried out with 25 and 50 μL, respectively, assisted by a thermostatic incubator with agitation (950 rpm, 25 °C) or a magnetic concentrator. Briefly, for each determination, 5 μL of the commercial suspension of NA-MBs were modified by incubation for 30 min with 100 ng b-dsDNA (prepared in B&W buffer). After two washings with wash buffer, the as prepared conjugates were incubated for 30 min with the standard solution or the sample to be analyzed (prepared in sample buffer) for the selective capture of the dsDNA-Abs. The resulting Abs-dsDNA-b-NA-MBs were incubated with 75 μL of the commercial mixture HRP-antihIgG/IgM/IgA or with 25 μL of 1.0 μg mL^{-1} HRP-antihIgG or 1000-fold diluted HRP-antihIgM or HRP-antihIgA (all prepared in BB) for 30, 15 and 45 min to interrogate dsDNA-three hIgs, hIgG, and hIgM/hIgA, respectively.

It is important to note that for the determination of both individual and total content of the 3 isotypes, the dsDNA-Abs calibrators supplied in the dsDNA Antibody ELISA Kit from Creative Diagnostics (Cat. No. DEIA1681) were used as standards.

The resulting bioconjugates were washed twice with 50 μL of wash buffer and resuspended in 50 or 5 μL of 50 mM PB buffer pH 6.0 to perform single or quadruple amperometric transduction, respectively.

2.3.2. Amperometric detection

The suspension of the magnetic microparticles modified with the bioconjugates was deposited on the corresponding working surface of each electrode (SPCE or SP_4CEs), which was previously placed in a homemade PMMA casing with the embedded neodymium magnets, allowing the magnetic trapping of the microparticles.

Amperometric transduction was carried out under constant stirring (400 rpm) by immersing the casing/electrode assembly with the captured magnetic bioconjugates in a cell containing 10 or 20 mL of 50 mM PB buffer pH 6.0 and 100 or 200 μL of a freshly prepared 100 mM HQ solution in the same measuring buffer, for single or quadruple detection, respectively, so that the electrodes were oriented towards the place where the H_2O_2 addition was made. A constant potential of −0.20 V (*vs.* the Ag pseudo-reference electrode) was applied, and when the background current was stabilized (approximately 50 s), 50 or 100 μL of a 100 mM H_2O_2 solution (freshly prepared in PB 50 mM pH 6.0) were added, producing a cathodic current variation attributed to enzymatic reduction of the H_2O_2 mediated by HQ, which again reached the steady state.

The amperometric responses given in the manuscript corresponded to the difference between the steady state current reached after the addition of H_2O_2 and the background current and are the mean values of three replicates. The error bars shown in the figures were estimated as three times the standard deviation of the replicates ($\alpha = 0.05$).

It is important to note that we performed amperometric measurements in stirred solutions instead of using drops of quiescent solutions to avoid the "false increase" of the cathodic current that occurs in quiescent solutions after the addition of H_2O_2 because of the increase of its local concentration near the electrode surface which decreases as the diffusion progresses. Nevertheless, previous works with SPCEs [29] and SP_4CEs [30] showed that there was no significant difference between the results obtained with the two ways of measurement.

2.3.3. Analysis of serum samples

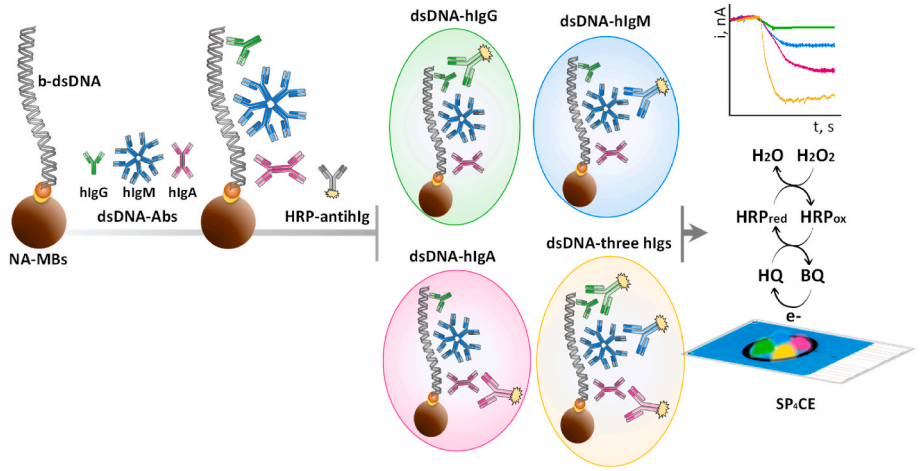
The developed biosensing multiplatform was applied to the determination of the individual and total content of the mentioned dsDNA-Abs isotypes in real human serum samples from healthy individuals and from patients diagnosed with SLE and AD. Serum samples from healthy individuals and SLE patients were purchased from an online marketplace for human biospecimens (Central BioHub®), while serum samples from AD patients were obtained from the BT-CIEN. The samples were stored at −40 °C or −80 °C, respectively, until use. Written informed consents were obtained from all subjects and patients participating in the study. All experiments were performed in compliance with all ethical aspects and relevant guidelines and regulations of the involved institutions.

After confirming the absence of matrix effect in serum samples diluted 100-fold or more, the determinations were performed by interpolation of the amperometric responses provided by the bioplatforms for 100-fold diluted serum samples into the calibration plots constructed with the dsDNA-Abs calibrator standards.

The serum samples were also analyzed using the same reagents by single ELISA kits for each target. ROC curves (Receiver Operating Characteristic Curve) of individual and in combination autoantibodies were obtained with R (version 3.6.2), using the "ModelGood" and the "Epi" packages to determine the diagnostic ability of the test. Cut-off values for separation of the indicated groups were calculated with GraphPad Prism 8 program [31].

3. Results and discussion

This work reports the first bioplatform that allows both individual and total determination of the three most relevant isotypes of human dsDNA-Abs (hIgG, hIgM and hIgA). For this purpose, and as it is illustrated in Scheme 1, dsDNA-Abs were efficiently captured on commercially available NA-functionalized magnetic microcarriers modified with a b-dsDNA produced in the laboratory from a human plasmid (dsDNA-b-NA-MBs). The Abs captured on the dsDNA-b-NA-MBs were enzymatically labeled with HRP-conjugated secondary antibodies selective to each isotype or with a mixed solution of all of them. Thus, for quadruple transduction, four batches of magnetic bioconjugates were prepared simultaneously and differentially enzymatically labeled to allow the determination of dsDNA-hIgG, dsDNA-hIgM, dsDNA-hIgA or dsDNA-three hIgs. These batches were captured on each of the working



Scheme 1. Fundamentals of the bioplatform functioning developed for the single or total amperometric multidetermination of the human dsDNA-Abs (hIgG, hIgM, and hIgA isotypes) on disposable platforms. The reactions involved in the amperometric transduction are also displayed.

electrodes of a SP_4CEs, and amperometry at $E_{app} = -0.20$ V *vs.* Ag pseudo-reference electrode, in stirred solutions and in the presence of the H_2O_2/HQ system was employed to measure cathodic current variations which were proportional to the concentration of each target.

3.1. Optimization of the experimental variables

The working conditions for the amperometric transduction on SPCEs using the HRP/H_2O_2/HQ system were previously optimized [32]. Similarly, the conditions used for the preparation of dsDNA-b-NA-MBs,

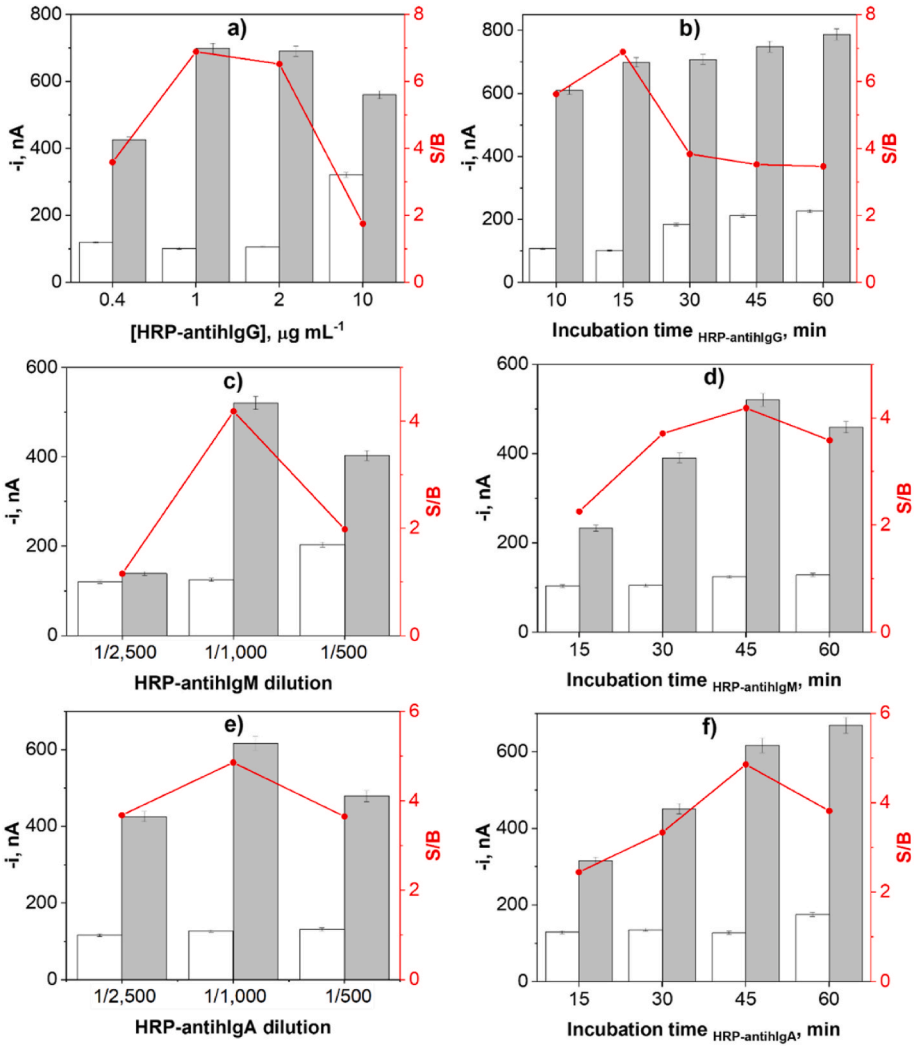


Fig. 1. Amperometric responses for 0 and 25 U mL^{-1} of the dsDNA-Abs calibrator measured with the bioplatforms for the individual determination of human isotypes of dsDNA-Abs (hIgG, hIgM and hIgA) upon variation of the concentration/dilution (a, c, e) and incubation time (b, d, f) of the HRP-labeled secondary antibodies (a and b: HRP-antihIgG; c and d: HRP-antihIgM; e and f: HRP-antihIgA). The values of the corresponding S/B ratios are shown in circles and red lines. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 1
Experimental variables evaluated for the amperometric determination of human isotypes of dsDNA-Abs.

