

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Trabajo Fin de Máster

TÍTULO:

**Optimización de un inmunosensor electroquímico
para la detección de cáncer de próstata**

AUTOR:

Gabriel Álvarez Menéndez

TUTOR/A:

María Begoña González García

FECHA:

Julio 2012, Oviedo

M^a Begoña González García, Profesor Ayudante Doctor-Lou de Química Física y Analítica, adscrita al Departamento de Química-Física y Analítica de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “Optimización de un inmunosensor electroquímico para la detección de cáncer de próstata” ha sido realizado por Gabriel Álvarez Menéndez en el Departamento de Química-Física de la Universidad de Oviedo, bajo su dirección constituyendo el Proyecto Fin de Máster del interesado, cuya presentación autorizo.

Oviedo, Julio de 2012

M^a Begoña González García

ÍNDICE

Nº pág.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PSA.....	2
1.2. ELECTRODOS SERIGRAFIADOS.....	9
1.3. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	12
1.3.1. Ventajas de la nanoestructuración.....	12
1.4. REFERENCIAS.....	14
1.5. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	17
2. EQUIPOS, MATERIAL Y REACTIVOS.....	19
2.1. INSTRUMENTACIÓN.....	20
2.2. MATERIAL.....	22
2.3. REACTIVOS.....	23
3. EXPERIMENTAL.....	26
3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE BLOQUEO.....	27
3.2. DISMINUCIÓN DEL TIEMPO DE ANÁLISIS.....	35
3.3. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS PROPIOS.....	39
3.3.1. Introducción de los anticuerpos seleccionados en la construcción del sensor y respuesta de éste.....	43
4. CONCLUSIONES Y FUTURO PRÓXIMO DEL SENSOR.....	48
4.1. CONCLUSIONES.....	49
4.2. FUTURO PRÓXIMO DEL SENSOR.....	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PSA

El cáncer de próstata es el segundo cáncer más común en los hombres, después del cáncer de piel, y la segunda causa principal de muerte por cáncer en los hombres, después del cáncer de pulmón. Esto se debe a que los síntomas aparecen tardíamente cuando la enfermedad está muy avanzada y no existe una terapia eficaz una vez que se ha producido la metástasis. Como ocurre en muchos tipos de cáncer, la detección y tratamiento temprano aumenta las perspectivas de curación y es fundamental. Por tanto es importante detectar el carcinoma en sus primeras etapas de desarrollo.

La glucoproteína PSA (Prostate Specific Antigen) no es un marcador específico del carcinoma pero sí del tejido prostático, por lo que un aumento de tamaño de la glándula de la próstata trae consigo un aumento de niveles de PSA en suero y sangre, ya que el tejido cancerígeno produce diez veces más PSA que el tejido sano.

Desde su introducción en la década de 1980, el antígeno prostático específico (PSA), es el marcador más ampliamente usado para la detección de este cáncer. Sin embargo, la especificidad de esta determinación es baja, ya que pacientes con diagnósticos no cancerosos (enfermedad prostática benigna) pueden tener también PSA elevado. Las afecciones benignas más comunes de la próstata son la prostatitis (inflamación de la próstata) y la hiperplasia benigna de la próstata (benign prostatic hyperplasia, BPH) (agrandamiento de la próstata).

Se han estudiado diversas estrategias para tratar de mejorar la especificidad en la determinación de PSA total, como usar rangos de referencia ajustados por edad, densidad de PSA, zona transicional de densidad de PSA y velocidad de PSA. Sin embargo, ninguno de estos parámetros tuvieron amplia aceptación en la práctica clínica de rutina. Recientemente, el descubrimiento de diferentes isoformas de PSA ha generado gran interés.

El PSA se encuentra en el suero en dos formas principales: complejado y libre. La mayor parte del PSA en el suero está unido a inhibidores de proteasas, más

comúnmente a α -1-antitripsina (ACT) siendo pequeña la proporción de PSA libre (fPSA).

Se ha sugerido que, como la proporción del PSA complejo es mayor en pacientes con cáncer prostático que en pacientes con enfermedad prostática benigna, las medidas de PSA libre y PSA total proveerían una determinación más específica que sólo las medidas de PSA total.

Existen tres intervalos de concentraciones de PSA total (tPSA) con diferentes riesgos a la hora de establecer la probabilidad de que un paciente tenga cáncer de próstata y la necesidad de una biopsia de próstata para confirmarlo¹.

- Concentración de tPSA menor de 4 ng/mL. Por debajo de esta concentración de tPSA se asume que el riesgo de cáncer de próstata es muy bajo. Sin embargo, recientes estudios realizados en Estados Unidos muestran que el 22% de los hombres con una concentración en el intervalo 2,6-4 ng/mL tienen un cáncer de próstata encubierto, la mayoría de los cuales lo tienen localizado en la próstata y, por tanto, curable². Estos datos han sido confirmados también por estudios realizados en Europa³. Basándose en estos estudios y en otros se ha sugerido que la concentración de tPSA se baje a 2,5 ng/mL.
- Concentración de tPSA comprendida entre 4 y 10 ng/mL. A este intervalo de concentraciones se le suele llamar zona gris de diagnóstico, debido a que este único dato no da suficiente información de si se trata de un aumento de concentración debido a un cáncer de próstata o a otra patología no cancerosa como las ya mencionadas BPH o prostatitis. Como ya se ha comentado anteriormente una manera de diferenciar el cáncer de próstata de las patologías no cancerosas se basa en la proporción de fPSA/tPSA (relación entre PSA libre y total), pues en el cáncer de próstata esta relación es significativamente menor que en el caso de prostatitis o BPH^{4,5}. Varios estudios realizados por distintos centros y con una muestra de población importante establecieron que un porcentaje de PSA libre menor o igual al

25% en suero permite detectar el 95 % de los casos de cáncer con una reducción del 20 % de las biopsias cuando la concentración de tPSA se encuentra en la zona gris⁶.

- Concentración de tPSA mayor de 10 ng/mL. En este caso el porcentaje de pacientes que pueden tener un cáncer de próstata se eleva al 70% cuando el contenido supera los 20 ng/mL de tPSA⁷. En estos casos es recomendable llevar a cabo una biopsia de próstata para confirmar el diagnóstico.

En conclusión es necesario detectar tanto la tPSA como la fPSA sobre todo en pacientes donde la concentración de tPSA se encuentre en la zona gris de diagnóstico⁸.

En función del tipo de molécula de PSA que se desee detectar, se pueden construir inmunosensores electroquímicos específicos, sólo es necesario inmovilizar en la superficie del electrodo el anticuerpo monoclonal adecuado. En el caso de que se pretenda detectar fPSA se elegiría un monoclonal dirigido hacia el epítipo que ocultaría la ACT (anticuerpo verde). En el caso de que se pretenda determinar tPSA, se inmovilizaría un anticuerpo dirigido contra unos epítipos comunes (anticuerpo azul y negro). También cabría el caso de detectar las PSA-ACT eligiendo un monoclonal dirigidos contra epítipos de la ACT (anticuerpo rojo).

La disponibilidad de estos anticuerpos monoclonales permite construir distintos modelos de inmunosensores tanto para la detección de PSA libre como asociado a ACT.

