



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**APTÁMEROS MULTIVALENTES: NUEVOS RECEPTORES
PARA MEJORAR LA SENSIBILIDAD DE DETECCIÓN DE
GLUTEN**

ANA DÍAZ FERNÁNDEZ

Julio 2016, Oviedo



María Jesús Lobo Castañón, Profesora del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “Aptámeros multivalentes: nuevos receptores para mejorar la sensibilidad de detección de gluten”

ha sido realizado por el alumno Ana Díaz Fernández 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 2015-16, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 13 de Julio de 2016

Fdo: María Jesús Lobo Castañón

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1.- Introducción..... | 6 |
| 1.1.- La enfermedad celiaca..... | 7 |
| 1.2.- El gluten..... | 8 |
| 1.3.- Métodos de detección de gluten en alimentos..... | 10 |
| 1.4.- Aptámeros como nuevos receptores..... | 12 |
| 1.5.- Métodos de medida de la afinidad de los aptámeros..... | 15 |
| 2.-Objetivos..... | 18 |
| 3.-Experimental..... | 21 |
| 3.1- Reactivos..... | 22 |
| 3.2.- Instrumentación..... | 24 |
| 3.3.- Procedimiento experimental para caracterizar la interacción homogénea aptámero- proteína..... | 25 |
| 3.3.1.- Modificación de las partículas magnéticas..... | 26 |
| 3.3.2.- Protocolo de realización del ensayo..... | 26 |
| 3.3.3.- Protocolo de detección..... | 27 |
| 3.3.4.- Preparación de los filtros de separación..... | 27 |
| 3.4.- Procedimiento experimental para caracterizar la interacción aptámero-proteína en superficie..... | 29 |
| 3.4.1.- Acondicionamiento de los electrodos de oro..... | 29 |
| 3.4.2.-Medidas de impedancia..... | 29 |
| 4.- Resultados y Discusión..... | 30 |
| 4.1.- Caracterización de la interacción homogénea aptámero-proteína..... | 31 |
| 4.1.1.- Diseño del proceso de separación..... | 31 |
| 4.1.2.- Ensayo de medida del aptámero libre..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 4.1.3.- Curva de enlace para la proteína en disolución..... | 34 |
| 4.2.-Inmovilización de la gliadina sobre la superficie de transductores electroquímicos. | 36 |
| 4.2.1.-Inmovilización sobre carbono vitrificado..... | 36 |
| 4.2.2.-Inmovilización covalente sobre carbono vitrificado oxidado. | 38 |
| 4.2.3.-Inmovilización sobre grafeno..... | 38 |
| 4.2.4.-Inmovilización sobre oro..... | 40 |
| 4.2.5.-Inmovilización sobre oro empleando sales de aril diazonio | 42 |
| 4.3.- Caracterización de la interacción heterogénea proteína aptámero..... | 44 |
| 5.-Conclusiones | 45 |
| 6.-Bibliografía | 45 |

1.- Introducción

1.1.- La enfermedad celiaca.

La enfermedad celiaca (EC) se puede definir como la intolerancia al gluten de trigo, cebada, centeno y probablemente avena que se presenta en individuos genéticamente predispuestos. Se caracteriza por una reacción inmunológica que provoca una inflamación en la mucosa del intestino delgado dificultando la absorción de macro y micronutrientes. ^[1] Esta enfermedad es uno de los trastornos más frecuentes en occidente, afectando al 1% de la población total, aunque se estima que solo entre un 10 – 20 % de los enfermos celíacos están adecuadamente diagnosticados. ^[2]

En el desarrollo de esta enfermedad están involucrados factores genéticos y ambientales. Los factores genéticos están relacionados con los genes DQ2 y DQ8 presentes en el sistema HLA (antígeno leucocitario humano) y una serie de genes no HLA. Los HLA son moléculas que se encuentran en la superficie de los glóbulos blancos y de casi todas las moléculas de los tejidos de un individuo y que están implicadas en el reconocimiento y señalización del sistema inmune. Como factores ambientales, además del gluten, se encuentran microorganismos patógenos como el adenovirus 12 o el virus de la hepatitis C y el momento de la ingesta del gluten. ^[3]

Las manifestaciones clínicas de la EC son muy variadas. Se pueden presentar en individuos de cualquier edad y afecta a diferentes órganos. Los enfermos pueden presentar tanto síntomas asociados al sistema gastrointestinal como no relacionados con este. El diagnóstico se basa en la presencia del factor de predisposición genética HLA-DQ2/8, así como en una biopsia intestinal que confirme daños en la mucosa del intestino delgado y la presencia de anticuerpos anti-transglutaminasa en suero cuando el paciente consume gluten. ^[4]

Dependiendo de los síntomas que se desarrollan, la enfermedad celiaca se clasifica en diferentes fenotipos: ^[5]

- EC clásica: presenta síntomas gastrointestinales y secuelas producidas por la mala absorción de nutrientes.
- EC atípica: se caracteriza por la escasa o nula presencia de síntomas gastrointestinales y la presencia de síntomas sistémicos.
- EC silente: es asintomática, pero los individuos que la padecen presentan test serológicos positivos y daños en la mucosa intestinal.

- EC latente: los individuos que la padecen no presentan sintomatología ni atrofia en la mucosa intestinal, pero dan positivo en el test serológico. Estos individuos pueden desarrollar síntomas o sufrir cambios histológicos a lo largo del tiempo.

El único tratamiento posible para la EC consiste en seguir una estricta dieta libre de gluten a lo largo de la vida del paciente. El seguimiento de esta dieta es crucial para resolver los síntomas y para evitar complicaciones clínicas asociadas con la ingesta de gluten a largo plazo en pacientes celíacos como la osteoporosis o la anemia. ^[6] Por este motivo el control de la cantidad de gluten que contienen los alimentos es muy importante, en especial aquellos que son aptos para celíacos, que deben ser etiquetados y certificados como sin gluten.

Además de la EC se han descrito otras reacciones al gluten como la alergia al trigo que también produce la activación de las células T en la mucosa intestinal, u otros casos de reacción al gluten sin un mecanismo autoinmune, denominadas sensibilidad al gluten. ^[7]

La legislación europea fija en 20 ppm la cantidad máxima de gluten que el producto acabado puede tener para que sea etiquetado como “sin gluten” y en 100 ppm para que sea etiquetado como con un contenido muy reducido en gluten, basándose en la sensibilidad de los métodos de detección de gluten. ^[8]

Por otra parte, la federación de asociaciones de celíacos de España (FACE) posee una etiqueta propia para aquellos productos que contienen menos de 10 ppm de gluten. ^[1] Sin embargo estos límites, en ocasiones, no son suficientes para los enfermos especialmente sensibles y se plantea la necesidad de nuevos métodos de análisis que permitan reducir los valores de los límites legalmente establecidos.

1.2.- El gluten

El gluten no es una especie química bien definida, sino un conjunto de proteínas de almacenamiento de los cereales. ^[9]

El gluten se define como la fracción proteica del trigo, cebada, centeno, avena y sus variedades híbridas o derivados, insoluble en una disolución de agua y NaCl 0.5 M. ^[10] Las proteínas que forman el gluten se pueden dividir en dos grupos según su solubilidad en disoluciones de etanol-agua de entre 50-70 %: gluteninas (insolubles) y prolaminas (solubles).^[11]

Las prolaminas del trigo se conocen como gliadinas, las del centeno como hordeínas y las de la cebada son las secalinas, todas ellas poseen una estructura similar. ^[12]

Las prolaminas de los cereales potencialmente tóxicos para los celíacos se pueden clasificar en tres grupos de fracciones diferentes dependiendo de la composición de los aminoácidos que las conforman: fracción rica en azufre, a la que pertenecen las α , β y γ -gliadinas, las γ -secalinas y las β -hordeínas; fracción pobre en azufre a la que pertenecen las ω -gliadinas y las ω -secalinas; y la fracción de alto peso molecular. ^[13] Aunque recientemente se ha confirmado que las gluteninas también son tóxicas para los celíacos. ^[14]

La toxicidad de las proteínas depende en último lugar de los péptidos que se liberan de las mismas durante el proceso de la digestión. Las proteínas tóxicas ricas en prolina y glutamina producen, tras la hidrólisis, péptidos con regiones repetitivas que son epítomos estimulantes de las células T. ^[15] Una secuencia de 33 aminoácidos presentes en la α 2-gliadina, el péptido 33-mer, es uno de los fragmentos más largos identificados, en el que están presentes muchos de los otros péptidos inmutotóxicos descritos, cuya secuencia es LQLQPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF. ^[16] Se han identificado secuencias homólogas a esta en las proteínas de almacenamiento de todos los cereales tóxicos para los celíacos, mientras que están ausentes en los cereales considerados como seguros. ^[17]

Para la cuantificación de gluten en los alimentos es necesario disponer de un estándar de gluten, siendo complicada su obtención debido a que el gluten no es una única proteína, sino que existen cientos de proteínas distintas que varían entre distintos cereales y los cereales de una misma especie.

Actualmente existe en el mercado un patrón de gliadina preparado por un grupo de trabajo: Prolamin Working Group, denominado PWG-gliadina. Este se obtiene tras el procesado de 28 cultivos europeos de trigo diferentes, para minimizar la variabilidad producida por las diferencias en el cultivo. No se trata de un material de referencia certificado por el IRMM (Instituto de Materiales de Referencia y Medidas) porque contiene impurezas debidas a la presencia de gluteninas que se extraen conjuntamente con las prolaminas. ^[18]

1.3.- Métodos de detección de gluten en alimentos

Debido a que el único tratamiento para los enfermos celíacos es mantener una dieta sin gluten, se necesitan métodos analíticos de gran sensibilidad y selectividad para saber si un alimento contiene gluten a niveles que pueden desencadenar el problema, que pueden variar mucho de unos individuos a otros.

Los diferentes métodos disponibles para detectar y cuantificar gluten se pueden dividir en dos grandes grupos: directos, o basados en la medida de proteínas; e indirectos, o basados en la medida de ADN.

1.3.1- Métodos directos

Dentro de estos métodos se incluyen los ensayos inmunoquímicos, los inmunosensores y los análisis por espectrometría de masas, que detectan proteínas y péptidos derivados del gluten. ^[19]

Dentro de los análisis por espectrometría de masas se han desarrollado varios métodos para cuantificar gluten nativo (MALDI-TOF-MS) o péptidos derivados del gluten (LC-ESI-MS). Se basan en la comparación de los perfiles de las proteínas extraídas del alimento frente a los perfiles característicos de las diferentes prolaminas extraídas de estándares del cereal. ^[20] Mediante estos métodos se cuantifican determinados péptidos y no el gluten de forma total, como lo demanda la legislación. ^[21]

Los métodos inmunoquímicos, basados en el empleo de anticuerpos dirigidos contra las proteínas tóxicas del gluten, son los más utilizados para la detección de gluten en los alimentos. El primer método validado por la AOAC International en el año 1991 fue el basado en la utilización de un anticuerpo monoclonal desarrollado por Skeritt y Hill frente a la fracción más termorresistente de las gliadinas, las ω -gliadinas. En la actualidad el único método validado por la AOAC y que es considerado como método oficial por el Codex Alimentarius, es un ensayo ELISA tipo sándwich, desarrollado con el anticuerpo monoclonal R5 obtenido frente al péptido (QQPFP) potencialmente nocivo que se encuentra en las subfracciones α , β , γ y ω -gliadinas, en las secalinas y las hordeínas. Con este método no es posible la cuantificación de aveninas. Mediante el método ELISA utilizando el anticuerpo R5 es posible la cuantificación de 5 ppm de gluten en alimentos. ^[20]