Variable	dsDNA-Abs isotype	Tested range	Selected value
HRP-antihIg concentration/ dilution	hIgG	0.5–10 μg mL^{-1}	1.0
	hIgM	1/2500–1/500	1/1000
	hIgA		
HRP-antihIg incubation time, min	hIgG	10–60	15
	hIgM	15–60	45
	hIgA		

the capture of dsDNAs-Abs and the joint enzymatic labeling of the three isotypes were optimized before [24]. Therefore, only the conditions involved in the enzymatic labeling of each individual isotype, i.e., concentration/dilution and incubation time with the corresponding secondary antibody were checked for the development of the quadruple bioplatform. For this purpose, the amperometric responses provided by the SPCEs bioplatforms for each isotype for 0 (B signal) and 25 (S signal) U mL^{-1} of the dsDNA-Abs calibrator supplied in the corresponding ELISA kit, were measured and the S/B ratio calculated. The obtained results are shown in Fig. 1 and summarized in Table 1.

As can be seen in Fig. 1, similar trends were observed for both variables concerning the three HRP-secondary antibodies. The S/B ratios increased with the HRP-labeled secondary antibody concentration and the incubation time up to a value, and showed a decrease for larger concentrations or longer incubation times due to the noticeable increase of the non-specific responses compared to the specific ones. It is important to note that better ratios for both variables were attained at the same value for the secondary antibodies used to recognize hIgM and hIgA isotypes (1/1000 dilution and 45 min incubation time). In the case of the hIgG isotype, better S/B ratios were obtained by incubating the Abs-dsDNA-b-NA-MBs for 15 min in a 1.0 μg mL^{-1} of HRP-antihIgG solution.

3.2. *Analytical and operational characteristics for the individual and total quadruple amperometric determination of the three isotypes of dsDNA-Abs*

The feasibility of the multiplexing approach allowing the simultaneous determination of the individual and total content of the three target human isotypes of dsDNA-Abs, was confirmed by the results shown in Fig. 2. The quadruple amperometric determination involved the preparation of independent magnetic conjugates for the determination of dsDNA-hIgG, dsDNA-hIgM, dsDNA-hIgA and dsDNA-three IgG, according to the selected conditions summarized in Table 1. Once the four independent batches were prepared, the quadruple amperometric transduction at the SP_4CEs was performed. It is worthy to mention that the amperometric responses recorded at the SP_4CEs are 70–80% smaller than those obtained by capturing the same bioconjugates on SPCEs due to the differences in the geometric area of the working electrodes (6.8 mm^2 for SP_4CEs vs. 12.6 mm^2 for SPCEs). However, there were no significant differences between the S/B ratios calculated using the SPCE or the SP_4CEs (4.4 *vs.* 4.3 for dsDNA-hIgG; 2.4 *vs.* 2.4 for dsDNA-hIgM; 2.4 *vs.* 2.3 for dsDNA-hIgA; 3.6 *vs.* 3.5 for dsDNA-three hIgs, respectively). In addition to the feasibility of multiplexing, the obtained results show that no significant cross-reactivity occurred between the four adjacent working electrodes of the SP_4CEs.

The analytical and operational characteristics of the bioplatform for the quadruple amperometric determination of dsDNA-hIgG, dsDNA-hIgM, dsDNA-hIgA and dsDNA-three hIgs were established. The calibration plots constructed using the dsDNA-Abs calibrators of the commercial kit are shown in Fig. 3 and the corresponding parameters summarized in Table 2.

The data summarized in Table 2 show that the quadruple bioplatform exhibit concentration ranges and LOD values suitable for the determination of these biomarkers in serum from patients diagnosed with autoimmune diseases. It is important to note that the most widely accepted cut-off value in serum for the discrimination of patients with SLE is 100 U mL^{-1} of dsDNA-Abs [33], which is about two orders of magnitude larger than the LOD values achieved with the developed bioplatform. It is also important to remark the great reproducibility of the whole process involving both the bioconjugates manufacturing and the quadruple amperometric transduction at SP_4CEs. Interestingly, an excellent storage stability of the dsDNA-b-NA-MBs was obtained showing that no significant loss of sensitivity of the as prepared bioplatforms was observed after 40 days of the dsDNA-b-NA-MBs preparation. Importantly, and counting since this preparation, the quadruple determination (dsDNA-hIgG, dsDNA-hIgM, dsDNA-hIgA and dsDNA-three hIgs) can be completed in only 1 h and 15 min.

To our knowledge, only two others electrochemical bioplatforms have been reported so far for the determination of dsDNA-Abs. One of these works reports the single determination of dsDNA-hIgGs [34], while other deals with the determination of dsDNA-three hIgs [24]. The work of Rubin et al. describes a continuous flow biosensor involving immobilization of native dsDNA on a porous membrane coupled to an eight-electrode array and claimed a 5-times lower LOD than that achieved with the developed bioplatform (10 *vs.* 50 μg mL^{-1}). However, such biosensor required 16 h and 90 μg of dsDNA for preparing the dsDNA-coated membrane compared to the 30 min and 100 ng of dsDNA required for the preparation of the dsDNA-b-NA-MBs. In addition, the obtained results evidenced that the transduction on the quadruple platforms had a very scarce influence on the achieved LOD for dsDNA-three hIgs, when compared with the single transduction (0.56 vs 0.30 U mL^{-1} [24]), which, as commented above, must be attributed to the smaller area of the SP_4CEs working electrodes compared to the SPCEs.

When the comparison is made versus the commercially available ELISA methodologies, it is important to note that most of them determine the total IgG, IgM and IgA class Abs [Abbexa, Cat. No. abx364947; Creative Diagnostics, Cat. No. DEIA1681; MyBiource, Cat No.

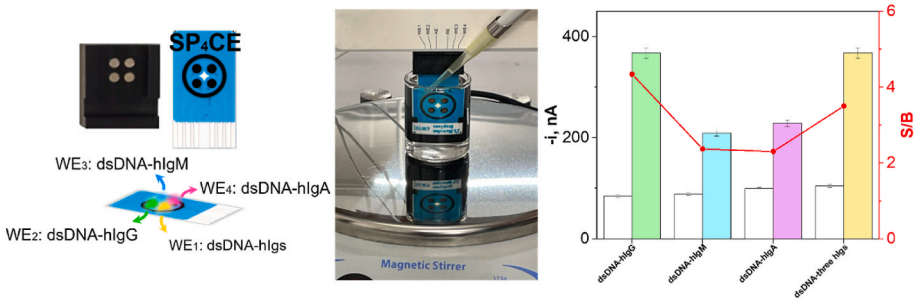


Fig. 2. Drawing with the type of magnetic bioconjugates captured on each working electrode of the SP_4CEs to perform the quadruple amperometric determination of the target antibodies and real image of the electrode setup used for quadruple amperometric determinations with the developed bioplatform. Amperometric responses measured for 0 (white bars, B signal) and 25 (grey bars, S signal) U mL^{-1} of the enzymatically marked dsDNA-Abs calibrator for determination of dsDNA-hIgG, dsDNA-hIgM, dsDNA-hIgA and dsDNA-three hIgs at SP_4CEs. The values of the corresponding S/B ratios are shown in circles and red lines. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

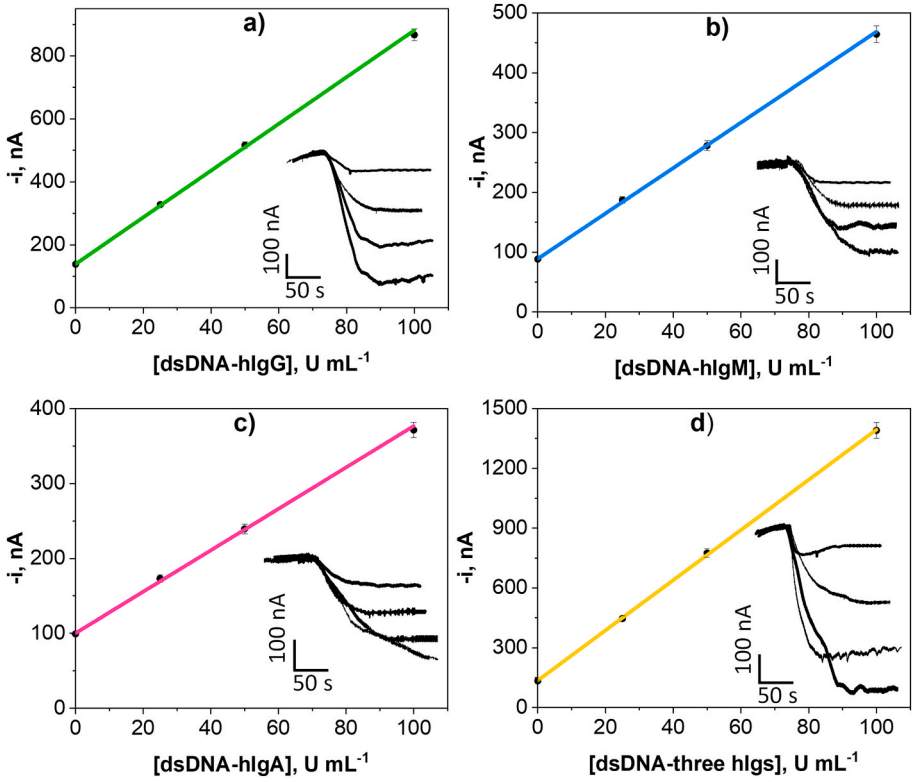


Fig. 3. Calibration graphs and real amperometric traces recorded with the quadruple bioplatform for the amperometric determination of dsDNA-hIgG a), dsDNA-hIgM b) dsDNA-hIgA c) and dsDNA-three hIgs.

