

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2020

MEMORIA DEL PROYECTO Nº SV-20-GIJÓN-10

1. Datos del proyecto

Título: Diagnóstico de la enfermedad celiaca mediante el uso de nanopartículas.

Investigador/a/es responsable/es: Laura Elbaile Viñuales

Teléfono: 985 103308

E-mail: elbaile@uniovi.es

Otros investigadores: Alfredo de la Escosura Muñiz, María Rosario Díaz Crespo y Celia Toyos Rodríguez

Empresas o instituciones colaboradoras: Dismed S.A. y Nanovex Biotechnologies

2. Memoria descriptiva del proyecto

2.1 Resumen ejecutivo

El resumen ejecutivo del Proyecto debe ser una síntesis clara y concisa del trabajo realizado, describiendo brevemente los motivos que justifican su realización, los beneficiarios, los objetivos específicos y su grado de consecución, la metodología aplicada y los resultados obtenidos. Extensión: un máximo de 4000 caracteres, incluidos espacios.

El trabajo realizado en el marco de este proyecto pretende poner solución a un problema actual como es la detección de la enfermedad celiaca (EC). La EC es una enfermedad que se manifiesta por la aparición de una inflamación de la mucosa del intestino delgado derivada de intolerancias frente al gluten del trigo, cebada, centeno y avena. El diagnóstico de esta enfermedad es dificultoso, con más de un 85% de los afectados no diagnosticados, además de invasivo, por lo que el desarrollo de tecnologías que permitan su detección de forma rápida y sencilla es altamente demandado. De este modo, esta tecnología podría acercarse a todo el mundo y emplearse, además, de forma preventiva en pacientes desde una temprana edad permitiendo tratar la enfermedad con rapidez y reducir los problemas derivados de un diagnóstico tardío.

En este proyecto, se pretende atajar este problema a través del diagnóstico de esta patología mediante el desarrollo de un sensor electroquímico basado en micropartículas magnéticas (MPMs) y nanopartículas marcadoras. Por ello, el objetivo principal de este proyecto ha sido la construcción de un biosensor basado en anticuerpos para la detección de biomarcadores de EC, siguiendo la metodología descrita en la Figura 1. Para ello, se ha propuesto la detección de los anticuerpos biomarcadores anti-transglutaminasa tisular (anti-tTG) o el anti-péptido deaminado de gliadina (anti-DGP) mediante el uso de micropartículas

magnéticas como base del sensor, sobre las que se anclarán los anticuerpos biomarcadores. Una vez producida la bioconjugación, se propone el uso de nanopartículas biomarcadoras, bioconjugadas con un anticuerpo secundario, para completar el ensayo inmunológico, permitiendo cuantificar las mismas de forma electroquímica.