Existen en el mercado otros sistemas ELISA tipo sándwich que utilizan anticuerpos monoclonales y policlonales diferentes al R5, con límites de cuantificación entre 3 y 10 ppm de gluten. ^[20] Uno de estos anticuerpos es el anticuerpo monoclonal G12, dirigido contra el péptido inmunotóxico 33-mer que se encuentra en la α 2-gliadina. Este anticuerpo presenta una alta reactividad frente a las prolaminas presentes en el trigo, cebada, centeno y ciertos tipos de avena. ^[22]

Los sistemas ELISA tipo sandwich no permiten analizar muestras que hayan sido hidrolizadas y/o altamente procesadas, puesto que el gluten debido a tratamientos térmicos o enzimáticos se encuentra fragmentado en fracciones incapaces de ser reconocidas por dos anticuerpos simultáneamente. ^[23]

Estos métodos inmunoquímicos son ampliamente utilizados en análisis de rutina, ya que se comercializan en forma de kits, que permiten la rápida y sencilla cuantificación de gluten en diversas matrices. Sus principales limitaciones están asociadas a dificultades en la extracción del gluten de los alimentos procesados, los falsos negativos que se producen cuando el gluten se desnaturaliza y los anticuerpos específicos no reconocen a los antígenos, las reacciones cruzadas que se pueden dar con otras proteínas y las sustancias inhibidoras de las interacciones específicas entre el antígeno y el anticuerpo que pueden estar presentes en la matriz de los alimentos. ^[20]

Además de los sistemas ELISA, dentro de los métodos inmunoquímicos se encuentra la técnica Western-Blot. Consiste en la extracción de las prolaminas, seguida de una separación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), la posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa y finalmente la incubación con anticuerpos marcados, específicos frente a las gliadinas del trigo para poder luego ser revelados mediante una reacción enzimática. Mediante este método se pueden cuantificar 8 ppm de gluten en alimentos. ^[20]

Las limitaciones de este método son su complejidad, puesto que es difícil de llevar a cabo y se necesita una mayor formación y especialización; además de la falta de anticuerpos comerciales específicos y fiables. ^[20]

1.3.2.- Métodos indirectos

Estos métodos se basan en la detección de secuencias de ADN específicas de los cereales que contiene gluten. La detección de estas secuencias en los alimentos indica la presencia del cereal, aunque no de la proteína alergénica. ^[20]

La detección de ADN se realiza mediante los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tanto en la amplificación por PCR con análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis en gel, como mediante la PCR en tiempo real. Recientemente se están empezando a desarrollar genosensores con el fin de abaratar los costes de los métodos tradicionales. ^[24]

Es necesario establecer una relación entre el contenido de ADN y de la proteína en la muestra. Esta correlación depende de la expresión de los genes que codifican las proteínas alergénicas y esta varía en cada especie de cereal, así como con las condiciones de crecimiento de la planta, de almacenamiento del grano o del tipo de procesamiento. Son pocos los métodos indirectos desarrollados hasta el momento en los que se trata de informar sobre la cantidad de proteínas inmunotóxicas en la muestra ^[25], por lo que no son adecuados para verificar el cumplimiento de la normativa vigente sobre el etiquetado de productos sin gluten. Estos métodos son más apropiados para identificar las especies de cereales presentes en la muestra o como alternativa confirmatoria, en aquellos alimentos cuyo procesamiento conlleve una elevada desnaturalización o hidrólisis de las proteínas. ^[26]

1.4.- Aptámeros como nuevos receptores

Los aptámeros son secuencias cortas de ARN o ADN de cadena sencilla, que en presencia de un determinado ligando pueden adoptar alguna estructura tridimensional que permite el enlace de afinidad con el mismo. Estos aptámeros son capaces de reconocer selectivamente una gran variedad de moléculas entre ellas a proteínas, actuando por tanto como elementos de reconocimiento molecular basados en un enlace de afinidad distinto de la reacción de hibridación entre secuencias de ácidos nucleicos complementarias. ^[27]

Los aptámeros se obtienen mediante un procedimiento de selección *in vitro*, que simula la selección natural, denominado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), descrito por primera vez en 1990. ^{[28],[29]} En este proceso se parte de una biblioteca

aleatoria de secuencias de ácidos nucleicos diferentes, que poseen una zona variable central de entre 20 y 80 nucleótidos y unas zonas constantes en los extremos, de entre 18 y 21 nucleótidos, para poder llevar a cabo una amplificación por PCR. Esta biblioteca se hace interactuar con la diana y mediante iteraciones de un ciclo de interacción, separación de las secuencias enlazadas y amplificación de las mismas se pueden obtener secuencias de ácidos nucleicos que enlacen específicamente y con gran afinidad a la diana. ^{[30], [31]}

El método SELEX se desarrolla mediante la repetición sucesiva de cinco etapas: incubación, separación, elución, amplificación y acondicionamiento. Estas etapas se muestran en la *figura 1*.

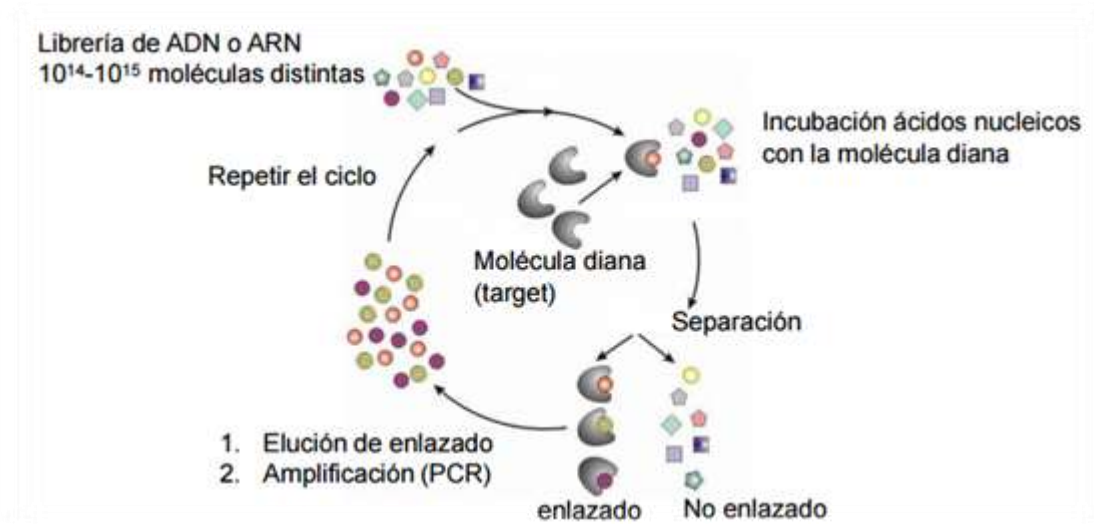


Figura 1: Esquema del proceso SELEX

En la primera etapa tiene lugar la incubación de la librería con la molécula diana durante un tiempo a una temperatura controlada, para que aquellas secuencias que tengan afinidad por la molécula diana se unan a ella.

En la segunda etapa se lleva a cabo la separación de las secuencias que no se han enlazado de las que si se enlazaron a la molécula diana. Esta etapa es crítica, porque además de eliminar aquellas secuencias no enlazadas, también se produce la separación de las secuencias unidas débilmente o inespecíficamente a la diana.

En la tercera etapa las secuencias unidas a la diana se eluyen y se amplifican mediante PCR, obteniéndose hebras dobles de ADN.

Estas hebras dobles de ADN se separan en hebras simples en la etapa de acondicionamiento, para así poder comenzar un nuevo ciclo con estas secuencias. Cada nuevo ciclo establece unas condiciones más restrictivas de interacción y separación, para favorecer la selección de las secuencias con mayor afinidad.

Normalmente son necesarias de 6 a 20 ciclos para obtener aptámeros con una gran afinidad por la molécula diana. En cada ciclo se monitoriza el enriquecimiento de la biblioteca inicial en secuencias afines a la diana. Las secuencias de aptámeros que se obtienen en el último ciclo se clonan en un vector bacteriano para su identificación. ^[30]

Mediante este procedimiento se ha obtenido una colección de aptámeros contra el péptido 33-mer, una secuencia de aminoácidos contenida en la α -gliadina identificada como una de las principales fracciones inmunotóxicas del gluten, que pueden ser utilizados como alternativa a los anticuerpos monoclonales para la detección de gluten en los alimentos. ^[32] Estos presentan las siguientes ventajas frente a los anticuerpos: al ser seleccionados in vitro no es necesario inmunizar animales ni conjuntos celulares y se pueden obtener en un proceso de síntesis química, más reproducible y a un menor coste.

Entre estos aptámeros se encuentra el Gli4, cuya estructura secundaria se muestra en la *figura 2*. Este es el aptámero que presenta una mayor afinidad hacia el péptido 33-mer, y además es capaz de reconocer a la proteína completa.

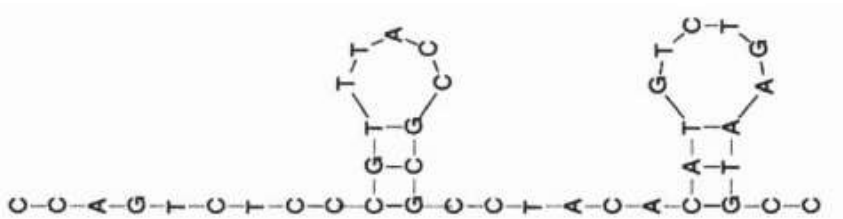


Figura 2: estructura secundaria del aptámero Gli4

Este aptámero es capaz de reconocer al gluten proveniente del trigo, centeno y avena. Y no reconoce el gluten de otros alimentos considerados como no tóxicos para los celíacos, como el arroz, el maíz y la soja. ^[32]

1.5.-Métodos de medida de la afinidad de los aptámeros

El reconocimiento molecular entre el aptámero y la proteína completa es un proceso reversible, en el que pueden tener lugar múltiples interacciones no covalentes como interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas.

La afinidad de los aptámeros frente a la PWG-gliadina se puede describir mediante la constante de disociación (K_D), si se tiene en cuenta que se produce el siguiente equilibrio cuando tiene lugar la interacción:



Donde A es el aptámero y P la proteína PWG.

La constante de disociación de este equilibrio se puede escribir como:

$$K_D = \frac{[A]_{eq}[P]_{eq}}{[A-P]_{eq}} \quad \text{Ecuación 2}$$

La constante de disociación, con unidades de concentración (M) es tanto menor cuanto mayor sea la afinidad de la interacción en estudio.

Una de las estrategias para medir la constante de disociación es utilizar un modelo de equilibrio. Este tipo de modelos consisten en incubar una cantidad constante de uno de los componentes que interaccionan con cantidades crecientes del otro, dejando que el sistema alcance el equilibrio. A continuación se mide, directa o indirectamente, la cantidad de complejo de afinidad formado (B) (del inglés "bound"), relacionándola con la cantidad de uno de los componentes que quede libre en el equilibrio (F). De esta forma se obtiene una curva de enlace, que puede ajustarse mediante métodos de ajuste no lineal, a diferentes modelos como el de la isoterma de Langmuir y el modelo basado en la ecuación de Hill.

El método de la isoterma de Langmuir supone que la interacción que tiene lugar entre el aptámero y la proteína es uno a uno, es decir, solo se une una molécula de aptámero por

molécula de proteína; y que todos los sitios de unión son equivalentes. Este método se ajusta a la siguiente ecuación:

$$B = \frac{[P]_0 \cdot F}{K_D + F} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde B es la cantidad de complejo aptámero-PWG formado en el equilibrio, F es la cantidad de aptámero libre, K_D la constante de disociación y $[P]_0$ la concentración inicial de PWG-gliadina.

La representación de la cantidad de aptámero enlazado en el equilibrio frente a la concentración de proteína libre da lugar a una hipérbola equilátera y el ajuste no lineal de esta curva a la *ecuación 3* permite obtener el valor de la constante de disociación, K_D .

