



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

Reconocimiento Molecular Mediante Aptámeros de Péptidos Inmunotóxicos de Gluten

SANDRA GONZÁLEZ GARCÍA

Julio 2015, Oviedo



Rebeca Miranda Castro, Investigadora Contratada Doctora del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado "Reconocimiento Molecular Mediante Aptámeros de Péptidos Inmunotóxicos de Gluten"

ha sido realizado por la alumna Sandra González García bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2014-15, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 14 de julio de 2015

Fdo: Rebeca Miranda Castro

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Enfermedad celíaca y gluten	2
1.2. Métodos de análisis de gluten	4
1.3. Aptámeros como elemento de reconocimiento molecular	7
1.4. Métodos de inmovilización de aptámeros	11
1.5. Técnicas electroquímicas	13
1.6. Objetivos	21
2. EXPERIMENTAL	
2.1. Reactivos	23
2.2. Instrumentación	25
2.3. Procedimientos experimentales	26
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. Diseño de la estrategia de inmovilización del aptámero	30
3.2. Determinación de la constante de afinidad	34
3.3. Ensayo con detección electroquímica	40
4. CONCLUSIONES	49
5. REFERENCIAS	51

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad celíaca y gluten

La enfermedad celíaca se trata de una enfermedad autoinmune que se caracteriza por un daño producido en las microvellosidades del intestino delgado como consecuencia de la ingesta de gluten dificultando la absorción de macro y micronutrientes, de manera que las personas que sufren esta enfermedad presentan síntomas de malnutrición.

La celiacía empezó a ser conocida a finales del siglo XIX, aunque las causas que la originaban no se conocieron hasta mediados del siglo XX. Se calcula que 1 de cada 100 personas en todo el mundo se ve afectada por la intolerancia al gluten, aunque solo se diagnostican un 20% de ellas¹. Esta enfermedad suele manifestarse en la infancia con síntomas como dolor abdominal, pérdida de peso, diarrea o fatiga. Sin embargo, hay muchos pacientes que no manifiestan estos síntomas y quedan sin diagnosticar hasta que son adultos, cuando empiezan a manifestar síntomas derivados del no diagnóstico como: deficiencia de hierro, intolerancia a la lactosa, carencia de vitaminas o problemas óseos, siendo la osteopenia el más importante. Además, esta enfermedad presenta un componente genético importante, ya que las personas con un familiar directo afectado tienen un 10% más de probabilidad de desarrollar la enfermedad².

El gluten se define, según el Codex Alimentarius, como la fracción proteica del trigo, cebada, centeno, avena y sus variedades híbridas y derivados, que es insoluble en disoluciones de agua y NaCl 0,5 M³. Las distintas proteínas que componen el gluten se clasifican mediante el fraccionamiento de Osborne, introducido a principios de siglo, según el cual el gluten está compuesto por gluteninas (fracción insoluble en disoluciones etanol-agua) y prolaminas (fracción soluble en disoluciones etanol-agua). Esta clasificación es la más utilizada en la actualidad, aunque existen otras igual de válidas⁴. Según el cereal del que provienen, las prolaminas reciben un nombre diferente, siendo del trigo la gliadina, del centeno la secalina, de avena, avenina y de cebada, hordeína.

En la actualidad, se están investigando distintas opciones terapéuticas basadas en el uso de inhibidores de la transglutaminasa tisular (tTG), que se trata del autoantígeno

de la enfermedad celíaca, o en enzimas que son capaces de degradar de forma eficaz los péptidos inmunotóxicos que están presentes en el gluten, pudiendo ser usadas para la obtención de alimentos sin gluten o para administrarse oralmente para su degradación *in vivo*⁵. Recientemente se ha propuesto una vacuna que está en fase de ensayo clínico. Sin embargo, hoy en día, el único tratamiento efectivo que existe es el seguimiento de una dieta estricta sin gluten a lo largo de la vida del paciente⁶. Debido a esto, la determinación de gluten en los alimentos es de gran importancia, sobre todo en aquellos etiquetados y certificados como aptos para celíacos. La cantidad de gluten segura para todos los celíacos, aún no se ha conseguido establecer. De hecho la ingesta de cantidades mínimas puede desencadenar los síntomas de la enfermedad y llegar a causar trastornos neurológicos o respiratorios graves en algunos pacientes especialmente sensibles.

Los alimentos preparados para consumo exclusivo de celíacos contienen cereales considerados libres de gluten, como arroz, maíz o soja, que de forma inherente no contienen las prolaminas inmunotóxicas. Pese a esto, es posible encontrar concentraciones apreciables de gluten en estos alimentos, debido al cultivo conjunto de cereales que pueden provocar contaminación cruzada por contacto durante la cosecha, la molienda o en la manipulación del producto final. Por este motivo, es necesario un control de la presencia de prolaminas en los alimentos que son certificados como *sin gluten* para verificar el cumplimiento de la normativa vigente⁷.

A nivel europeo, existe una normativa del año 2009 que fija las cantidades límite de gluten presente en alimentos certificados⁸. Para este tipo de productos que se etiquetan como *sin gluten*, el contenido máximo de gluten permitido es de 20 mg/kg (es decir, 20 ppm) y, para productos *bajos en gluten*, el límite es de 100 mg/kg (100 ppm) en el producto procesado. La Federación Española de Asociaciones de Celíacos (FACE), por su parte, posee una etiqueta propia para aquellos alimentos certificados con una cantidad de gluten máxima de 10 ppm¹. Estos valores no son lo suficientemente seguros para algunos pacientes, pero no pueden ser disminuidos debido a que la metodología analítica existente ofrece unos límites de cuantificación muy cercanos a estos valores.

1.2. Métodos de análisis de gluten

La detección del gluten presenta distintos inconvenientes por estar constituido por varias regiones inmunotóxicas. Hasta no hace mucho se pensaba que únicamente las prolaminas eran inmunotóxicas, pero estudios recientes indican que también las gluteninas están implicadas⁶. Las prolaminas son proteínas ricas en aminoácidos prolina (Pro, P) y glutamina (Gln, Q), con secuencias diferentes dependiendo del cereal. Otro inconveniente es que durante la digestión las proteínas del gluten son hidrolizadas en forma de péptidos de longitudes y secuencias distintas, que no mantienen sus lugares de reconocimiento pero que son igualmente tóxicos, lo que dificulta la cuantificación de prolaminas en muestras hidrolizadas.

Dentro de los numerosos péptidos que constituyen epítomos para las células T y desencadenan la celiaquía⁸, se identificó como compuesto inmunodominante, es decir, como indicador primario de la respuesta inflamatoria de la enfermedad celíaca, al péptido 33-mer, cuya secuencia de aminoácidos es: LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF⁹. Esta secuencia se corresponde con los residuos que se encuentran entre las posiciones 57 y 89 de la α 2-gliadina¹⁰ (en el trigo) y que está presente con algunas variaciones en cebada y centeno⁹. Este péptido es resistente a la digestión por proteasas y su tiempo de vida medio es de más de 20 horas, de manera que llega intacto al intestino, desarrollando su efecto tóxico ya que es estable cuando se expone a las microvellosidades del intestino delgado. Se comprobó que reacciona con la transglutaminasa tisular (tTG), el mayor autoantígeno de la enfermedad celíaca. En su secuencia presenta zonas identificadas como epítomos que reaccionan con las células T: PFPQPQLPY, tres copias de PQPQLPYQ y, dos copias de PYPQPQLPY¹⁰.

Dado que este péptido es el más predominante en cuanto a la inmunotoxicidad asociada al gluten, se ha utilizado como molécula diana para obtener anticuerpos contra el gluten que han servido para desarrollar métodos de análisis inmunoquímicos^{11,12}.

Existen distintos tipos de metodologías analíticas que permiten la cuantificación de gluten en alimentos¹⁰: métodos inmunoquímicos¹³ (se basan en el reconocimiento entre un anticuerpo y su diana), métodos basados en el ADN^{14, 15} (detección y cuantificación de hebras de ADN de secuencia específica) y métodos proteómicos^{16, 17} (utilizan una técnica de separación acoplada a un espectrómetro de masas).

En el campo de la proteómica se han desarrollado distintos métodos para cuantificar gluten nativo (MALDI-TOF-MS)^a o péptidos derivados del gluten (LC-ESI-MS)^b, lo que permite el análisis de muestras hidrolizadas. En la actualidad, el sistema de reacción múltiple monitorizada (MRM) ha sido aplicado en la cuantificación de péptidos derivados del gluten en alimentos procesados de trigo¹⁸ y cebada¹⁹. Sin embargo, ninguno de estos métodos permite cuantificar el contenido total de gluten como dicta la legislación, sino la cuantificación de determinados péptidos. En general, estos métodos están más orientados hacia la caracterización de fragmentos inmunotóxicos. Además, como inconveniente principal de estas técnicas destaca que no son aplicables a análisis de rutina, debido al alto coste del equipamiento requerido y a que el tiempo de análisis es superior al de otros métodos.

Los métodos que se basan en el ADN presentan elevada selectividad, pero son métodos indirectos, que necesitan establecer una relación entre el ADN presente y la cantidad de proteína que hay en la muestra. Esto se debe a que durante el procesado del alimento, la proteína y el ADN pueden sufrir degradaciones diferentes o segregación. Aun así, se utilizan como métodos alternativos de confirmación. En la actualidad, se están empezando a desarrollar genosensores para detección de gluten con el fin de abaratar los costes de los métodos tradicionales basados en PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a tiempo real (RT-PCR) y permitir un análisis descentralizado^{14, 20}.

En cuanto a los métodos inmunoquímicos, son los más utilizados a la hora de realizar análisis de rutina, ya que son fácilmente comercializados en forma de kits, permitiendo

^a Combina desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI, de sus siglas en inglés) como técnica de ionización suave con un analizador de tiempo de vuelo (TOF).

^b Los péptidos se separan por Cromatografía de Líquidos (LC) y, a continuación, se acopla a la detección por Espectrometría de Masas (MS) empleando la técnica de Ionización por Electro spray (ESI) para la producción de iones.

una rápida y sencilla cuantificación de gluten en distintas matrices. Hasta ahora, el único método validado por la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para detección de gluten en alimentos y, que es considerado como método oficial por el Codex Alimentarius, es un ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) tipo sándwich desarrollado con el anticuerpo monoclonal R5²¹ empleando el patrón de gliadina producido por *Prolamin Working Group (PWG)*²², que es el único patrón disponible comercialmente. Está compuesto por una mezcla de proteínas de 28 especies distintas de trigo de Europa. El PWG no alcanza la categoría de material de referencia, entre otras razones, por la variabilidad genética que existe entre los distintos tipos de trigo, no pudiendo ofrecer las garantías necesarias de reproducibilidad exigidas para tal fin, pero es un material de consenso ampliamente utilizado para desarrollar ensayos contra gluten.

El anticuerpo R5 está dirigido contra la secalina²³, que es la prolamina del centeno, mostrando gran afinidad con las secuencias aminoacídicas: QQFPF, QQQFP, LQPFP y QLFPF, presentes en α -, β -, γ - y ω - gliadinas²⁴. Dichas secuencias se encuentran en las prolaminas de trigo, cebada y centeno, pero no en avena, por lo que con este anticuerpo no se puede realizar la cuantificación de aveninas. Tampoco es posible analizar muestras que hayan sido hidrolizadas con este formato tipo sándwich. Este mismo anticuerpo ha sido utilizado para desarrollar un formato de ensayo ELISA competitivo, que posibilita la detección de péptidos más pequeños resultantes de procesos de hidrólisis²⁵. El límite de detección de este tipo de ensayos, tanto sándwich como competitivo, es de 5 ppm, siendo insuficiente para proteger a los celíacos que presentan mayor intolerancia al gluten.

Más recientemente se ha desarrollado una metodología utilizando el anticuerpo monoclonal denominado G12^{12, 26}, dirigido contra el péptido inmunotóxico 33-mer presente en la α 2-gliadina. Este anticuerpo presenta una elevada reactividad frente a las prolaminas presentes en trigo, cebada, centeno y algunos tipos de avena²⁷. El límite de detección obtenido para ensayos tipo sándwich y competitivo utilizando el anticuerpo G12 es de 0,6 ppm y 0,3 ppm, respectivamente. Este anticuerpo permite una mayor sensibilidad en el análisis y, en algunos casos, la cuantificación de aveninas,

por lo que es un gran candidato para reemplazar al anticuerpo R5 como método de referencia a la hora de cuantificar gluten en alimentos.

1.3. Aptámeros como elemento de reconocimiento molecular

Como alternativa al uso de los tradicionales anticuerpos monoclonales para detectar el gluten en alimentos, en este trabajo se propone el uso de aptámeros como receptor molecular, ya que aporta mayor afinidad y especificidad por el analito, entre otras ventajas²⁸. Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN de cadena sencilla, cuya longitud es inferior a 100 nucleótidos, que adoptan una estructura tridimensional característica capaz de reconocer con elevada selectividad y afinidad a una amplia gama de moléculas diana, tales como proteínas, carbohidratos, moléculas pequeñas, células enteras e incluso organismos²⁹.