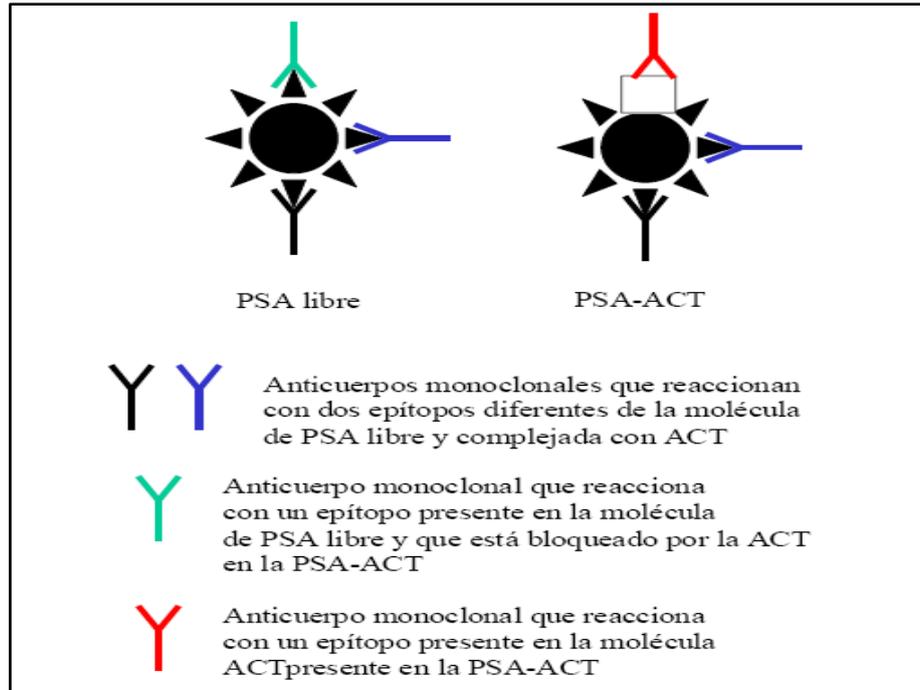


Figura 1.1. Esquema de los distintos anticuerpos de la molécula de PSA.

Existen muchas metodologías para la detección de PSA, de las cuales, la gran mayoría son inmunosensores.

Han sido publicados un gran número de inmunosensores diseñados para la detección de PSA que se basan en modos de transducción óptica (fluorescencia, láser)^{9,10,11}, electroquímica^{12,13,14,15} y piezoeléctrica^{16,17}.

A continuación, se muestra un esquema del formato del inmunosensor que se ha desarrollado en este trabajo así como la metodología analítica utilizada.

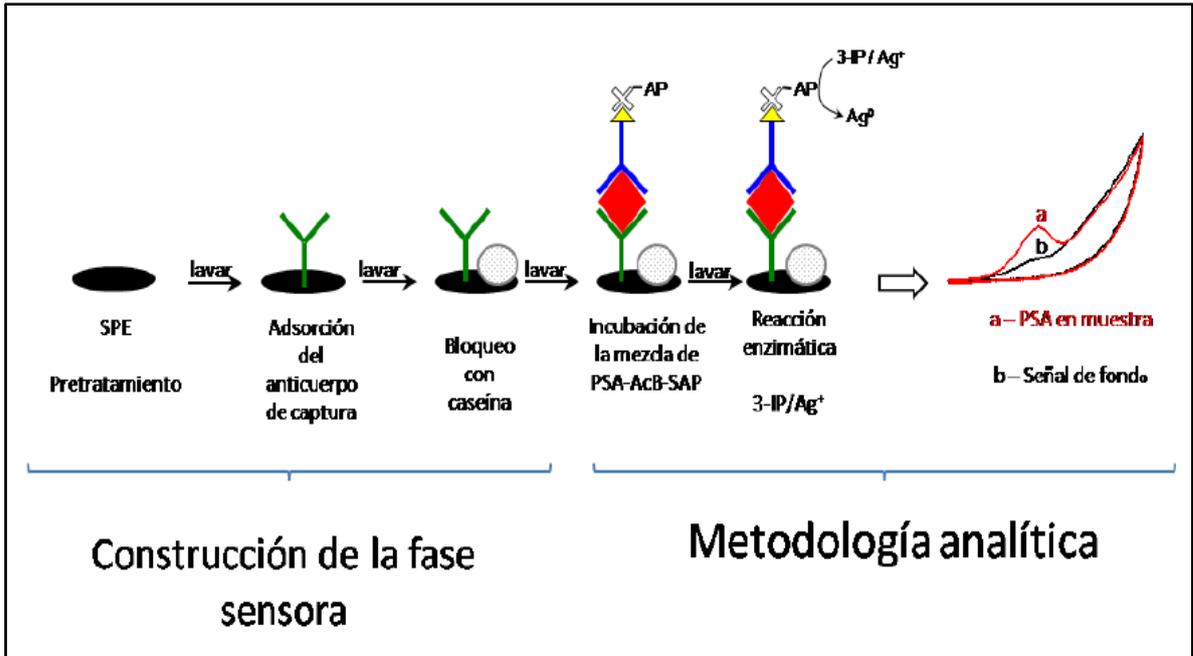


Figura 1.2. Esquema inmunosensor desarrollado para la detección de PSA.

Existen numerosos inmunoensayos comerciales para la detección de PSA total para uso clínico, por ejemplo el ensayo de Elecsys de Roche (ver figura 1.3.), IMX, Architect i2000, Architect i2000SR, AxSYM de Abbott o Inmulite de Diagnostic Products Corporation, que son sistemas automáticos, implantados en laboratorios rutinarios de análisis clínico¹⁸.



Figura 1.3. Elecsys de Roche

Sin embargo, recientemente se ha puesto bastante énfasis en el desarrollo de sistemas point-of-care (POC) que resultan adecuados para la detección de PSA. Este tipo de sensores se basan en inmunoensayos o ensayos enzimáticos.

Se trata de sistemas de un solo uso ya que presentan altas constantes de afinidad de la interacción entre el antígeno y el anticuerpo. A pesar de la gran selectividad y sensibilidad de los inmunosensores, su falta de estabilidad, su limitada reproducibilidad y la necesidad de adicionar reactivos externos, limitan su aplicación comercial.

Esta limitación a la hora de encontrar aplicaciones comerciales, marca el objetivo fundamental del presente trabajo, el cual consiste en el desarrollo del biosensor inmunoelectroquímico para la cuantificación de PSA en sueros con unos niveles de estabilidad y reproducibilidad aceptables para su posterior comercialización.

Cabe destacar que han sido desarrollados tests basados en membranas inmunocromatográficas, también conocidos como tests de inmunostrip, con detección de capacitancia, colorimétrica o electroquímica^{19,20,21,22}, en un esfuerzo de proporcionar una alternativa para el POC en la determinación clínica de PSA. La gran ventaja de los tests de inmunostrip es su bajo coste, naturaleza robusta y la facilidad de uso. Aunque hay algunos tests comerciales de inmunostrip para la detección de PSA (Biosign, Chembio, Medpro), la gran desventaja de los mecanismos de inmunostrip es en general, su naturaleza semicuantitativa y la falta de sensibilidad.

Una alternativa para el análisis en POC son los biosensores construidos sobre electrodos serigrafiados. Un buen ejemplo, lo constituyen los sensores de glucosa desechables. Los electrodos serigrafiados son herramientas muy adecuadas para el desarrollo de biosensores. La tecnología de fabricación de serigrafiados está hoy en día, bien establecida para la producción de transductores electroquímicos de capa gruesa. Esta tecnología permite la producción en masa de electrodos reproducibles, mecánicamente robustos y a un bajo coste. Otra importante característica que presentan estos electrodos, está relacionada con la miniaturización del sistema analítico y es la facilidad de manejo y manipulación, así como la posibilidad de desarrollar metodologías sensibles y cuantitativas. Sarkar et al. desarrollaron el primer

inmunosensor para la detección de PSA utilizando electrodos serigrafiados usando un electrodo de trabajo de carbono, y detección amperométrica¹².

La mayoría de los inmunosensores para la determinación de PSA son monoanalito, es decir, o se detecta la PSA total o se detecta la libre. No se han encontrado hasta la fecha ningún dispositivo que determine los dos tipos de PSA simultáneamente.

1.2. ELECTRODOS SERIGRAFIADOS

Entre los diferentes tipos de electrodos empleados para construir biosensores electroquímicos, las características que presentan los electrodos de carbono serigrafiado o Screen-Printed Carbon Electrodes (SPCEs) han suscitado un interés especial. Cualidades como sencillez y bajo coste de producción, flexibilidad de diseño, reducidas dimensiones y posibilidad de incorporación a sistemas portátiles, así como sus buenas características electroanalíticas (especialmente su reproducibilidad) han hecho que los SPCEs se hayan ido incorporando progresivamente a sistemas de análisis rutinarios medioambientales y clínicos²³.

A principios de la década de los 90, varios grupos de investigación propusieron el uso de la tecnología thick-film (o capa gruesa) como una posible solución a la falta de comercialización de los sensores químicos y bioquímicos diseñados, hasta la fecha, sobre electrodos convencionales.