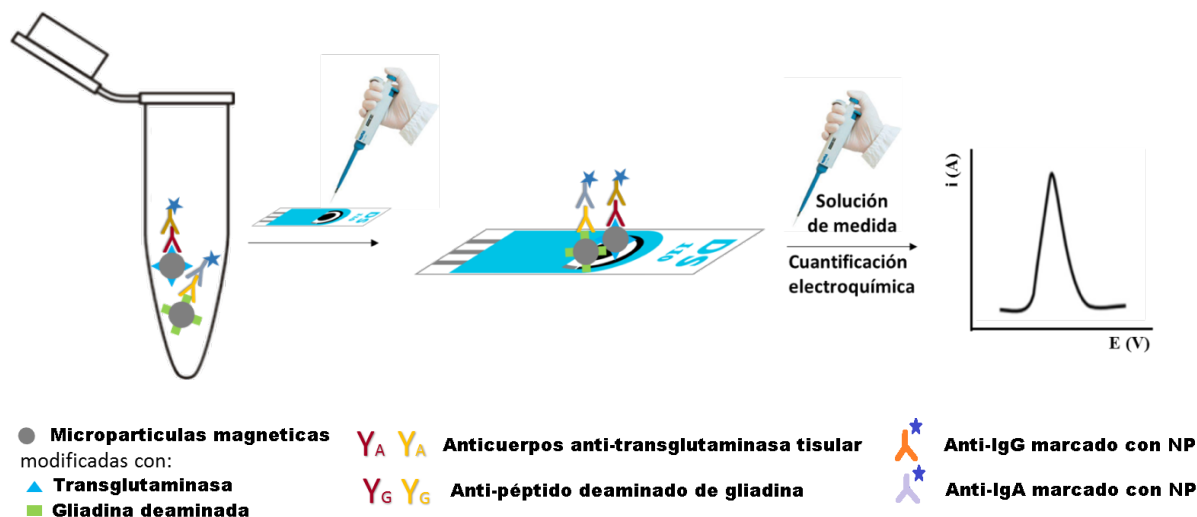


Figura 1. Esquema representativo del biosensor objeto de este proyecto

Con todo ello, los objetivos parciales en este trabajo han sido, a) el desarrollo de MPMs capaces de ser empleadas como plataforma sensora, b) la síntesis de nanopartículas marcadoras con propiedades electroactivas y c) la determinación electroquímica de biomarcadores relacionados con la EC empleando los nanomateriales antes citados.

En este contexto, se ha conseguido, en primer lugar, la síntesis de MPMs poliméricas de un tamaño medio de 96 ± 16 nm y un alto poder de imanación (Ms de 65 emu/g). La síntesis de MPMs llevada a cabo se ha basado en un método de encapsulación de nanopartículas magnéticas, en este caso nanoferritas de Zn, en una matriz polimérica de poliácido láctico-ácido glicólico (PLGA). Las MPMs sintetizadas han sido caracterizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión dinámica de la luz (DLS) y magnetismo.

Además, estas MPMs han sido funcionalizadas con anticuerpos de tipo Inmunoglobulina G (IgG) como prueba de concepto, para evaluar su idoneidad como plataformas en inmunosensores, resultando ser igual de válidas que las MPMs actualmente en el mercado.

Por otro lado, se ha llevado a cabo la síntesis de nanopartículas de tipo metal-organic frameworks (nanoMOFs) de un tamaño medio de en torno a 50 nm. En este caso, se ha elegido un nanoMOF ya descrito

como es el nano-HKUST-1. Estos nanoMOFs han sido funcionalizados con proteínas de afinidad como la neutravidina, como paso previo al anclaje de anticuerpos.

De esta forma, se ha conseguido desarrollar ambos nanomateriales necesarios para la construcción de un biosensor para la detección de biomarcadores de EC. La implementación de estas dos tecnologías de forma conjunta y su aplicación a la EC no ha podido ser realizada durante este proyecto, debido al tiempo disponible para su realización, si bien es una línea actualmente en desarrollo en el grupo de investigación, dados los avances conseguidos gracias a este proyecto.

2.2 Objetivos iniciales del proyecto y grado de consecución

- a) Síntesis de MPMs con alto poder de imanación y su posterior funcionalización: este objetivo se ha concluido al 100%, habiéndose obtenido MPMs funcionalizadas con anticuerpos, igual de válidas que las disponibles en el mercado como plataforma en biosensores inmunológicos.
- b) Síntesis de nanopartículas con propiedades electroactivas para su uso como marcas: este objetivo se ha conseguido al 100% ya que se han obtenido de forma reproducible y fiable nanoMOFs de un tamaño y forma deseables.
- c) Funcionalización de estos nanoMOFs con anticuerpos específicos para la detección de marcadores de celiaquía: este objetivo se ha conseguido en un 20% ya que, si bien no se ha conseguido anclar anticuerpos frente a marcadores de celiaquía, si que se ha conseguido funcionalizar los nanoMOFs obtenidos con proteínas de afinidad, paso previo a la incorporación de anticuerpos.
- d) Puesta a punto de un método analítico que permita correlacionar la cantidad de nanopartículas marcadoras con los biomarcadores de celiaquía: debido a la falta de tiempo no se ha conseguido completar este objetivo.