Los aptámeros se obtienen *in vitro* a través de un proceso denominado SELEX (*Systematic Evolution Ligands by EXponential enrichment*). Este método fue publicado en 1990 por Tuerk y Gold³⁰, y Ellington y Szostak³¹ de forma independiente. Inicialmente, se seleccionaron aptámeros de ARN partiendo de una biblioteca aleatoria de ácidos nucleicos y, posteriormente, esta selección fue ampliada a aptámeros de ADN³². Desde entonces, la tecnología SELEX se convirtió en una herramienta importante para investigar nuevos medicamentos basados en estos receptores, así como de reactivos de afinidad novedosos para su aplicación en métodos de diagnóstico y análisis.

El método SELEX se desarrolla a partir de la repetición sucesiva de 5 etapas: incubación, separación, elución, amplificación y acondicionamiento (**Figura 1**).

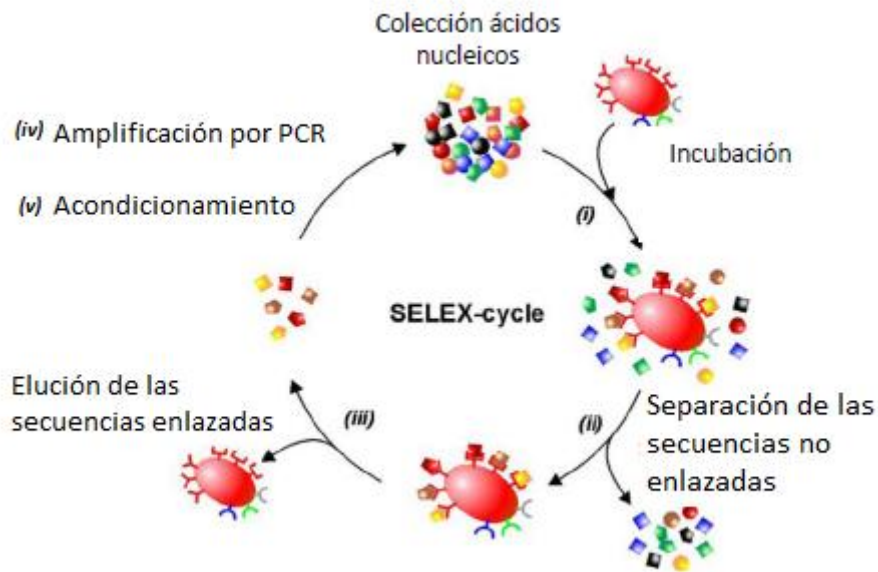


Figura 1. Procedimiento de selección *in vitro* de aptámeros mediante el método SELEX.

Este proceso comienza con una colección de oligonucleótidos que contiene entre 10^{14} - 10^{15} secuencias diferentes de ADN o ARN de cadena sencilla. Esta biblioteca se genera por síntesis química y puede ser utilizada sin necesidad de un tratamiento previo.

Los oligonucleótidos que componen esta biblioteca están formados por una región central variable de entre 40 y 60 nucleótidos flanqueada por dos regiones constantes, denominadas cebadores, que servirán para su posterior amplificación por PCR. Inicialmente se incuba la colección de oligonucleótidos con la molécula diana durante un cierto tiempo para que las secuencias que tengan afinidad por la diana se enlacen a ella (**Figura 1, etapa i**). A continuación, se separan las secuencias que se han unido a la molécula diana de las secuencias no enlazadas, descartándose estas últimas (**Figura 1, etapa ii**). Las secuencias que se han enlazado son separadas de las dianas por elución (**Figura 1, etapa iii**) y se amplifican mediante PCR (**Figura 1, etapa iv**). Posteriormente, se realiza una etapa de acondicionamiento en la que las hebras dobles resultantes de la PCR se separan para obtener hebras de cadena sencilla (**Figura 1, etapa v**).

Esta nueva colección de oligonucleótidos, enriquecida en secuencias de mayor afinidad se vuelve a incubar con las moléculas diana dando comienzo a un nuevo ciclo. En cada ciclo las condiciones de interacción y separación son cada vez más restrictivas para favorecer la selección de las secuencias con mayor afinidad. Normalmente, se necesitan entre 6 y 20 ciclos de SELEX para la selección de aptámeros de alta afinidad.

El grado de enriquecimiento se determina después de cada ciclo mediante ensayos de enlace. Cuando el porcentaje de oligonucleótidos con alta afinidad es suficiente, se lleva a cabo una clonación para separar las distintas secuencias de oligonucleótidos obtenidas. Finalmente, se secuencian para conocer la secuencia de los oligonucleótidos seleccionados.

Los aptámeros identificados por el proceso de selección suelen tener de 80 a 100 nucleótidos incluyendo los cebadores. Sin embargo, no todos los oligonucleótidos de un aptámero juegan un papel crítico en la unión a su diana. Por ello, los oligonucleótidos no esenciales son eliminados posteriormente en estudios de truncado^{33, 34}.

Dentro de los factores que más influyen en la interacción aptámero-diana, se encuentra la naturaleza de los grupos funcionales de la misma, que debe cumplir una serie de requisitos. Éstos se basan en los principios básicos de la interacción molecular de un complejo aptámero-diana. En moléculas diana cuyo peso molecular es elevado (como ocurre en proteínas), a la hora de formar el enlace con el aptámero estarán implicadas las cadenas laterales de los aminoácidos de carácter básico, como lisina o arginina, que son a menudo responsables de formar enlaces de hidrógeno.

Aunque en principio se podrían obtener aptámeros para cualquier molécula, se sabe que se logra un mayor éxito si se cumplen ciertos requisitos:

- 1) Las moléculas de analito definidas de manera individual deben estar presentes en una cantidad suficiente y con un alto grado de pureza. Esto permite minimizar el enriquecimiento en secuencias que enlazan inespecíficamente a la diana y, por tanto, se incrementa la especificidad de la selección.

- 2) Cuando se trabaja con moléculas que presentan gran carácter hidrofóbico (por ejemplo, largas cadenas alifáticas) y con grupos cargados negativamente (por ejemplo, grupos fosfato), la selección de aptámeros se ve dificultada debido a que las secuencias de ADN están cargadas negativamente y, por acción de fuerzas de repulsión electrostáticas, se enlazan en menor cantidad.
- 3) La selección de aptámeros específicos es más efectiva cuando la molécula diana posee en su estructura: grupos cargados positivamente (por ejemplo, grupos amino primarios), átomos capaces de formar enlaces de hidrógeno o estructuras planas como son los anillos aromáticos.

Los aptámeros se han propuesto como potenciales sustitutos de los anticuerpos convencionales debido a sus propiedades de reconocimiento similares y otras características superiores. De hecho, la constante de afinidad del enlace aptámero-diana varía en el intervalo de μM a pM , siendo comparable a la de algunos anticuerpos monoclonales³⁵. Además, presentan elevada selectividad, ya que son capaces de diferenciar entre homólogos estrechamente relacionados³⁶ e incluso enantiómeros³⁷.

Los aptámeros presentan más ventajas respecto a los anticuerpos tradicionales, haciéndolos prometedores para un uso regular en la práctica analítica³⁸. Los aptámeros son seleccionados *in vitro*, por lo que no se necesita inmunizar animales ni conjuntos celulares, mientras que los anticuerpos se obtienen haciendo uso de estos sistemas. Este hecho permite generar aptámeros contra compuestos tóxicos o no inmunogénicos. Además pueden obtenerse aptámeros dirigidos contra un epítipo concreto, lo que no es posible con los anticuerpos.

Los aptámeros, además, pueden ser desnaturalizados y recuperar su conformación nativa posteriormente, por lo que pueden ser usados en condiciones de pH y temperatura extremas. Como se obtienen por síntesis química, son baratos y presentan gran reproducibilidad entre lotes, pudiendo purificarse en condiciones desnaturalizantes consiguiendo elevados grados de pureza. Por último, son fácilmente modificables, con marcas moleculares u otros grupos funcionales de bajo coste.

Debido a estas ventajas, en los últimos años se han empezado a desarrollar bioensayos basados en el uso de aptámeros como receptores de afinidad (aptaensayos), que son utilizados en diversos campos de investigación³⁸, ya que están destinados a convivir con los anticuerpos como receptores de afinidad, en diversas aplicaciones.

1.4. Métodos de inmovilización de aptámeros

Debido a las numerosas ventajas que presenta el uso de aptámeros como elemento de reconocimiento molecular, ha ido aumentando el número de dispositivos analíticos en los que se requiere la inmovilización del receptor a su superficie para poder integrarlo en la plataforma sensora.

Uno de los principales objetivos a la hora de inmovilizar el aptámero es mantener la afinidad de unión y la selectividad que el aptámero posee en disolución. La elección adecuada y cuidadosa del método de inmovilización del aptámero es determinante para el desarrollo del aptasensor, ya que la sensibilidad y selectividad del ensayo estarán influidas por la orientación y accesibilidad del receptor.

En general, los métodos de inmovilización deben permitir un control adecuado de la densidad de empaquetamiento y de la orientación de las moléculas de manera que se facilite el reconocimiento molecular. La inmovilización debe conducir a una pérdida mínima de la capacidad de enlace del aptámero y, la adsorción inespecífica debe ser despreciable.

Se han explorado distintas posibilidades para la fijación de aptámeros sobre superficies. La mayoría de ellas se basan en métodos previamente desarrollados para la inmovilización de ADN y otras biomoléculas en ensayos de afinidad (genosensores, inmunosensores, etc.). Balamurugan *et al.*⁴³ han hecho una revisión de la química de inmovilización de los aptámeros sobre superficies electrónicas que se resumen en la **Tabla 1.**

Método de Inmovilización	Control de la orientación	Capacidad de Enlace	Sencillez
Fisorción	+	+	+++
Adsorción electrostática	++	++	++
Afinidad	+++	+++	+
Covalente	+++	+++	+
Quimisorción (Au-S)	+++	+++	+

Tabla 1. Evaluación de diferentes métodos de inmovilización de aptámeros (+: pobre, +++: bueno).

Uno de los métodos más frecuentes para el anclaje de aptámeros sobre superficies sólidas que permite una inmovilización orientada y, por tanto, una captura eficiente de la diana, es la formación de monocapas autoensambladas o SAMs (*Self-Assembled Monolayers*). Aunque existen varias opciones, la más utilizada es la unión oro-azufre (con una energía de quimisorción de aproximadamente 30 Kcal/mol) que supone el empleo de un electrodo de oro, como soporte sólido, y de aptámeros modificados con un grupo tiol. Con este método se consiguen películas resistentes y estables termodinámicamente por inmersión del sustrato de oro en una disolución que contiene el receptor tiolado.

Como es de esperar, durante la formación de la monocapa el aptámero se une a la superficie de oro mediante el grupo tiol terminal. Sin embargo, los átomos de nitrógeno de las bases del ADN poseen cierta afinidad por el oro. Para eliminar estas interacciones inespecíficas entre los nucleótidos y el sustrato de oro dejando el aptámero enlazado a través del grupo tiol terminal, se emplea un tiol diluyente que además modula la densidad superficial del aptámero y bloquea los sitios libres sobre la superficie de oro, evitando la unión inespecífica de otras moléculas como proteínas. El tiol diluyente más ampliamente utilizado es el 6-mercapto-hexanol (MCH).

Para facilitar la interacción del aptámero inmovilizado con el ligando en disolución, es frecuente añadir un espaciador entre la superficie y el receptor anclado a la misma a través de un grupo funcional adecuado que, en el caso de las monocapas autoensambladas sobre oro, es un grupo tiol. El papel del espaciador es alejar el receptor de la superficie, haciéndolo más accesible al ligando que se encuentra en disolución.

Aunque la naturaleza química del espaciador puede ser diversa, es frecuente emplear espaciadores oligonucleotídicos que se añaden fácilmente a la secuencia del aptámero durante su síntesis en fase sólida⁴⁴.

Existen distintas opciones, pero la más común es utilizar una cadena de nucleótido timidina debido a que la timina (T) tiene menor afinidad por el oro que el resto de bases nitrogenadas, proporcionando el espaciador más inerte de todos los oligonucleótidos⁴⁵.

✚ 1.5. Técnicas electroquímicas

- **Voltamperometría cíclica.**

La voltamperometría cíclica es el primer experimento que se lleva a cabo en un estudio electroquímico por ser la técnica electroquímica más eficiente y versátil para el estudio mecanístico de las reacciones electrónicas³⁹.

Se basa en la extensión lógica de la voltamperometría de barrido lineal, realizándose una inversión en el sentido del barrido de potencial. De modo que, se aplica al electrodo de trabajo una señal de excitación triangular, en la que el potencial se barre linealmente desde un valor inicial E_i hasta un valor E_λ *potencial de inversión*, al que se invierte la dirección del barrido hasta alcanzar un potencial final E_f ³⁹ (**Figura 2**).