La tecnología screen-printed es la más utilizada para la producción de estos electrodos, ya que permite la obtención de electrodos sólidos planos, mecánicamente robustos y de una gran versatilidad. Ligeras modificaciones en el proceso de fabricación de los mismos, así como la posibilidad de emplear materiales muy variados, han provocado la aparición de multitud de aplicaciones analíticas en campos muy diferentes.

Los electrodos de carbono son especialmente atractivos para la construcción de sensores electroquímicos: son en gran medida químicamente inertes y dan lugar a un amplio intervalo de potenciales de trabajo con una baja resistividad eléctrica. Además, tienen una estructura cristalina que genera bajas corrientes residuales y una alta relación señal-ruido, por lo que la fabricación de SPCEs realizados con pasta de carbono resulta muy interesante. La principal ventaja de estos electrodos es que debido a su pequeño tamaño, facilidad de modificación y de uso se pueden llevar a cabo determinaciones “in situ” con pequeños volúmenes de muestra ya que no se necesitan celdas electroquímicas convencionales.

Dentro del análisis clínico, y concretamente en el área de análisis inmunoelectroquímico, los SPCEs presentan algunas ventajas adicionales como el uso de pequeños volúmenes de muestra y la posibilidad de desarrollar inmunosensores desechables por su bajo coste. Sin embargo el material con el que se elaboran los SPCEs presenta ciertas limitaciones para la construcción de inmunosensores. El carbono presenta cualidades excepcionales como material electródico, pero es relativamente inerte y difícil de modificar químicamente. Como consecuencia la capacidad de los SPCEs para retener material proteico es muy baja. Para potenciar esta retención es necesaria una modificación de la superficie electródica mediante pretratamientos drásticos, lo cual puede suponer pérdidas en las propiedades analíticas del método (especialmente en la sencillez y reproducibilidad)²⁴.

Por otra parte, el oro es otro material usado frecuentemente en la construcción de inmunosensores electroquímicos. Como electrodo, el oro tiene peores cualidades que el carbono pero no carece totalmente de reactividad química. Una reacción especialmente interesante es la que tiene lugar cuando el oro se expone a grupos tioles (RSH) y disulfuros (RSSR'). En esta reacción, la ruptura homolítica de enlaces S-H o S-S conlleva la formación de monocapas autoensambladas (SAMs). Dependiendo de los tioles o disulfuros empleados, el oro puede ser modificado sencillamente para que presente diferentes grupos funcionales, pudiendo alcanzarse una alta densidad de funcionalización superficial. Esto amplía las posibilidades para hacer otras modificaciones mediante reacciones químicas convencionales²⁵. Además, los restos cisteína y cistina del material proteico permiten su quimisorción directa a superficies de oro, lo cual resulta de gran interés en la construcción de inmunosensores²⁶.

Debido a la espontaneidad de estas reacciones, el sistema tiende a maximizar el número de interacciones entre oro y material proteico. Por tanto, además de la reactividad química también es muy importante la estructura superficial que presenta el oro. El empleo de superficies continuas de oro tiene el inconveniente de que se establecen un número elevado de interacciones, lo cual puede implicar una orientación poco selectiva y cambios drásticos en la estructura del material proteico quimisorbido. Como consecuencia, la actividad biológica de los anticuerpos puede verse alterada y la eficacia de los inmunosensores puede ser baja. Una posible solución a este problema

sería el empleo de nanoestructuras de oro porque mantienen las mismas propiedades químicas de reactividad pero ofrecen una mayor biocompatibilidad. Esto se debe a que al reducir las dimensiones del oro también se minimizan las interacciones con el material proteico, permitiendo una quimisorción con menor influencia en la estructura del material proteico^{27,28,29,30}.

Por tanto, es fácil comprender que resultaría interesante disponer simultáneamente de las cualidades electrónicas de los SPCEs y las propiedades químicas del oro (especialmente cuando es nanoestructurado) para la construcción de inmunosensores electroquímicos.

1.3. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Las nanopartículas son clusters de unos 100 a 1000 átomos, pero con unas dimensiones de sólo unos pocos nanómetros. Constituyen un tipo de materiales intermedios entre las moléculas y los sólidos macroscópicos. Sus propiedades físicas dependen de su tamaño, lo cual abre la posibilidad de fabricar materiales con propiedades físicas elegidas casi a la carta, mediante el control de su tamaño, forma u organización en estructuras bi o tridimensionales.

El oro como material, posee unas características que lo hacen ideal para un amplio rango de aplicaciones, tales como su nobleza y su resistencia a la oxidación superficial. Además las propiedades ópticas del oro a escala nanométrica también son importantes, ya que las nanopartículas de oro presentan un color que va del rojo al púrpura dependiendo de su tamaño, propiedad que puede ser explotada en la aplicación a sensores ópticos.

Aunque existen varios métodos para modificar las superficies electródicas con oro de dimensiones nanométricas^{31,32,33,34,35,36}, la que mejor resultado ha dado en nuestro grupo de investigación ha sido la generación “in situ” de nanopartículas de oro en la superficie del electrodo mediante la aplicación de una intensidad de corriente constante durante un tiempo tras lo que se mantiene el electrodo a un potencial constante cercano a 0V durante un corto periodo de tiempo^{37,38,39}. De esta forma, se electrodeposita oro (en estado “nativo”, es decir, puro) en la superficie del electrodo a partir de una disolución ácida de tetracloruro de oro (III). Dependiendo de la intensidad de corriente aplicada, tiempo de electrodeposición y concentración de oro, el tamaño de las partículas y la dispersión de las mismas en la superficie del electrodo es diferente.

1.3.1. Ventajas de la nanoestructuración

El uso de nanoestructuras puede mejorar importantes ventajas respecto a los modelos clásicos; por ejemplo, la sensibilidad puede aumentar debido a unas mejores

propiedades de conducción, los límites de detección pueden ser menores, pueden emplearse menores cantidades de muestra para el análisis, la detección directa es posible sin el uso de marcas, y puede suprimirse el uso de algunos reactivos.

Además, muchas propiedades de las nanopartículas son útiles para aplicaciones en sensores y biosensores electroquímicos, pero lo más importante es que debido a la alta proporción de átomos superficiales con valencias libres respecto a los átomos totales, da lugar a una mayor actividad catalítica del material nanoestructurado en reacciones electroquímicas. Estas propiedades catalíticas de las nanopartículas, pueden disminuir los sobrepotenciales de las reacciones electroquímicas, o incluso dar lugar a la reversibilidad de algunos procesos que son irreversibles con los electrodos metálicos⁴⁰. La actividad catalítica de estos electrodos depende en gran medida del tamaño de partícula empleado en cada caso⁴¹.

Finalmente las nanopartículas estables, pueden sustituir el uso de marcas para amplificar la señal de limitada estabilidad, como enzimas y liposomas, con una sensibilidad equivalente o incluso mejor.