2.3 Tareas realizadas

Durante el desarrollo de este proyecto, el estudiante contratado ha realizado las siguientes tareas:

- Síntesis, caracterización y funcionalización de MPMs.
- Evaluación de la idoneidad de las MPMs desarrolladas como plataforma en biosensores basados en anticuerpos.
- Síntesis, caracterización y funcionalización de nanoMOFs.

2.4 Resultados obtenidos

1. Síntesis, caracterización y funcionalización de MPMs.

En este contexto, se ha conseguido, en primer lugar, la síntesis de MPMs poliméricas de un tamaño medio de 96 ± 16 nm y un alto poder de imanación (M_s de 65 emu/g). La síntesis de MPMs llevada a cabo se ha basado en un método de encapsulación de nanopartículas magnéticas, en este caso nanoferritas de Zn, en una matriz polimérica de poliácido láctico-ácido glicólico (PLGA). Una vez realizada la encapsulación, estas partículas han sido recubiertas con polietilenimina, permitiendo, por un lado, asegurar la encapsulación y aumentar la estabilidad a largo plazo de las partículas sintetizadas, así como proporcionar grupos funcionales en su superficie que permitan el anclaje de proteínas de afinidad o anticuerpos. Estas partículas han sido caracterizadas mediante TEM, DLS, potencial- ζ . (Figura 2) y medidas magnéticas (Figura 3).

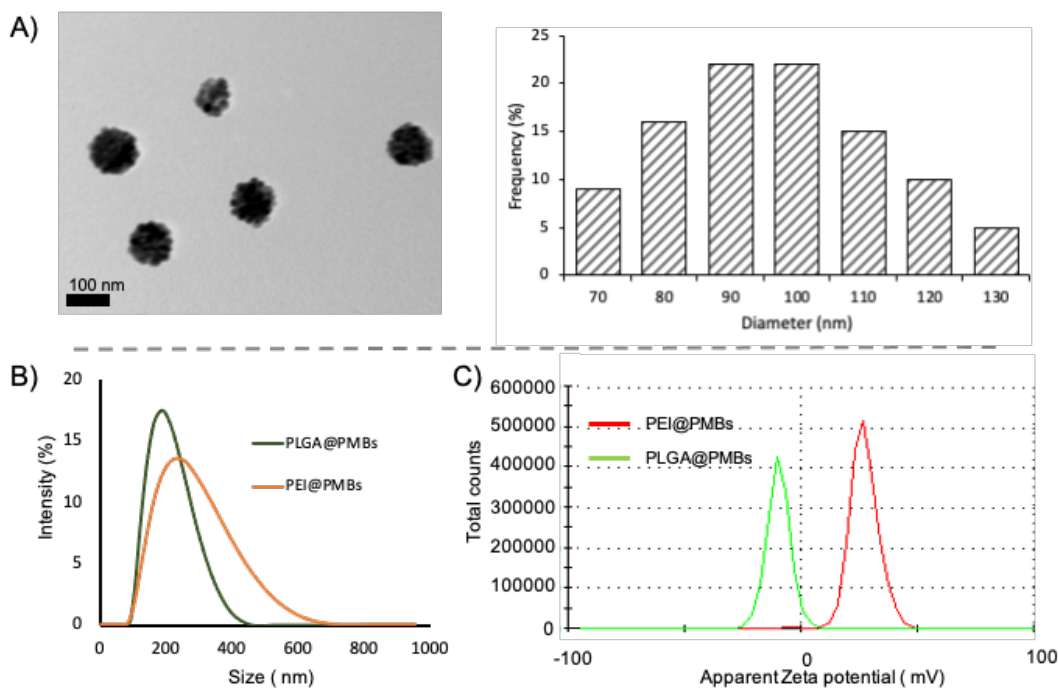


Figura 2. Caracterización de las MPMs obtenidas y funcionalizadas con PEI mediante A) micrografías de TEM con su correspondiente distribución de tamaños; B) DLS por distribución de tamaños y C) potencial- ζ .