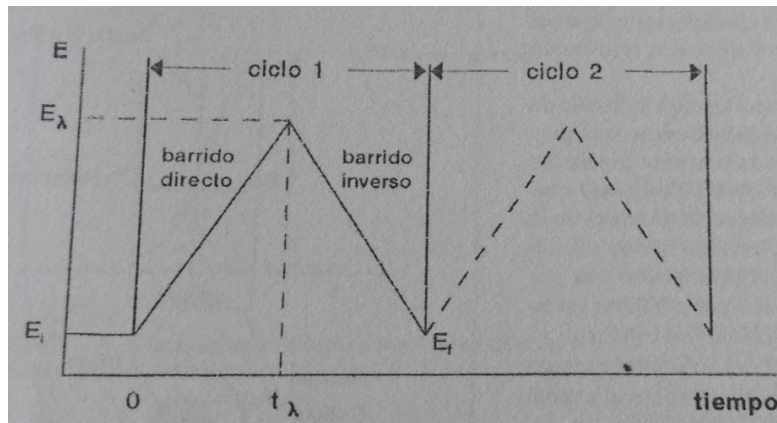


Figura 2. Señal de excitación potencial-tiempo triangular usada en voltamperometría cíclica³⁹.

Para obtener un voltamperograma cíclico, se mide la corriente que pasa por el electrodo de trabajo en una disolución sin agitar durante un barrido de potencial. La voltamperometría cíclica es capaz de generar rápidamente una nueva especie durante el barrido directo y, a continuación, probar su existencia en el barrido inverso (**Figura 3**).

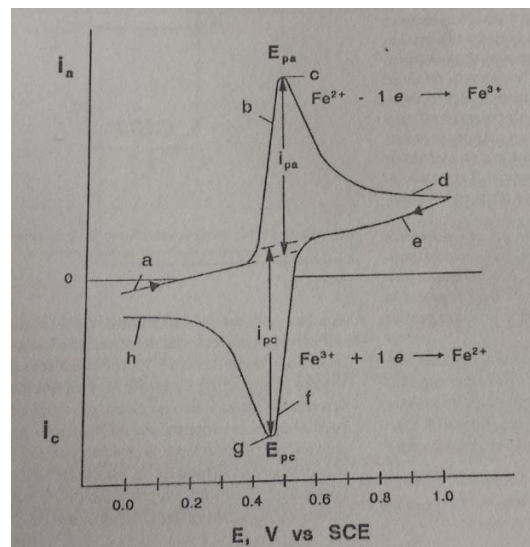


Figura 3. Ejemplo de voltamperograma cíclico de la especie Fe^{2+} en medio H_2SO_4 1 M³⁹.

Los parámetros de interés en voltamperometría cíclica son las magnitudes de las corrientes de pico, i_{pa} e i_{pc} o, su relación, i_{pa}/i_{pc} y la separación entre los potenciales de pico, $E_{pa} - E_{pc}$. La medida de las intensidades de pico implica la extrapolación de una

línea de base que se suele tomar como la corriente existente antes de que el pico comience a desarrollarse en cada uno de los barridos, siendo el establecimiento de una línea base correcta esencial para la medida exacta de las corrientes de pico³⁹.

- **Cronoamperometría.**

Las técnicas electroanalíticas conocidas como *cronoamperométricas* se basan en una misma función de excitación que consiste en uno o varios saltos de potencial aplicados a un electrodo sumergido en una disolución sin agitar⁴⁰.

La función de excitación consiste en un salto de potencial desde un valor inicial E_i , al que no hay corriente debida a un proceso redox, hasta un segundo potencial E_s , cuyo valor es tal que toda la forma oxidada (supuesta una reacción de reducción) en la superficie del electrodo es inmediatamente reducida, provocando un gradiente de concentración y, por tanto, un transporte de materia debido a la difusión de la especie oxidada desde el seno de la disolución hasta la superficie del electrodo. Tan rápido como la especie oxidada difunde al electrodo, se convierte en una especie reducida (**Figura 4**). Por tanto, la velocidad de desaparición de la especie oxidada y la consecuente velocidad de formación de la especie reducida, están controladas por la velocidad de difusión de la especie oxidada a la superficie del electrodo bajo la influencia del gradiente de concentración⁴⁰.

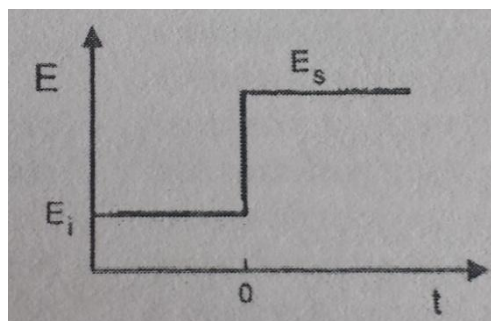


Figura 4. Señal de excitación empleada en cronoamperometría cuando la especie que se encuentra en disolución es oxidada⁴⁰.

La corriente que fluye por el electrodo de trabajo utilizado, monitorizada en función del tiempo, es la respuesta registrada en esta técnica tras llevar a cabo el salto de potencial. La duración del salto de potencial (τ) viene determinada por el tipo de información deseada, pudiendo variar desde $10 \mu\text{s}$ hasta varios segundos. El salto de potencial (E_s) se termina invirtiendo el potencial hasta un valor final E_f , al que la especie reducida es oxidada de nuevo. Si este potencial es lo suficientemente positivo, la concentración de la especie reducida en la superficie del electrodo se hace cero. El valor del potencial E_s debe escogerse de modo que la relación de concentraciones entre especie oxidada y reducida en la superficie del electrodo sea pequeña⁴⁰ (Figura 5).

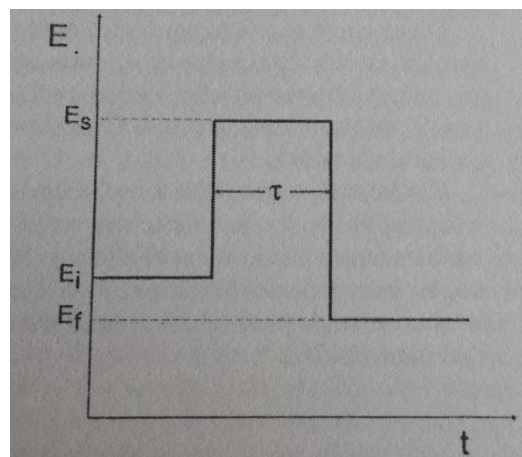


Figura 5. Señal de excitación empleada en las técnicas de salto de potencial⁴⁰.

El paso de E_i a E_s provoca la aparición de una elevada corriente instantánea como resultado de la reducción de la especie oxidada a la reducida. La corriente que pasa se debe a que dicha reducción crea un gradiente de concentración que produce, a su vez, un flujo neto de especie oxidada a la superficie del electrodo. Debido a que la especie oxidada no puede existir en el electrodo al potencial E_s , ésta debe ser eliminada por reducción. El flujo de especie oxidada y, por tanto, también la corriente, es proporcional al gradiente de concentración en la superficie del electrodo. El flujo continuado de la especie oxidada da lugar a que la zona de agotamiento de ésta se haga más grande y, como consecuencia, la pendiente del perfil de concentración en la

superficie disminuye con el tiempo, ocurriendo lo mismo con la corriente, siendo inversamente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo⁴⁰ (**Figura 6**).

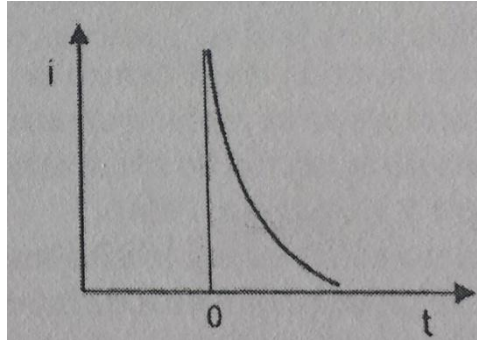


Figura 6. Cronoamperograma en el que se muestra la respuesta corriente-tiempo⁴⁰.

- **Espectroscopia de Impedancia Faradaica.**

La Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (FIS) es una herramienta muy poderosa capaz de aportar información acerca de propiedades físicas y químicas de superficies electródicas modificadas. Las técnicas impedimétricas han ido desarrollándose con el objetivo de caracterizar adecuadamente la fabricación de biosensores y monitorizar todo tipo de reacciones electródicas, como pueden ser las catalizadas por enzimas o el reconocimiento molecular de determinadas moléculas de enlace como proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, etc⁴¹.

La FIS posee un elevado potencial para el análisis de propiedades interfaciales de superficies electródicas, mostrándose capaz de aportar información acerca de cambios de resistencia/capacitancia que tienen lugar sobre superficies conductoras o semiconductoras. Estos cambios en las propiedades eléctricas de la interfase electrodo disolución pueden producirse como consecuencia de un proceso de reconocimiento molecular. Por tanto, esta técnica ha sido utilizada como sistema de transducción en diferentes tipos de biosensores⁴¹.

La impedancia Z de un sistema se obtiene a partir de la medida de la corriente generada como respuesta a la aplicación de una perturbación sinusoidal del voltaje con una pequeña amplitud y frecuencia angular de variación, ω , a la celda

electroquímica. La impedancia se calcula como el cociente entre la función voltaje, $V(t)$ y la función de la corriente resultante $I(t)$.

$$Z = V(j\omega)/I(j\omega) = Z_{re}(\omega) + jZ_{im}(\omega) \quad (1)$$

Donde $\omega=2\pi f$; $j=\sqrt{-1}$; f = frecuencia de excitación.

Como se puede observar en la ecuación (1) la impedancia se trata de un valor complejo, ya que la función de la corriente puede variar de la de voltaje no sólo en el módulo sino en el desplazamiento de fase (ϕ). De este modo el valor de la impedancia puede expresarse con su módulo $|Z|$ y el ángulo de fase ϕ , o como la suma de una parte real, $Z_{re}(\omega)$ y otra imaginaria, $Z_{im}(\omega)$, componentes que se originan principalmente de la resistencia y capacitancia de la celda respectivamente.

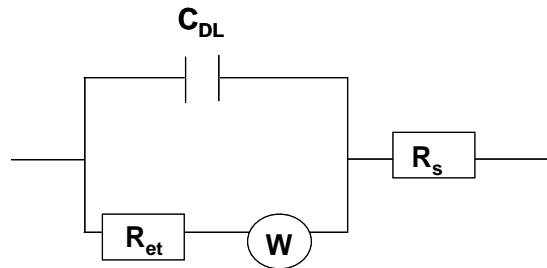
Dentro de las técnicas impedimétricas destacan la Impedancia no Faradaica que se basa en medidas de capacitancia y la Espectroscopia de Impedancia Faradaica (FIS) en la que tiene lugar un proceso faradaico. La FIS permite el estudio de la cinética y el mecanismo de las reacciones que tengan lugar sobre la superficie modificada del electrodo de trabajo⁴¹.

En la terminología electroquímica un proceso faradaico es aquel en el cual una carga es transferida a través de una interfase metal/disolución. Para llevar a cabo medidas de FIS debe existir una especie electroactiva en la disolución (habitualmente $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$).

Las transformaciones electroquímicas que tienen lugar en la interfase electrodo-disolución pueden modelizarse de acuerdo a circuitos electrónicos equivalentes, dentro de los cuales el circuito general más utilizado para modelizar los fenómenos interfaciales es el circuito de Randles (**Figura 7A**). En dicho circuito equivalente se incluye la resistencia óhmica de la disolución (R_s), la impedancia de Warburg (W), que depende de la difusión de los iones desde el seno de la disolución hacia la interfase electródica, la capacitancia de la doble capa (C_{DL}) y la resistencia a la transferencia

electrónica que aparece debido a la existencia de una molécula electroactiva en la disolución (R_{et}). R_s y W representan propiedades de la disolución, por lo que no se ven afectados por las transformaciones químicas que tienen lugar sobre la superficie electródica, mientras que C_{DL} y R_{et} dependen de las propiedades dieléctricas y aislantes de la interfase electrodo-disolución⁴¹.

(A)



(B)

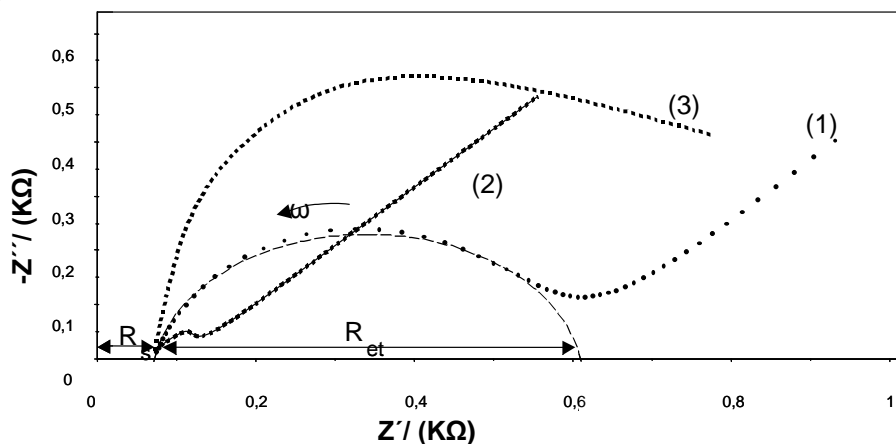


Figura 7. (A) Representación esquemática de un circuito de Randles. (B) Diferentes representaciones de Nyquist; (1) control mixto; (2) transferencia electrónica rápida; (3) transferencia electrónica lenta.