Si en la proteína hubiese n sitios de unión idénticos e independientes, la curva de enlace también se ajustaría al modelo de Langmuir, pero considerando que la concentración total de sitios de la proteína es $n[PWG]_0$. La ecuación a la que se ajusta es la siguiente:

$$B = \frac{n [P]_0 F}{K_D + F} \quad \text{Ecuación 4}$$

El modelo de Hill supone que la interacción no es uno a uno, sino que tiene lugar un efecto de cooperatividad entre el aptámero y la proteína. El efecto cooperativo se produce cuando la proteína tiene varios sitios de unión del aptámero, y es el proceso por el cual la unión de un aptámero influye sobre la unión de los siguientes. Estos sitios de unión deben ser idénticos y dependientes. La cooperatividad entre los sitios de unión puede ser positiva, si la unión de una primera molécula de aptámero facilita la unión de una segunda, o negativa si por el contrario la unión de una primera molécula de aptámero dificulta la unión de una segunda.

Se considera el siguiente sistema, en el que n moléculas del aptámero se unen a una molécula de proteína:



Este sistema descrito por Hill se ajusta a la siguiente ecuación:

$$B = \frac{[PWG]_0 \cdot F^n}{K_D + F^n}$$

Ecuación 6

La representación de la cantidad de aptámero enlazado en el equilibrio frente a la que permanece libre da lugar a una sigmoide y el ajuste no lineal de esta curva a la *ecuación 6* se obtiene el valor de la constante de disociación, K_D , y del número de moléculas de aptámero que se unen por molécula de proteína, n . El valor de n que se obtiene puede ser mayor que uno, si hay cooperatividad positiva, o menor que uno si es negativa.

La medida de la afinidad según el modelo de equilibrio se puede llevar a cabo en disolución o en superficie. En disolución, es necesaria la separación del aptámero libre del que se ha enlazado a la proteína, mientras que en superficie se inmoviliza uno de los dos componentes y se mida la cantidad del otro que se ha enlazado.

2.-Objetivos

El desarrollo de métodos extraordinariamente sensibles para detectar la presencia de gluten en alimentos es de gran importancia para asegurar una protección adecuada a todos los enfermos celíacos.

En el grupo de electroanálisis de la Universidad de Oviedo se ha completado un proceso de selección de aptámeros capaces de reconocer las proteínas alergénicas y se ha desarrollado un método de detección de gluten basado en estos aptámeros, que podría ser una buena alternativa a los inmunoensayos que actualmente se usan con este fin.

Los aptaensayos se basan en desarrollar la reacción de reconocimiento entre la proteína (gliadina) y el receptor (aptámero), infiriendo la cantidad de analito presente en el medio a partir de la observación de la extensión en la que la reacción de reconocimiento se ha producido. Esta observación puede mejorarse incorporando un cierto trazador en el reactivo de reconocimiento, el aptámero en este caso.

El reto de lograr una sensibilidad superior a la que se obtiene en los inmunoensayos depende en gran extensión no solo de la detectabilidad del trazador que se utilice, sino de la afinidad de unión proteína-aptámero. Esto es especialmente importante en ensayos con un formato competitivo, que a priori son los más adecuados si se desea determinar tanto gluten como fracciones peptídicas características de este, que pueden resultar de diferentes procesamientos de los alimentos.

Por tanto, desde un punto de vista fundamental es necesario disponer de métodos que permitan estimar la constante de afinidad de la reacción de reconocimiento y evaluar como se ve afectada esta por la modificación o inmovilización de alguno de los reactivos que participan en la misma.

Los objetivos que se plantean en este trabajo son:

- 1.- Desarrollar un método que permita obtener la constante de afinidad característica de la interacción entre la proteína y el aptámero en disolución.
- 2.- Evaluar diferentes métodos de inmovilización de la proteína sobre sustratos conductores, con el objetivo de seleccionar aquel que permita conservar, en la mayor medida posible, su capacidad de interacción con el aptámero en disolución.

- 3.- Obtener la constante de afinidad característica para la reacción entre la proteína inmovilizada y el aptámero en disolución.

3.-Experimental

3.1- Reactivos

Las partículas magnéticas de 1.0 μM de diámetro funcionalizadas con estreptavidina, DynabeadsMyOneStreptvidin C1, son de Invitrogen (Barcelona, España). Las partículas se suministran en forma de suspensión de concentración 10 mg/mL ($7\cdot 12\cdot 10^9$ micropartículas/mL) en disolución reguladora de fosfato (PBS) de pH 7.4 que contiene 0.01% Tween-20 y 0.09 % de NaN_3 como conservante.

El aptámero Gli4 fue sintetizado por Integrated DNA Technologies (IDT). El aptámero Gli4 complementario fue sintetizado por Metabion (Alemania). Los dos fueron suministrados en su forma liofilizada. Sus secuencias de bases se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1: Nombre y secuencia de los aptámeros empleados.

| Nombre | Secuencia de bases 5'→3' |
|--------------------|--|
| Btn-Gli4 | Btn-CCA GTC TCC CGT TTA CCG CGC CTA CAC ATG TCT GAA TCG C |
| Btn-complementario | Btn-GGC ATT CAG ACA TGT GTA GGC GCG GTA AAC GGG AGA CTG G |

El patrón de gliadina de Prolamin Working Group (PWG) se adquirió a R-Biopharm AG (Alemania).

El resto de reactivos empleados se detallan en la Tabla 2.

Todos los compuestos fueron obtenidos comercialmente y usados sin tratamiento previo. Las disoluciones se prepararon con agua Milli-Q purificada con un sistema Direct-Q de Millipore.

Tabla 2: Reactivos empleados

| Reactivo | Casa Comercial |
|--|-------------------|
| 10× PBS ¹ | Sigma-Aldrich |
| Tween-20 (70%) | Sigma-Aldrich |
| Biotina | Fluka |
| NaCl (≥ 98%) | Sigma-Aldrich |
| Tris-HCl 1M | Sigma-Aldrich |
| MgCl ₂ 1M | Fluka |
| Etanol (96%) | J.T. Baker |
| 3,3',5',5''-tetrametilbencidina(TMB) | Sigma-Aldrich |
| Str-HRP ² | Thermo Scientific |
| Seroábumina humana (BSA) | Sigma-Aldrich |
| Peróxido de Hidrogeno (H ₂ O ₂) | Sigma-Aldrich |
| Ácido sulfúrico (95%) | Fisher |
| Tioanilina | Sigma-Aldrich |
| HCl | J.T. Baker |
| Nitrito de sodio | Sigma-Aldrich |
| Ácido acético | Merck |
| KCl | Sigma-Aldrich |
| Ferricianuro potásico | Fluka |
| Ferrocianuro potásico | Fluka |
| 20× SSPE ³ | Sigma-Aldrich |

¹El PBS es una disolución reguladora de fosfato 0.01 M de pH 7.4 que contiene 0.154 M de NaCl

²Str-HRP es el conjugado enzimático estreptavidina - peroxidasa de rábano silvestre.

³El SSPE es una disolución reguladora de fosfato 0.2M de pH 7.4 que contiene 2.98 M de NaCl y 0.02 M de EDTA

Tabla 2 (bis): reactivos empleados

| Reactivo | Casa Comercial |
|--|----------------------|
| 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) | Sigma-Aldrich |
| N-hidroxisuccinimida (NHS) | Fluka |
| Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-etanosulfónico (HEPES) | Sigma-Aldrich |
| Etanolamina (98 %) | Sigma-Aldrich |
| Óxido de grafeno (láminas secas) | Graphene supermarket |
| N,N-dimetilformamida (DMF) (≥ 99.9 %) | Sigma-Aldrich |
| Ácido 1-pirenobutanoicosuccimidilester (PANHS) | Sigma-Aldrich |
| Ácido nítrico (65 %) | J. T. Baker |

La composición de las disoluciones empleadas en las diferentes etapas del ensayo es la siguiente:

- Disolución PBS: 2x-PBS
- Disolución PBSL: 2xPBS + 0.01 % tween-20
- Disolución BS: 50 mM Tris-HCl + 250 Mm NaCl + 5mM MgCl₂.
- Disolución BSL: BS + 0.01 % tween-20

3.2.- Instrumentación

Las medidas electroquímicas de cronoamperometría se realizaron con un potenciostato μ Autolab Type II (Ecochemie, Holanda) controlado por un equipo informático provisto del software GPES 4.9. Las medidas de impedancia se realizaron con un potenciostato PGSTAT 12 (Ecochemie, Holanda) controlado por un equipo informático provisto con el software FRA 4.9.

Para las medidas de cronoamperometría se emplearon electrodos serigrafiados de carbono DRP-110 de Dropsens (Asturias, España) que constan de un electrodo de trabajo de 4 mm de diámetro fabricado con tinta de carbono, un electrodo auxiliar también de tinta de carbono y un electrodo de referencia, que en realidad es un pseudoreferencia, de plata.

Como interfase entre el electrodo serigrafiado y el potenciostato se empleó un conector específico suministrado por Dropsens (Asturias, España).

En la etapa de detección, para asegurar que las partículas magnéticas modificadas se depositan sobre el electrodo de trabajo, se utilizó un imán de 4 mm de diámetro adquirido en la Boutique del Imán (Barcelona, España).

Las etapas de incubación se llevaron a cabo en un agitador termostatzado para tubos Eppendroff de 1.5 mL, modelo Thermomixer Comfort. (Eppendorf, España).

Las disoluciones de aptámeros y partículas magnéticas contenidas en los viales se homogenizaron mediante agitación con un vortex IKA.

Para la etapa de separación de las fracciones enlazada y libre de aptámero se utilizan filtros de centrifugación Amicon Ultra-4 de 50 KDa, suministrados por Merck Millipore (Irlanda). Las disoluciones se centrifugaron empleando una centrifuga Heraeus Multifuge 1L-R (Thermo Scientific).

Para las medidas de impedancia se empleó un montaje potencioestático convencional, en el cual hay tres electrodos en la celda:

- Electrodo de referencia: se utilizó un electrodo de Ag/AgCl/KCl (saturado) aislado de la disolución mediante un puente salino de nitrato potásico 3M.
- Electrodo auxiliar: se utilizó un hilo de platino.
- Electrodo de trabajo: se empleó un electrodo de oro policristalino comercial de 1.6 mm de diámetro (BASI, UK).

3.3.- Procedimiento experimental para caracterizar la interacción homogénea aptámero-proteína.

Para obtener la constante de disociación del complejo aptámero-proteína en disolución, se hace interaccionar una cantidad fija del aptámero con cantidades crecientes de proteína.

Mediante filtración por centrifugación se separa el aptámero libre del enlazado a la proteína y de la proteína que no se ha enlazado. La separación tiene lugar atendiendo a sus diferentes pesos moleculares.

La detección del aptámero libre se lleva a cabo mediante un ensayo de hibridación sobre partículas magnéticas, cuyo esquema se muestra en la Figura 3.

3.3.1.- Modificación de las partículas magnéticas

En primer lugar, se realiza un lavado de las partículas magnéticas comerciales para eliminar la disolución con conservantes en la que se suministran. Se toman 50 μL de la suspensión comercial y se transfieren a un tubo de 1.5 mL. Se adicionan 450 μL de PBSL, se agita en el Vortex y se coloca sobre un imán que permite acumular las partículas en la pared del tubo y así eliminar el sobrenadante.

Tras retirar el sobrenadante se reconstituyen en 500 μL de PBS 2 \times con una concentración 1 μM del aptámero complementario, y se incuba en el Thermomixer durante 30 minutos. (Etapa 1; Figura 3).

Una vez pasado este tiempo, se colocan en el imán y se realizan dos lavados con PBSL para eliminar el exceso de aptámero

A continuación, se realiza una etapa de bloqueo con biotina. Se reconstituyen en 500 μL de PBS 2X con una concentración de biotina 500 μM , y se incuba en el Thermomixer durante 30 minutos. (Etapa 2; Figura 3).