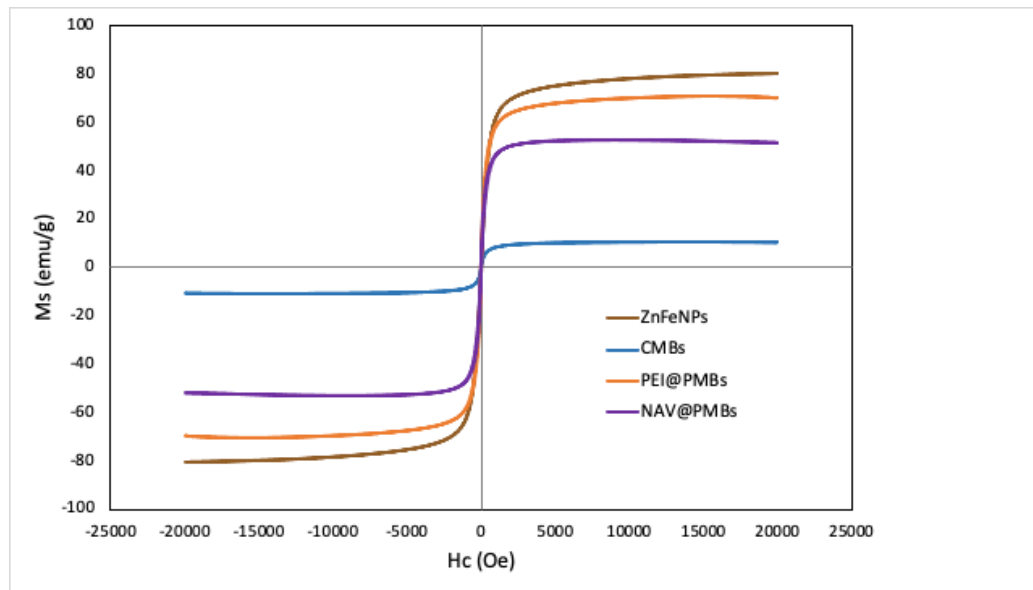


Figura 3. Curvas de histéresis de las nanoferritas de Zn utilizadas en la encapsulación (ZnFeNPs), las MPMs recubiertas de PEI (PMBs@PEI), las MPMs una vez funcionalizadas con neutravidina (PMBs@NAV) y MPMs comerciales (CMBs).

2. Evaluación de la idoneidad de las MPMs desarrolladas como plataforma en biosensores basados en anticuerpos.

Además, estas MPMs han sido funcionalizadas con anticuerpos de tipo IgG como prueba de concepto para evaluar su idoneidad como plataformas en inmunosensores, resultando ser igual de válidas que las MPMs actualmente en el mercado (Figura 4). Para conseguir este objetivo, en primer lugar, se ha funcionalizado las MPMs obtenidas con la proteína de afinidad neutravidina. Esta etapa se ha llevado a cabo para facilitar la comparación de las MPMs sintetizadas en este trabajo con las disponibles a nivel comercial, puesto que estas también están recubiertas de este tipo de proteínas de afinidad. Posteriormente, se ancló a la superficie de las MPMs un anticuerpo de tipo IgG biotinilado, el cual se une de forma específica a la neutravidina. En una siguiente etapa, se puso en contacto estas MPMs con nanopartículas de oro (AuNPs) bioconjugadas con un anticuerpo anti-IgG, el cual reconoce de forma específica al anticuerpo IgG anclado a la superficie de las micropartículas magnéticas. Una vez anclado, se usan las AuNPs como marca para su detección electroquímica. Mediante el uso de electrodos serigrafados de carbono (SPCEs) y en presencia de HCl, se registra la capacidad catalítica de las AuNPs frente a la reacción de evolución del hidrógeno. De esta forma se obtiene una señal proporcional a la cantidad de AuNPs presentes, de forma que nos indica que este se ha anclado correctamente a las MPMs utilizadas.