La R_{et} está relacionada con la cinética de transferencia electrónica de la molécula electroactiva presente en disolución a través de la interfase electródica, es decir, una modificación de la superficie electródica cuya naturaleza sea aislante afectará a la cinética de transferencia de carga a través de la interfase electródica disminuyéndola, aumentando, por lo tanto, la resistencia a la transferencia electrónica, R_{et} .

Una de las representaciones más habituales de un espectro de impedancias es la representación de Nyquist, que supone la representación de la $Z_{im}(\omega)$ frente a $Z_{re}(\omega)$ (**Figura 7B**). Esta representación puede tomar diferentes formas dependiendo de las características del experimento que se esté realizando, siendo una de las más habituales aquella en la que se observa una región que forma un semicírculo seguida de una línea recta (**Figura 7B (1)**). La parte semicircular, que aparece a las frecuencias más altas, se corresponde a la situación en la que el proceso está limitado por la transferencia electrónica, mientras que la parte lineal, que aparece a frecuencias más bajas representa la situación en la que el proceso está limitado por difusión. En el caso de procesos cuya transferencia electrónica es muy rápida, el semicírculo de la representación de Nyquist puede quedar muy reducido observándose una región lineal en la mayor parte del intervalo de frecuencias utilizado (**Figura 7B (2)**), mientras que en el caso de procesos en los cuales la transferencia electrónica es muy lenta dicha representación está formada solamente por un semicírculo de gran amplitud (**Figura 7B (3)**). Del espectro obtenido, se puede, por tanto, extraer las características de la cinética de transferencia electrónica y difusión. El diámetro del semicírculo se corresponde con el valor de R_{et} , mientras que la intersección de dicho semicírculo con el eje X a valores de frecuencias altos ($\omega \rightarrow \infty$) es igual a la resistencia de la disolución, R_s (**Figura 7**). La extrapolación del semicírculo hacia valores de frecuencia más bajos, permite obtener en el punto de la intersección con el eje X, el valor de $R_s + R_{et}$ ⁴¹.

Normalmente un espectro de impedancias se traza empleando valores de frecuencias comprendidos en el intervalo 10 mHz - 100 KHz, dentro del cual la impedancia está controlada por las propiedades interfaciales de los electrodos modificados, siendo mínimas las contribuciones debidas a otros fenómenos, tales como la inductancia de la celda o el efecto de las conexiones⁴¹.

1.6. Objetivos

El objetivo fundamental de este trabajo de investigación se basa en el estudio de la interacción entre el aptámero Gli1 y el péptido 33-mer que forma parte de la α -gliadina, como base para el desarrollo de un aptasensor electroquímico que permita llevar a cabo la determinación de la fracción inmunotóxica del gluten.

Teniendo en cuenta este objetivo general, se han formulado los siguientes objetivos específicos:

1. Selección del método de inmovilización del aptámero y evaluación de su influencia sobre la afinidad del enlace.
2. Optimización de los parámetros más relevantes que afectan a la señal analítica.
3. Evaluación de las características analíticas del ensayo.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies (IDT, España)* y suministrados en su forma libre de sales. Sus secuencias de bases se detallan en la **Tabla 2**.

Nombre	Función	Secuencia en sentido 5'-3'
(A) ₁₅ -SH	Sonda auxiliar de inmovilización	AAAAAAAAAAAAAAAA(CH ₂) ₃ .SH
(T) ₂₀ -Gli1	Aptámero	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTAGGCGAAATATAGCTAC AACTGTCTGAAGGCACCCAAT

Tabla 2. Nombres y secuencias de los oligonucleótidos empleados.

El oligonucleótido modificado con el grupo alcanotiol se suministró en forma protegida como disulfuro; por tanto, es necesario realizar una etapa de reducción para obtener el grupo tiol.

La etapa de reducción se lleva a cabo empleando Ditioneitol (DTT) como agente reductor en concentración 0,1 M. La mezcla de DTT y oligonucleótido liofilizado se incuba protegida de la luz durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, el oligonucleótido tiolado se aísla de la mezcla mediante una separación por exclusión por tamaños. Para ello se empleó una columna NAP-10 Sephadex G-25 DNA Grade (GE Healthcare) y, finalmente, se determinó la concentración de oligonucleótido tiolado espectrofotométricamente a 260 nm.

Se utilizó el péptido 33-mer modificado con biotina (Biomedal, España) de secuencia: LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPFHHHHHH-Biotina.

En la **Tabla 3** se recogen otros reactivos utilizados en este trabajo.

Reactivo	Pureza	Casa comercial
Ditiotreitol (DTT)	99%	Sigma
4-Aminotiofenol (Tioanilina)		Sigma-Aldrich
6-Mercapto-hexanol (MCH)	97%	Sigma-Aldrich
20x SSPE ¹		Sigma-Aldrich
Seroalbúmina bovina (BSA)		Sigma-Aldrich
PBS-Caseína		Thermo Scientific
10x PBS ²		Sigma-Aldrich
STRP-HRP ₂ *		Thermo Scientific
3, 3', 5, 5'- tetrametilbencidina (TMB)	99%	Sigma-Aldrich
[Fe(CN ₆)] ³⁻ (Ferricianuro)	99%	Fluka
[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (Ferrocianuro)	99,5%	Fluka
Tris-HCl		Sigma-Aldrich
H ₂ SO ₄	95%	Fisher
NaCl		Sigma-Aldrich
MgCl ₂		Fluka

Tabla 3. Reactivos empleados en el ensayo.

¹ 20x SSPE: disolución reguladora de fosfato 0,2 M de pH aproximado a 7,4 que contiene 2,98 M de NaCl y 0,02 M de EDTA.

² 10x PBS: disolución reguladora de fosfato 0,01 M, 0,0027 M de KCl y 0,137 M de NaCl, con un pH aproximado de 7,4.

* STRP-HRP₂: conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa de rábano silvestre.

La composición de las disoluciones empleadas en las diferentes etapas de construcción y operación del aptasensor es la siguiente:

- Disolución de inmovilización del aptámero: 2x SSPE (preparada a partir de la disolución comercial 20x SSPE).
- Disolución de enlace: BS³.
- Disolución de marcaje enzimático: PBS 1x (dilución 1:10 de la disolución comercial 10x PBS) + PBS-Caseína pH 7,4.

³ BS: disolución en la que se realizó el ensayo de reconocimiento aptámero-péptido 33-mer, que es el mismo medio que se empleó en la selección del aptámero (SELEX)^{33,34}, compuesta por 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl y 5 mM de MgCl₂.

Las disoluciones fueron preparadas con agua purificada mediante un sistema Milli-Q RG (Millipore).

2.2. Instrumentación

La señal electroquímica se mide por medio de un potenciostato PGSTAT 12 (EcoChemie, Holanda) controlado por un equipo informático que lleva incorporados los programas GPES 4.9005, para el desarrollo de las técnicas electroquímicas convencionales y FRA 4.9 para las medidas de impedancia.

La formación del dúplex de inmovilización del aptámero se llevó a cabo empleando un agitador termostatzado modelo Thermomixer Comfort (Eppendorf, España).

Las medidas espectrofotométricas se realizaron con un espectrofotómetro modelo Genesys 10S UV-VIS (Thermo Scientific, España).

En la detección cronoamperométrica se empleó una celda de dimensiones reducidas (volumen máximo 500 µL) de diseño propio (ADEPRO Ingeniería, S.L. Avilés, España).

En todas las técnicas electroquímicas se empleó un montaje potencioestático convencional de tres electrodos:

- Electrodo de referencia: se utilizó un electrodo Ag/AgCl/KCl (saturado) aislado de la disolución de medida mediante un puente salino de nitrato potásico (3

M), cuyo potencial fue contrastado periódicamente con un electrodo patrón de calomelanos saturado.

- Electrodo auxiliar: se empleó un alambre de platino.
- Electrodo de trabajo: se trabajó con dos tipos de electrodos de oro.
 - a) Electrodos de oro policristalino comercial de 1,6 mm de diámetro (BASi, UK).
 - b) Electrodos de oro construidos manualmente en el laboratorio a partir de superficies de oro obtenidas por evaporación térmica de un hilo de oro (99,999% de pureza) a alto vacío (10^{-6} torr) y, posterior condensación sobre una lámina de poliéster previamente irradiada con luz ($\lambda = 365$ nm) durante cinco días. La capa de oro resultante posee un espesor de 65-80 nm.

2.3. Procedimientos experimentales

2.3.1. Acondicionamiento de los electrodos de disco de oro.

El transductor de oro comercial fue sometido a un proceso de limpieza y acondicionamiento⁴² que se detalla a continuación.

Lo primero de todo es la eliminación de restos de materia orgánica sumergiendo el electrodo, durante 10 minutos, en disolución piraña (30% H_2O_2 , 70% H_2SO_4), tomando las precauciones oportunas dado que reacciona violentamente con la materia orgánica. A continuación, el electrodo de oro se pule con suspensiones de alúmina de 1, 0,3 y 0,05 μm de diámetro en agua ultrapura y sobre un recorte de tejido de poliéster. Posteriormente, se introduce en un baño de ultrasonidos (SELECTA, España) el tiempo necesario para eliminar las partículas de oro exfoliadas.

Para disponer de una superficie reproducible, el electrodo es introducido durante una hora en una disolución caliente de KOH 2 M; tras un lavado con agua Milli-Q, permanece 10 minutos sumergido en H_2SO_4 concentrado, se enjuaga de nuevo con agua Milli-Q y se pone en contacto con HNO_3 concentrado durante 10 minutos más. Finalmente, se lava con agua Milli-Q.

Por último, se realiza una limpieza electroquímica mediante voltamperometría cíclica en H_2SO_4 0,5 M, barriendo a unos potenciales entre 0 y 1,6 V con una velocidad de barrido de 100 mV/s.

2.3.2. Preparación y limpieza de los electrodos de lámina de oro.

La lámina recubierta de oro mediante evaporación térmica a alto vacío se corta en porciones de 3 mm de ancho y 10 mm de largo aproximadamente, a las que se les acopla una tira de cobre para obtener el contacto eléctrico. Posteriormente, se define la superficie del electrodo de trabajo con dos pegatinas de plástico transparente que evitan que el resto del oro entre en contacto con la disolución. Finalmente, se envuelve el conjunto con teflón con el fin de evitar que las disoluciones entren por el lateral y accedan a la tira de cobre. Se puede ver una secuencia resumida de la construcción en la **Figura 8**.

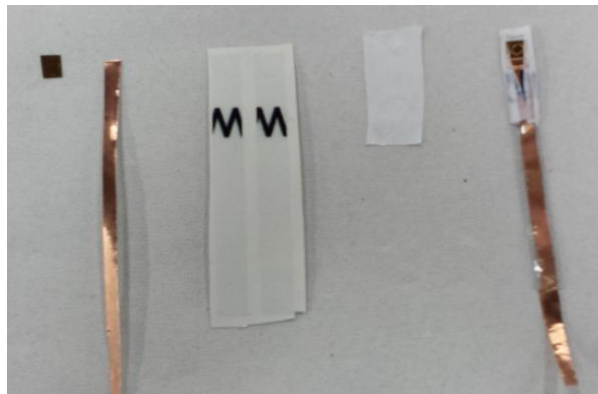


Figura 8. Etapas del proceso de construcción de los electrodos en orden de izquierda a derecha.

Una vez construido el electrodo, éste se somete a una limpieza electroquímica. Para ello se emplea una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y, mediante voltamperometría cíclica con una velocidad de 50mV/s y un barrido de (0,2-1,55) V, se hacen cinco ciclos para conseguir un voltamperograma típico de oro policristalino limpio (**Figura 9**).

Seguidamente, se lavan los electrodos con agua Milli-Q y se secan con una corriente de N_2 .

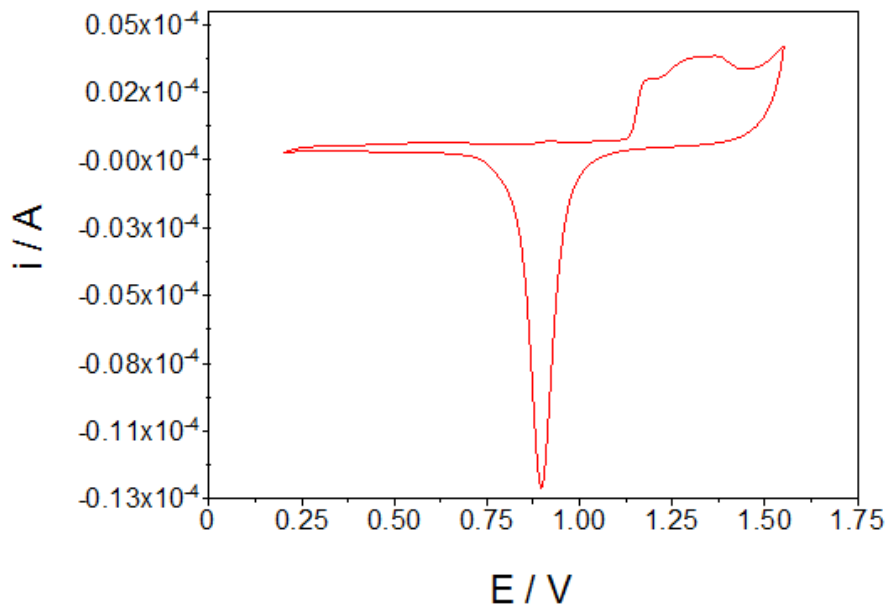


Figura 9. Voltamperograma cíclico típico de oro policristalino obtenido en 0,5 M H_2SO_4 . Velocidad de barrido 50 mV/s.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Diseño de la estrategia de inmovilización del aptámero

En el laboratorio de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo se han obtenido recientemente, mediante el método SELEX, aptámeros contra el péptido inmunodominante de gliadina 33-mer, siendo el más abundante en la mezcla final enriquecida el denominado Gli1. Este receptor oligonucleotídico tiene un tamaño de 40 bases (ver **Tabla 2**) y una masa molecular de alrededor de 12 KDa.