MBS269122; ELISAKITS.co.uk, Anti-dsDNA Screen ELISA Kit] or the individual IgG class content [ImmunoDiagnostics Limited, Cat. No. 31A040; Signosis, Cat. No. EA-500; Eagle Biosciences, SKU: DSD31-K01; Cusabio, Cat. No. CSB-E04911h; MyBiource, Cat No. MBS2601760; ELISAKITS.co.uk, Anti-dsDNA IgG ELISA Kit]. Nevertheless, some companies, such as ELISAKITS.co.uk and MyBiource, offer different kits that allow the individual or total determination of hIgG, hIgM, and hIgA isotypes. These kits have adequate sensitivity with LOD values of around 1 U mL^{-1}. However, to our knowledge, there are no kits available that allow the simultaneous determination of individual isotypes and their total content. Moreover, the ELISA kits must be used with instrumentation that is difficult to miniaturize and by trained personnel, aspects in which the proposed bioplatform could lead the way.

3.3. Selectivity

As it was previously reported [24], the significant interference observed in the presence of non-dsDNA-related hIgs for the determination of dsDNA-related hIgs, which was attributed to the not target hIgs non-specific adsorption on the magnetic microcarriers, was efficiently corrected by subtracting the current measured for the appropriately diluted commercial synthetic serum sample from the response of a real sample. Therefore, in this work we only evaluated the influence of the presence of HSA and HB on the determination of hIgGs, hIgMs and hIgAs. The amperometric responses obtained for 0 and 25 U mL^{-1} of the dsDNA-Abs calibrators, prepared in the absence and in the presence of both interferents at their normal concentrations in serum are shown in Fig. 4. As it can be observed, the presence of HB did not interfere with the determination of the three isotypes. However, the presence of HSA did affect the determination of hIgGs and hIgAs. This effect can be attributed to the presence of hIgG in the not completely purified HSA [35]. The fact that HSA interfered for hIgG and hIgA and not for hIgM may be justified by the different secondary antibodies used for their enzymatic labeling and/or to the structures of these isotypes which are more similar, monomeric and/or dimeric, in the case of hIgG and hIgA and more different, pentameric, in hIgM. However, it is

Table 2
Analytical, operational and storage characteristics of the quadruple bioplatform constructed for the individual and total amperometric determination of dsDNA-hIgG, dsDNA-hIgM, dsDNA-hIgA and dsDNA-three hIgs.

Characteristic	dsDNA-Abs			
	hIgG	hIgM	hIgA	Three hIgs
Linear range, U mL^{-1}	3.4–100	5.0–100	5.9–100	1.9–100
Slope, mL (nA U)$^{-1}$	7.4 ± 0.1	3.80 ± 0.06	2.76 ± 0.06	12.6 ± 0.1
Intercept, nA	139 ± 2	89 ± 1	100 ± 2	136 ± 7
LOD*, U mL^{-1}	1.01	1.49	1.77	0.56
LOQ**, U mL^{-1}	3.4	5.0	5.9	1.9
RSD, % (n = 5, 25 U mL^{-1} dsDNA-Abs calibrators)	2.2	3.0	2.8	2.9
Storage stability of dsDNA-b-NA-MBs (S/B for 25 U mL^{-1} dsDNA-Abs calibrators)**	40 days			

*3 × s_b/m and ** 10 × s_b/m, s_b is the standard deviation of 10 blank measurements and m is the slope of the calibration plots. **Stored in 10 mM filtered PBS (pH 7.4) at 4 °C.

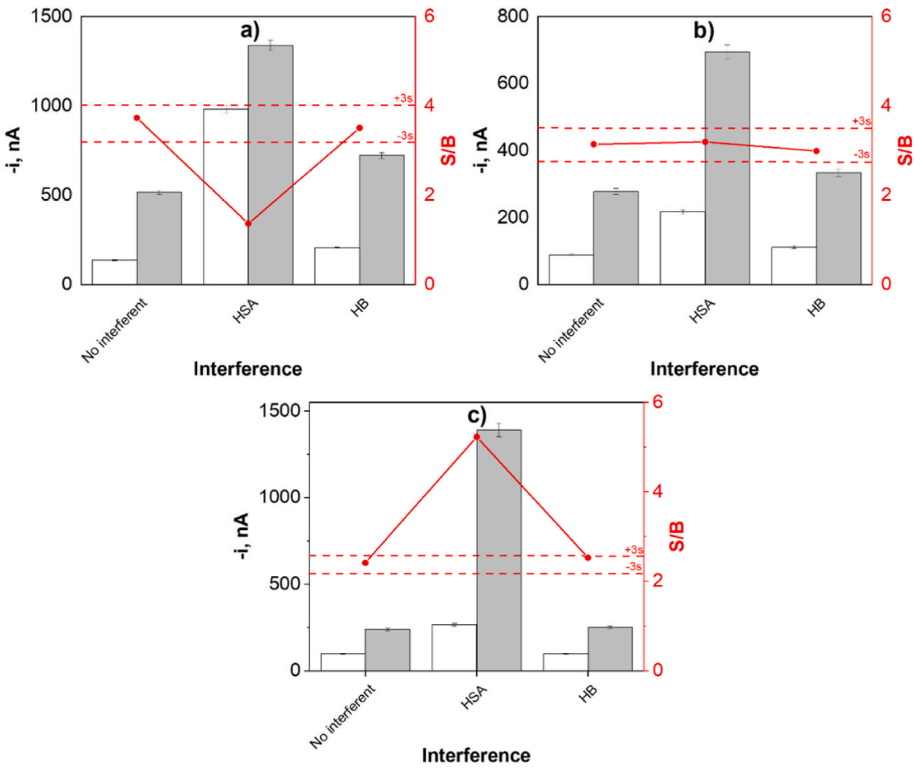


Fig. 4. Comparison of the amperometric responses (and the corresponding S/B ratios in red) for dsDNA-hIgG a), dsDNA-hIgM b) and dsDNA-hIgA c) provided by the developed quadruple bioplatform for 0 and 25 U mL^{-1} of the dsDNA-Abs calibrators prepared in the absence and in the presence of 50 mg mL^{-1} HSA and 5 mg mL^{-1} HB. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

important to note that, as it was previously reported for the interference of hIgs non-specific to dsDNA, the interference of HSA became negligible upon a 100-fold sample dilution.

3.4. Application to the analysis of serum samples

The developed quadruple bioplatform was applied to the determination of the individual and total content of the target hIgs in eight different serum samples (3 from healthy individuals, 3 from SLE patients and 2 from AD patients).

Table 3 compares the slope values of the calibration plots constructed with buffered standards and in a 100-fold diluted human commercial serum sample. The statistical comparison confirmed the absence of matrix effect under these conditions. Accordingly, the individual and total endogenous contents of the target hIgs were determined by interpolation of the responses resulting of subtracting the current measured for the 100-fold diluted commercial synthetic serum sample from the response of analyzed sample (also 100-fold diluted) [24] into the calibration plots for the dsDNA-Abs standards in buffered solutions.

Table 3
Statistical comparison between the slope values (mL nA U^{-1}) of the calibration plots constructed with the multiplexed bioplatform for the dsDNA-hIgG, dsDNA-hIgM, dsDNA-hIgA, and dsDNA-three hIgs prepared in buffered solutions and in a 100-fold diluted commercial human serum sample.

	Buffered solutions	100-fold diluted commercial human serum	t_{exp}*
dsDNA-hIgG	7.4 ± 0.1	7.2 ± 0.3	0.255
dsDNA-hIgM	3.80 ± 0.06	3.5 ± 0.2	1.126
dsDNA-hIgA	2.76 ± 0.06	2.67 ± 0.02	0.649
dsDNA-three hIgs	12.6 ± 0.1	12.3 ± 0.2	1.608

*t_{exp} estimated by comparing the slope value obtained for standards prepared in the corresponding matrix and in buffered solutions, $t_{tab} = 2.776$, $n = 4$, $\alpha = 0.05$.

The results obtained in the analysis of the serum samples are shown in Fig. 5 and summarized in Table 4, which also shows the concentrations found when the same samples were analyzed using individual ELISA kits involving the same immunoreagents.

As expected, the contents of the three isotypes are significantly larger in patients diagnosed with SLE and AD compared to healthy individuals.

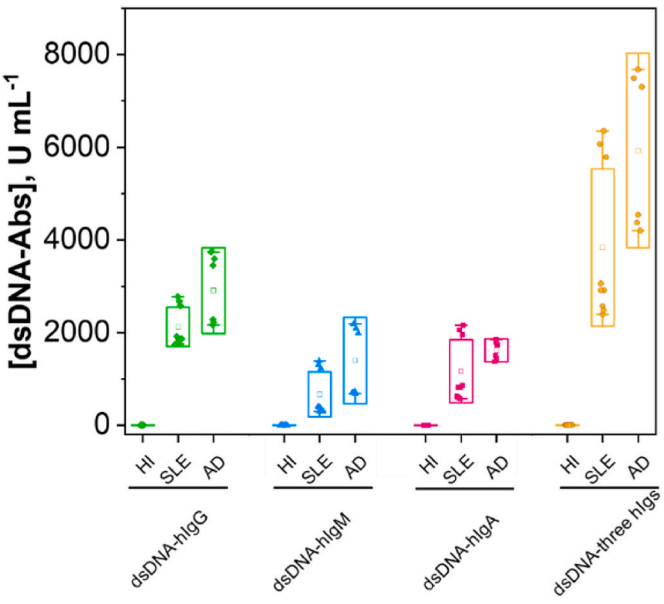


Fig. 5. Endogenous content (including values of all replicas) of dsDNA-hIgG, dsDNA-hIgM, dsDNA-hIgA and dsDNA-three hIgs provided by the multiplexed bioplatform for the analysis of serum samples grouped into pools of healthy individuals (HI), SLE and AD patients.

Table 4
Endogenous content (in U mL^{-1}, mean value ± ts/$\sqrt{n}$; n = 3; α = 0.05) of the dsDNA-Abs (hIgG, hIgM, hIgA and three hIgs) provided by the quadruple bioplatform developed in this work as well as by using the individual ELISA methodologies for serum samples from healthy individuals and patients diagnosed with SLE and AD.