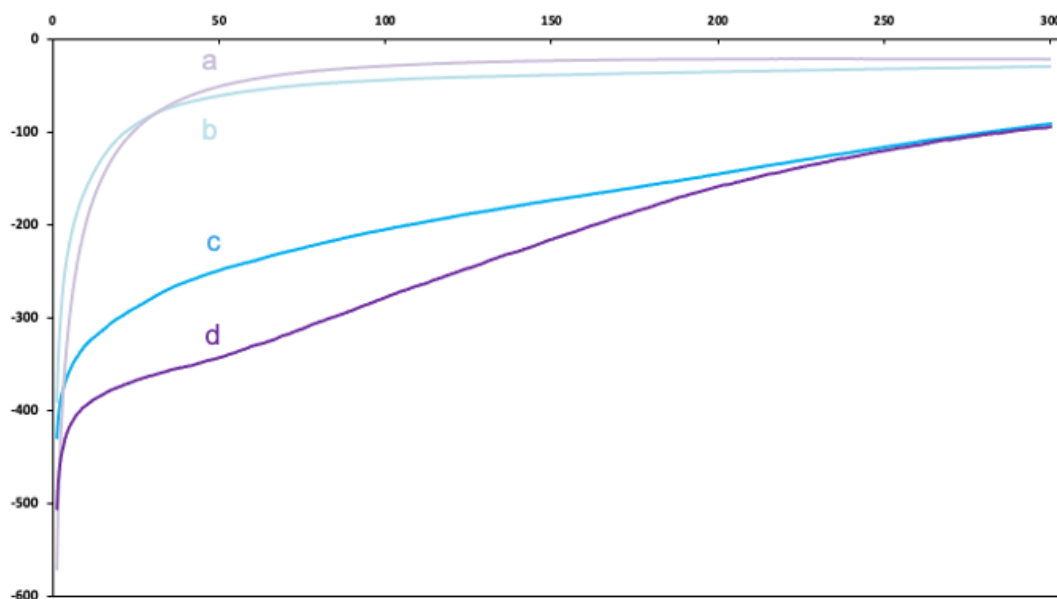


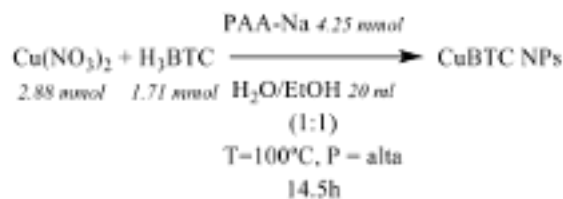
Figura 4. Cronoamperogramas registrados en HCl 0.1 M, aplicando un potencial de +1.35 V para: a. MPMs sintetizadas en este trabajo en el control negativo (con un IgG no humano), b. MPMs comerciales en el control negativo, c. MPMs comerciales como control positivo y d. MPMs sintetizadas en este trabajo como control positivo. En este caso, se ha empleado un control negativo, es decir un anticuerpo que no reconoce al anclado en la superficie de las MPMs, para asegurar que las AuNPs utilizadas como marca se anclan de forma específica a las MPMs.

3. Síntesis, caracterización y funcionalización de nanoMOFs.

En el anterior apartado, se ha conseguido la síntesis de MPMs y éstas han sido empleadas en un sensor de tipo inmunológico. En el caso anterior, se han empleado como marca AuNPs, puesto que su síntesis es un método altamente estandarizado. Sin embargo, el uso de estas nanopartículas como marca está limitado por la necesidad de medios ácidos para su detección. Por ello, se ha llevado a cabo en paralelo la síntesis de nanoMOFs como marca electroquímica, en sustitución de las AuNPs empleadas en el caso anterior. Estas partículas presentan un mayor interés puesto que son electroquímicamente activas, ya que contienen metales electroactivos, a la par que pueden presentar propiedades ópticas. De esta forma, podrían ser empleadas en sensores tanto electroquímicos como ópticos, lo que amplía su campo de utilización.

Para la síntesis de nanoMOFs, se ha decidido utilizar el nano-HKUST-1, siendo este un nanoMOF descrito previamente, útil tanto como marca óptica como electroquímica. Para la síntesis del nanoHKUST-1 se han probado varios métodos, buscando el más idóneo. De todos los métodos probados, se ha puesto a punto el método solvotermal descrito en la Figura 5.A., que dio lugar a nanopartículas de un tamaño medio de en torno a 50 nm con una forma adecuada.