Con el objetivo de desarrollar un aptasensor electroquímico para la detección de gluten en alimentos, se propone el uso del aptámero Gli1 como receptor de afinidad inmovilizado sobre sustratos de oro.

Como se ha comentado anteriormente, la accesibilidad del receptor inmovilizado a su diana juega un papel crítico en el reconocimiento biomolecular en superficie, siendo necesario un control preciso de la orientación espacial y posicionamiento del aptámero sobre la superficie.

La estrategia de inmovilización directa del aptámero tiolado sobre el soporte de oro es la más habitual. Alternativamente, en este trabajo se propone una estrategia de anclaje por hibridación, es decir, el aptámero Gli1 se inmovilizará a la superficie metálica a través de un espaciador oligonucleotídico de hebra doble.

La estructura rígida de este espaciador reduce drásticamente su tendencia a enlazarse sobre la superficie de oro manteniendo el aptámero lejos de la misma, por lo que el reconocimiento molecular ocurrirá lejos de la superficie, al tiempo que se consigue una densidad de empaquetamiento óptima. Además, a diferencia de los sistemas en los que el receptor se enlaza directamente al soporte sólido donde los procesos de regeneración, drásticos y sucesivos, conducen a la degradación de la fase sensora, la regeneración de la superficie se produce por simple desnaturalización/hibridación.

Para ello, la secuencia aptamérica Gli1 se alargó en su extremo 5' con una cola de 20 timinas, (T)₂₀-Gli1, que como se ha explicado previamente, presenta baja afinidad por

el oro, para hibridar con una secuencia tiolada de 15 adeninas, (A)₁₅-SH, que permite su anclaje específico a la superficie metálica. Se escogieron secuencias de bases repetidas (politimina y poliadenina) en el diseño del espaciador oligonucleotídico para evitar una posible hibridación con la secuencia aptamérica o la formación de estructuras secundarias internas (autocomplementariedad) que impedirían el reconocimiento aptámero-diana. Además, en la hebra (T)₂₀-Gli1 quedan cinco timinas sin hibridar localizadas entre el dúplex espaciador (A-T)₁₅ y el aptámero, que aportan flexibilidad y favorecen el plegamiento del aptámero en presencia de su diana, el péptido 33-mer.

Un parámetro clave en el diseño del sistema de inmovilización vía hibridación es el número de pares de bases que componen el dúplex de anclaje. Éste ha de ser más estable que el complejo aptámero-péptido en superficie para que la formación de éste último no desplace el aptámero del soporte sólido destruyendo la fase sensora.

Para comprobar la idoneidad de la longitud del dúplex de inmovilización (A-T)₁₅ se determinó su energía libre de Gibbs empleando el programa de ordenador MFOLD⁴⁷ de acceso libre a través de Internet, que permite determinar este parámetro en unas condiciones de temperatura y concentración salina dadas, así como su estructura más estable (**Figura 10**); obteniéndose un valor de $\Delta G = -14,12$ Kcal/mol a 20°C y 0,3 M de Na⁺ (condiciones para el desarrollo del aptasensor).

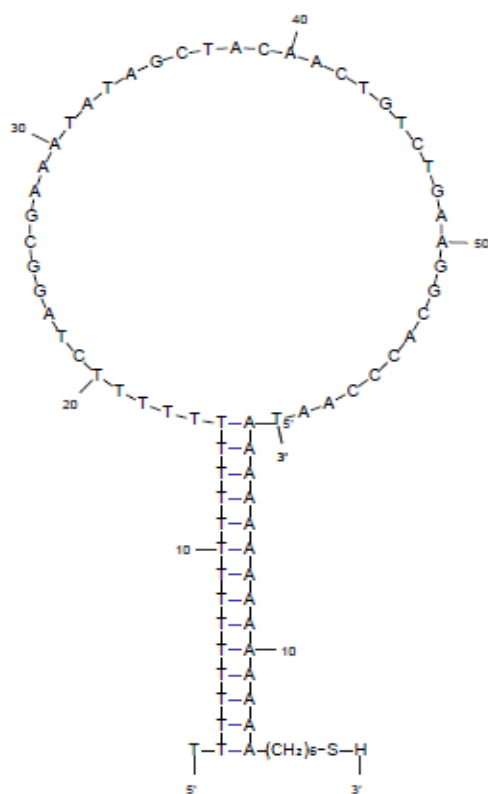


Figura 10. Estructura secundaria para el dúplex (A-T)₁₅.

Por otro lado, mediante la técnica *Isothermal Titration Calorimetric* (ITC) se determinó un valor para la constante de disociación (K_d) del enlace Gli1-33-mer, en disolución, de 45 nM^{46} . A través de la ecuación $\Delta G = -R T \ln K_d$ es posible calcular la energía libre de Gibbs de la formación del complejo en disolución: $\Delta G_{\text{Gli1-33mer}} = -9,75 \text{ Kcal/mol}$.

Según estos cálculos, el dúplex espaciador es más estable que el complejo Gli1-33-mer formado en disolución, lo que indica que el sistema de inmovilización es viable. En cualquier caso, se procedió a comprobarlo experimentalmente utilizando la técnica de Espectroscopia de Impedancia Faradaica (FIS).

Para realizar las medidas de impedancia, la fase sensora se construyó sobre electrodos de disco de oro previamente sometidos a una limpieza electroquímica (ver apartado 2.3.1.). El dúplex tiolado $(T)_{20}\text{-Gli1} + (A)_{15}\text{-SH}$ preformado en disolución, se inmovilizó sobre la superficie limpia de oro aplicando un potencial constante y positivo que acelera la aproximación de las hebras de ADN a la superficie electródica

permitiendo acortar el tiempo de formación de la fase sensora. Concretamente, se aplica un potencial de 0,3 V durante 5 minutos sobre el electrodo sumergido en 2x SSPE para reducir la superficie de oro, seguido de 5 minutos a 0,4 V en la disolución 0,1 μM de (T)₂₀-Gli1 + (A)₁₅-SH. A continuación, se lava el electrodo con agua Milli-Q y se incuba durante 50 minutos en una disolución 1 mM de un tiol bloqueante para bloquear la superficie de oro sin modificar y minimizar las adsorciones inespecíficas⁴⁶. En este trabajo se utilizaron como tiol bloqueante 6-mercapto-hexanol y tioanilina, y se evaluaron comparativamente.

La interacción con el péptido 33-mer biotinado se lleva a cabo incubando los electrodos modificados con concentraciones crecientes de péptido en la disolución de enlace (BS) durante 30 minutos. Posteriormente, el electrodo se introduce en la disolución de medida (10 mM Tris-HCL pH 7,4 + 100 mM KCl + 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) donde se obtiene el espectro a un potencial de 0,223 V, usando un rango de frecuencias de 10 KHz a 100 mHz y una amplitud de corriente alterna de 5 mV⁴⁶.

Los espectros obtenidos para ambos tipos de fases sensoras se muestran en la siguiente figura (**Figura 11**).

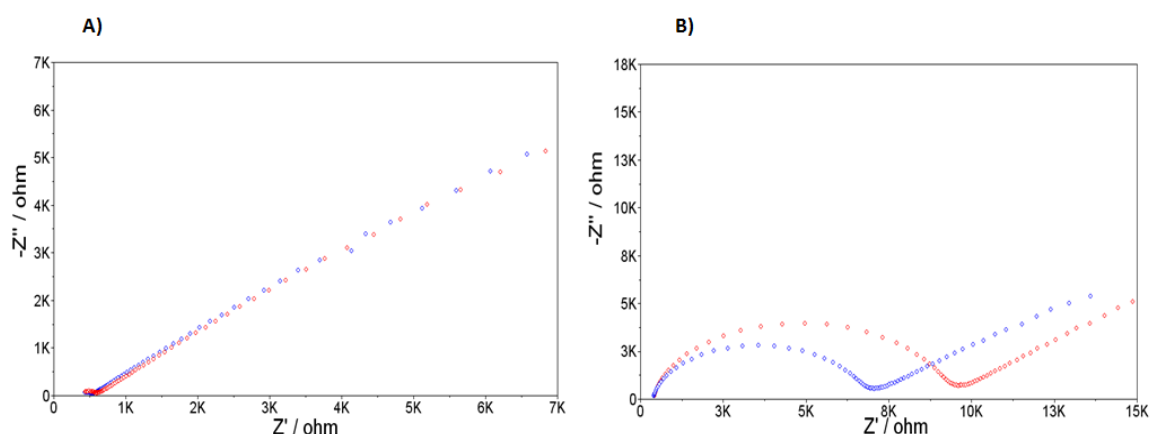


Figura 11. Representación de Nyquist correspondiente a electrodos de oro modificados con: A) aptámero y tioanilina, B) aptámero y 6-mercapto-hexanol tras incubación con: (azul) 0 nM, (rojo) 500 nM de péptido 33-merBiot.

En el caso de la fase sensora constituida por el aptámero y tioanilina como bloqueante (**Figura 11 A**) el espectro registrado se corresponde con una transferencia electrónica rápida, probablemente debido a la estructura aromática de la tioanilina, que da como resultado una monocapa muy conductora. Tras su incubación con 500 nM de péptido biotinado, no se observa cambio apreciable en el diagrama de Nyquist, si bien, no quiere decir que no haya reconocimiento molecular, sino que no es posible detectarlo en estas condiciones.

Cuando se emplea 6-mercapto-hexanol como tiol bloqueante (**Figura 11 B**) se registra un cambio significativo en la resistencia a la transferencia electrónica tras incubación con 33-merBiot, indicando que se produce el reconocimiento molecular entre el aptámero y el péptido en superficie y que, por tanto, el diseño de inmovilización del receptor aptamérico es adecuado.

3.2. Determinación de la constante de afinidad

Una vez comprobado que el sistema de inmovilización propuesto permite el reconocimiento molecular en superficie y que éste puede ser detectado mediante Espectroscopia de Impedancia Faradaica empleando 6-mercapto-hexanol como tiol bloqueante, se trató de determinar la constante de afinidad del enlace utilizando la misma metodología.

Para ello se incubaron electrodos de oro modificados con nuevas fases sensoras obtenidas de forma equivalente con concentraciones crecientes del péptido 33-merBiot durante 30 minutos a temperatura ambiente y bajo agitación, registrándose a continuación el espectro de impedancias. Los resultados aparecen representados en la **Figura 12**.

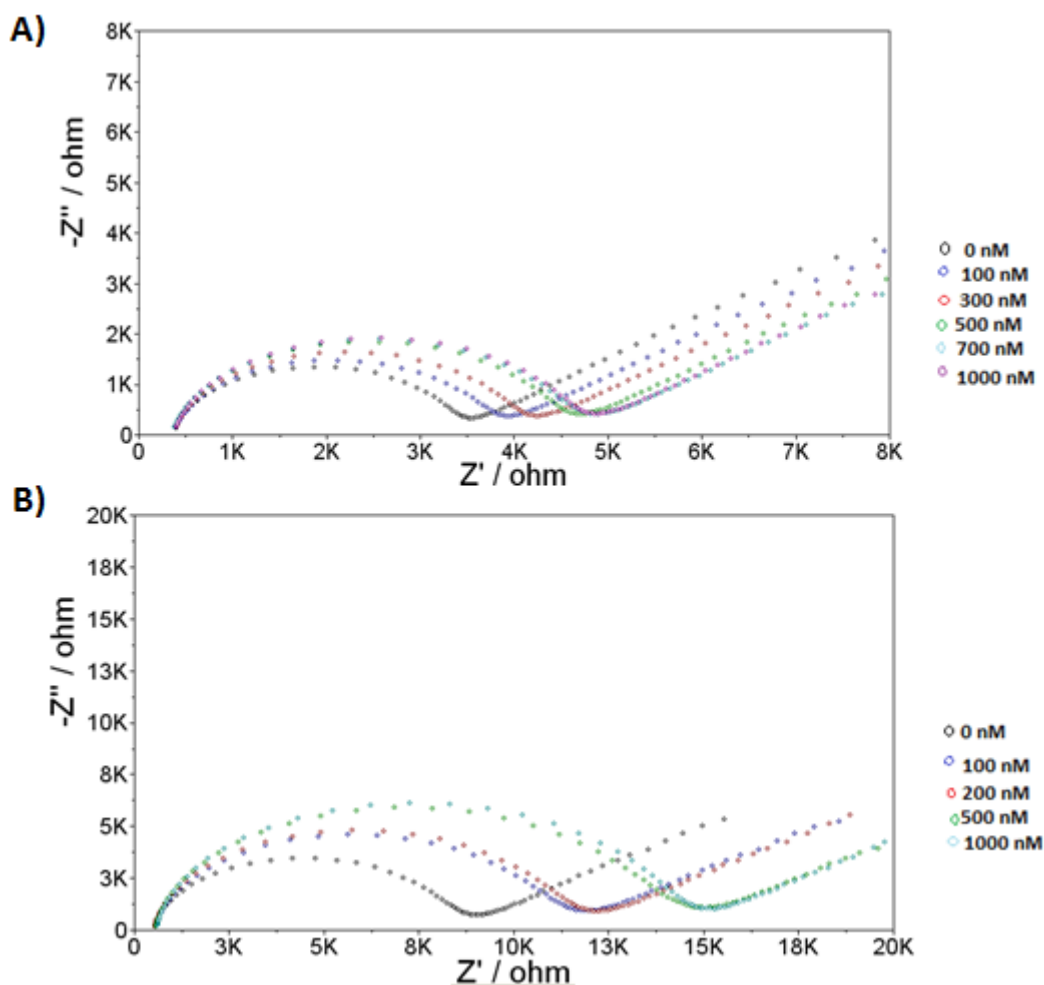


Figura 12. Representación de Nyquist correspondiente a electrodos de oro modificados con aptámero y 6-mercapto-hexanol tras incubación con distintas concentraciones de péptido 33-merBiot.