Tras la incubación se colocan nuevamente en el imán y se realiza un lavado con BSL y otro con BS. Finalmente se reconstituyen en 500 μL de BS.

3.3.2.- Protocolo de realización del ensayo

En cada tubo que contiene la disolución del aptámero que se quiere medir se colocan 50 μL de partículas magnéticas y se incuba durante 30 minutos en el Thermomixer. (Etapa 3; Figura 3).

Tras el periodo de incubación se colocan en el imán y se realizan dos lavados con BSL.

A continuación, se lleva a cabo el marcaje enzimático, para ello se reconstituyen las partículas en 500 μL de BSL con 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Strp-HRP y se incuban durante 10 minutos en el Thermomixer. (Etapa 4; Figura 3).

Pasado este tiempo, se colocan en el imán y se realiza un lavado con BSL y dos con BS. Finalmente se reconstituyen en 500 μL de BS y se dan pequeños toques en el Vortex para resuspender las partículas.

3.3.3.- Protocolo de detección

Para llevar a cabo la medida electroquímica se tienen que atrapar las partículas magnéticas sobre el electrodo de trabajo.

Para que las partículas no se muevan del electrodo de trabajo se coloca un imán con la misma superficie del electrodo debajo del mismo, empleando cinta adhesiva de doble cara, de tal manera que las partículas se ven atraídas por la acción del campo magnético.

Tras colocar el imán, se depositan 15 μL de partículas sobre el electrodo de trabajo y se deja que el imán las atrape durante un minuto. A continuación, se añaden 25 μL de TMB, sustrato de la enzima, de modo que cubra los tres electrodos de la celda electroquímica. Se deja que la reacción enzimática transcurra durante 30 segundos y se realiza la medida. (Etapa 5; Figura 3)

La medida electroquímica del producto electroactivo generado se lleva a cabo mediante cronoamperometría a 0 V y adquiriendo un valor de corriente cada 0.2 segundos. La señal analítica es el valor absoluto del promedio de los últimos 10 segundos de la medida cronoamperométrica.

3.3.4.- Preparación de los filtros de separación

En primer lugar, se realizan tres ciclos de 10 minutos a 5000 $\times g$ con una disolución de 1 mg/mL de BSA, para bloquear los sitios del filtro en los que se puede adsorber inespecíficamente el aptámero. Para bloquear aún más el filtro se realiza un ciclo con una secuencia aleatoria de ADN diferente al aptámero en estudio, pero con la misma longitud.

A continuación, se realiza un ciclo con agua para eliminar los restos que puedan quedar de las disoluciones anteriores.

Todos los ciclos se realizan a una temperatura constante de 25 °C.

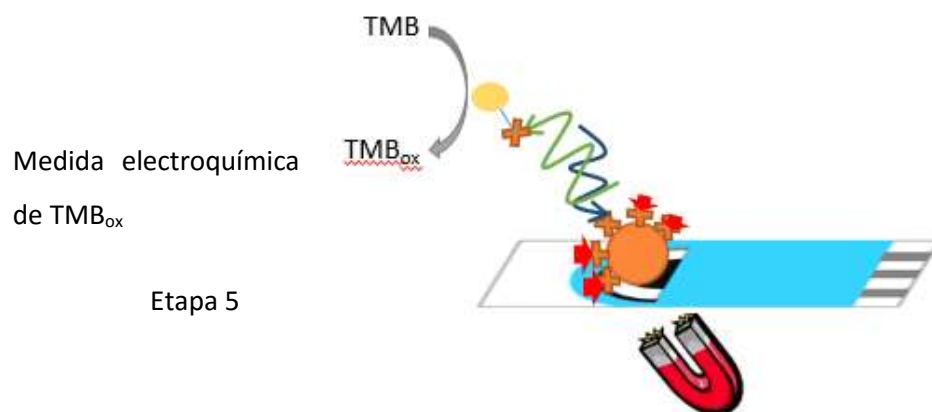
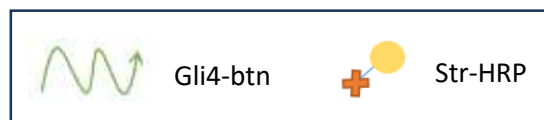
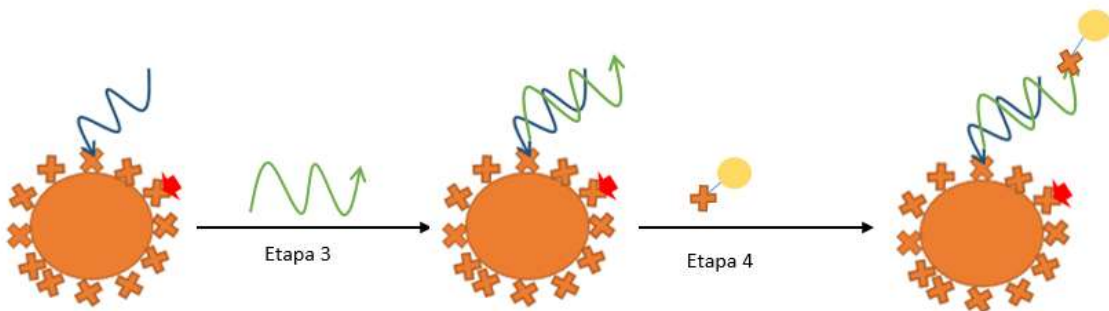
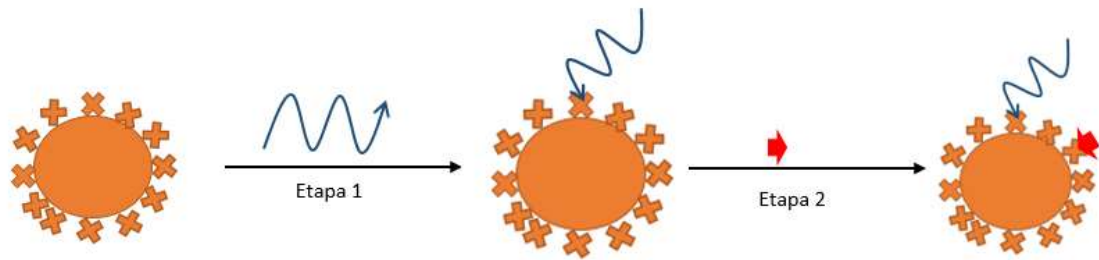


Figura 3: Esquema del ensayo utilizado para medir la cantidad de aptámero libre después del proceso de interacción homogénea aptámero-proteína

3.4.- Procedimiento experimental para caracterizar la interacción aptámero-proteína en superficie.

Para evaluar los cambios de afinidad que se producen al efectuar la interacción en superficie se procedió a inmovilizar la proteína sobre la superficie de electrodos de oro. Esta superficie modificada se hace interaccionar con cantidades crecientes de aptámero.

3.4.1.- Acondicionamiento de los electrodos de oro

En primer lugar, se realiza un lavado de la superficie de los electrodos de oro para eliminar los restos de materia orgánica, para ello se sumergen durante 10 minutos en una disolución de piraña (30% H₂O₂, 70 % H₂SO₄).

A continuación, se pule la superficie de los electrodos con suspensiones de alúmina de 1, 0.3 y 0.05 µm de diámetro sobre un recorte de tejido de poliéster. El pulido se realiza de mayor a menor diámetro de la suspensión, realizando movimientos en forma de ocho sobre el tejido durante 5 minutos. Posteriormente se introducen en una disolución de agua y se soniquetean durante dos minutos para eliminar los restos de alúmina.

Por último, se realiza una limpieza electroquímica mediante voltamperometría cíclica en H₂SO₄, en el intervalo de potenciales entre 0 y 1.25 V (vs. Ag|AgCl|KNO₃) con una velocidad de variación de potencial de 50 mV/s. Antes de comenzar los ciclos de potencial se somete al electrodo a un potencial de 2 V durante cinco segundos y después a uno de -0.1 V durante otros cinco segundos.

3.4.2.-Medidas de impedancia

A la celda electroquímica se añaden 50 mL de KCl 100 mM y los compuestos electroquímicamente activos ferrocianuro y ferricianuro potásico para tener una concentración en la celda 5 mM de cada uno. Es necesario eliminar el oxígeno disuelto, para lo cual se hace borbotear nitrógeno antes de realizar las medidas, y se mantiene la corriente de nitrógeno mientras se están realizando.

El potencial de trabajo se fija en el potencial formal del sistema reversible que se utilice como indicador, que para el ferricianuro/ferrocianuro es 0.22 V. Este potencial se obtiene previamente realizando un voltamperograma cíclico del sistema redox indicador. Se realiza un espectro de impedancias variando la frecuencia del potencial de excitación en el intervalo entre 100 mHz y 10 KHz.

4.- Resultados y Discusión

4.1.- Caracterización de la interacción homogénea aptámero-proteína.

La constante de afinidad, es decir la constante del equilibrio de la reacción de reconocimiento, es una de las características que limitan la sensibilidad que puede alcanzarse en los aptaensayos. Estudios previos del grupo de electroanálisis de la Universidad de Oviedo ^[33] han revelado que la unión de los aptámeros a una etiqueta de biotina es la modificación del aptámero que menos afecta a la afinidad de enlace péptido-aptámero. Sin embargo, no se ha estudiado cual es la afinidad de unión hacia la proteína nativa, que incorpora el péptido como un epítipo.

Una de las técnicas más utilizadas para evaluar la interacción aptámero-diana en disolución es la calorimetría de valoración isotérmica. Con esta técnica se obtuvo para la interacción entre el péptido 33-mer y al aptámero Gli1, el aptámero más abundante obtenido en el proceso de selección, un valor de $K_D = 45 \pm 10$ nM. ^[33] Sin embargo, en este método se necesitan utilizar concentraciones muy altas de los dos componentes que participan en la reacción de interacción que son incompatibles con la solubilidad limitada de la proteína gliadina en disoluciones acuosas. Por esta razón, desarrollamos un método mediante el cual, después de que se produce la interacción entre la proteína y el aptámero marcado con una etiqueta de biotina en disolución, se procede a la separación y cuantificación de la fracción de aptámero no enlazada.

4.1.1.- Diseño del proceso de separación

En primer lugar fue necesario seleccionar una técnica de separación que asegure una separación completa de las formas enlazada y libre del aptámero biotinilado, sin afectar a la reacción primaria proteína-aptámero. La separación debería además ser práctica (simple y rápida).

Una de las propiedades que pueden aprovecharse en el proceso de separación es la diferencia de tamaño entre la proteína (peso molecular 50000 Da) y el aptámero marcado (peso molecular 12497.3 Da). Sobre la base de esta diferencia se evaluó la filtración con centrifuga, empleando membranas de celulosa con diferentes cortes de peso molecular.

Para seleccionar el tamaño de poro más conveniente para la separación, se comprobó la capacidad de diferentes membranas para permitir el paso a su través del aptámero libre. Se utilizaron membranas de 30000 y 50000 Da de tamaño de corte, procediendo a la filtración de disoluciones del aptámero biotinilado 10 nM. Para medir el aptámero en el filtrado se utilizó el

ensayo genómico electroquímico que se describe en la siguiente sección. Como puede observarse en la figura 4, aunque con el filtro de 50000 Da se obtienen recuperaciones mayores ($9.7 \pm 0.5 \%$), ninguna de las dos membranas permite la recuperación cuantitativa del aptámero libre. De acuerdo con las especificaciones del producto comercial una de las razones de la recuperación disminuida puede ser interacciones inespecíficas del ADN con el material de la membrana. Por esta razón, se diseñó un proceso de acondicionamiento de las membranas, con el que sea posible bloquear estos sitios de adsorción inespecíficos y mejorar así la recuperación. El pretatamiento, que se detalla en la sección 3.3.4., implica el empleo de albúmina y ADN aleatorio como agentes bloqueantes.

De esta forma es posible, con la membrana de 50000 Da alcanzar una recuperación de $84 \pm 3 \%$.