		Multiplexed bioplatform				ELISA			
		hIgG	hIgM	hIgA	Three hIgs	hIgG	hIgM	hIgA	Three hIgs
Control	1	5.3 ± 0.4	1.5 ± 0.2	2.2 ± 0.2	9.2 ± 0.5	5.1 ± 0.4	1.4 ± 0.3	2.1 ± 0.2	8.7 ± 0.8
	2	2.6 ± 0.2	2.4 ± 0.2	1.0 ± 0.1	6.2 ± 0.5	2.6 ± 0.3	2.5 ± 0.3	1.0 ± 0.2	6.0 ± 0.8
	3	4.6 ± 0.8	2.9 ± 0.4	1.5 ± 0.2	9.0 ± 0.6	4.6 ± 0.8	3.0 ± 0.5	1.4 ± 0.2	9.5 ± 0.8
SLE	4	2677 ± 242	1308 ± 198	2056 ± 247	6070 ± 701	2614 ± 493	1324 ± 244	2060 ± 261	6035 ± 802
	5	1921 ± 137	312 ± 28	862 ± 116	3056 ± 356	1851 ± 240	301 ± 33	842 ± 141	3096 ± 520
	6	1808 ± 143	387 ± 40	602 ± 72	2843 ± 217	1735 ± 264	384 ± 48	614 ± 121	2636 ± 309
AD	7	3594 ± 362	2088 ± 245	1796 ± 148	7490 ± 464	3316 ± 583	2128 ± 367	1707 ± 242	6763 ± 1344
	8	2224 ± 149	706 ± 57	1439 ± 158	4373 ± 425	2119 ± 348	664 ± 92	1485 ± 248	4180 ± 862

The results are also consistent with the fact that hIgG is the predominant Ig class in human serum. Furthermore, the concentration determined for the three subclasses agreed with the arithmetic sum of the individual contents.

As occurred with other biomarkers, the cut-offs and reference values established for dsDNA-Abs are dependent on the method, testing laboratory and bioreagents involved, which reveals a lack of standardization [36]. Nevertheless, the results provided by the bioplatform are consistent with the serum cut-off value established in most commercial ELISA kits for diagnosing SLE by interrogating dsDNA-Abs or dsDNA-hIgG (20−25 U mL^{-1}) [Creative Diagnostics, Cat. No. DEIA1681; Immuno-Diagnostics Limited, Cat. No. 31A040; ELISAKITS.co.uk, Anti-dsDNA Screen ELISA Kit; ELISAKITS.co.uk, Anti-dsDNA IgG ELISA Kit]. The results are also consistent with those reported by Gargiulo et al. [33] and Abdel-Rahman Elsayed et al. [37] (>100 and 49 U mL^{-1} for dsDNA-Abs, respectively), by González-Rodríguez for the determination of dsDNA-hIgG (10–45 U mL^{-1}) [36]), and by Villalta et al., 73.5, 69.5 and 28 U mL^{-1} for hIgG, hIgM and hIgA, respectively, to discriminate between positive and negative SLE samples [12]. It is also important to note that some commercial ELISA kits (e.g. Quanta Lite™ dsDNA Kit, INOVA Diagnostic Inc, CA, USA and Warde Medical Cat. No 3000200 Laboratory), classify the sample results as: negative: 0−200 U mL^{-1}; equivocal: 201−300 U mL^{-1}; moderately positive: 301−800 U mL^{-1} and strongly positive >801 U mL^{-1} [10]. According to this criterion, the contents obtained with the bioplatform for the analyzed patients would be strongly positive.

Regarding the results on patients with AD, although the literature echoes the relationship of dsDNA-Abs with this disease [10,11], no cut-off values have been reported to confront the results obtained with the developed bioplatform. In fact, the provided results are the first contents described in the literature for this type of patients. Therefore, an exhaustive validation of these biomarkers is still necessary for AD patients.

Importantly, the correlations plots displayed Fig. 6 between the results obtained with the developed bioplatform and the individual ELISA kits, with slope and intercept values including 1 and 0, respectively, confirmed the excellent agreement of the results provided by both methodologies.

Despite the limited size of the patient's cohort, an analysis of the results by means of ROC curves was performed (Table 5). The resulting parameters showed that the bioplatform allowed a full discrimination between healthy individuals and SS or AD patients with AUCs, sensitivity and specificity of 100% for individual hIgG, hIgM, or hIgA isotypes and all three hIgs. However, the bioplatform was unable to fully

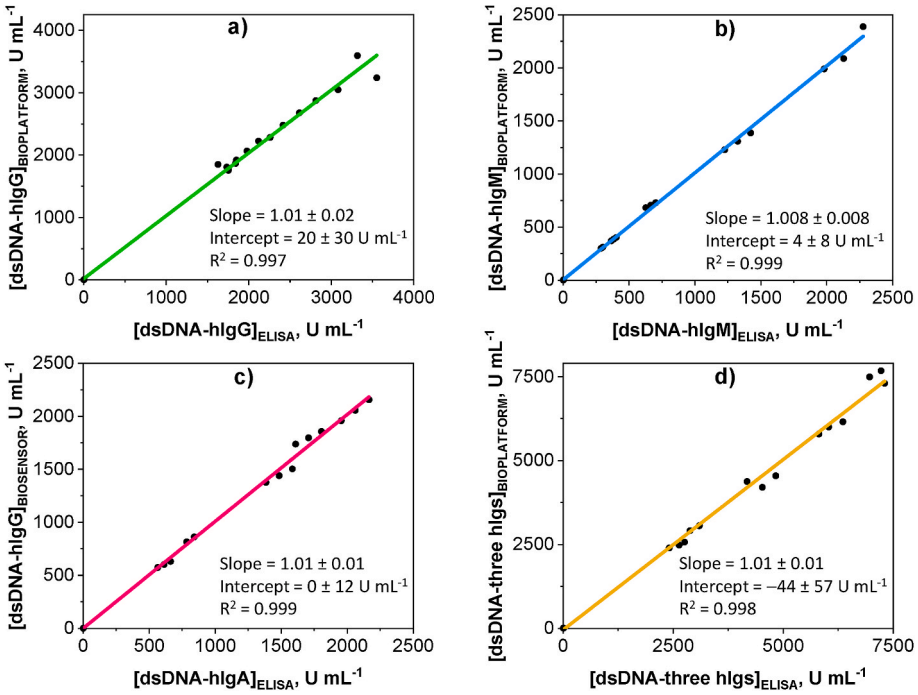


Fig. 6. Correlation plots between the concentrations obtained by the developed multiplexed bioplatform and the individual ELISA methodologies for the determination of the target dsDNA-Abs.

Table 5
Potential of the four-target dsDNA-Abs (1: hIgG, 2: hIgM, 3: hIgA and 4: three hIgs) considered individually or in combination to discriminate autoimmune and neurological diseases and serum cut-off values.

Parameter	Healthy *vs.* SS					Healthy *vs.* AD					SLE *vs.* AD				
	1	2	3	4	All[a]	1	2	3	4	All[a]	1	2	3	4	All[a]
AUC	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83.3	83.3	66.7	83.3	100
Sensitivity	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Specificity	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	66.7	66.7	66.7	66.7	100
Cut-off (U mL^{-1})	907	157	302	1426	–	1115	354	721	2191	–	2073	546	1151	3715	–

[a] Considering the results of the four target Abs together.

discriminate SLE from AD patients, due to the partial overlapping in the concentration of patients. However, sensitivities of 100%, specificities larger than 66.7% and AUCs of 83.3% for hIgG, hIgM and all three hIgs, with a lower value for hIgA, which is the less concentrated immunoglobulin in blood, were achieved. Therefore, in combination, the four-target dsDNA-Abs showed full ability to discriminate either healthy individuals *vs.* SLE or AD patients, or SLE *vs.* AD individuals. The analysis of the results obtained with the developed quadruple bioplatform by means of ROC curves allowed us to establish the cut-off values shown in the last row of Table 5 for each target dsDNA-Abs isotype to discriminate patients with SLE or AD from healthy individuals, and between SLE and AD patients.

4. Conclusions

The first bioplatform allowing the simultaneous determination of the individual and total content of the three most common isotypes of dsDNA-Abs is reported. The strategy is based on the efficient capture of dsDNA-Abs, assisted by magnetic microsupports modified with a human dsDNA prepared in the laboratory, their differential enzymatic labeling using individual secondary antibodies or a mixture of them, and their trapping on the working electrodes of a disposable multiplexing platform to perform amperometric quadruple transduction.

The developed quadruple bioplatform exhibits suitable analytical and operational operability characteristics for the diagnosis of SLE patients according to the most widely accepted cut-off values in serum. The bioplatform was applied to the individual and total analysis of the target hIgs subclasses in serum samples from healthy individuals and from patients diagnosed with SLE and AD. The obtained results show that the bioplatforms are bioanalytical tools competitive in terms of simplicity, speed, cost, information provided and applicability by low-specialized personnel and at the POC, with other available methodologies to perform the isotyping of this type of serum antibodies in patients with SLE and AD, thus contributing to the advance towards a more personalized diagnosis and to investigate the clinical potential that these antibodies and the different isotypes can play in the diagnosis and prognosis of many diseases other than SLE.

Funding

The financial support of PID2019-103899RB-I00 and PID2021-122457OB-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación) Research Projects, PI17CIII/00045 and PI20CIII/00019 Grants from the AES-ISCIII Program co-founded by FEDER funds and the TRANSNANOAVANSENS-CM Program from the Comunidad de Madrid (Grant S2018/NMT-4349) are gratefully acknowledged. B.A. acknowledges predoctoral contracts from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovacion y Universidades (PRE2019-087596). M.G-A. acknowledges the postdoctoral contract Margarita Salas for the requalification of the Spanish University System. A.M-C. was supported by a FPU predoctoral contract supported by the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

CRediT authorship contribution statement

Beatriz Arévalo: Methodology, Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **Verónica Serafín:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **Maria Garranzo-Asensio:** Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **Ana Montero-Calle:** Investigation, Writing – review & editing, Writing – original draft. **Rodrigo Barderas:** Supervision, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft, Funding acquisition. **Paloma Yáñez-Sedeño:** Supervision, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft, Funding acquisition. **Susana Campuzano:** Conceptualization, Supervision, Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft, Funding acquisition. **José M. Pingarrón:** Resources, Writing – review & editing, Writing – original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