En la **Figura 12 A** se muestra el espectro de impedancias obtenido para un electrodo de disco de oro modificado con una monocapa de aptámero + 6-mercapto-hexanol incubado con distintas concentraciones de péptido. Se puede observar como a medida que aumenta la concentración de péptido, la resistencia a la transferencia de electrones es mayor debido a la formación del complejo aptámero-péptido biotinado en la superficie del electrodo.

En la **Figura 12 B** se muestra el espectro de impedancias que se obtuvo para un segundo electrodo de disco de oro modificado de la misma manera que en el caso anterior e incubado con concentraciones crecientes de péptido. El resultado es el

mismo que en el caso anterior (**Figura 12 A**), a medida que aumenta la concentración de péptido 33-mer biotinado, aumenta la resistencia a la transferencia de electrones.

En ambos casos (**Figuras 12 A, 12 B**), para una concentración de péptido de 1000 nM no se observa cambio en el espectro, lo que indica la saturación de la fase sensora.

Para poder comparar diferentes fases sensoras, los valores obtenidos se expresan en porcentaje de aumento de resistencia a la transferencia de electrones (R_{et}), que se denota por % S:

$$\% S = \frac{R_{eq} - R_0}{R_0} \times 100$$

donde R_{eq} es la resistencia a la transferencia de electrones (R_{et}) en equilibrio, tras incubación con péptido 33-mer biotinado; y R_0 es la resistencia a la transferencia de electrones (R_{et}) al inicio.

Las señales obtenidas en función de la concentración de péptido biotinado y los porcentajes de señal calculados para cada una de ellas se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 4**).

Electrodo 1			Electrodo 2		
Concentración (nM)	Señal (Ω)	% Señal	Concentración (nM)	Señal (Ω)	% Señal
0	3,06E+03	0	0	7,90E+03	0
100	3,40E+03	11,05	100	1,05E+04	32,34
300	4,16E+03	21,13	200	1,08E+04	37,07
500	3,71E+03	35,66	500	1,32E+04	67,41
700	4,29E+03	40,13	1000	1,38E+04	74,27
1000	4,33E+03	41,25			

Tabla 4. Valores de impedancia obtenidos para ambos electrodos tras incubar con el péptido 33-merBiot.

Los datos de la **Tabla 4** se ajustaron a la Isoterma de Langmuir para obtener la constante de afinidad empleando el programa *Origin Pro 8.6*, que permite realizar un ajuste no lineal. La Isoterma de Langmuir viene definida por la ecuación:

$$[B] = \frac{[F] \times B_{\text{máx}}}{K_d + [F]}$$

siendo B la fracción de ligando enlazado a la molécula diana; F la fracción de ligando libre y K_d la constante de disociación para un sitio de unión.

El ajuste obtenido para cada uno de los electrodos se muestra en la **Figuras 13 y 14**.

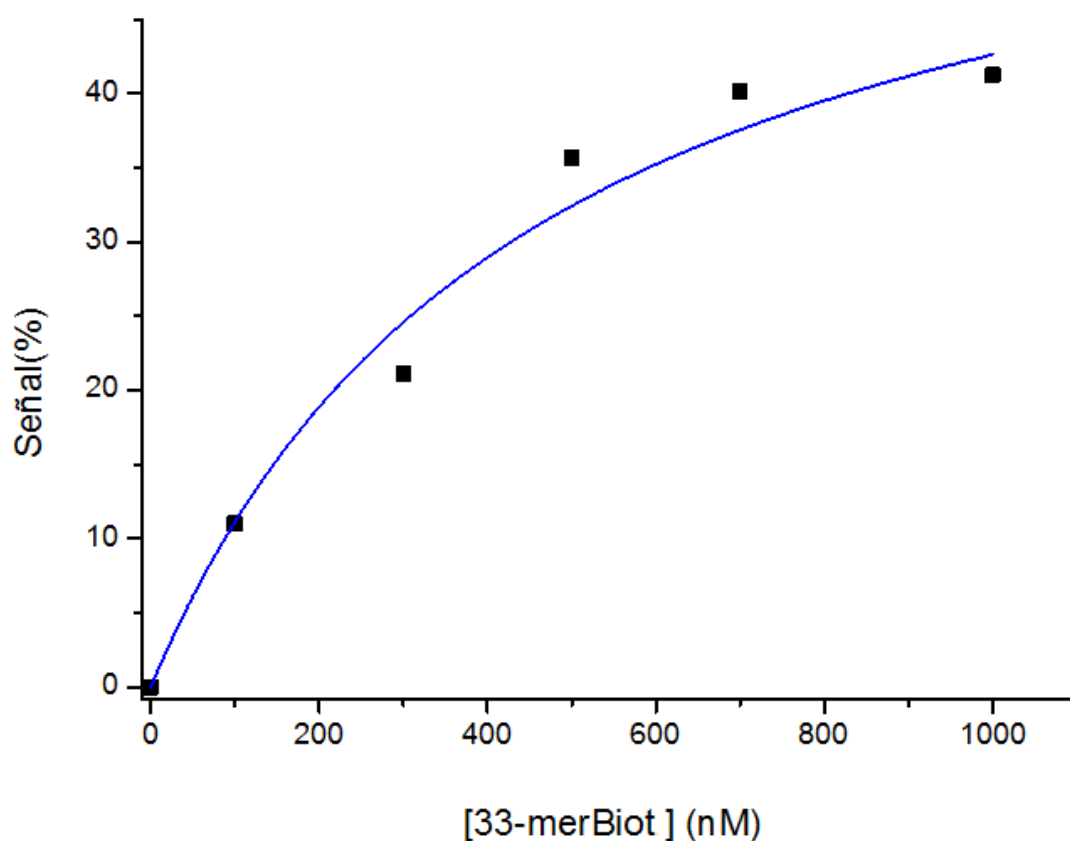


Figura 13. Isoterma de enlace obtenida a partir de los datos registrados por Espectroscopia de Impedancia Faradaica ajustados al modelo de Langmuir (**Tabla 4**, Electrodo 1).

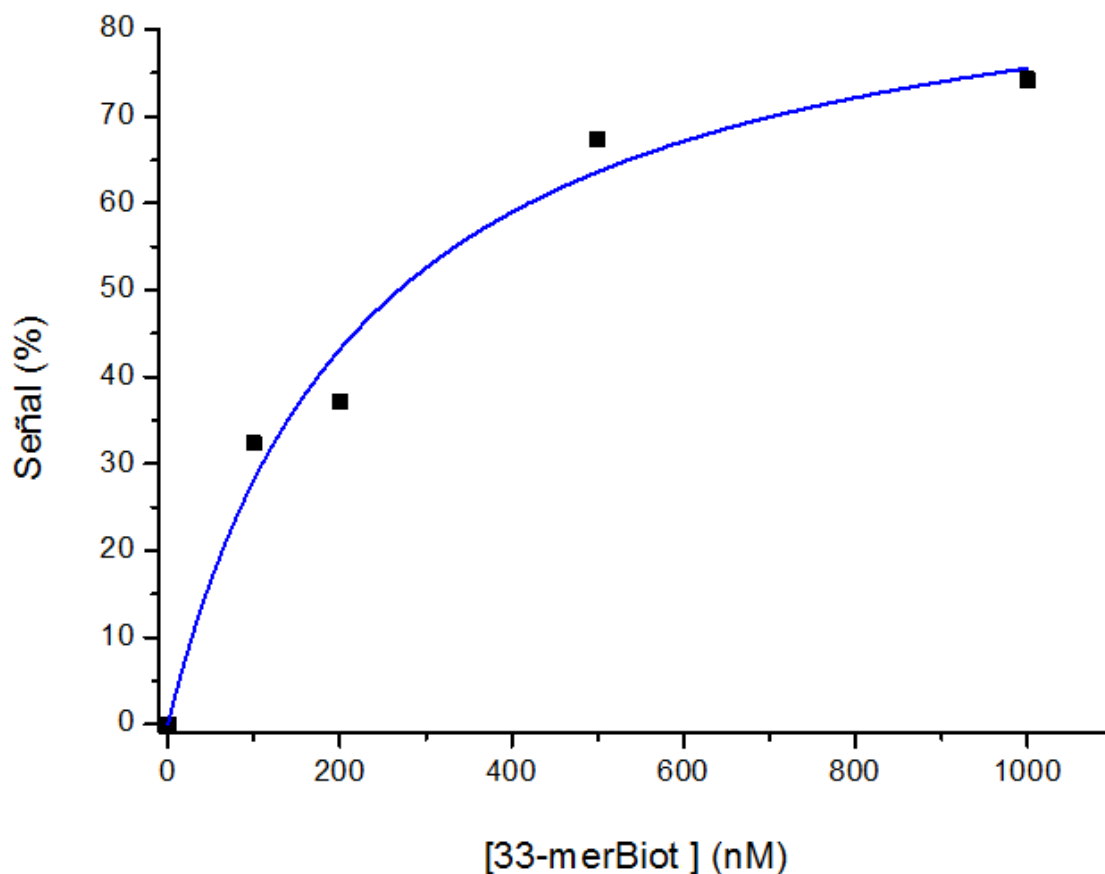


Figura 14. Isotherma de enlace obtenida a partir de los datos registrados por Espectroscopia de Impedancia Faradaica y ajustados al modelo de Langmuir (Tabla 4, Electrodo 2).

Mediante el modelo de Langmuir, se obtuvieron unos valores de $K_d = 458 \pm 131$ nM con $R^2=0,98$ para el electrodo 1 y, de $K_d = 231 \pm 65$ nM con $R^2=0,97$ para el electrodo 2.

A continuación, se hace un análisis comparativo de los valores de K_d obtenidos en este trabajo para la interacción entre el aptámero Gli1 y el péptido 33-mer con los valores medidos para el mismo sistema empleando otras técnicas, recogidos en la **Tabla 5**.

Técnica	Especies inmovilizadas	Especies en disolución	K_d (nM)
ITC*	(-)	33-mer, Gli1	45 ± 10
FIS*	SH-Gli1	33-mer	98 ± 48
SPR*	33-merBiot	Gli1	51 ± 16
Cronoamperometría*	33-merBiot	Gli1-Biot	102 ± 11
FIS (en este trabajo)	SH-Gli1	33-merBiot	344 ± 161

Tabla 5. Resultados obtenidos al calcular la K_d por distintas técnicas y con diferentes sistemas de inmovilización. Las técnicas marcadas con * pertenecen a otro trabajo⁴⁶.

En primer lugar cabe destacar que el aptámero seleccionado contra el péptido 33-mer presenta una afinidad de enlace mayor que la de los aptámeros contra otros alérgenos alimentarios descritos en la bibliografía^{48,49}.

Para el sistema objeto de estudio, la mayor afinidad se obtiene para la interacción en disolución entre Gli1 y péptido 33-mer (medidas de ITC).

La modificación (marcaje o inmovilización) del aptámero y el péptido 33-mer tiene un efecto negativo sobre la afinidad, pero en distinta extensión.

La inmovilización del péptido conduce a un ligero incremento en K_d (medidas de SPR), si bien, resultó menos perjudicial que la inmovilización del aptámero con el grupo tiol (medidas de impedancia).

El marcaje con biotina del aptámero (102 ± 11 nM) afecta más a la afinidad del enlace que la modificación del péptido 33-mer con la misma marca (51 ± 16 nM).

La biotinilación del aptámero Gli1 tiene una influencia notable sobre la afinidad, ya que el valor promedio de K_d obtenido en este trabajo (344 ± 161 nM) es claramente superior al medido por FIS empleando el péptido sin marcar (98 ± 48 nM).