A)



B)

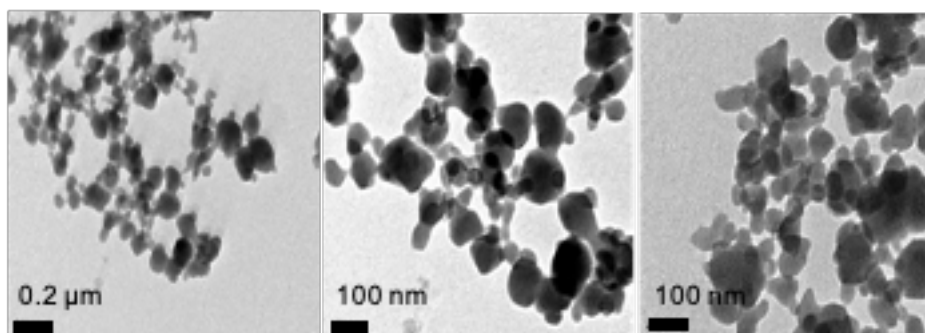


Figura 5. A. Esquema de la reacción de síntesis de los nanoMOFs y B. micrografías de las partículas obtenidas

Estas partículas se han caracterizado también a nivel electroquímico, evaluando la señal electroquímica de oxidación del Cu (I) a Cu (II), aplicando un barrido de potenciales de -1.1 V a 0.5 V en acetato de sodio 0.1M pH 4.6. La intensidad de corriente del pico de oxidación registrado a -0.36 V representa la señal analítica, que es proporcional a la concentración de nanoMOFs. Se observa una relación lineal entre el valor de esta señal y la concentración de nanoMOFs en el rango de 0.001 a 0.1 mg/mL. (Figura 6). Esto confirma que son válidas para su uso como marca.

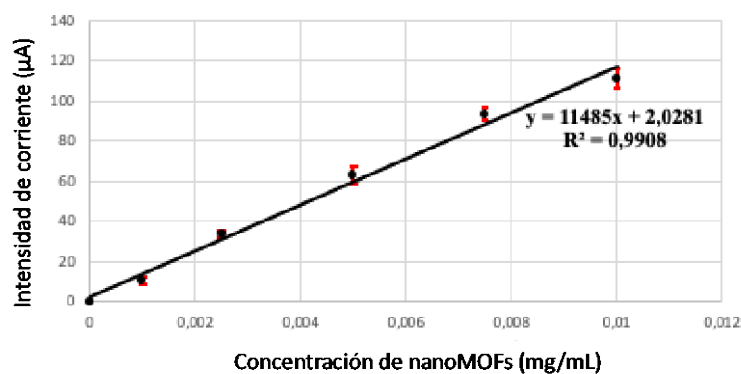


Figura 6. Calibrado de la señal electroquímica obtenida a distintas concentraciones de nanoMOFs.

Adicionalmente, se han caracterizado por fluorescencia para conocer su espectro de emisión, observándose la presencia de una leve banda de emisión a 225 nm (Figura 7).