References

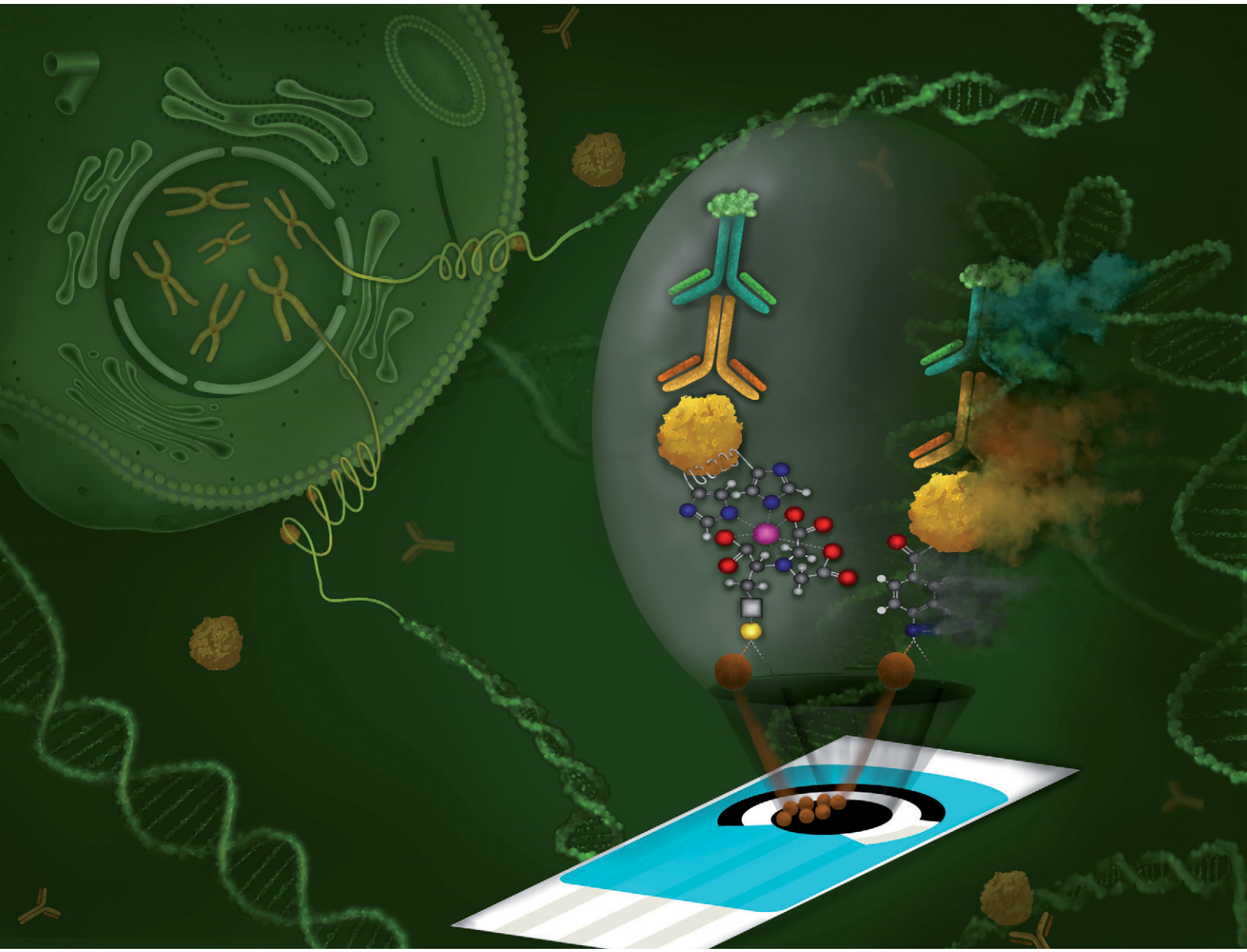
[1] P. Mecocci, R. Ekman, L. Parnetti, U. Senin, Antihistone and anti-dsDNA autoantibodies in Alzheimer's disease and vascular dementia, Biol. Psychiatry 15 (1993) 380–385.
[2] F. Arshad, S. Alladi, F. Varghese, S. Ramakrishnan, S. Nashi, A. Mahadevan, Pathogenesis of degenerative dementia: emerging role for inflammation, Alzheimer's Dementia 16 (Suppl.2) (2020), e045973.
[3] M. Benkler, N. Agmon-Levin, S. Hassin-Baer, O.S. Cohen, O.-D. Ortega-Hernandez, A. Levy, et al., Immunology, autoimmunity, and autoantibodies in Parkinson's disease, Clin. Rev. Allergy Immunol. 42 (2012) 164–171.
[4] R.J. Ludwig, K. Vanhoorelbeke, F. Leypoldt, Z. Kaya, K. Bieber, S.M. McLachlan, et al., Mechanisms of autoantibody-induced pathology, Front. Immunol. 8 (2017) 603.
[5] S.B. Mkaddem, M. Benhamou, R.C. Monteiro, Understanding Fc receptor involvement in inflammatory diseases: from mechanisms to new therapeutic tools, Front. Immunol. 10 (2019) 811.
[6] E.A. Ermakov, G.A. Nevinsky, V.N. Buneva, Immunoglobulins with non-canonical functions in inflammatory and autoimmune disease states, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020) 5392.
[7] M. Neiman, C. Hellström, D. Just, C. Mattsson, L. Fagerberg, I. Schuppe-Koistinen, et al., Individual and stable autoantibody repertoires in healthy individuals, Autoimmunity 52 (2019) 1–11.
[8] K.-Y. Sim, K.C. Im, S.-G. Park, The functional roles and applications of immunoglobulins in neurodegenerative disease, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020) 5295.
[9] P.D. Burbelo, S.M. Gordon, M. Waldman, J.D. Edison, D.J. Little, R.S. Stitt, et al., Autoantibodies are present before the clinical diagnosis of systemic sclerosis, PLoS One 14 (2019), e0214202.
[10] S.M. Attar, E.A. Koshak, Medical conditions associated with a positive anti-double-stranded deoxyribonucleic acid, Saudi Med. J. 31 (7) (2010) 781–787.
[11] A.F. Kavanaugh, D.H. Solomon, The American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines, Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests, Arthritis Rheum. 47 (5) (2002) 546–555.
[12] D. Villalta, N. Bizzaro, N. Bassi, M. Zen, M. Gatto, A. Ghirardello, et al., Anti-dsDNA antibody isotypes in Systemic Lupus Erythematosus: IgA in addition to IgG anti-

dsDNA help to identify glomerulonephritis and active disease, PLoS One 8 (8) (2013), e71458.
[13] A. María Patiño-Trives, C. Pérez-Sánchez, L. Pérez-Sánchez, M. Luque-Tévar, M. C. Ábalos-Aguilera, L. Alcaide-Ruggiero, et al., Anti-dsDNA antibodies increase the cardiovascular risk in Systemic Lupus Erythematosus promoting a distinctive immune and vascular activation, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 41 (2021) 2417–2430.
[14] X. Wang, Y. Xia, Anti-double stranded DNA antibodies: origin, pathogenicity, and targeted therapies, Front. Immunol. 10 (2019) 1667.
[15] S. Xu, H. Yang, Y. Zhuo, Y. Yu, H. Liao, S. Li, et al., Production of autoreactive heavy chain-only antibodies in Systemic Lupus Erythematosus, Front. Immunol. 11 (2020) 632.
[16] A. Ullah, N. Omar, N.M. Savage, R.J. Bollag, G. Singh, Immune subtraction for improved resolution in serum protein immunofixation electrophoresis and antibody isotype determination in a patient with autoantibody, Pract. Lab. Med. 26 (2021), e00240.
[17] T. Witte, K. Hartung, C. Sachse, T. Matthias, M. Fricke, H. Deicher, et al., IgM anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: negative association with nephritis, Rheumatol. Int. 18 (1998) 85–91.
[18] T. Witte, IgM antibodies against dsDNA in SLE, Clin. Rev. Allergy Immunol. 34 (3) (2008) 345–347.
[19] F. Förger, T. Matthias, M. Oppermann, H. Becker, K. Helmke, Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis, Lupus 13 (1) (2004) 36–44.
[20] Y. Dong, Y. Zhang, L. Xia, P. Wang, J. Chen, M. Xu, et al., The deposition of anti-DNA IgG contributes to the development of cutaneous lupus erythematosus, Immunol. Lett. 19 (2017) 1–9.
[21] J.W. Kinney, S.M. Bemiller, A.S. Murtishaw, A.M. Leisgang, A.M. Salazar, B. T. Lamb, Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease, Alzheimers Dement. 4 (2018) 575–590.
[22] N. Bizarro, I. Brusca, G. Previtali, M.G. Alessio, M. Daves, S. Platzgummer, et al., The association of solid-phase assays to immunofluorescence increases the diagnostic accuracy for ANA screening in patients with autoimmune rheumatic diseases, Autoimmun. Rev. 17 (6) (2018) 541–547.
[23] M.E. Orme, A. Voreck, R. Aksouh, R. Ramsey-Goldman, M.W.J. Schreurs, Systematic review of anti-dsDNA testing for systemic lupus erythematosus: a meta-analysis of the diagnostic test specificity of an anti-dsDNA fluorescence enzyme immunoassay, Autoimmun. Rev. 20 (11) (2021), 102943.
[24] B. Arévalo, V. Serafín, M. Sánchez-Paniagua, A. Montero-Calle, R. Barderas, B. López-Ruíz, et al., Fast and sensitive diagnosis of autoimmune disorders through amperometric biosensing of serum anti-dsDNA autoantibodies, Biosens. Bioelectron. 160 (2020), 112233.
[25] B. Arévalo, M. Blázquez, V. Serafín, A. Montero-Calle, M. Calero, A. Valverde, et al., Unraveling autoimmune and neurodegenerative diseases by amperometric serological detection of antibodies against aquaporin-4, Bioelectrochemistry 144 (2022), 108041.
[26] S. Guerrero, E. Sánchez-Tirado, L. Agüí, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, Monitoring autoimmune diseases by bioelectrochemical detection of autoantibodies. Application to the determination of anti-myelin basic protein autoantibodies in serum of multiple sclerosis patients, Talanta 243 (2022), 123304.
[27] A. Valverde, A. Montero-Calle, B. Arevalo, P. San Segundo-Acosta, V. Serafin, M. Alonso-Navarro, et al., Phage-derived and aberrant HaloTag peptides immobilized on magnetic microbeads for amperometric biosensing of serum autoantibodies and Alzheimer's disease diagnosis, Anal. Sens. 1 (2021) 161–165.
[28] B. Arévalo, M. Blázquez-García, A. Valverde, V. Serafín, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, et al., First electrochemical bioplatforms to determine anti-centromere B antibodies: critical comparison between integrated and magnetic bead-assisted strategies using His-tag chemistry, Sens. Diagn. 2 (2023) 256–261.
[29] V. Serafín, G. Martínez-García, J. Aznar-Poveda, J.A. Lopez-Pastor, A.J. Garcia-Sánchez, J. Garcia-Haro, et al., Determination of progesterone in saliva using an electrochemical immunosensor and a COTS-based portable potentiostat, Anal. Chim. Acta 1049 (2019) 65–73.
[30] B. Arévalo, V. Serafín, J.F. Beltrán-Sánchez, J. Aznar-Poveda, J.A. López-Pastor, A. J. García-Sánchez, et al., Simultaneous determination of four fertility-related hormones in saliva using disposable multiplexed immunoplatforms coupled to a custom-designed and field-portable potentiostat, Anal. Methods 13 (2021) 3471–3478.
[31] R.M. Torrente-Rodríguez, A. Montero-Calle, C. San Bartolomé, O. Cano, M. Vázquez, M. Iglesias-Caballero, et al., Towards control and oversight of SARS-CoV-2 diagnosis and monitoring through multiplexed quantitative electroanalytical immune response biosensors, Angew. Chem. Int. Ed. 61 (2022), e202203662.
[32] M. Eguílaz, M. Moreno-Guzmán, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes, Biosens. Bioelectron. 26 (2010) 517–522.
[33] M.A. Gargiulo, M. Khoury, G. Gómez, S. Grimaudo, L. Suárez, M.V. Collado, et al., Cut-off values of immunological tests to identify patients at high risk of severe lupus nephritis, Medicina 78 (5) (2018) 329–335.
[34] R.L. Rubin, D. Wall, K.N. Konstantinov, Electrochemical biosensor for quantitation of anti-DNA autoantibodies in human serum, Biosens. Bioelectron. 51 (2004) 177–183.
[35] C. Muñoz-San Martín, M. Gamella, M. Pedrero, A. Montero-Calle, V. Pérez-Ginés, J. Camps, et al., Anticipating metastasis through electrochemical immunosensing of tumor hypoxia biomarkers, Anal. Bioanal. Chem. 414 (2022) 399–412.
[36] C. González Rodríguez, M.B. Aparicio Hernández, I. Alarcón Torres, Update and clinical management of anti-DNA auto-antibodies, Adv. Lab. Med. 2 (3) (2021) 313–321.
[37] S. Abdel-Rahman Elsayed, H.M. Kamaly, M.A. Esmail, Co-positivity of anti-dsDNA, antinucleosome, and anti-smith autoantibodies as serological biomarkers for disease activity in systemic lupus erythematosus, Egypt. Rheumatol. Rehabil. 49 (2022) 8.