Teniendo en cuenta estos resultados, la inmovilización del péptido 33-mer parece más ventajosa, en términos de afinidad, frente a la inmovilización del aptámero Gli1 a

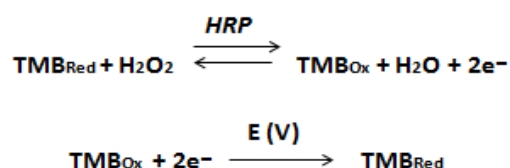
la hora de desarrollar un aptaensayo para la determinación de gluten. Aunque es preciso evaluar las características analíticas de esta segunda estrategia para esclarecer si el límite de detección resultante sería suficiente para resolver el problema analítico planteado.

3.3. Ensayo con detección electroquímica

El ensayo electroquímico consiste en el reconocimiento entre el aptámero Gli1 (el más abundante en la mezcla enriquecida tras realizar el proceso SELEX) y el péptido 33-mer biotinado sobre la superficie de un electrodo. La molécula de biotina permitirá fijar, posteriormente, una marca enzimática sobre el complejo aptámero-péptido formado en superficie, permitiendo su cuantificación.

La etapa de detección se llevará a cabo sobre electrodos de lámina de oro fabricados en el laboratorio. Para realizar las medidas electroquímicas al final del ensayo, se utilizó un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl con un puente salino externo de KNO₃.

La señal analítica es la intensidad de corriente eléctrica que se genera al reducirse el producto de una reacción enzimática. En este caso, se utilizó un conjugado formado por el enzima peroxidasa de rábano silvestre (HRP) y estreptavidina (STR), que permitirá anclar la marca sobre el sensor. La estequiometría del conjugado es de dos moléculas de HRP por cada molécula de estreptavidina. Como sustrato enzimático se utiliza 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (TMB), que en presencia de H₂O₂ y con HRP como catalizador, se oxida en un proceso que produce dos electrones (**Esquema 1**).



Esquema 1. Reacciones que ocurren en los procesos enzimático y electroquímico que se producen en la superficie del electrodo.

Aplicando un potencial adecuado se reduce electroquímicamente el TMB oxidado enzimáticamente, originándose una corriente catódica, que es la señal analítica.

La técnica electroquímica utilizada para medir la señal analítica fue la cronoamperometría, en la que se mide la intensidad de corriente durante un tiempo determinado fijando un potencial constante. Para evaluar el potencial que hay que aplicar sobre nuestro sistema, se realizaron voltamperogramas cíclicos del sustrato para observar los distintos procesos electroquímicos que tienen lugar y a qué potenciales ocurren. En la **Figura 15** se muestra un voltamperograma cíclico característico del TMB sobre el sustrato electródico.

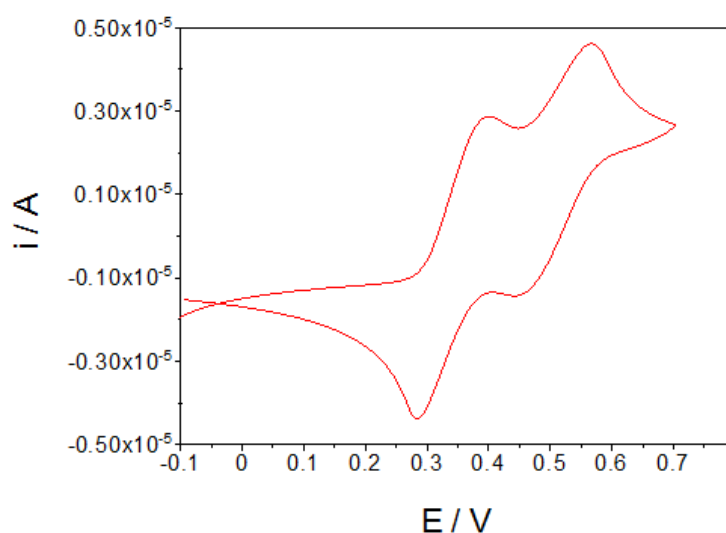


Figura 15. Voltamperograma cíclico del TMB sobre un sustrato electródico de oro. Barrido de potenciales entre 0 y 1 V a 100 mV/s.

Observando el voltamperograma de la **Figura 15**, se fija un potencial de medida de 0 V, ya que todo el TMB oxidado enzimáticamente se reducirá completamente a este potencial. El potencial fue aplicado durante 60 segundos y el valor de la señal analítica es el promedio de las señales obtenidas en los últimos 10 segundos del cronoamperograma, ya que en ese punto la señal está estabilizada.

3.3.1. Protocolo de ensayo

- Construcción de la fase sensora:

La construcción del sensor se inicia con la limpieza y acondicionamiento de electrodos de oro (ver apartado 2.3.2).

A continuación, se procede a la inmovilización del dúplex formado por las hebras de ADN (A)₁₅-SH y (T)₂₀-Gli1. Para ello se lleva a cabo la hibridación en una disolución de 2x SSPE con una concentración final de 0,2 μ M de cada una de las hebras. Se cogen 15 μ L de cada una de ellas (con concentración 2 μ M) y se añaden 120 μ L de 2x SSPE, obteniéndose un volumen final de 150 μ L. Esta disolución se calienta a 95°C durante 5 minutos y, posteriormente, se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente. A continuación, se cogen 12 μ L y se depositan sobre el electrodo, dejándolo incubar durante toda la noche en la nevera (a 4°C) en atmósfera saturada de agua (**Esquema 2, etapa 1**). Al día siguiente, se lavan los electrodos con la disolución reguladora y se secan en corriente de nitrógeno.

Posteriormente, para evitar interacciones inespecíficas sobre la superficie del electrodo, ésta se bloquea con una disolución de un compuesto tiolado de concentración 1 mM durante 50 minutos en nevera en las mismas condiciones de temperatura y humedad (**Esquema 2, etapa 2**).

- Etapa de reconocimiento:

El ensayo de afinidad se basa en el reconocimiento entre el aptámero anclado a la superficie de oro y el péptido 33-mer biotinado. Para ello se incuban 6 μ L de la disolución del péptido 33mer-biotina (en concentración variable) en el buffer de selección (BS) durante una hora a temperatura ambiente y en atmósfera saturada de agua. Transcurrido este tiempo, se lavan los electrodos con PBS 1x para retirar lo que no se ha enlazado y se secan con N₂ (**Esquema 2, etapa 3**).

- Marcaje enzimático:

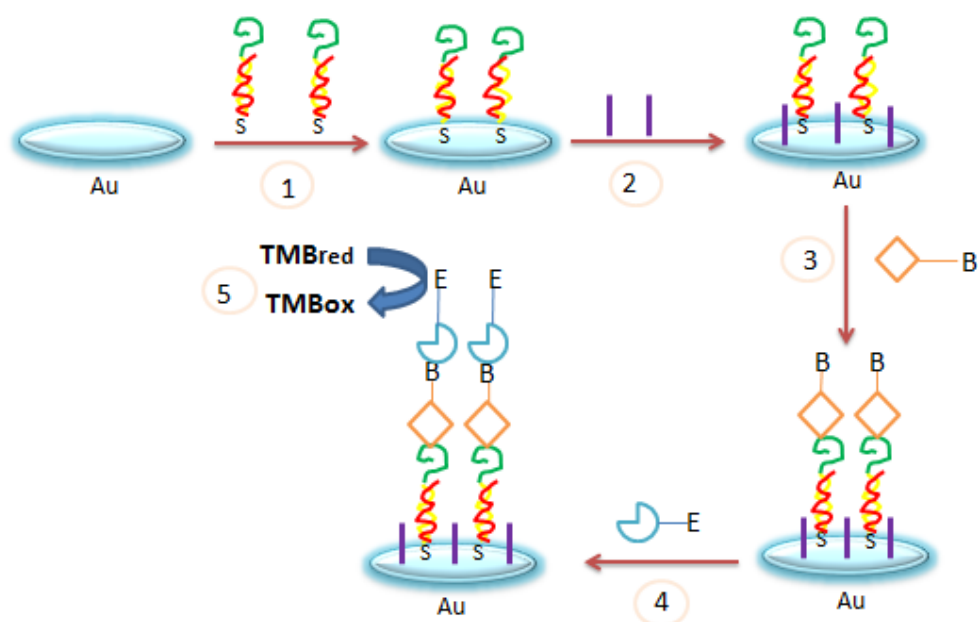
Tras la unión péptido-aptámero, se procede al marcaje enzimático empleando el conjugado STR-HRP₂, de manera que la estreptavidina se une a la biotina del péptido inmovilizado. Para llevar a cabo esta etapa el electrodo modificado se incuba con una disolución 0,1 mg/mL del conjugado enzimático en la disolución reguladora de PBS-Caseína durante 30 minutos a temperatura ambiente y en atmósfera saturada de agua (**Esquema 2, etapa 4**).

Transcurrido este tiempo, se lavan los electrodos con BS y se dejan cubiertos con esta disolución hasta que se realiza la medida cronoamperométrica, siendo entonces cuando se secan de uno en uno.

- Medida electroquímica de la señal analítica:

Para llevar a cabo la detección electroquímica se sumerge el electrodo en una microcelda con 450 µL de disolución que contiene los sustratos enzimáticos tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Tras un minuto de reacción enzimática se mide, por cronoamperometría a 0 V, el producto electroactivo generado enzimáticamente durante 60 segundos.

En esta etapa el sustrato TMB sufre un proceso de oxidación enzimática en presencia de H₂O₂, como puede observarse en el **Esquema 2, etapa 5**. El producto enzimático que se genera es TMB oxidado, que es electroactivo y se reduce sobre la superficie del electrodo a TMB.



Esquema 2. Esquema resumen de todos los pasos del ensayo electroquímico. **1)** Inmovilización del aptámero, **2)** Bloqueo de la superficie con un compuesto tiolado, **3)** Reconocimiento del péptido 33-merBiot, **4)** Marcaje enzimático, **5)** Medida electroquímica de la señal analítica.

Aplicando el protocolo descrito anteriormente, se comenzó evaluando el efecto de distintas combinaciones de bloqueantes sobre la señal analítica en ausencia y presencia de 500 nM de péptido 33-mer biotinado.

Los bloqueantes ensayados fueron 6-mercapto-hexanol y tioanilina como tiol bloqueante para la construcción de la fase sensora y, caseína y BSA en la etapa de marcaje enzimático. Los resultados se recogen en la **Figura 16**.

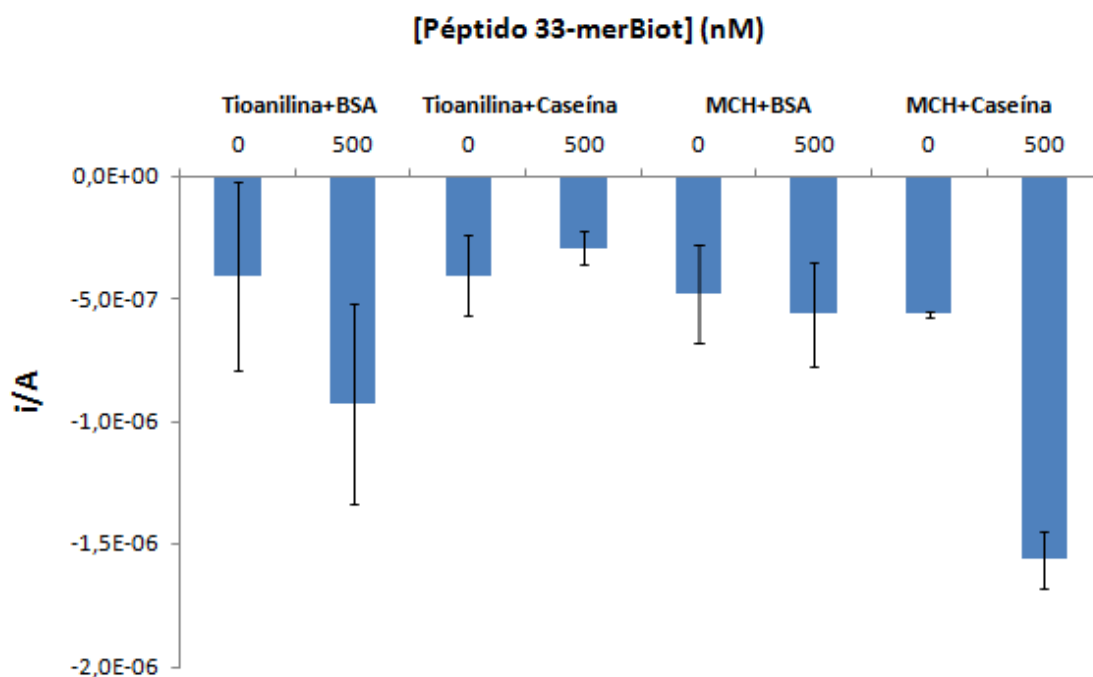


Figura 16. Señales electroquímicas registradas en ausencia o presencia de 500 nM de 33-merBiot empleando distintas combinaciones de bloqueantes.

En vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la mejor combinación de bloqueantes es la de 6-mercapto-hexanol (MCH) y caseína, ya que proporciona una mayor relación señal/fondo y una mejor reproducibilidad de las medidas. Por ello, se escogió esta combinación para estudiar las características analíticas del aptasensor.

Con el fin de evaluar dichas características de calibración (límite de detección, intervalo de respuesta y reproducibilidad) se realizaron medidas para cantidades crecientes de péptido en un intervalo de concentraciones comprendido entre 100 nM y 500 nM.