1.4. REFERENCIAS

1. W.J. Catalona., Ds. Smith., T.L. Ratliff., et al., *N. Engl. J. Med.*, 324(17), (1991), 1156-1161.
2. W.J. Catalona, Ds. Smith, D.K. Ornstein, *JAMA*, 277(18), (1997), 1452-1455.
3. F.H. Schroder, I. van der Crujisen-Koetar, H.J. de Kaning, A.N. Vis, R.F. Hoedemaeker, R. Kranse, *J. Urol.*, 163(3), (2000), 806-812.
4. U.H. Stenman, J. Leivonen, H. Alfthan, S. Rannikko, K. Tuhkanen, O. Allthan, *Cancer Res.*, 51(1), (1991), 222-226.
5. L. Nogueira, E. Ferreira Faria, L. Oliveira Reis, R. Borges dos Reis, R. Dias Machado, C. Freitas, W. Magnabosco, G. Franco Carvalhal, M. Tobías Machado, *The Journal of Urology*, 185(4), (2011) e397.
6. W.J. Catalona, A.W. Partin, K.M. Slwain, et al., *JAMA*, 279(1), (1998), 1542-1547.
7. W.J. Catalona., D.S. Smith., T.L. Ratliff., J.W. Basle.r, *JAMA*, 270(8), (1993), 948-954.
8. J. Catalona Wiliam, W. Partin Alan, G. Sanda Martin, T. Wei John, G. Klee George, H. Bangma Chris, M. Slawin Kevin, S. Marks Leonard, S. Loeb, L. Broyles Dennis, S. Shin Sanghyuk, B. Cruz Amabelle, W. Chan Daniel, J. Sokoll Lori, L. Roberts William, H.N. van Schaik Ron, A. Mizrahi Isaac, *The Journal of Urology*, 185(5) (2011) 1650-1655.
9. O'Neill, P.M., Fletcher, J.E., Stafford, C.G., Daniels, P.B., Bacerese-Hamilton, T. *Sens. Actuators B* (1995), 29, 79.
10. Wu, G., Datar, R.H. ,Hansen, K.M., Thundat, T., Cote, R.J., Majumdar, A., *Nat. Biotech.* 19, 856–860.
11. X. Wang, M, Zhao, D. Nolte David, L. Ratliff Timothy, *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5) (2011) 1871-1875.
12. Sarkar, P., Pal, P.S., Ghosh, D., Setford, S.J., Tothill, I.E., *Int. J. Pharm.* (2002), 238, 1.
13. Nancy V. Panini, Germán A. Messina, Eloy Salinas, Héctor Fernández, Julio Raba *Biosens. Bioelectron.*(2008), 23, 1145.
14. Jun Okunoo, Kenzo Maehashia, Kagan Kermanb, Yuzuru Takamurab, Kazuhiko Matsumotoa, Eiichi Tamiya *Biosens. Bioelectron.* (2007), 22, 2377.
15. Liu, Y. *Thin Solid Films* (2008), 516(8), 1803.
16. J.H., Hwang, K.S., Park, J., Yoon, K.H., Yoon, D.S., Kim, T.S. *Biosens. Bioelectron.* (2005), 20, 2157.
17. BoZhang, XueZhang, Hui-huiYan, Shi-junXu, Dai-hua Tang, Wei-ling Fu *Biosens. Bioelectron.* (2007), 23, 19.

18. Declan A Healy, Conor J. Hayes, Paul Leonard, Louise McKenna, Richard O'Kennedy, *Trends in Biotechnology* (2007), 25(3), 125.
19. Fernández-Sánchez, C., McNeil, C.J., Rawson, K., Nilsson, O. *Anal.Chem.* (2004), 76, 5649.
20. Fernández-Sánchez, C., Gallardo-Soto, A.M., Rawson, K., Nilsson, O., McNeil, C.J. *Electrochem. Commun.* (2004), 6, 138.
21. Fernández-Sánchez, C.; McNeil, C.; Rawson, K.; Nilsson, O.; Leung, H.; Gaanapragasam, V. *J. Immunol. Methods* (2005), 307, 1.
22. Guodong Liu, Ying-Ying Lin, Jun Wang, Hong Wu, Chien M. Wai, Yuehe Lin, *Anal. Chem.* (2007), 79, 7644.
23. H. Ju et al, *Anal. Lett.*, 37(5), (2004), 789-830.
24. A. Costa-García et, al., *Talanta* 65, (2005) 565-573.
25. J.J. Gooding and D.B. Hibbert, *TRAC*, 18(8), (1999), 525-533.
26. M.D. Ward et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 112, (1990), 3239-3241.
27. H. Ju et al., *Anal. Lett.*, 36(1), (2003), 1-19.
28. P. Yáñez-Señedo and J.M. Pingarrón, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382, (2005), 884-886.
29. Y. Bai et al., *Biosens. Bioelectron.*, 19, (2004), 575-582.
30. A.L. Crumbliss et al., *Biosens. Bioelectron.*, 11, (1996), 493-502.
31. H. Ju et al., *Biomaterials* 26, (2005), 6487-6495.
32. S. Liu and H. Ju, *Anal. Biochem.* 307(1), (2002), 110-116.
33. D. Hernández-Santos, M.B. González-García y A. Costa-García, *Electrochim. Acta* 46, (2000), 607-615.
34. M. Campás and I. Katakis, *Anal. Chem.* 84 (11), (2004), 799-807.
35. J.M. Pingarrón et al., *Anal. Chem. Acta* 528, (2005), 1-8.
36. J. Wang and B. Tian, *Anal. Chem.* 65, (1993), 1529-1532.
37. G. Martínez Paredes, M.B. González García, A. Costa García, *Revista (A), Electroanalysis*, 21(3-5), (2009), 379-385
38. G. Martínez Paredes, M.B. González García, A. Costa García, *Revista (A), Electroanalysis*, 21(8), (2009), 925-930.
39. G. Martínez Paredes, M.B. González García, A. Costa García, *Revista (A), Sens. Actuators B-Chem.*, 149, (2010), 329-335.

40. E. Katz, I. Willner and J. Wang, *Electroanalysis*, 16(1-2), (2004), 19-44.

41. M. Haruta, *Catal. Today* 36(1), (1997), 153-166

1.5. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo y mejora de un bisensor electroquímico para la cuantificación de PSA libre y PSA total de forma simultánea en sueros para su posible comercialización. Este sensor seguirá un formato sándwich en una sola etapa, con el fin de disminuir los tiempos de análisis. Los transductores utilizados para el desarrollo y mejora del sensor, son electrodos serigrafiados de carbono nanoestructurados con oro. Dicho sensor ha sido desarrollado durante los últimos años en el grupo de Inmuno electroanálisis del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo dirigido por el catedrático D. Agustín Costa García, así como en la empresa spin-off del Hospital Universitario Central de Asturias, Healthsens S.L. El sensor ha sido publicado en la revista científica “Biosensors and Bioelectronics” (Ref.: V. Escamilla Gómez, D. Hernández Santos, M.B. González García, J.M. Pingarrón Carrazón, A. Costa García, “SIMULTANEOUS DETECTION OF FREE AND TOTAL PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN ON A SCREEN-PRINTED ELECTROCHEMICAL DUAL SENSOR”, *Biosensors and Bioelectronics*, 24(8) (2009) 2678-2683).

Dado que los anticuerpos son uno de los reactivos más importantes en este tipo de dispositivos y la especificidad y afinidad de éstos varía según las diferentes casas comerciales (con el consiguiente riesgo de depender del servicio y suministro de dicha casa comercial), en una de las etapas del trabajo se probarán diferentes anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de hibridomas propios. La especificidad y afinidad de los mismos serán comprobadas previamente mediante ensayos de ELISA.

Otra de las limitaciones más importantes encontradas durante el desarrollo del bisensor son los problemas de reproducibilidad de los blancos por lo que en otra etapa del trabajo se intentará mejorar este aspecto con el uso de distintos reactivos como bloqueantes así como distintos modos de bloqueo.

Tanto la formación de la fase sensora como el resto de la metodología serán modificadas con el fin de simplificar el ensayo y disminuir el tiempo de análisis, aspectos muy importantes en sistemas POC.

Con el fin de alcanzar estos objetivos se realizarán los siguientes estudios:

- Estudio de la eficacia de diferentes tipos de bloqueantes, así como la influencia que tiene en el sensor el tiempo de duración de la etapa de bloqueo.
- Disminución del tiempo de alguna de las etapas involucradas en la construcción del sensor con el fin de disminuir el tiempo de análisis.
- Confirmación de la especificidad y afinidad de los anticuerpos generados a partir de hibridomas propios mediante ensayos ELISA, así como elección de los clones más adecuados para la producción de anticuerpos propios.
- Introducción de los anticuerpos seleccionados en la construcción del sensor y respuesta de éste.

2. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

2.1. INSTRUMENTACIÓN:

En el desarrollo de este trabajo se hizo uso de dos potenciostatos/galvanostatos conectados a un ordenador, uno de ellos el PGSTAT12 controlado mediante software “Autolab GPES” y el otro μ STAT 400 Bipotenciostato suministrado por Dropsens (Oviedo, España) y controlado mediante software “Dropview”. A continuación se muestra una imagen del μ STAT 400 Bipotenciostato:



Figura 2.1. μ STAT 400 Bipotenciostato (Dropsens)

Dos pHmetros, Crison Micro-pH y Sartorius Docu-pHmeter así como dos balanzas analíticas, Mettler Toledo AB54 y Acculab Sartorius Group VIC-303.