Volume 2
Number 2
March 2023
Pages 247–470

Sensors & Diagnostics

rsc.li/sensors



ISSN 2635-0998

COMMUNICATION

Paloma Yáñez-Sedeño, Susana Campuzano, José M. Pingarrón *et al.*
First electrochemical bioplatforms to determine anti-centromere B antibodies: critical comparison between integrated and magnetic bead-assisted strategies using His-tag chemistry

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

Sensors & Diagnostics

COMMUNICATION

View Article Online
View Journal | View Issue

Check for updates

Cite this: *Sens. Diagn.*, 2023, **2**, 256

Received 31st October 2022,
Accepted 21st November 2022

DOI: 10.1039/d2sd00193d

rsc.li/sensors

First electrochemical bioplatforms to determine anti-centromere B antibodies: critical comparison between integrated and magnetic bead-assisted strategies using His-tag chemistry†

Beatriz Arévalo, Marina Blázquez-García, Alejando Valverde, Verónica Serafín, Paloma Yáñez-Sedeño, * Susana Campuzano * and José M. Pingarrón *

This work reports and compares the first electrochemical bioplatforms for determining anti-centromere B antibodies developed in magnetic microbead-assisted or integrated formats and proves the competitiveness of the nitrilotriacetic acid chemistry they exploit against common carbodiimide/succinimide-based one and their potential to determine serum target autoantibodies at clinically relevant levels.

The immune system is responsible for protecting the body from potentially harmful substances. Unfortunately, hypersensitivity reactions sometimes occur in which the immune system produces antibodies against the body's own components. These autoantibodies increase the circulating autoreactive cells and favour the development of autoimmune diseases.

Numerous studies have demonstrated the dysregulation of autoantibodies to intracellular components, such as centromeric proteins, which are the basis for the assembly of the kinetochore, a macromolecular complex essential for the precise segregation of chromosomes during mitosis.[1] Anti-centromere antibodies (ACAs), polyclonal autoantibodies directed primarily to three of the centromeric proteins (CENPA, CENPB and CENPC),[2,3] are detected in patients with various autoimmune, rheumatic and cancer diseases.[1] ACAs are considered diagnostic biomarkers in systemic sclerosis (SSc) and are mainly associated with the limited cutaneous subset (lSSc) of this disease which is also known as CREST syndrome. Deregulation of ACAs has also been reported in systemic lupus erythematosus (SLE), primary biliary cholangitis (PBC), rheumatoid arthritis (RA), Sjögren syndrome (SjS) and Raynaud's phenomenon.[1–7]

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain. E-mail: yseo@quim.ucm.es, susanacr@quim.ucm.es, pingarro@quim.ucm.es

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: https://doi.org/10.1039/d2sd00193d

In particular, the serum level of IgG-type autoantibodies against CENPB, commonly referred to as CENPB-Abs, the main and most clinically relevant ACAs,[1,6,7] is considered as a relevant biomarker for early and minimally invasive diagnosis and follow-up and risk stratification of these diseases.

The detection of the serum level of specific autoantibodies can be performed using indirect immunofluorescence, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), immunodiffusion, line immunoblot assay and light scattering immunoassay.[4–6] Commercial ELISA kits routinely used for these determinations provide adequate sensitivity and selectivity but are poorly compatible with point-of-care (POC) applications. As is known, electroanalytical bioplatforms are particularly attractive tools for the determination of clinical biomarkers, including specific autoantibodies,[8] because they are easy to use and exhibit short assay times and compatibility with multiplexed and/or multiomics determinations in any environment and by any user. However, to the best of our knowledge, no electroanalytical bioplatforms have been reported in the literature for the specific determination of CENPB-Abs.

To fill this gap, we report in this work the design, optimization, and application of unique bioplatforms developed so far for the determination of CENPB-Abs. Two different strategies for the construction of the bioplatforms were developed and compared. The first strategy is a magnetic microparticle (MB)-based format involving the immobilization of the CENPB protein on a magnetic substrate for the efficient and selective capture of specific autoantibodies (CENPB-Abs) that were enzymatically labelled with a secondary antibody for the most clinically relevant immunoglobulin isotype (IgG) conjugated to the horseradish peroxidase enzyme (HRP-antihIgG). The second strategy involved the immobilization of CENPB onto Co^{2+}-tetradentate nitrilotriacetic acid (NTA)-modified screen-printed carbon electrodes (SPCEs) and a similar labelling. In both cases, the

Open Access Article. Published on 13 December 2022. Downloaded on 4/19/2024 11:03:17 AM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 13 December 2022. Downloaded on 4/19/2024 11:03:17 AM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

transduction was performed by amperometry at the SPCEs using a H_2O_2/hydroquinone (HQ) system. Unlike electrochemical bioplatforms recently developed for the determination of particular Abs which exploited the immobilization of target antigens forming amide-[9] or amidine-[10] type covalent bonds, through HaloTag technology[11–14] or streptavidin–biotin affinity reaction,[15,16] or by interacting with the carboxylic acid groups of the polycarbonate used as a separator in arrays of nanoelectrodes,[17,18] the strategies reported in this work used NTA chemistry for the immobilization through the hexahistidine (His) tag expressed in a commercially available CENPB.

Immobilization on NTA *via* a His-tag is considered competitive with covalent immobilization exploiting carbodiimide (EDC)/sulfosuccinimide (Sulfo-NHS) chemistry in terms of simplicity, selectivity, sensitivity, and possibility of regeneration under mild conditions. In addition, the high affinity His-tag immobilization strategy allows working with low concentrations of the immobilized biomolecule, is highly specific because only the His-tagged target protein will be immobilized, avoiding the untagged proteins, and leads to oriented immobilization and adequate spacing, thus avoiding large densities of immobilized biomolecules, which improves the efficiency of the interaction with the solution phase or the solid support.[19,20]

For all these reasons and with the purpose of developing competitive biotools for the determination of CENPB-Abs, in this work, two biosensing platforms for the determination of CENPB-Abs were developed involving either a MB-assisted or integrated format. The commercially available CENPB with a 6× His-tag at the N-terminus was immobilized through this tag on the surface of MBs suitable for the immobilization of His-tagged proteins (His-tag-isolation-MBs, Fig. 1a), or on the surface of the working electrode of a SPCE modified with NTA and a tetradentate cobalt complex (Fig. 1b). Specific IgG class autoantibodies directed against CENPB were selectively captured on both substrates and enzymatically labelled with a secondary antibody conjugated to the horseradish peroxidase enzyme (HRP-antihIgG) for amperometric detection using a H_2O_2/HQ system, providing a cathodic current variation directly proportional to the concentration of CENPB-Abs.

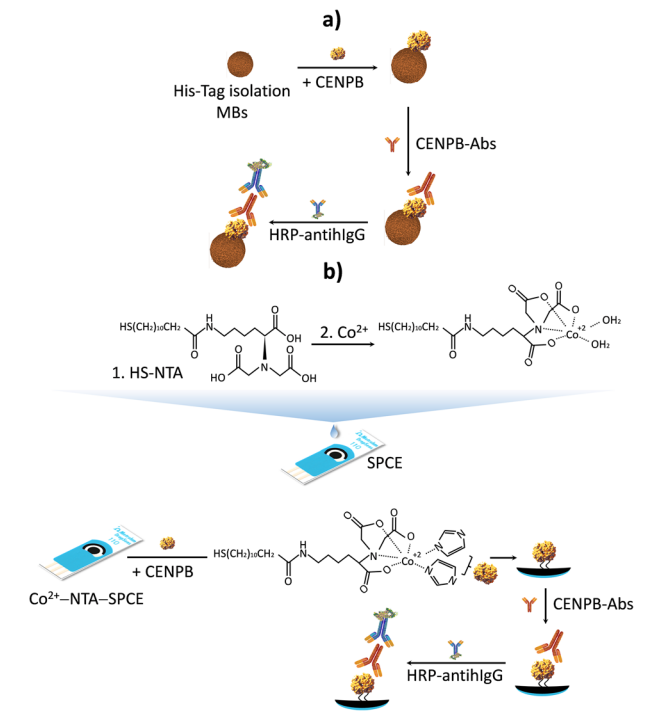


Fig. 1 Schematic display of the bioplatforms constructed for the amperometric determination of CENPB-Abs assisted by using MBs a) or an integrated format b).

It is important to mention that although a thiolated long alkyl-NTA derivative was employed for SPCE modification; as reported previously,[21] similar ordered physisorbed layers were formed on these substrates using a non-thiolated analogue, which allows concluding that the thiol moiety did not play an important role in the adsorption of long-chain alkyl-NTA derivatives on the carbon surface. Moreover, it has been reported that this type of compound adsorbs with their long axis parallel to the graphite surface.[22]

Since the objective of this research was, on the one hand to develop competitive bioplatforms on both supports, and on the other hand to critically compare their performance, we compared them using the optimized experimental conditions for the bioplatforms prepared on each substrate, which, as expected, were different.