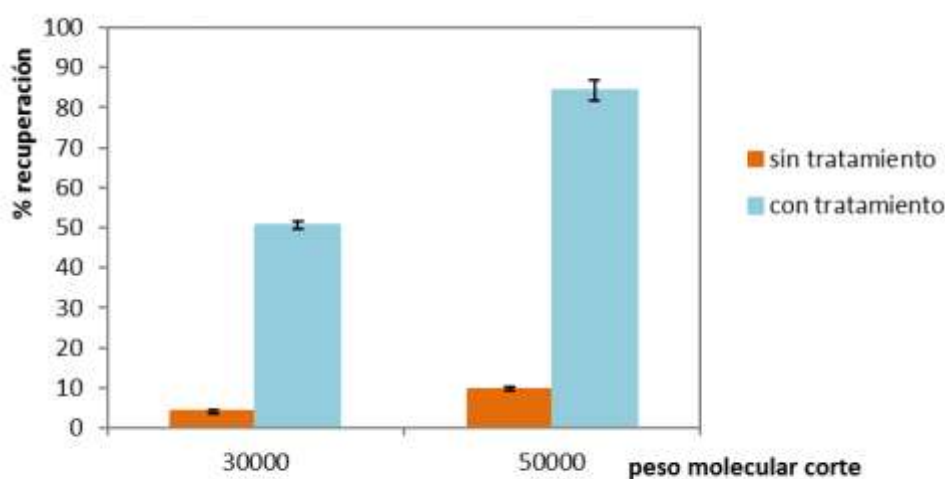


Figura 4: Efecto del tamaño de corte de la membrana utilizada en el proceso de filtración sobre la recuperación del aptámero biotinilado libre.

4.1.2.- Ensayo de medida del aptámero libre

Para la medida del aptámero libre, aprovechando su naturaleza nucleotídica, se diseñó un ensayo genómico con detección electroquímica. Con este objetivo seleccionamos una secuencia de ADN sintética, complementaria a la secuencia del aptámero. Esta secuencia con una molécula de biotina en su extremo 5' se atrapa sobre partículas magnéticas modificadas con estreptavidina, tal y como se explicó en la sección 3.3.1. Después de bloquear los sitios de estreptavidina libres con biotina, cuando estas partículas magnéticas se hacen interaccionar con una disolución de aptámero biotinilado, este se fija específicamente a la superficie a través de la reacción de hibridación. Si a continuación se incorpora el conjugado estreptavidina-

peroxidasa es posible obtener información sobre la cantidad de aptámero presente inicialmente en la disolución midiendo la actividad enzimática fijada a la superficie de las partículas magnéticas. Esto se consigue atrapando las partículas magnéticas sobre la superficie de electrodos serigráficos de carbono y poniéndolas en contacto con una disolución que contiene peróxido de hidrógeno y tetrametilbenzidina como sustratos de la peroxidasa. Después de 30 segundos de reacción enzimática, la corriente de reducción, obtenida mediante cronoamperometría a 0 V, es una medida de la cantidad de producto de oxidación generado enzimáticamente e informa sobre la cantidad de aptámero libre en la disolución original.

En la figura 5 se muestran los cronoamperogramas que se registraron para concentraciones crecientes de aptámero en el intervalo entre 0 y 10 nM. La corriente de reducción medida varía linealmente con la concentración de aptámero en el intervalo de concentraciones ensayadas. (Figura 6)

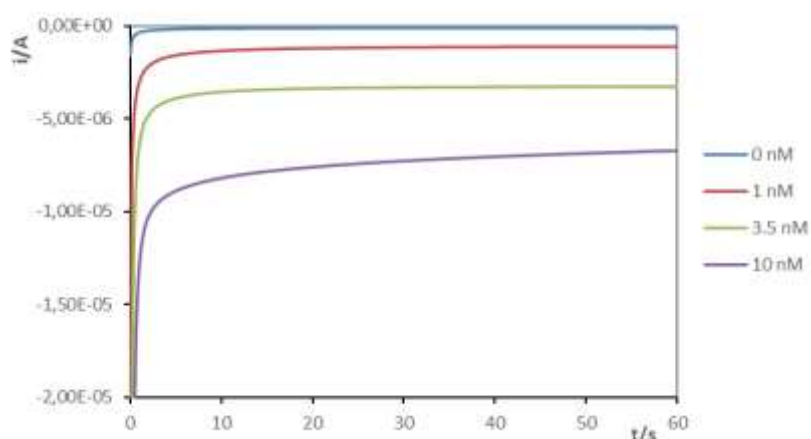


Figura 5: Cronoamperogramas obtenidos para diferentes concentraciones de aptámero

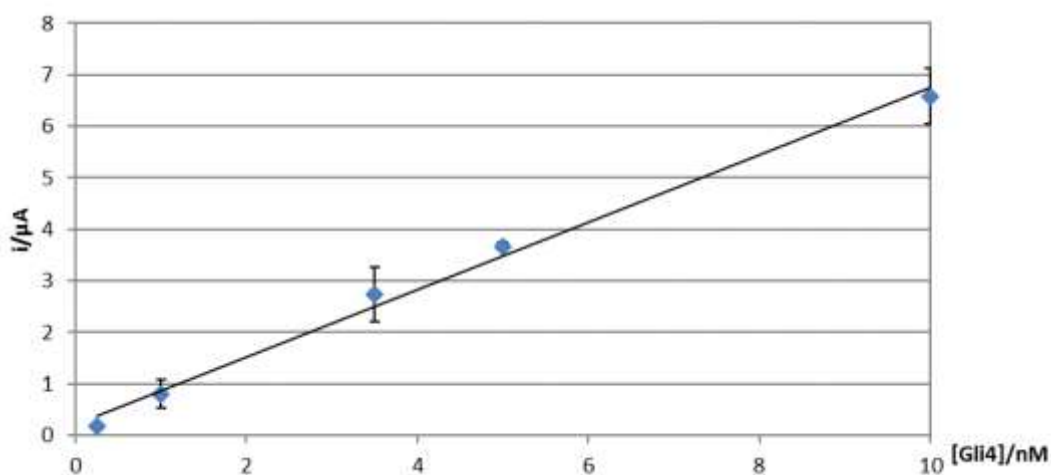


Figura 6: Dependencia de la corriente de reducción medida en el ensayo genómico con la concentración de aptámero libre

La ecuación de la recta de calibrado es:

$$i/\mu\text{A} = (0.7 \pm 0.2) [\text{aptámero}]/\text{nM} + (0.2 \pm 0.1)$$

$$r^2 = 0.994; n=5$$

El ensayo muestra una reproducibilidad aceptable, con una desviación estándar relativa del 8 % para una concentración de aptámero 10 nM. El límite de detección, calculado como la concentración de aptámero que produce una señal cronoamperométrica igual a tres veces la desviación estándar de la estima es 0.1 nM.

4.1.3.- Curva de enlace para la proteína en disolución

Fijando la concentración de aptámero-biotinado en 10 nM, se realizó un ensayo de enlace con diferentes concentraciones de gliadina PWG en disolución, en el intervalo de concentraciones entre 0.1 y 10 nM. Tras un periodo de interacción de 30 minutos se pasa la disolución resultante a través de la membrana de 50000 Da, lo que permite separar el aptámero que tras la interacción permanece libre. Este aptámero se mide mediante el ensayo con partículas magnéticas descrito en la sección anterior.

En todos los casos se procesa de idéntica manera, como control, una disolución que solo contiene aptámero. El % de enlace del aptámero se obtiene a partir de la señal obtenida en el control (i_{max}) y la que se mide para las diferentes concentraciones de proteína (i) de acuerdo a la ecuación 7.

$$\%enlace = \frac{i_{\text{max}} - i}{i_{\text{max}}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

La representación del % enlace frente a la concentración de proteína da lugar a la curva de enlace que se muestra en la figura 7.

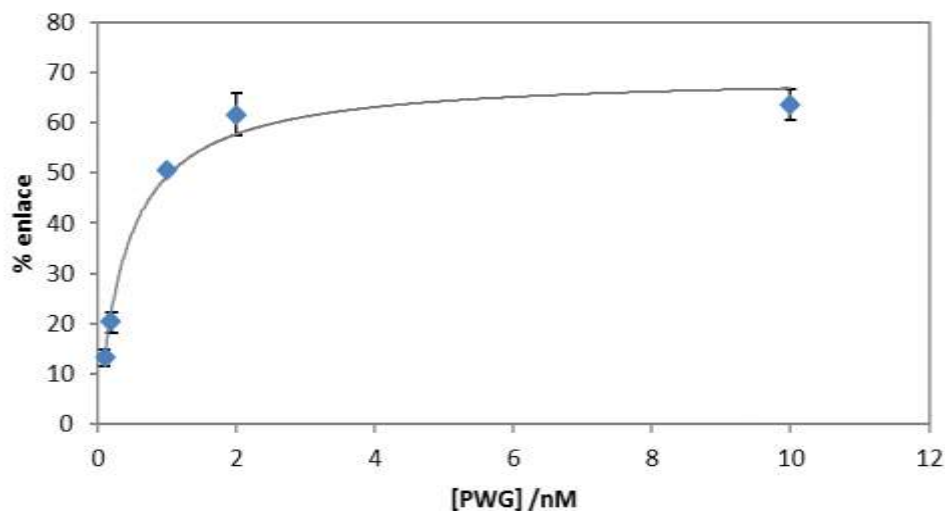


Figura 7: Ajuste de los datos obtenidos para la interacción homogénea gliadina-PWG - aptámero-biotina al modelo de Langmuir.

El ajuste de estos datos a los modelos de Langmuir y Hill se muestra en la tabla 3. Como puede observarse, los datos experimentales se ajustan bien a los dos modelos, lo que es razonable si la estequiometría de enlace es 1:1, tal y como predicen ambos modelos. Este es un resultado inesperado para una molécula como la gliadina, en la que se presentan múltiples dominios repetidos, en los que se encuentran parte de la secuencia peptídica de 33 aminoácidos utilizada como diana en el proceso de selección.

Tabla 3: Ajuste a los modelos de Langmuir y de Hill

| | Ecuación | Coefficiente de correlación (r) |
|----------|---|---------------------------------|
| Langmuir | $\%enlace = \frac{(70 \pm 4) \cdot [PWG]/nM}{(0.41 \pm 0.08) + [PWG]/nM}$ | 0.9800 |
| Hill | $\%enlace = \frac{(66 \pm 4) \cdot ([PWG]/nM)^{(1.2 \pm 0.2)}}{(0.36 \pm 0.06) + [PWG]/nM^{(1.2 \pm 0.2)}}$ | 0.9863 |

El valor de K_D estimado es 0.41 ± 0.08 nM de acuerdo al modelo de Langmuir. Este valor es indicativo de una interacción muy fuerte entre el aptámero y la proteína, más aún que la interacción entre el aptámero y el péptido en disolución para la que se obtuvo un valor de K_D un orden de magnitud superior.

4.2.-Inmovilización de la gliadina sobre la superficie de transductores electroquímicos.

El desarrollo de sensores electroquímicos para gliadina exigirá la inmovilización sobre la superficie del transductor del aptámero o la proteína. Si se tiene en cuenta que la estequiometría de la interacción, tal y como se describió en la sección anterior, es 1:1, lo más adecuado es pensar en el diseño de un sensor con un formato de ensayo competitivo o de desplazamiento, en el que sea la proteína la que se inmoviliza. Por esta razón, se exploraron en primer lugar diferentes estrategias de inmovilización de la gliadina PWG sobre superficies de carbono vitrificado y oro, dos de las superficies electródicas más utilizadas, con el objetivo de seleccionar la que conduzca a un menor efecto sobre la afinidad proteína inmovilizada-aptámero. Para evaluar la interacción proteína inmovilizada-aptámero se propone utilizar la espectroscopía de impedancia faradaica. Esta es una técnica electroquímica en la que se utiliza como señal de excitación un potencial que varía con el tiempo con una función de sinusoidal de pequeña amplitud y frecuencia variable.