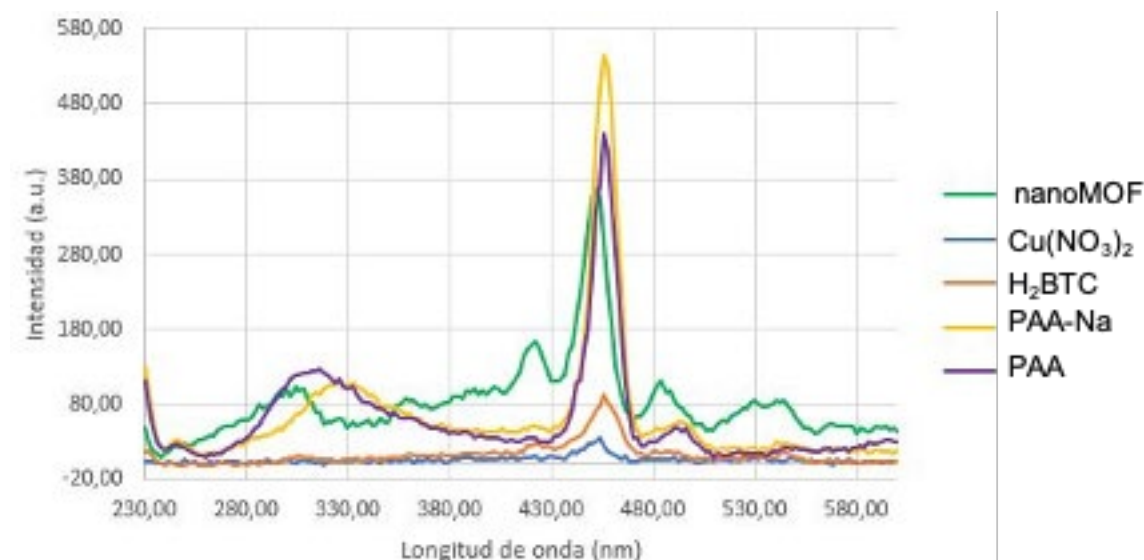
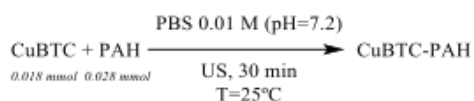


Figura 7. Espectro de emisión de los nanoMOFs frente a los distintos reactivos de partida empleados en la síntesis.

Una vez caracterizados los nanoMOFs, se procedió a la funcionalización con polialilamina (PAH) como paso previo a la bioconjugación con la proteína de afinidad neutravidina. Esta funcionalización se caracterizó a través de TEM (Figura 8). Dado el aumento de la agregación de las nanopartículas observada en este punto, se están estudiando otras formas de anclaje de la neutravidina a la superficie de los nanoMOFs. El anclaje de anticuerpos a los nanoMOFs y su uso en biosensores todavía no ha sido puesto a punto.

A)



B)

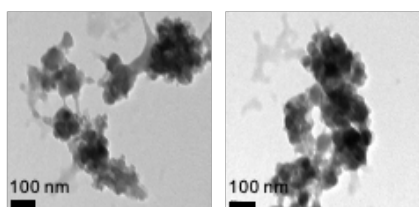


Figura 8. A. Esquema de la funcionalización de los nanoMOFs con PAH y B. micrografías de TEM de los nanoMOFs tras la funcionalización.

2.5 Trabajos o necesidades futuras

Si bien los resultados obtenidos en este proyecto son esperanzadores y suponen un avance en el desarrollo de la tecnología necesaria para la construcción de un biosensor de detección de biomarcadores de EC, todavía es necesaria a) la implementación de los nanomateriales desarrollados en este trabajo en conjunto en un único sensor, b) la evaluación de este sensor para la detección de biomarcadores de EC.

2.6 Divulgación de los resultados (publicaciones, artículos, ponencias...)

En cuanto a los resultados obtenidos con las MPMs, actualmente se está escribiendo un artículo científico que será enviado para su publicación próximamente en revistas del campo de magnetismo o nanomateriales. Adicionalmente, se está estudiando la comercialización de las MPMs desarrolladas en este proyecto a través de la empresa colaboradora Nanovex Biotechnologies.

3. Memoria económica

Financiación		Personal	Inventariable	Fungible	Otros gastos
IUTA	SV-20-GIJÓN-10	4200 €			
Otras fuentes	Referencia proyecto/contrato				
Estudiante con ayuda a la investigación	Nombre	María Palomares Albarrán			
	Tareas	Síntesis y caracterización de micropartículas magnéticas y de nanoMOFs.			
	Período	01/08/2020 – 31/08/2020			

4. Otros proyectos y contratos con financiación externa

Título del proyecto/contrato	
Referencia	
Investigador/a/es principal/es	
Equipo investigador	
Periodo de vigencia	
Entidad financiadora	
Cantidad subvencionada	