Therefore, studies were carried out to optimize key experimental variables and to demonstrate the reliability of the strategy (control experiments and characterization of the stepwise integrated immunosensing platform fabrication by EIS and CV) and its competitive advantages over other more commonly employed strategies (covalent immobilization with EDC/Sulfo-NHS). The results of all these studies (Fig. S1–S5 and Table S1) and their discussion are given in the ESI.†

The analytical and operational characteristics of each bioplatform were evaluated and compared. Under the selected working conditions, calibration graphs displayed in Fig. 2 were constructed for the amperometric determination of CENPB-Abs standards. The equation parameters and the analytical features are summarized in Table S2 (in the ESI†).

As can be seen, the immunoplatform assisted by MBs achieved a lower LOD (0.006 *vs.* 0.11 U mL^{-1}) and a wider linear range (0.02–200 *vs.* 0.35–250 U mL^{-1}), which is attributed to the larger CENPB loading that can be immobilized as well as the more efficient recognition of the target Abs by improving the binding kinetics by working in suspension under constant stirring.[23–26] It is important to note that the determination of CENPB-Abs using both platforms can be performed in 45 min. However, counting from the preparation of CENPB-MBs, the construction of the immunoplatform takes only 15 min, while the preparation of CENPB-Co^{2+}-NTA-SPCEs needed 3 h 15 min.

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 13 December 2022. Downloaded on 4/19/2024 11:03:17 AM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

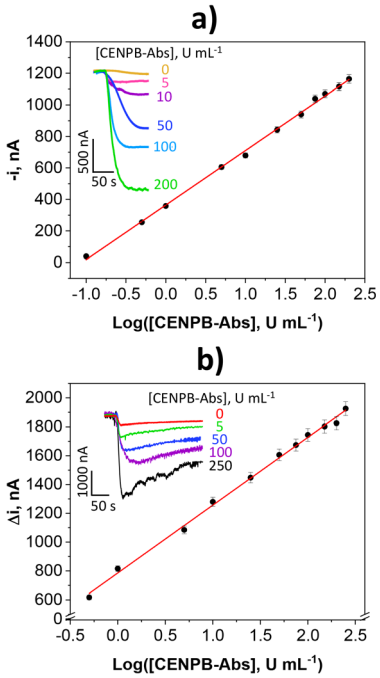


Fig. 2 Calibration plots and amperometric traces (inset) provided by the MB-assisted a) and integrated b) immunoplatforms for the determination of CENPB-Abs standards.

It should be highlighted that the analytical characteristics achieved with both immunoplatforms are competitive with those claimed for the ELISA methodology. Indeed, in addition to shorter assay times and compatibility of use at the POC, the developed immunoplatforms provided lower LODs since commercially available ELISA kits claim LODs between 0.2 and 10 U mL^{-1}.[27–29] Moreover, the linear ranges of the calibration plots extend from concentrations which are clearly below the established CENPB-Abs (IgG) cut-off values in serum to discriminate healthy individuals from patients diagnosed with autoimmune (*e.g.*, 7 U mL^{-1} in SSc)[30] and rheumatic (*e.g.*, 10 U mL^{-1} in CREST syndrome)[29] diseases.

To evaluate the repeatability of the measurements and the reproducibility of the method, the amperometric responses for 10 U mL^{-1} CENPB-Abs standard solutions measured with ten different immunoplatforms prepared in the same manner were recorded. RSD values of 2.3 and 2.5% for measurements made in the same day, and 2.8 and 2.9% in different days, were obtained using the MB-assisted or integrated bioplatforms, respectively. These results show well the good precision and reliability of the manufacturing and electrochemical detection processes involved with both immunoplatforms.

The storage stability of the integrated bioplatforms and the protein-functionalized microparticles was checked. So, different batches of CENPB-MBs and different CENPB-Co^{2+}-NTA-SPCEs were prepared on the same day. All were stored at 4 °C, the former resuspended in 50 μL of filtered 10 mM PBS (pH 7.4) in 1.5 mL microcentrifuge tubes, and the latter stored in a humid chamber. Each control day, the amperometric responses provided by the immunoplatforms prepared from both batches in the absence and presence of CENPB-Abs standards were compared. As Fig. S6 (in the ESI†) shows, the CENPB-MBs can be stored for 30 days and the CENPB-Co^{2+}-HS-NTA-SPCEs for 25 days without a significant loss of sensitivity.

In addition to storage stability, the possibility of reusing NTA-modified supports profiting the His-tag chemistry was evaluated. The amperometric responses obtained with the two types of bioplatforms in the absence and in the presence of CENPB-Abs were measured after surface regeneration by incubation for 3 h in a 50 mM phosphate solution (pH 8.0) containing 300 mM NaCl, 300 mM imidazole and 0.01% Tween 20 under continuous stirring and after 40 min in deionized water.[21] This protocol leads to the substitution of the His ligand by imidazole and consequently to the release of immobilized CENPB. Fig. S7 (in the ESI†) shows the amperometric responses obtained when the Co^{2+} coordination, CENPB immobilization and CENPB-Abs recognition protocols were repeated on both regenerated substrates. According to the results, both types of substrates can be regenerated at least 5 times, without an apparent loss of sensitivity, indicating the reversibility of the immobilization strategy used as compared to other immobilization methods which, in addition to being more laborious, leads to irreversible anchoring of biomolecules.

The effects of the presence of other antibodies and proteins that can be found in serum, at concentrations reported for healthy individuals, on the response of both immunoplatforms were evaluated. Fig. S8 (in the ESI†) shows that none of the tested substances significantly interfered with the determination of the target autoantibodies when integrated platforms were used. However, the presence of human IgGs showed a noticeable interference with MB-based bioplatforms, which was attributed to their adsorption on the magnetic microsubstrates[15,16] and to the presence of multiple histidines in their Fc region of the immunoglobulins. Fortunately, this interference was minimized if the sample is diluted 100-fold. It is important to note that the higher interference observed for human IgGs when working with the MB-assisted bioplatform compared to the integrated bioplatform should be considered as a particular case, because of the well-documented advantages of MBs for improving selectivity and minimizing sample matrix effects.[23–26]

The practical usefulness of the developed immunoplatforms was tested by analysing serum samples collected from healthy individuals and from subjects considered CENPB-Abs positive.

Previously, the accuracy of the results provided by the bioplatforms was evaluated by analysing the controls (negative and positive) supplied in the centromer B antibody IgG ELISA kit (Cat. no.: DEIA1684) with concentrations of 3 and 35 U mL^{-1}, respectively. The results obtained (mean value ± $ts/\sqrt{n}$; n = 3; α = 0.05) by applying the protocols

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 13 December 2022. Downloaded on 4/19/2024 11:03:17 AM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

described in the Experimental section (in the ESI†) using the MB-assisted and integrated bioplatforms, respectively, were: 3.1 ± 0.2 and 3.2 ± 0.2 U mL^{-1} for the negative control and 35 ± 2 and 34 ± 2 U mL^{-1} for the positive control, thus confirming the high accuracy of the determinations performed with the immunoplatforms.

In addition, the possible existence of matrix effects in the serum samples was evaluated using serum subjected to different dilution factors. The results obtained showed that samples diluted to 1/50 and 1/1000 did not exhibit matrix effects and the amperometric responses fell within the linear range provided by integrated and MB-assisted immunoplatforms, respectively. Therefore, the concentration of CENPB-Abs was determined by interpolating the amperometric responses provided by the immunoplatforms for the diluted samples into the calibration graphs constructed with standards (Fig. 2).

The obtained results are shown in Fig. 3, while Table S3 (in the ESI†) summarizes such results as well as those obtained with the ELISA methodology. For comparative purposes, the contents that the marketplace (Central BioHub®), from which the CENPB-Abs positive serum samples were purchased, indicated in the specifications are also shown in the table.

As expected, significantly larger CENPB-Abs concentrations were found for individuals classified as positive compared to those for healthy subjects. It is important to highlight that the determined concentrations agreed with the cut-off values established to discriminate healthy individuals from patients positive for this biomarker and diagnosed with autoimmune and rheumatic diseases (7–10 U mL^{-1}).[29–31] Furthermore, the agreement of the concentrations provided by the bioplatforms with those indicated by the online marketplace from which the CENPB-Abs positive human biospecimens were acquired was excellent.

Moreover, the t_{exp} values[32] given in Table S3† were lower in all cases than t_{tab} (4.303 at the chosen significance level, α = 0.05), and the parameters gathered in the last row of Table S3† coming from the excellent correlations shown on the right side of Fig. 3 confirmed the absence of significant differences between the results provided by the developed bioplatforms and the widely employed ELISA methodology. All these results confirm the accuracy and reliability of the developed immunoplatforms.

The apparatus and electrodes, reagents and solutions and all the procedures used are described in detail in the ESI.†

All experiments were conducted in accordance with institutional guidelines. Furthermore, since all human serum samples tested were purchased from an online marketplace for human biospecimens (Central BioHub®), no informed consents were obtained from the human participants in this study and no ethics committee assurance numbers need to be cited.

This work reports the first electrochemical bioplatforms described to date for the determination of CENPB-Abs. The bioplatforms were implemented on integrated substrates or on the surface of magnetic microparticles. The immunoplatform assisted by MBs provided an 18-fold lower LOD (0.006 *vs.* 0.11 U mL^{-1}, both well below the established serum cut-off value of 7 U mL^{-1} to discriminate between individuals considered positive and negative for CENPB-Abs), and a slightly wider linear range and exhibited a shorter preparation time (15 min *vs.* 3 h 15 min). Nevertheless, both immunoplatforms possess analytical and operational characteristics able to fulfil the challenging demands of today's clinic in terms of sensitivity, simplicity, affordability, compatibility with multiplexed or multiomics determinations, and in field operation.

It should be pointed out that the choice between an integrated or MB-assisted bioplatform is neither simple nor universal and must be thoroughly evaluated on a case-by-case basis. Since there is no significant difference between the costs per determination using both bioplatforms (the small amount of MBs and employed immunoreagents limits the cost in both cases compared to that of the SPCE), the selection will be conditioned mainly by the required sensitivity and the composition and viscosity of the sample to be analyzed. For example, for the determination in scarcely diluted serum samples, and due to the discussed IgG interference on magnetic microcarriers, the integrated bioplatforms are probably more attractive. However, in the analysis of saliva samples, with higher viscosity and low IgG content, it would probably be more convenient to use a MB-assisted bioplatform to improve the binding kinetics by working in suspension under constant stirring. It should be also mentioned that, in general, there is a general trend to think that integrated formats (as biosensors used in glucometers) are easier to implement in POCT devices than those based on the use of MBs.