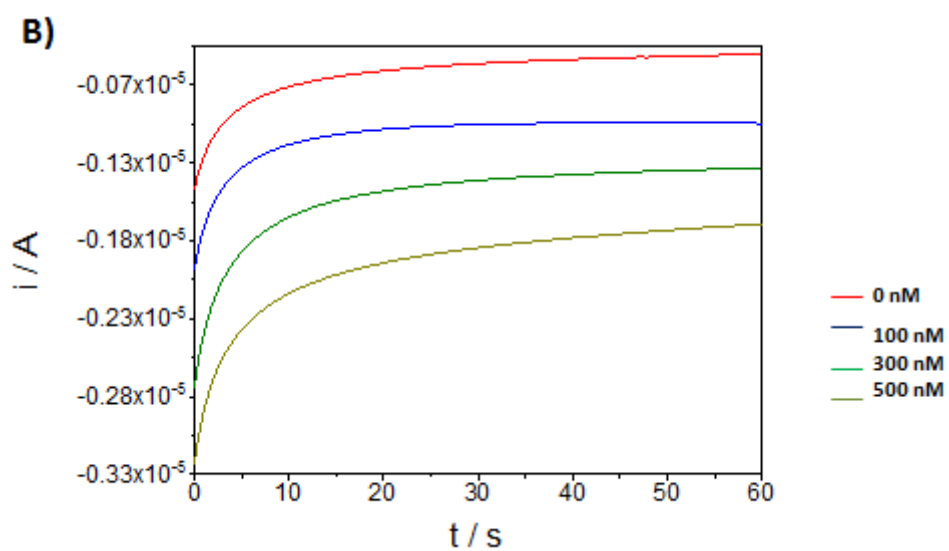
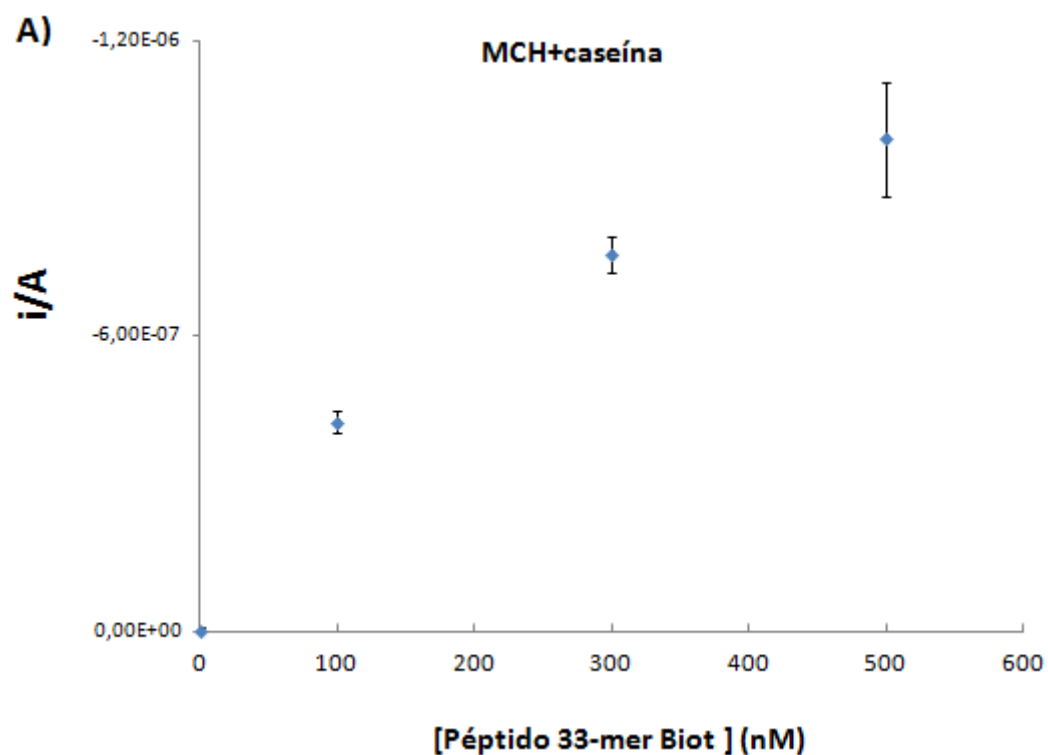


Figura 17 A: curva de respuesta que representa la intensidad de corriente medida a 0 V frente a la concentración de péptido. **Figura 17 B:** cronoamperogramas obtenidos a 0 V para distintas concentraciones de 33-merBiot: 0 nM, 100 nM, 300 nM y 500 nM.

En la **Figura 17** puede verse la respuesta del aptasensor frente a la concentración de péptido 33-merBiot. La intensidad de corriente crece hasta 500 nM donde se alcanza la saturación de la fase sensora; por tanto, el intervalo de respuesta sería de 0 a 500 nM de péptido.

El límite de detección del sistema calculado como tres veces la desviación estándar del blanco es de 30 nM. La reproducibilidad obtenida, expresada como coeficiente de variación, es de un 7% para 500 nM.

4. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas al término de este Trabajo Fin de Máster y, de acuerdo con los objetivos propuestos han sido las siguientes:

- Se ha diseñado una fase sensora para la detección de la fracción inmunodominante del gluten (péptido 33-mer) empleando un aptámero como receptor molecular inmovilizado sobre un sustrato de oro a través de la hibridación con una sonda oligonucleotídica corta tiolada.
- Se ha obtenido la constante de afinidad, K_d , para el enlace entre el aptámero y el péptido biotinado mediante Espectroscopia de Impedancia Faradaica, constatando una pérdida de afinidad al inmovilizar el receptor.
- Se ha determinado que en la interacción específica entre el aptámero y su diana, el péptido 33-mer, sobre electrodos de oro es de especial importancia la selección adecuada de los agentes de bloqueo.
- Este ensayo, que permite detectar 30 nM de péptido, constituye el primer paso hacia el desarrollo de un ensayo competitivo para la detección de gluten en muestras alimentarias.

5. REFERENCIAS

- (1) FACE, www.celiacos.org, (Última consulta 27/06/15).
- (2) *What is Celiac Disease?*; Celiac Disease Foundation; <http://celiac.org/ceciac-disease/what-is-celiac-disease>, (Última consulta 27/06/15).
- (3) CODEX STANDARD FOR FOODS FOR SPECIAL DIETARY USE FOR PERSONS INTOLERANT TO GLUTEN, **1979**.
- (4) Sherwy P.R., Haldford N.G., *J. Exper. Bot.*, **2002**, 53.
- (5) Wieser H., Koehler P., *J. AOAC Int.*, **2010**, 93.
- (6) Sollid L.M., Khosla C., *J. Inter. Med.*, **2011**, 269.
- (7) Lee H. J., Anderson Z., Ryu D., *J. Food. Prot.*, **2014**, 77.
- (8) Código Europeo nº41, **2009**.
- (9) Shan et al., *Science*, **2002**, 297, 2275.
- (10) Amigo C. D., Popping B., *J. AOAC. Int.*, **2012**, 95, 337.
- (11) Morón B., López C., Bethune M. T., Comino I., Manyani H., Ferragud M., Cebolla M. A., Khosla C., Sousa C., *PLOS One*, **2008**.
- (12) Morón B., Cebolla M.A., Manyani H., Álvarez-Maqueda M., Megias M., del Carmen-Thomas M., López M.C., Sousa C., *Am. J. Clin. Nut.* **2008**, 87, 405.
- (13) Rallabhandi P., Sharma G.M. Pereira M., Williams K. M. , *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63, 1825.
- (14) Martín-Fernández B., de-los-Santos-Álvarez N., Lobo-Castañón M.J., López-Ruiz B., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, 407, 3481-3488.
- (15) Martín-Fernández B., Miranda-Ordieres A. J., Lobo-Castañón M.J., Frutos-Cabanillas G., de-los-Santos-Álvarez N., López-Ruiz B., *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, 60.
- (16) Colgrave, M. L., Goswami, H., Blundell, M., Howitt, C. A., Tanner, G. J. *J.Chrom. A.*, **2014**, 1370, 105.
- (17) Ferranti P., Mamone G., Picariello G., Addeo F. , *J. Mass Spectr.*, **2007**, 42, 1531.
- (18) Sealey-Voyksner J.A., K. C., Voyksner R.D., Jorgenson J.W., *J. Chrom. A.*, **2010**, 1217, 4167.
- (19) Colgrave M.L., G. H., Howitt C.A., Tanner G.J., *J. Proteome. Res.*, **2012**, 11, 386.
- (20) Martín-Fernández B., Miranda-Ordieres A. J., Lobo-Castañón M. J., Frutos-Cabanillas G., de-los-Santos-Álvarez N., López-Ruiz B. , *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, 60, 244.
- (21) Thompson T.; Méndez E., *J. Am. Diet. Assoc.*, **2008**, 108, 1682.
- (22) Van Eckert, R.; Berghofer, E.; Ciclitira, P. J.; Chirido, F.; Denery-Papini, S.; Ellis, H. J.; Ferranti, P.; Goodwin, P.; Immer, U.; Mamone, G.; Méndez, E.; Mothes, T.; Novalin, S.; Osman, A.; Rumbo, M.; Stern, M.; Thorell, L.; Whim, A.; Wieser, H., *J. Cer.Science*, **2006**, 43, 331.
- (23) Sorell L., López J.A., Valdés I., Alfonso P., Camafeita E., Acebedo B., Chirido F., Gavilondo J., Méndez E., *FEBS Lett.* **1998**, 439, 46.

- (24) Kahleberg F., S. D., Lachman I., Tuckova L., Tlaskalova H., Mendez E., Mothes T. *Eur. Food. Res. Technol.*, **2006**, *222*, 78.
- (25) Haas-Lauterbach S., Immer U., Richter M., Koehler P. *J. AOAC Int.* **2012**, *95*.
- (26) Halbmayr-Jech E., Hammer E., *J. AOAC. Int.*, **2012**, *95*.
- (27) Comino I., Real A., de Lorenzo L., Cornell H., Lopez-Casado M.A. Barro F., Lorite P., Torres M.I., Cebolla A., Sousa C., *Gut*, **2011**, *60*, 915.
- (28) Amaya-González, S.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Miranda-Ordieres, A. J.; Lobo-Castañón, M. J., *Anal. Chem.*, **2014**, *86*, 2733.
- (29) Spiridonova, V. A. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomed. Chem.*, **2010**, *4*, 138.
- (30) Tuerk L., Gold C., *Science* **1990**, *209*, 505.
- (31) Ellington A.D., Szostak J.W., *Nature* **1990**, *346*, 818.
- (32) Ellington A.D., Szostak J.W., *Nature* **1992**, *355*, 850.
- (33) Zhou, J., Batting, M. R., Wang, Y., *Anal Bioanal Chem.*, **2010**, *398*, 2471-2480.
- (34) De-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., Tuñón-Blanco, P., *Trends in Analytical Chemistry*, **2008**, *27*, 437-446.
- (35) Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B., *Biomol. Eng.*, **2007**, *24*, 381.
- (36) Tombelli S., Minunni M., Mascini M., *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, *20*, 2424.
- (37) Patel D.J., Suri A.K., Jiang P., Jiang P., Fan P., Kumar A., Nonin S., *J.Molec. Bio.*, **1997**.
- (38) Wu, J., Zhu Y., Xue F., Mei Z., Yao L., Wang X., Zheng L., Liu J., Liu, G., Peng C., Chen W., *Mikrochim. Act.*, **2014**, *181*, 479.
- (39) Pingarrón-Carrazón, J. M., Sánchez-Batanero, P., *Química Electroanalítica Fundamentos y Aplicaciones*, **2003**, *15*, 264-268.
- (40) Pingarrón-Carrazón, J. M., Sánchez-Batanero, P., *Química Electroanalítica Fundamentos y Aplicaciones*, **2003**, *21*, 298-301.
- (41) Laisa, A., *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*, Conway., B. E.; Bockris, J., and White, R.E., Edts, Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, **1999**, *32*, 143-248.
- (42) De-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A.J., Tuñón-Blanco, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 3809.
- (43) Balamurugan, S., Obubuafo, A., A. Soper, S., A. Spivak, D., *Anal Bioanal Chem*, **2008**, *390*, 1009-1021.
- (44) Bini, A.; Minunni, M.; Tombelli, S.; Centi, S.; Mascini, M., *Anal Chem*, **2007**, *79*, 3016-3019.
- (45) Kimura-Suda, H.; Petrovykh, D. Y.; Tarlov, M. J.; Whitman, L. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 9014-9015.
- (46) Amaya-González, S.; López-López, L.; Miranda-Castro, R.; De-los-Santos-Álvarez, N.; Miranda-Ordieres, A. J.; Lobo-Castañón, M. J., *Analytica Chimica Acta*, **2015**, *873*, 63-70.
- (47) Zuker, M., *Nucleic Acid Res.*, **2003**, *31*, 3406-3415.

- (48) Nadal, P.; Pinto, A.; Svobodova, M; Canela, N; O'Sullivan, C. K.; *PLoS One*, **2012**, 7, e35253.
- (49) Tran, D. T.; Knez, K.; Janssen, K. P.; Pollet, J.; Spasic, D.; Lammertyn, J., *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 43, 245-251.