El análisis de la impedancia del sistema en función de la frecuencia de la señal de excitación proporciona información sobre la estructura de la interfase electrodo-disolución y las reacciones que tienen lugar en la superficie electródica. Por tanto, esta técnica permitirá evaluar de manera directa la interacción proteína inmovilizada-aptámero.

4.2.1.-Inmovilización sobre carbono vitrificado

Las superficies de carbono vitrificado constituyen una buena alternativa como material electródico y fueron el primer tipo de superficie explorada como plataforma para la inmovilización de la gliadina PWG.

El método de inmovilización más sencillo consiste en la adsorción de la proteína sobre la superficie de carbono vitrificado pulida. La inmovilización tiene lugar sumergiendo el electrodo en una disolución de gliadina PWG 500 nM durante 10 minutos en una disolución de KCl 0.1 M. La modificación se monitoriza mediante espectroscopía de impedancia faradaica en presencia de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. El cambio en la resistencia a la transferencia electrónica, obtenido a partir de los diagramas de Nyquist registrados antes y después de la modificación, puede utilizarse como una medida relativa de la concentración de proteína inmovilizada en superficie. Con este fin se utiliza el parámetro θ , definido de acuerdo a la ecuación 8, donde R_{et} es el valor de la resistencia a la transferencia electrónica de la superficie de carbono vitrificado pulida, y

R'_{et} el valor de la resistencia a la transferencia electrónica de la superficie con la proteína inmovilizada. [34], [35]

$$\theta = 1 - \frac{R_{et}}{R'_{et}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Para la superficie de carbono vitrificado limpia se obtuvo un valor de resistencia a la transferencia electrónica de $114 \pm 31 \Omega$, mientras que con la proteína inmovilizada este valor aumenta, resultando un valor de $\theta = 0.93 \pm 0.06$.

Para evaluar la unión proteína inmovilizada-aptámero se hace interaccionar la proteína adsorbida con una disolución 100 nM del aptámero durante 30 minutos y se mide de nuevo el valor de la resistencia a la transferencia electrónica. Se observa un incremento de R_{et} después de la interacción con el aptámero, indicativo de que este se unió a la superficie produciendo un aumento en la repulsión electrostática de la molécula indicadora. El % de aumento que se produjo respecto a la superficie con la proteína adsorbida fue del 160 %.

Para comprobar si hay interacciones inespecíficas se hace interaccionar la proteína adsorbida con una disolución 100 nM de una librería de secuencias aleatorias durante 30 minutos y se mide la resistencia a la transferencia electrónica, produciéndose un 50 % de aumento. Este valor indica que tienen lugar interacciones inespecíficas de ADN con la superficie modificada que enmascaran en parte las interacciones específicas aptámero-proteína.

Así mismo se evaluó la estabilidad de la adsorción de la proteína con el tiempo en una disolución de BS. Como se observa en la figura 8, cuando la superficie modificada con PWG se mantiene en disolución se produce un aumento progresivo de la resistencia a la transferencia electrónica que probablemente se debe a los cambios conformacionales que sufre la proteína.

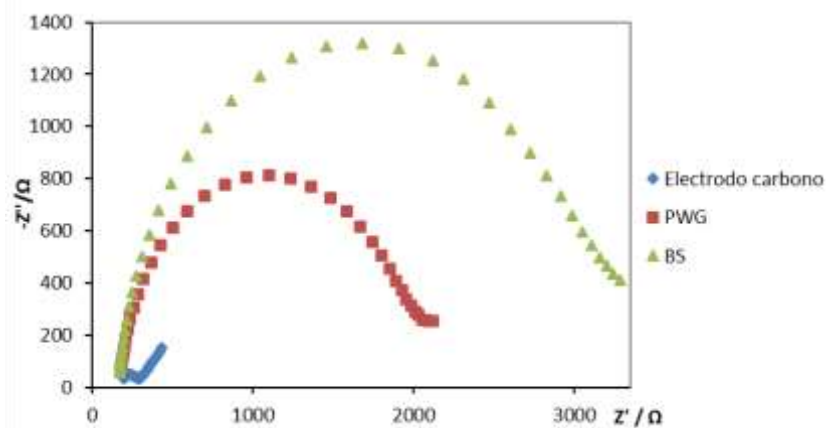


Figura 8: Espectro de impedancias que muestran la evolución de la medida al mantener la proteína inmovilizada en disolución.

La falta de estabilidad de esta superficie modificada hace que se exploren métodos de inmovilización que impliquen la unión covalente de la proteína.

4.2.2.-Inmovilización covalente sobre carbono vitrificado oxidado.

La oxidación de la superficie de carbono vitrificado conduce a la formación de grupos carboxílicos en superficie, que permiten la modificación de la misma con la proteína mediante la formación de enlace covalente a través de sus grupos amino. Con este objetivo se utiliza la reacción con carbodiimida. El tratamiento de la superficie oxidada con el derivado soluble 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), dará lugar a la transformación de los grupos carboxilo en un derivado o-acilisourea, que en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) conduce a un éster de succinimida. Este reacciona con aminas primarias para dar un enlace amida.

La oxidación de la superficie tiene lugar realizando cinco ciclos de potencial hasta 1.6 V en HNO₃, y a continuación se mide el valor de la resistencia a la transferencia electrónica. Este tratamiento conduce a un incremento en la R_{et} cuando se compara con la superficie sin oxidar, con un valor promedio de $R_{et} = 216 \pm 41 \Omega$. Tras la activación de la superficie con EDC y NHS, la superficie se incubó en la proteína (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en HEPES de pH 7).

Finalmente se bloquean los grupos activos de superficie con etanolamina y se mide la resistencia a la transferencia electrónica, que reflejará la cantidad de proteína inmovilizada. En este caso se observa un aumento mucho menor en R_{et} que el que se obtiene por adsorción, obteniéndose un valor de $\theta = 0.51$.

La pequeña cantidad de proteína que se consigue inmovilizar por este método se relaciona muy probablemente con el limitado número de grupos carboxilo de superficie que se consiguen generar por oxidación. Por tanto, se busca otro método con el que se pueda tener un control mayor sobre la cantidad de grupos activos de superficie, al mismo tiempo que se incremente la superficie activa para la inmovilización.

4.2.3.-Inmovilización sobre grafeno

La modificación de la superficie de carbono vitrificado con grafeno proporciona una mayor superficie electroactiva y al ser muy conductor proporciona valores de resistencia a la transferencia de electrones de la superficie inicial bajos, que permiten observar incrementos de este valor producidos por la inmovilización y la interacción.

Para la preparación de la suspensión de óxido de grafeno se parte de láminas de óxido de grafeno que se trituran con un mortero para formar el polvo de óxido de grafeno. A continuación se suspenden en DMF y se soniquetean durante una hora. Una gota de esta suspensión se deposita sobre la superficie del electrodo de carbono vitrificado y se deja a temperatura ambiente hasta su total evaporación (Etapa 1; Figura 10).^{[36], [37]}

A continuación se reduce el óxido de grafeno mediante la realización de ciclos de potencial entre 0 y -1.5 V en PBS de pH 5 saturado de N₂, hasta la desaparición del pico de reducción debido a los oxígenos que hay en superficie, como se observa en la figura 9 (Etapa 2; Figura 10).^[38] Se mide el valor de la resistencia a la transferencia electrónica de esta superficie, que será el valor que se tomará como inicial. Con este tratamiento se obtuvo un valor de R_{et} promedio de 1722 ± 452 Ω.

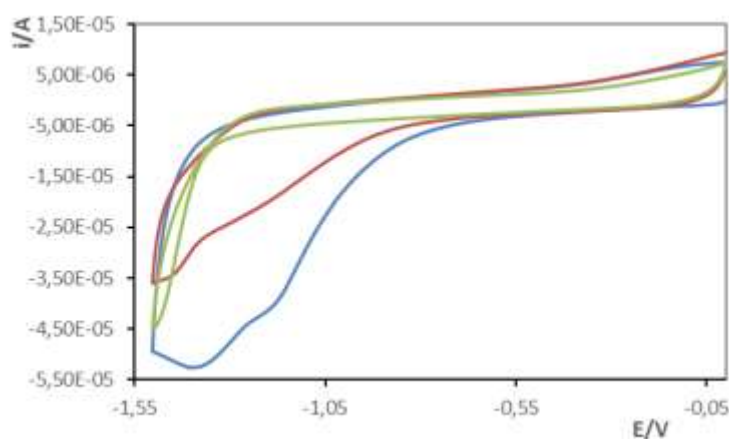


Figura 9: Voltamperometrias cíclicas de reducción del óxido de grafeno: 1 ciclo (azul), 3 ciclos (rojo) y 10 ciclos (verde)

Sobre esta superficie se adsorbe irreversiblemente el ácido 1-pirenobutanoico, succinimidilester (PANHS) a través del grupo pireno, debido a su alta naturaleza aromática que interacciona fuertemente con el grafito a través de enlaces π (Etapa 3; Figura 10). La inmovilización de la proteína tiene lugar a través de la sustitución nucleofílica del grupo succinimida por los grupos amino de la proteína, dando lugar a la formación de un enlace amida (Etapa 4; Figura 10).^[39] Por último se bloquea la superficie con etanolamina y se mide la resistencia a la transferencia electrónica de esta superficie, que dará una idea de la proteína inmovilizada. Se obtiene un valor de $\theta = 0.94 \pm 0.06$, lo que indica que la cantidad de proteína que se inmoviliza por este procedimiento es comparable a la que se obtiene por adsorción, aunque la conformación en la que se encuentra la proteína será muy probablemente diferente.

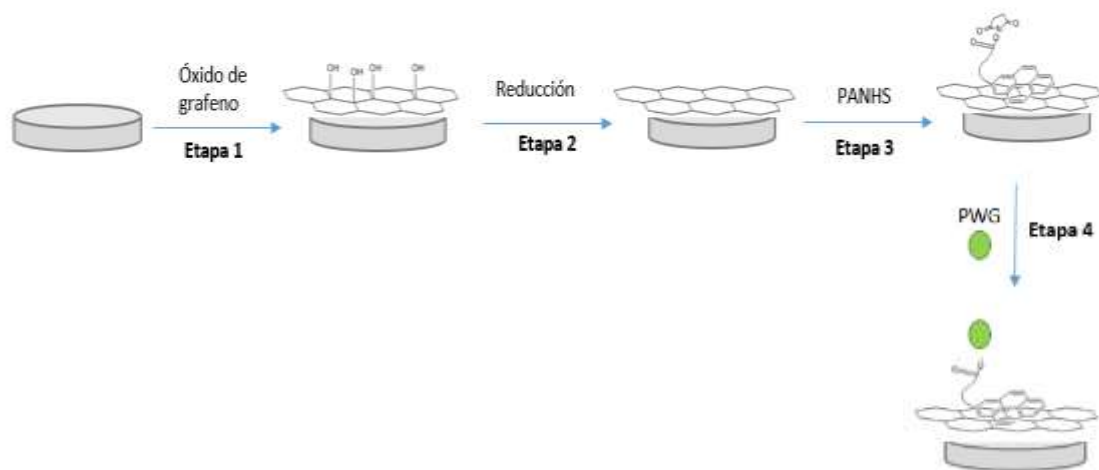


Figura 10: Esquema de la inmovilización de la proteína sobre grafeno

Para evaluar la interacción de la proteína con el aptámero se hace interaccionar esta superficie con una disolución de aptámero 100 nM durante 30 minutos y se mide la impedancia. El aumento en la R_{et} que se obtiene es comparable al que se observa cuando esta superficie se hace interaccionar con una librería de ADN de secuencias aleatorias (3.3% de aumento).