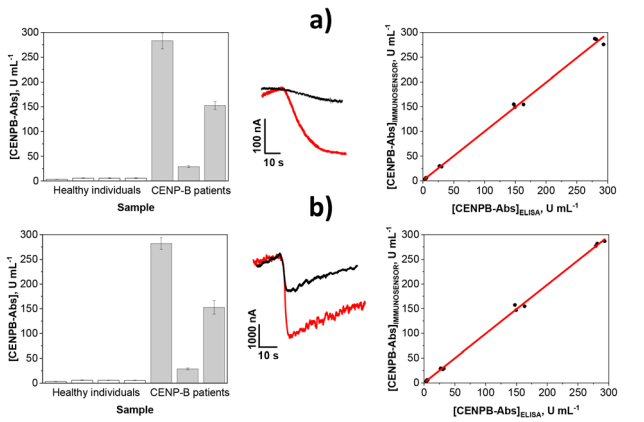


Fig. 3 Left: CENPB-Abs concentrations provided by the immunoplatforms in serum samples from healthy subjects and CENPB-Abs positive individuals. Centre: Representative amperometric responses recorded for samples from a control subject (in black) and a CENPB-Abs-positive individual (in red). Right: Correlation between the results provided by the developed immunoplatforms and the ELISA methodology. MB-assisted a) and integrated b) immunoplatforms.

Open Access Article. Published on 13 December 2022. Downloaded on 4/19/2024 11:03:17 AM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

The developed bioplatforms are also attractive compared to the widely accepted ELISA methodology in terms of cost, assay time and applicability in any environment. In terms of applicability, the immunoplatforms are suitable for the simple, accurate and reliable determination of CENPB-Abs in serum after simple sample dilution which avoids matrix effects. These capabilities may help to deepen the clinical role of this type of biomarker for the early detection and prognosis of diseases of high clinical relevance such as autoimmune and rheumatic disorders and to look for their associations with cancer diseases. The reported results also show that His-tag chemistry provides important advantages over covalent carbodiimide/succinimide immobilization methods, in terms of simplicity, cost, assay time, reusability and sensitivity, for the development of bioplatforms involving antigen immobilization for the determination of specific autoantibodies.

Beatriz Arévalo: methodology, investigation, and writing – review & editing of original draft. Marina Blázquez-García: methodology and investigation. Alejandro Valverde: methodology and investigation. Verónica Serafín: methodology, investigation, and review & editing of original draft. Paloma Yáñez-Sedeño: conceptualization, supervision, resources, review & editing of original draft, and funding acquisition. Susana Campuzano: conceptualization, supervision, resources, writing, review & editing of original draft, and funding acquisition. José M. Pingarrón: supervision, resources, and review & editing of original draft.

The financial support from RTI2018-096135-B-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia, Innovacion y Universidades), PID2019-103899RB-I00 (Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación) Research Project and the TRANSNANOAVANSENS-CM Program from the Comunidad de Madrid (Grant S2018/NMT-4349) is gratefully acknowledged. B. A. and A. V. acknowledge predoctoral contracts from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovacion y Universidades (PRE2019-087596) and Complutense University of Madrid, respectively.

Conflicts of interest

"There are no conflicts to declare".

Notes and references

1 R. M. Prasad, A. Bellacosa and T. J. Yen, *J. Mol. Pathol.*, 2021, **2**, 281–295.
2 Y. Muro, N. Azuma, H. Onouchi, M. Kunimatsu, Y. Tomita, M. Sasaki and K. Sugimoto, *Clin. Exp. Immunol.*, 2000, **120**(1), 218–223.
3 M. Mahler, L. Maes, D. Blockmans, R. Westhovens, X. Bossuyt, G. Riemekasten, S. Schneider, F. Hiepe, A. Swart, I. Gürtler, K. Egerer, M. Fooke and M. J. Fritzler, *Arthritis Res. Ther.*, 2010, **12**(3), R99.
4 N. Bizzaro, F. Bonelli, E. Tonutti, D. Villalta and R. Tozzolis, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2002, **20**(1), 45–51.
5 T. Dick, R. Mierau, P. Bartz-Bazzanella, M. Alavi, M. Stoyanova-Scholz, J. Kindler and E. Genth, *Ann. Rheum. Dis.*, 2002, **61**(2), 121–127.
6 K. Hanke, M. O. Becker, C. S. Brueckner, W. Meyer, A. Janssen, W. Schlumberger, F. Hiepe, G. R. Burmester and G. Riemekasten, *J. Rheumatol.*, 2010, **37**(12), 2548–2552.
7 N. Kajio, M. Takeshita, K. Suzuki, Y. Kaneda, H. Yamane, K. Ikeura, H. Sato, S. Kato, H. Shimizu, K. Tsunoda and T. Takeuchi, *Ann. Rheum. Dis.*, 2021, **80**(5), 651–659.
8 S. Campuzano, M. Pedrero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño and J. M. Pingarrón, *Anal. Methods*, 2019, **11**, 871–887.
9 S. Guerrero, E. Sánchez-Tirado, L. Agüí, A. González-Cortés, P. Yánez-Sedeño and J. M. Pingarrón, *Talanta*, 2022, **243**, 123304, DOI: **10.1016/j.talanta.2022.123304**.
10 A. F. Cruz-Pacheco, J. Quinchia and J. Orozco, *Microchim. Acta*, 2022, **189**, 228, DOI: **10.1007/s00604-022-05322-5**.
11 M. Garranzo-Asensio, A. Guzmán-Aránguez, C. Povés, M. J. Fernández-Aceñero, R. M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas-Montiel, G. Domínguez, M. Villalba, J. M. Pingarrón, S. Campuzano and R. Barderas, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 12339–12345.
12 M. Garranzo-Asensio, A. Guzmán-Aránguez, E. Povedano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, C. Poves, M. J. Fernandez-Aceñero, A. Montero-Calle, G. Solís-Fernández, S. Fernández-Diez, J. Camps, M. Arenas, N. Cabré, J. Joven, N. Rodríguez, G. Domínguez, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, S. Campuzano and R. Barderas, *Theranostics*, 2020, **10**, 3022–3034.
13 A. Montero-Calle, I. Aranguren-Abeigon, M. Garranzo-Asensio, A. Guzman-Aranguez, C. Povés, M. J. Fernández-Aceñero, J. Martínez-Useros, R. Sanz, J. Dziaková, J. Rodríguez-Cobos, G. Solís-Fernández, E. Povedano, M. Gamella, R. M. Torrente-Rodríguez, M. Alonso-Navarro, V. de los Ríos, J. I. Casal, G. Domínguez, J. M. Pingarrón, A. Peláez-García, S. Campuzano and R. Barderas, *Engineering*, 2021, **7**, 1393–1412.
14 A. Valverde, A. Montero-Calle, B. Arévalo, P. San Segundo-Acosta, V. Serafín, M. Alonso-Navarro, G. Solís-Fernández, J. M. Pingarrón, S. Campuzano and R. Barderas, *Analysis Sensing*, 2021, **1**, 161–165.
15 B. Arévalo, V. Serafín, M. Sánchez-Paniagua, A. Montero-Calle, R. Barderas, B. López-Ruíz, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño and J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.*, 2020, **160**, 112233, DOI: **10.1016/j.bios.2020.112233**.
16 B. Arévalo, M. Blázquez, V. Serafín, A. Montero-Calle, M. Calero, A. Valverde, R. Barderas, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño and J. M. Pingarrón, *Bioelectrochemistry*, 2022, **144**, 108041, DOI: **10.1016/j.bioelechem.2021.108041**.
17 H. B. Habtamu, M. Sentic, M. Silvestrini, L. De Leo, T. Not, S. Arbault, D. Manojlovic, N. Sojic and P. Ugo, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 12080–12087.
18 H. B. Habtamu, T. Not, L. De Leo, S. Longo, L. M. Moretto and P. Ugo, *Sensors*, 2019, **19**, 1233, DOI: **10.3390/s19051233**.
19 L.-J. Zhou, R.-F. Li, X.-Y. Li and Y.-W. Zhang, *Eng. Life Sci.*, 2021, **21**, 364–373.

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 13 December 2022. Downloaded on 4/19/2024 11:03:17 AM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

20 C. Ley, D. Holtmann, K.-M. Mangold and J. Schrader, *Colloids Surf., B*, 2011, **88**, 539–551.
21 F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, P. Martínez-Ruiz, M. Esteban-Torres, B. de las Rivas, A. J. Reviejo, R. Muñoz and J. M. Pingarrón, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 3246–3254.
22 T. Bhinde, S. M. Clarke, T. K. Phillips, T. Arnold and J. E. Parker, *Langmuir*, 2010, **26**, 8201–8206.
23 T. A. P. Rocha-Santos, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2014, **62**, 28–36.
24 L. Reverte, B. Prieto-Simon and M. Campas, *Anal. Chim. Acta*, 2016, **908**, 8–21.
25 J. Kudr, B. Klejdus, V. Adam and O. Zitka, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2018, **98**, 104–113.
26 M. Pastucha, Z. Farka, K. Lacina, Z. Mikusova and P. Skladal, *Microchim. Acta*, 2019, **186**, 312, DOI: **10.1007/s00604-019-3410-0**.
27 **https://steffens-biotec.com/wp-content/uploads/2020/03/CENP-B_igG_1511FE00.FWD_.pdf**.
28 **https://shop.tinyteria.com/index.php?route=extension/module/free_downloads/download&did=675**.
29 **https://products.orgentec.com/pdfs/ifu/ORG%20633_IFU_EN_QM113209_2018-01-02_3.pdf**.
30 N. M. van Leeuwen, M. Boonstra, J. A. Bakker, A. Grummels, S. Jordan, S. Liem, O. Distler, A. M. Hoffmann-Vold, K. Melsens, V. Smith, M. E. Truchetet, H. U. Scherer, R. Toes, T. W. J. Huizinga and J. K. de Vries-Bouwstra, *Arthritis Rheumatol.*, 2021, **73**(12), 2338–2347.
31 **https://www.thermofisher.com/phadia/es/es/product-catalog.html?articleNumber=14-5505-01&region=ES**.
32 J. N. Miller and J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education Limited, 6th edn, 2010, ISBN-10: 0273730428.