Un agitador magnético Velp Scientifica modelo F20520162.

Un Vortex Mixer Velp Scientifica modelo F202A0175.

Los electrodos serigrafiados de carbono utilizados para el desarrollo de este trabajo han sido suministrados por DropSens. Dichos dispositivos se muestran en la siguiente figura:

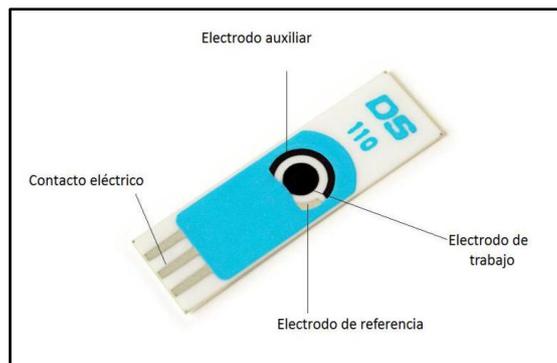


Figura 2.2. Electrodo serigrafiado de carbono DropSens

Los tres electrodos se serigrafían sobre un soporte de alúmina siendo el de trabajo y el auxiliar de pasta de carbono, mientras que el electrodo de referencia es un pseudo-electrodo de referencia de pasta de plata. Alrededor de los tres electrodos se ha fijado un separador aislante circular que delimita perfectamente la celda de trabajo. Las dimensiones del conjunto son aproximadamente 3.4x1.0 cm, siendo el diámetro del electrodo de trabajo de unos 4 mm.

Para la conexión de los electrodos al potenciostato, se utiliza el conector que se muestra en la figura:



Figura 2.3. Conector para electrodos

2.2. MATERIAL:

Para la preparación de alícuotas de reactivos se han empleado tubos Eppendorf desechables de 1.5 mL de base cónica.

Las micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 μL empleadas fueron de Eppendorf y VWR.

Las placas ELISA utilizadas fueron el modelo MICROTTEST 96 (353072) de Becton Dickinson Labware.

Finalmente decir que todo el material de vidrio empleado es de calidad analítica.

2.3. REACTIVOS Y DISOLUCIONES:

- Hidróxido de sodio (Sigma)
- Ácido clorhídrico fumante 37% (Merck)
- Ácido orto-fosfórico 85% (Scharlau)
- Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (Sigma)
- Nitrato de Magnesio (II) (Sigma)

- Disolución reguladora Tris-HCl 0.1M pH 7.2
- Disolución reguladora Tris-HCl 0.1M, 2mM de nitrato de magnesio pH 7.2
- Disolución reguladora Tris-HCl 0.1M, 20mM de nitrato de magnesio pH 9.8

Las disoluciones acuosas han sido preparadas con agua ultrapura (Mili Q plus 185 de Millipore)

- Disolución patrón de AuCl_4^- 10 mM en HCl 2 M. Alícuotas más diluidas se preparan diariamente en HCl 0.1M
- Bloqueantes: suero fetal bovino (FBS), Albúmina (BSA), Caseína, leche en polvo (MP) y gelatina de cola de pescado. Preparados diariamente en reguladora Tris- HNO_3 0.1M pH 7.2.
- Sustrato. Preparado a partir de dos disoluciones, una de nitrato de plata (Merck) y otra de 3-indoxil fosfato (3-IP) (Biosynth) preparadas diariamente en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 20mM de nitrato de magnesio pH 9.8. En la mezcla (que también se prepara a diario) se tiene una concentración 0.4mM de nitrato de plata y 1mM de 3-IP. Cabe destacar que este sustrato enzimático que comprende un compuesto indoxílico y una fuente de plata ha sido patentado por el grupo de Inmunolectroanálisis del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo dirigido por el catedrático D. Agustín Costa García con fecha de concesión: 21/11/08 y N° de Patente: ES2289927.
- Estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (S-AP) preparada diariamente en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 2mM de nitrato de magnesio pH 7.2.

- Kit PSA (CanAg, Fujirebio Diagnostics, INC, Suecia)
 - Anticuerpo anti-PSA total biotilado (Ac-B)
 - Calibradores de PSA libre y total
- Anticuerpo monoclonal anti-PSA PSA66 (PSA total) (CanAg, Fujirebio Diagnostics, INC, Suecia) preparado diariamente en disolución reguladora Tris-HNO₃ 0.1M pH 7.2.
- Anticuerpo monoclonal anti-PSA PSA30 (PSA libre) (CanAg, Fujirebio Diagnostics, INC, Suecia) preparado diariamente en disolución reguladora Tris-HNO₃ 0.1M pH 7.2.

Los anticuerpos son conservados en pequeñas alícuotas (10 μL) en el congelador, y se preparan respectivamente para el trabajo con las disoluciones reguladoras mencionadas anteriormente.

- MES: Ácido (2-N-morfolino)etanosulfúrico (Sigma).
- BIOTIN-LC: Biotina hidrazida 50 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) (Pierce).

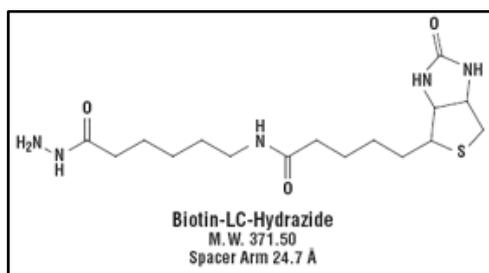


Figura 2.4. Estructura del BIOTIN-LC

- EDC: Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetiaminopropil)carbodiimida 100 mg/mL en MES 0.1M pH 4.7-5.5 (Sigma).

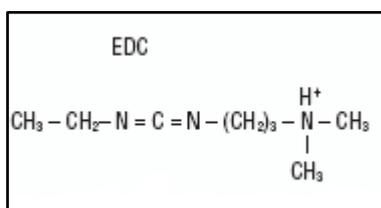


Figura 2.5. Estructura del EDC

- PBS: reguladoras de fosfatos
- Azida sódica (Merck)
- Tween 20 (Sigma)
- Anti-IgG-HRP 1 mg/mL (Invitrogen)
- TMB / H₂O₂: (1:1) (Sigma) (TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina), sustrato líquido preparado para ELISA

3. EXPERIMENTAL

3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE BLOQUEO:

La metodología analítica llevada a cabo para realizar los diferentes estudios de optimización de esta etapa consta de los siguientes pasos:

1. Al SPCE se le añade una gota de 40 μL de una disolución de AuCl_4^- 1mM en HCl 0.1M y se le aplica un potencial de +0.43V durante 5 minutos seguido de otro potencial constante de +0.1V durante 60 segundos.
2. Se lava el electrodo con un chorro de agua del grifo y después con agua Mili-Q.
3. Se deposita una gota de 20 μL de anticuerpo PSA66 (de concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M pH 7.2) sobre la superficie del electrodo de trabajo y se deja toda la noche en nevera a 4°C con humedad constante.
4. Al día siguiente se lava el electrodo con disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M pH 7.2.
5. Se deposita una gota de 40 μL del bloqueante en estudio a una determinada concentración en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M pH 7.2 y se deja durante 20 minutos.
6. Se lava el electrodo con disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 2mM Mg(II) pH 7.2.
7. Se deposita una gota de 40 μL de una mezcla que contiene PSA total de concentración variable (0 y 30 ng/mL o las dos concentraciones según el estudio a realizar), anticuerpo biotinilado a 300 ng/mL y S-AP a $5 \cdot 10^{-10}\text{M}$ en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 2mM Mg(II) pH 7.2 y se deja reaccionar durante una hora.
8. Se lava el electrodo con disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 20mM Mg(II) pH 9.8.
9. Se deposita una gota de 40 μL de una mezcla de AgNO_3 y 3-indoxil fosfato (3-IP) (concentración de plata 0.4 mM y 1mM de 3-IP) en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 20mM Mg(II) pH 9.8 y se deja reaccionar durante 20 minutos.