Por tanto, en estas condiciones no se observa reconocimiento específico de la proteína inmovilizada por el aptámero. Este hecho puede deberse a la diferente conformación de la proteína en superficie, que enmascara los sitios por los que el aptámero la reconoce.

4.2.4.-Inmovilización sobre oro.

Con el fin de garantizar que la superficie de oro utilizada para inmovilizar la proteína se encuentra libre de impurezas y con una rugosidad comparable entre diferentes electrodos y experimentos, se utilizan medidas de voltamperometría cíclica en medio de H_2SO_4 0.1 M para controlar el estado de partida, después del proceso de limpieza descrito en la sección 3.4.1. La figura 11 muestra un voltamperograma cíclico típico de una superficie limpia, donde pueden observarse los tres procesos de formación de los óxidos de oro a potenciales por encima de 1 V y el proceso de reducción de los óxidos, con un potencial de pico de 0.8 V. La carga asociada a la reducción de la monocapa de los óxidos de oro puede utilizarse para estimar el área electroquímica activa de la que se parte, usando el factor de conversión $386 \mu C \cdot cm^{-2}$. Con los electrodos de oro policristalino utilizados y las condiciones de limpieza descrita se obtiene un área promedio de $0.05 \pm 0.02 cm^2$.

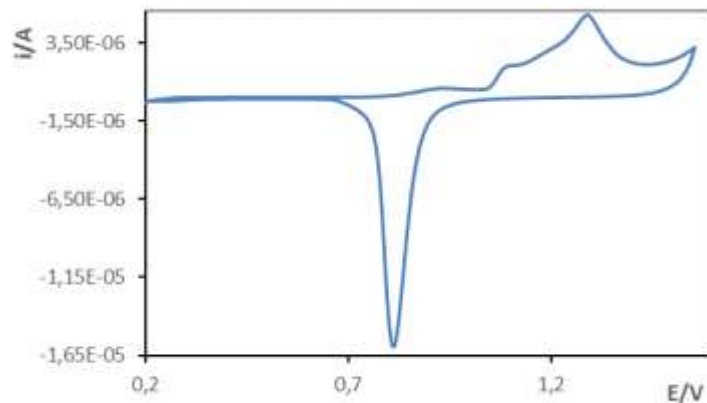


Figura 11: Típico voltamperograma cíclico obtenido con una superficie policristalina de oro en H_2SO_4 .

De nuevo se comenzó explorando la inmovilización de la proteína mediante adsorción. En este caso, la presencia de grupos tiol en la proteína hace pensar en que la adsorción de lugar a una inmovilización más estable a la que se obtiene sobre superficies de carbono. Tras un proceso de incubación de la superficie de oro en una disolución de PWG 50 nM en BS durante 30 minutos se obtiene un aumento en la resistencia a la transferencia electrónica tal y como se muestra en la figura 12. Esto es indicativo de que se ha producido la inmovilización de la proteína, obteniéndose en este caso un recubrimiento promedio de $\theta = 0.97 \pm 0.02$.

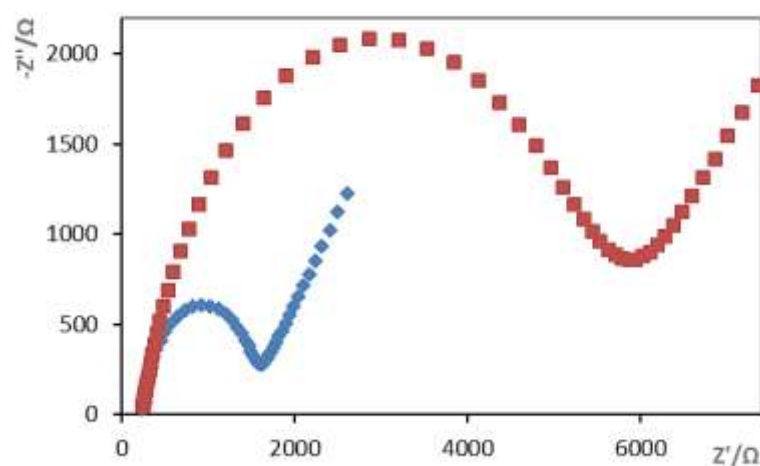


Figura 12: espectro de impedancias del oro limpio (azul) y tras la inmovilización de la gliadina PWG (rojo)

Sin embargo, cuando se hace interaccionar esta superficie con una disolución de aptámero 100 nM en BS durante 30 minutos no se observa un aumento en la resistencia a la

transferencia electrónica. Esto indica que el aptámero no es reconocido por la proteína debido a la desnaturalización de esta al adsorberse sobre la superficie de oro.

4.2.5.-Inmovilización sobre oro empleando sales de aril diazonio

Teniendo en cuenta que la inmovilización covalente de la gliadina sobre superficies de carbono vitrificado utilizando la reacción de la carbodiimida conduce a una conformación de la proteína no adecuada para su reconocimiento por el aptámero, se exploró una estrategia de inmovilización covalente sobre superficies de oro diferente. El empleo de sales de aril diazonio como agente de acoplamiento de biomoléculas a diferentes superficies puede constituir una excelente alternativa ^[40] que no ha sido previamente explorada para inmovilizar gliadina.

Los grupos aril-diazonio se pueden obtener mediante reacción de diazotación de una monocapa autoensamblada de tioanilina. La sal de diazonio obtenida reacciona con residuos de tirosina o histidina de la proteína, lo que conduce a la unión covalente de la misma a través de un enlace azo. Se espera que al alterarse grupos funcionales diferentes al grupo amino, la conformación que adopte la proteína en este caso sea más favorable al reconocimiento específico por el aptámero.

En primer lugar, sobre la superficie del electrodo limpia y pulida se forma una monocapa de tioanilina, sumergiendo el electrodo en una disolución 1 mM de tioanilina en SSPE 2× durante una hora. (Etapa 1; Figura 14) Para comprobar la formación de la monocapa se realiza una medida de impedancia, siendo esta menor que la inicial para la superficie del oro puesto que la monocapa de tioanilina es conductora y reduce la resistencia a la transferencia electrónica en la interfase electrodo-disolución, como se puede observar en la figura 13.

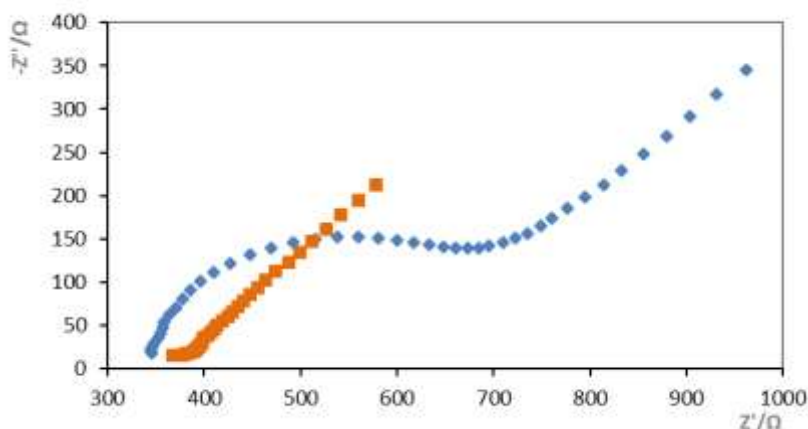


Figura 13: Espectro de impedancias para la superficie de oro limpia (azul) y tras la formación de la monocapa de tioanilina (naranja)

A continuación, tras limpiar el electrodo con agua, se sumerge durante 30 minutos en una disolución de nitrito de sodio 0.05M en HCl 0.1 M, en un baño de hielo. (Etapa 2; Figura 14) De esta forma tiene lugar la diazotación. Tras este tiempo se lava la superficie del electrodo con agua fría.

Después, tiene lugar la unión de la proteína a la superficie modificada a través de las tirosinas o histidinas de forma covalente. Para ello se introduce el electrodo en una disolución de PWG 200 nM en ácido acético de pH 5.5, en un baño de hielo, durante 30 minutos (Etapa 3; Figura 14). Pasado este tiempo se lava la superficie del electrodo con KCl.

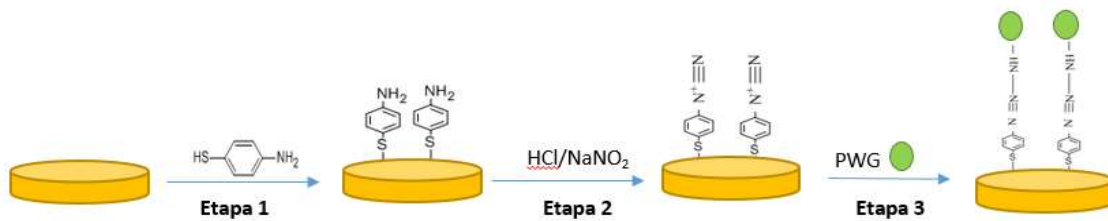


Figura 14: Esquema de la inmovilización de la proteína

Finalmente se mide la impedancia del electrodo, y como se puede ver en la figura 15, esta ha aumentado con respecto a la del electrodo de oro limpio y a la monocapa de tianina, lo que indica que la proteína se ha unido, obteniéndose un valor promedio de $\theta = 0.98 \pm 0.02$.

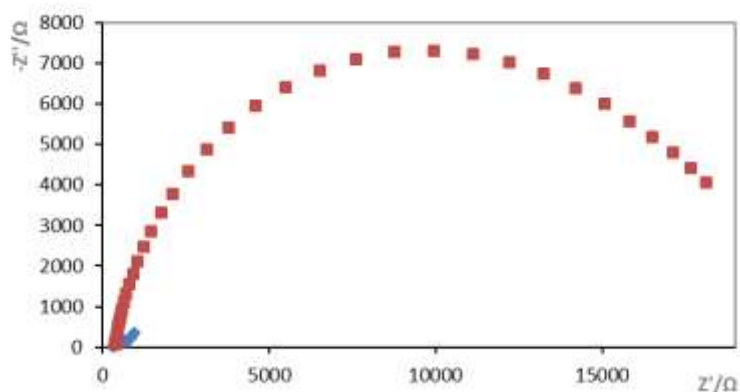


Figura 15: Espectro de impedancias para el oro limpio (azul) y tras la inmovilización de la proteína (rojo)

La interacción de esta superficie con una disolución de aptámero 100 nM durante 30 min da lugar a un aumento del valor de R_{et} (36 ± 2 % de aumento) que indica la unión del aptámero a la proteína. Esta unión es específica ya que la interacción de la superficie con una

librería de ADN de secuencias aleatorias da lugar solo a un 2% de aumento que puede ser debido a la variabilidad que presentan las medidas de impedancias.

4.3.- Caracterización de la interacción heterogénea proteína aptámero.

Una vez seleccionado un método para inmovilizar la gliadina en una conformación adecuada para su reconocimiento por el aptámero, se procedió a evaluar si esta inmovilización altera las características de afinidad de enlace con respecto a las obtenidas para la misma interacción en disolución. Con el objetivo de obtener la constante de afinidad para esta interacción se hizo reaccionar la superficie modificada con gliadina con cantidades crecientes del aptámero Gli4-biotina, en el intervalo de concentraciones entre 10 y 100 nM. Se comienza con una concentración pequeña y se va aumentando, todas ellas sobre el mismo electrodo. El tiempo de interacción es de 1 hora para la concentración de 10 nM y de 30 minutos para el resto. Tras cada interacción se lava el electrodo introduciéndolo en una disolución de KCl durante 2 minutos y se mide la impedancia del electrodo.

La resistencia a la transferencia electrónica aumenta cuando se hace interaccionar la proteína con el aptámero, y el aumento es mayor a medida que se aumenta la concentración del aptámero. Este aumento indica que el aptámero se une a la proteína.