10. Transcurridos los 20 minutos se lleva a cabo el registro de la señal analítica, haciendo un barrido de potenciales cíclico, desde -0.015 V hasta +0.5 V con una velocidad de barrido de 50 mV/s.

NOTA: cuando el bloqueante se introduce en las reguladoras en lugar de la etapa 5, como modo de bloqueo se utilizan las correspondientes reguladoras preparadas con dicho bloqueante a una concentración determinada para todas las etapas de lavado así como para las distintas diluciones de los reactivos necesarios. También cabe destacar que todas las medidas fueron realizadas por triplicado.

De esta forma se obtiene un pico de oxidación de la plata a un potencial de aproximadamente +0.1V (figura 3.1) que ha sido reducida enzimáticamente en la superficie del electrodo por la fosfatasa alcalina, según la reacción que se muestra en la figura 3.2.

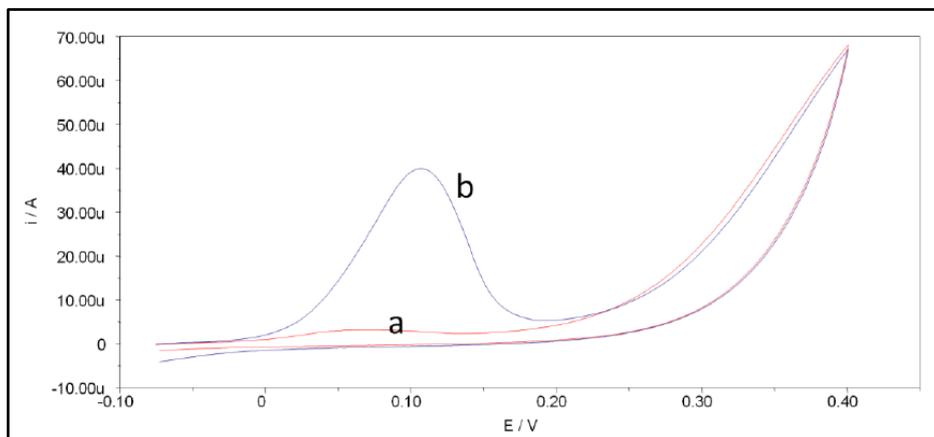


Figura 3.1.1. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para blanco (a) y para una concentración de 7 ng/ml de PSA total (b). Velocidad de barrido 50 mV/s

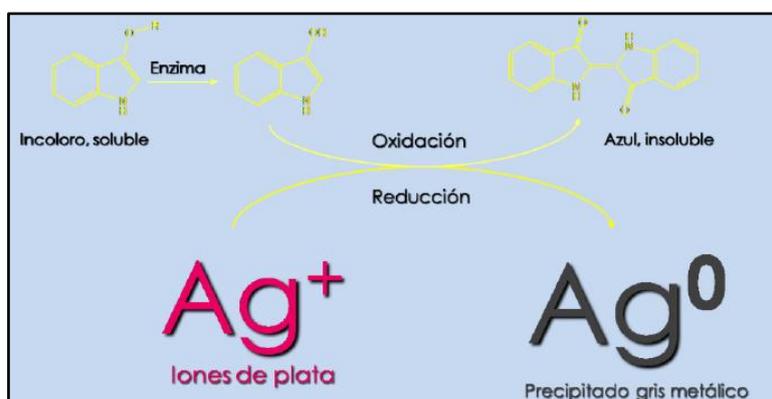


Figura 3.1.2. Reducción enzimática de iones plata catalizada por la fosfatasa alcalina a pH 9.8

Siguiendo este procedimiento analítico la primera prueba consistió en no aplicar ningún tipo de bloqueo (es decir omitir la etapa 5). Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

PSA (ng/mL)	Señal media (μA)	Desvest	Diferencia señal-blanco (μA)
0	29.13	0.85	10.51
30	39.64	4.17	

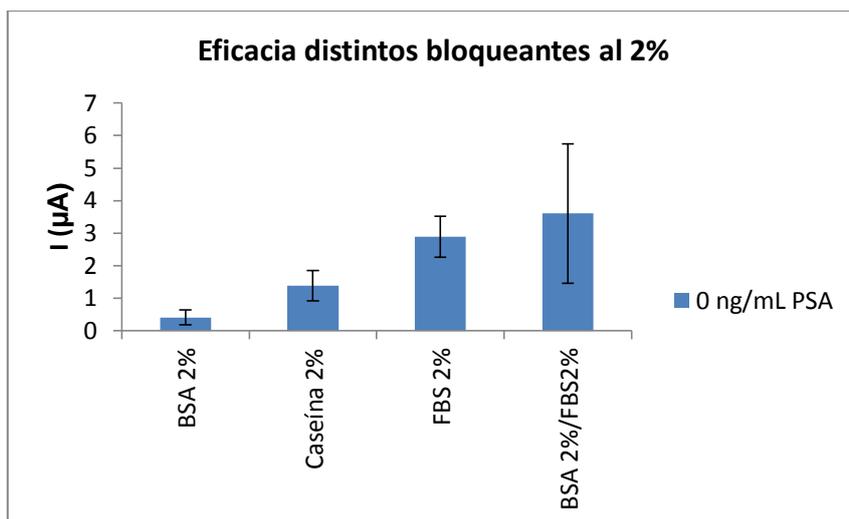
Tabla 3.1.1. Resultados sin ningún tipo de bloqueo

Con estos resultados se demuestra que se necesita alguna manera de bloquear la superficie del electrodo para eliminar las adsorciones inespecíficas.

La siguiente prueba consistió en un estudio de blancos (0 ng/mL de PSA en la etapa 7 del procedimiento analítico mencionado anteriormente) para comprobar la eficacia de diferentes tipos de bloqueantes a diferentes concentraciones con un tiempo de bloqueo de 20 minutos, obteniendo los siguientes resultados:

Bloqueante	PSA (ng/mL)	Señal media (μA)	Desvest
BSA 2%	0	0.41	0.23
Caseína 2%	0	1.39	0.47
FBS 2%	0	2.90	0.63
BSA 2%/FBS2%	0	3.61	2.14

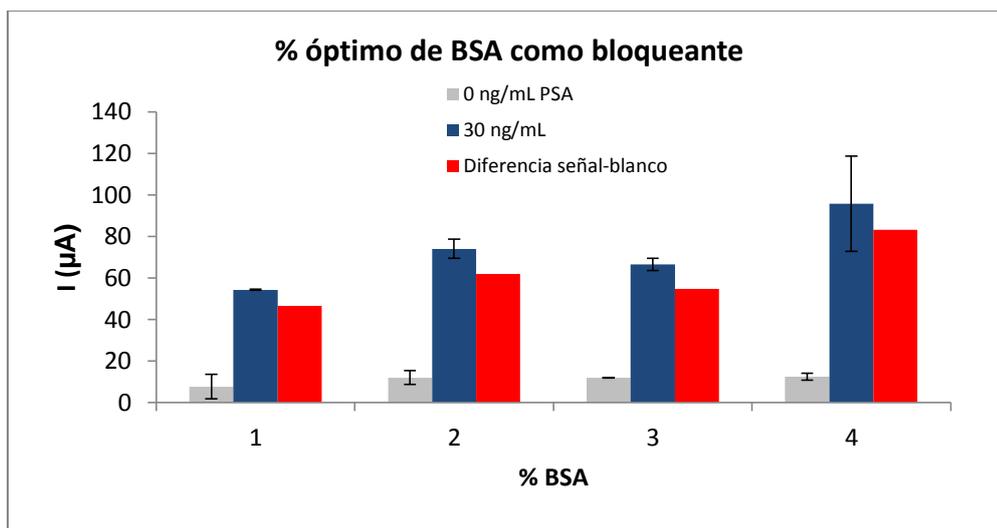
Tabla 3.1.2. Eficacia distintos bloqueantes al 2%



A la vista de los resultados se escogió la albúmina como el bloqueante más eficaz y se procedió a estudiar la concentración óptima de albúmina. Para ello se repitió el procedimiento analítico bloqueando con albúmina al 1, 2, 3 y 4% y registrando las señales para dos concentraciones de PSA (0 y 30 ng/mL) obteniendo los siguientes resultados:

% BSA	PSA (ng/mL)	Señal media (µA)	Desvest	Diferencia señal-blanco (µA)
1	0	7.72	5.95	46.55
	30	54.27	0.23	
2	0	12.02	3.33	62.02
	30	74.04	4.65	
3	0	11.91	0.09	54.68
	30	66.59	2.95	
4	0	12.54	1.62	83.22
	30	95.76	23.01	

Tabla 3.1.3. Resultados % óptimo de BSA como bloqueante



Una vez tratados los datos sorprende el resultado del último estudio ya que se había elegido la albúmina como bloqueante más eficaz y las señales de los blancos obtenidas en estos últimos análisis son 30 veces superiores a las obtenidas anteriormente, con lo que se intentó probar con nuevos bloqueantes como la leche en polvo (MP).

Para estudiar la efectividad de la leche en polvo como bloqueante se realizó una sencilla prueba siguiendo el procedimiento analítico mencionado anteriormente, usando leche en polvo al 2 % como bloqueante durante 20 minutos y registrando las señales correspondientes para 0 y 30 ng/mL de PSA obteniendo los siguientes resultados:

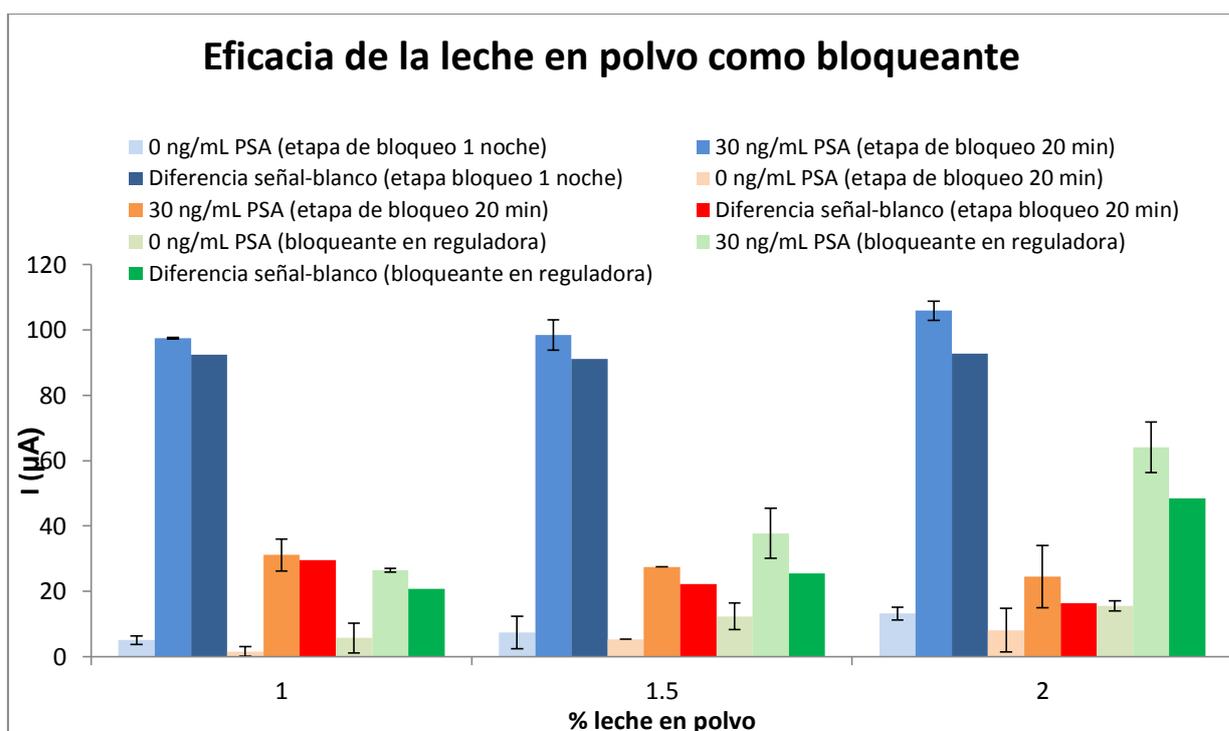
Bloqueante	PSA (ng/mL)	Señal media (μA)	Desvest	Diferencia señal-blanco (μA)
MP 2%	0	1.16	1.64	29.32
	30	30.48	0.51	

Tabla 3.1.4. Efectividad MP al 2% como bloqueante

Como indican los resultados la leche en polvo puede ser utilizada como bloqueante. Una vez comprobada su capacidad de bloqueo se realizó un estudio con diferentes modos de bloqueo con MP a diferentes concentraciones obteniendo los resultados que se resumen en la siguiente tabla:

% MP	Modo de bloqueo	PSA (ng/mL)	Señal media (µA)	Desvest	Diferencia señal-blanco (µA)
0.5	Etapa Bloqueo (1 noche)	0	6.93	2.68	90.65
		30	97.58	11.51	
1	Etapa Bloqueo (1 noche)	0	5.04	1.25	92.41
		30	97.45	24.90	
	Etapa Bloqueo (20 min)	0	1.58	1.47	29.53
		30	31.11	4.87	
	Bloqueante en reguladoras	0	5.69	4.55	20.73
		30	26.42	0.55	
1.5	Etapa Bloqueo (1 noche)	0	7.34	4.98	91.04
		30	98.38	18.08	
	Etapa Bloqueo (20 min)	0	5.36	0.03	22.15
		30	27.51	0.06	
	Bloqueante en reguladoras	0	12.35	4.05	25.42
		30	37.77	7.63	
2	Etapa Bloqueo (1 noche)	0	13.20	1.94	92.70
		30	105.9	5.98	
	Etapa Bloqueo (20 min)	0	8.11	6.70	16.39
		30	24.50	9.52	
	Bloqueante en reguladoras	0	15.55	1.48	48.47
		30	64.02	7.74	

Tabla 3.1.5. Eficacia MP como bloqueante

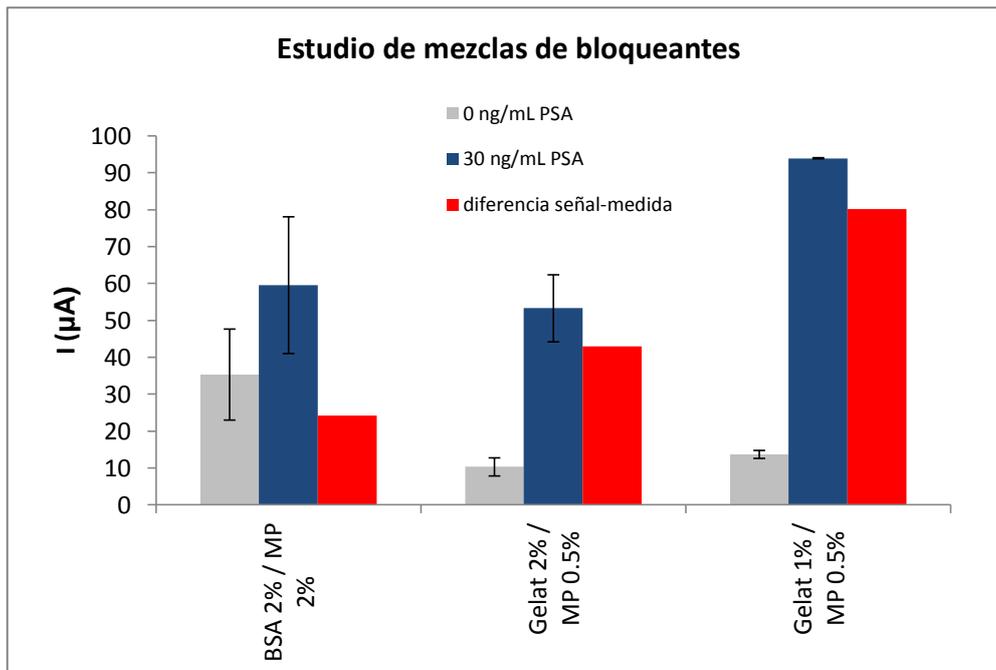


Aparentemente parece ser que la mejor forma de bloquear con leche en polvo es realizar una etapa de bloqueo de una noche, aun así no es una buena opción, ya que fijándose en los valores de los blancos éstos son muy altos, algo que se debe evitar.