La cantidad de complejo formado se mide mediante el incremento de la resistencia a la transferencia electrónica. El % de enlace se calculó mediante la ecuación 9:

$$\%B = \frac{R_{TE(m)} - R_{TE(p)}}{R_{TE(p)}} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde $R_{TE(m)}$ es la resistencia a la transferencia electrónica de la medida y $R_{TE(P)}$ la resistencia a la transferencia electrónica del electrodo modificado con la proteína en su superficie. La representación del %B frente a la concentración de aptámero permite obtener la curva de enlace que se muestra en la figura 16.

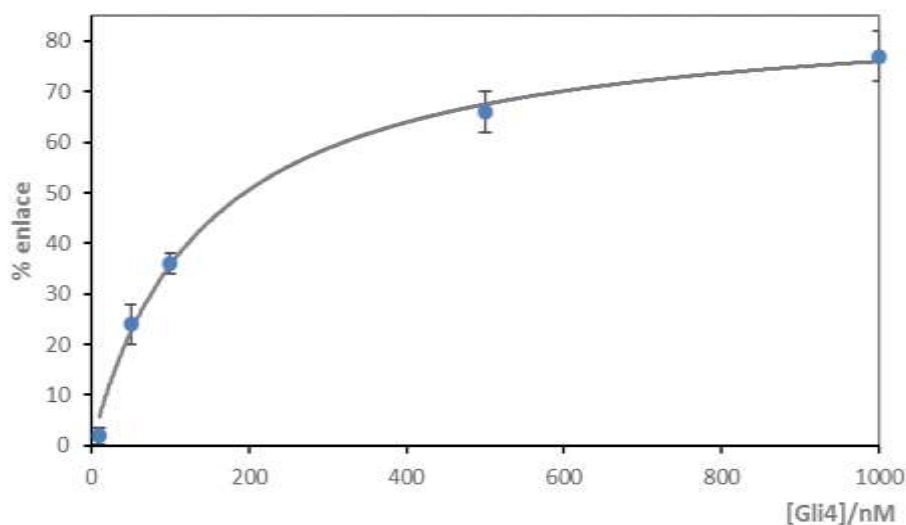


Figura 16: Curva de enlace obtenida mediante el modelo de Langmuir para la interacción homogénea gliadina-PWG – aptámero-biotina

Estos datos se ajustaron a la isoterma de Langmuir y al modelo de Hill para obtener la constante de disociación, empleando el programa Origin Pro 8.6. En la tabla 4 se muestran las características de ambos ajustes.

Tabla 4: Ajuste a los modelos de Langmuir y de Hill para la interacción heterogénea

| | Ecuación | Coefficiente de correlación (r) |
|-----------------|--|---------------------------------|
| Langmuir | $\%enlace = \frac{(87 \pm 4) \cdot [Gli4]/nM}{(145 \pm 20) + [Gli4]/nM}$ | 0.9930 |
| Hill | $\%enlace = \frac{(85 \pm 9) \cdot ([Gli4]/nM)^{(1.1 \pm 0.3)}}{(177 \pm 50) + [Gli4]/nM^{(1.1 \pm 0.3)}}$ | 0.9900 |

En este caso se obtiene un mejor ajuste para el modelo de Langmuir, a partir del cual se obtiene un valor de $K_D = 145 \pm 20$ nM. Este valor es unas 350 veces superior al que se obtiene para la interacción en disolución. Esta disminución de la afinidad puede deberse a efectos de superficie o cambios conformacionales de la proteína producidos como consecuencia de la inmovilización. La afinidad de enlace obtenida es del mismo orden que la que se obtiene para el reconocimiento por el aptámero Gli4-modificado con fluoresceína de la gliadina PWG

inmovilizada por adsorción sobre placas de poliestireno, y ligeramente inferior al que se obtiene con el mismo aptámero para el reconocimiento del péptido 33-mer (diana utilizada en el proceso de selección de los aptámeros) inmovilizado sobre partículas magnéticas. ^[32]

Estos resultados abren la posibilidad de diseñar un sensor químico sobre sustratos de oro, en el que se inmovilice la proteína tal y como se ha descrito, fijando a continuación el aptámero mediante interacción de afinidad. La combinación de esta fase sensora con un formato de ensayo por desplazamiento y medidas de espectroscopía de impedancia faradaica podría constituir una alternativa más simple al aptaensayo genomagnético con detección electroquímica desarrollado para la medida de gluten en alimentos. ^[31]

5.-Conclusiones

Como resultado de este trabajo de investigación, en el que se ha estudiado el efecto que la inmovilización de gliadina sobre diferentes superficies conductoras tiene sobre las propiedades de reconocimiento de un aptámero seleccionado para reconocer un fragmento peptídico contenido en la proteína, se concluye:

1. La interacción entre la proteína completa y el aptámero biotinilado en disolución se puede caracterizar mediante separación de la fracción de aptámero no enlazada por filtración, seguido de su cuantificación mediante un ensayo genomagnético con detección electroquímica. Se obtiene así un valor de $K_D = 0.41 \pm 0.08$ nM.
2. El método utilizado para inmovilizar la proteína sobre sustratos conductores afecta de manera importante a las propiedades de reconocimiento del aptámero. La inmovilización covalente sobre monocapas autoensambladas de tioanilina en oro, a través de enlaces azo, mantiene la proteína en una conformación adecuada para dicho reconocimiento selectivo.
3. La constante de afinidad para la interacción entre la proteína inmovilizada y el aptámero biotinilado, obtenida a partir de medidas de espectroscopía de impedancia faradaica, es 145 ± 20 nM. Esta constante de afinidad podría mejorarse con una modificación post-SELEX que permitiese obtener un aptámero multivalente.

6.-Bibliografía

- [1] www.celiacos.org (Página oficial de la Federación de Asociaciones de Celiacos de España, FACE) (último acceso el 08-07-2016).
- [2] A. Rostom, J.A. Murray, M.F. Kagnoff, *Gastroenterology*, 131 (2006), 1981-2002.
- [3] P. Koehler, H. Wieser, K. Konitzer, *Celiac Disease and Gluten: multidisciplinary challenges and opportunities*, Elsevier, USA (2014), 1-96.
- [4] N. Gujral, H.J. Freeman, A.B.R. Thomson, *World Journal of Gastroenterology*, 18 (2012), 6036-6059.
- [5] P.H.R. Green, *Gastroenterology*, 128 (2005), S74-S78.
- [6] M. Soler, M.C. Estevez, M.L. Moreno, A. Cebolla, L.M. Lechuga, *Biosensors and Bioelectronics*, 79 (2016), 158-164.
- [7] A. Sapone, J.C. Bai, C. Ciacci, J. Dolinsek, P.H. Green, M. Hadjivassiliou, K. Kaukinen, K. Rostami, D.S. Sanders, M. Schumann, R. Ullrich, D. Villaltam, U. Volta, C. Catassi, A. Fasano, *BMC Medicine*, 2012,10,13, doi: 10.1186/1741-7015-10-13.
- [8] Legislación Europea sobre el Gluten, www.eur-lex.europa.eu (último acceso 07-07-2016).
- [9] T.B. Osborne, *The vegetable proteins. Monographs on Biochemistry*, Longmans, Green and Co, Londres (1916)
- [10] CODEX STANDARD FOR FOODS FOR SPECIAL DIETARY USE FOR PERSONS INTOLERANT TO GLUTEN, 1979.
- [11] H. Wieser, *Food Microbiology*, 24 (2007), 115-119.
- [12] P.R. Shewry, A.S. Tatham, *Biochemical Journal*, 267 (1990), 1-12.
- [13] P.R. Shewry, B.J. Mifflin, D.D. Kasarda, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 304 (1984), 297-308.
- [14] L.M. Sollid, C. Khosla, *J. Inter. Med.*, 269 (2011), 269.
- [15] R.P. Anderson, P. Degano, A.J. Godkin, D.P. Jewell, A.V.S. Hill, *Nature Medicine*, 6 (2000), 337-342.

- [16] J.A. Tye-Din, J.A. Stewart, J.A. Dromey, T. Beissbarth, D.A. van Hell, A. Tatham, K. Henderson, S.I. Mannering, C. Gianfrani, D.P. Jewell, A.V.S. Hill, J. McCluskey, J. Rossjohn, R.P. Anderson, *Science Translational Medicine*, 2 (2010), 41-51.
- [17] L. Shan, Ø. Molberg, I. Parrot, F. Hausch, F. Filiz, G.M. Gray, L.M. Sollid, C. Khosla, *Science*, 297 (2002), 2275-2279.
- [18] www.wgpat.com (Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity) (último acceso el 09-07-2016)
- [19] R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, *Biosensors*, 2016, 6,16, doi: 10.3390 / bios 6020016.
- [20] www.aecosan.msssi.gob.es, Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con la enfermedad celíaca y los problemas que plantean las técnicas analíticas para el control del contenido de gluten en los alimentos, *AESAN-2010-003*, 2010. (último acceso el 08-07-2016).
- [21] J.A. Sealey-Voyksner, K. C., R.D. Voyksner, Jorgenson J.W., *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010), 4167-4183.
- [22] B. Morón, C. Lopez , M.T. Bethune, I. Comino, H. Manyani, M. Ferragud, M.A. Cebolla, C. Khosla, C. Sousa, *PLOS One*, 3 (2008), e2294, doi: 10.1371 / journal.pone.0002294.
- [23] S. Haas-Lauterbach, U. Immer, M. Richter, P. Koehler, *Journal of AOAC International.*, 95 (2012), 95.
- [24] B. Martín-Fernández; A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, G. Frutos-Cabanillas, N. de-los-Santos-Álvarez, B. López-Ruiz, *Biosensors and Bioelectronics*, 60 (2014),244-251.
- [25] B. Martín-Fernández; A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, G. Frutos-Cabanillas, N. de-los-Santos-Álvarez, B. López-Ruiz, *Talanta*, 146 (2016), 490-495.
- [26] C. Diaz-Amigo, B. Popping, *Journal of AOAC International*, 61 (2013), 337-348.
- [27] V.A. Spiridonova, *Biomedical Chemistry*, 4 (2010), 138-149.
- [28] C. Tuerk, L. Gold, *Science*, 249 (1990), 505-510.
- [29] A.D. Ellington, J.W. Szostak, *Nature*, 346 (1990), 818-822.

- [30] M. Mascini, *Aptamers in Bioanalysis*, Wiley, Italia (2009), 32-36.
- [31] R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J.- Lobo-Castañón, Aptamers as Synthetic receptors for food quality and safety control en “*Biosensors for sustainable food: new opportunities and technical challenges*”. Eds. V. Scognamiglio, G. Rea, F. Aduini, G. Palleschi, Elsevier, 2016.
- [32] S. Amaya-González, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J.- Lobo-Castañón, *Analytical Chemistry*, 86 (2014), 2733-2739.
- [33] S. Amaya-González, L. López-López, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J.- Lobo-Castañón, *Analytica Chimica Acta*, 873 (2015), 63-70.
- [34] T.M. Nahir, E.F. Bowden, *Electrochimica Acta*, 39 (1994) ,2347-2352.
- [35] R. K. Shervedani, A.H. Mehrjardi, N. Zamiri, *Bioelectrochemistry*, 69 (2006), 201-208.
- [36] J.I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Martínez-Alonso, J.M.D. Tascón, *Langmuir*, 24 (2008), 10560-10564.
- [37] S. Hajhosseini, N. Nasirizadeh, M. S. Hejazi, P. Yaghmaei, *Materials science & engineering*, 61 (2016), 506-515
- [38] H-L. Guo, X-F, Wang, Q-Y. Qian, F-B. Wang, X-H. Xia, *Acsnano*, 3 (2009), 2653-2659.
- [39] R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, *Journal of American Chemical Society*, 123 (2001), 3838-3839.
- [40] S. Mahouche-Chergui, S. Gam-Derouich, C. Mangeney, M. M. Chehimi, *Chemical Society Reviews*, 40 (2011), 4143-4166.