Por último para intentar mejorar los resultados se probó a emplear mezclas de MP con el bloqueante clásico por excelencia (BSA) y con un nuevo bloqueante: la gelatina de cola de pescado. Se realizó un estudio de estas mezclas de bloqueantes obteniendo los siguientes resultados:

Mezcla de bloqueante	Modo de bloqueo	PSA (ng/mL)	Señal media (µA)	Desvest	Diferencia señal-blanco (µA)
BSA 2% / MP 2%	Etapa Bloqueo (20 min)	0	35.30	12.37	24.21
		30	59.51	18.53	
Gelat 2% / MP 0.5%		0	10.31	2.47	42.97
		30	53.28	9.13	
Gelat 1% / MP 0.5%		0	13.69	1.05	80.22
		30	93.91	0.12	

Tabla 3.1.6. Estudio de mezclas de bloqueantes



Los resultados siguen ofreciendo blancos con unas intensidades muy altas, lo que nos indica la presencia de absorciones inespecíficas que deben ser eliminadas. De no ser así, a la hora de realizar un calibrado las señales correspondientes a las concentraciones más bajas de PSA (2, 4, 6 e incluso 10 ng/mL) podrían verse enmascaradas por los blancos impidiendo el estudio de esta región que es la de mayor interés (“zona gris”).

3.2. DISMINUCIÓN DEL TIEMPO DE ANÁLISIS:

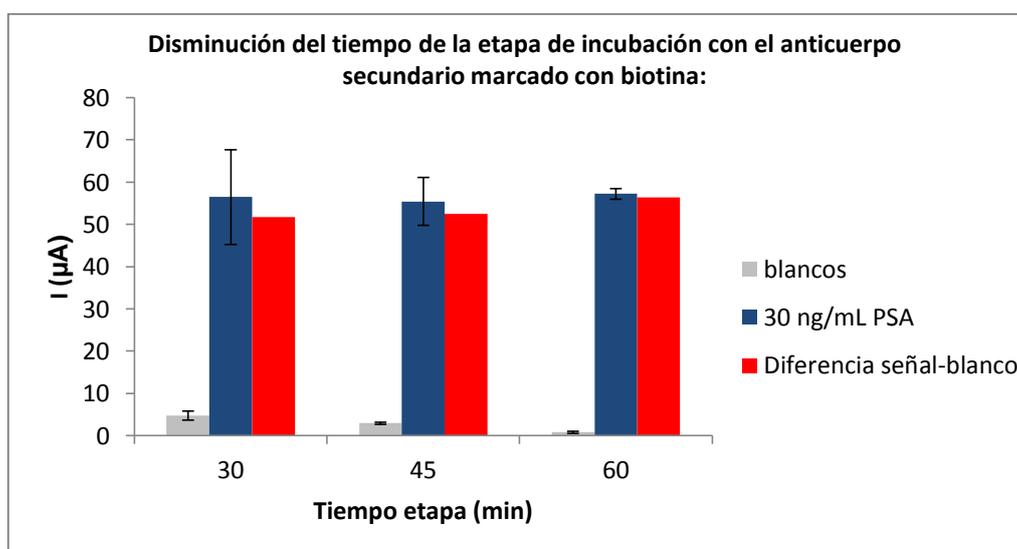
El tiempo de análisis actual de este ensayo ronda las 2 horas (dependiendo del número de puntos de calibrado así como del número de muestras a analizar). El ensayo había sido simplificado previamente cambiando el formato del “sándwich” por etapas a una sola etapa en la que se introduce una mezcla de muestra o patrón, anticuerpo de detección biotinilado y S-AP, con la consiguiente disminución del tiempo de análisis de 4 a 2 horas aproximadamente. Esta disminución de tiempo de análisis es fundamental, ya que es un aspecto muy importante en sistemas POC. Hasta el momento la etapa de incubación del anticuerpo secundario biotinilado se llevaba a cabo en 1 hora de reacción y la etapa de desarrollo enzimático con el sustrato tenía una duración de 20 minutos. En el presente trabajo se llevaron a cabo varios estudios para disminuir el tiempo total de análisis bajando el tiempo de cada una de estas dos etapas mientras se mantenía la otra constante.

- Disminución del tiempo de la etapa de incubación con el anticuerpo secundario biotinilado:

Para ver como afecta la disminución del tiempo de reacción de esta etapa en la respuesta del sensor se midieron distintas señales de PSA (blancos y 30 ng/mL PSA) con distintos tiempos de incubación del anticuerpo secundario (1 hora, 45 min y 30 min) manteniendo el resto de condiciones utilizadas hasta el momento constantes (entre ellas la etapa de bloqueo con albúmina al 2% 20 minutos debido a que el nuevo lote de electrodos usado en esta parte del trabajo no dio problemas con los blancos). Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tiempo (etapa sustrato) (min)	Tiempo (etapa incubac. Ac-biot.) (min)	PSA (ng/mL)	Señal media (μA)	Desvest	Diferencia señal-blanco
20	30	0	4.71	1.12	51.77
		30	56.48	11.19	
	45	0	2.91	0.28	52.52
		30	55.43	5.68	
	60	0	0.81	0.25	56.42
		30	57.23	1.29	

Tabla 3.2.1. Disminución del tiempo de la etapa de incubación con el Ac-biotinilado

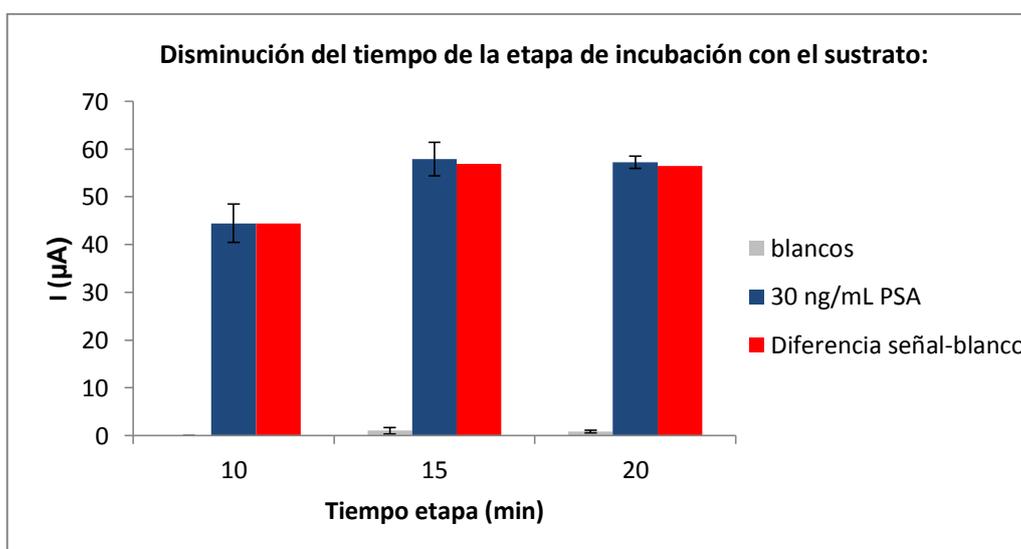


- Disminución del tiempo de la etapa de reacción con el sustrato:

Para ver como afecta la disminución del tiempo de reacción de esta etapa en la respuesta del sensor se midieron distintas señales de PSA (blancos y 30 ng/mL PSA) empleando distintos tiempos de reacción enzimática (20 min, 15 min y 10 min) mientras que el resto de condiciones se mantuvieron constantes. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tiempo (etapa incubac. Ac-biot.) (min)	Tiempo (etapa sustrato) (min)	PSA (ng/mL)	Señal media (μA)	Desvest	Diferencia señal-blanco
60	10	0	0.00	0.00	44.47
		30	44.47	4.03	
	15	0	1.02	0.67	56.88
		30	57.90	3.48	
	20	0	0.81	0.25	56.42
		30	57.23	1.29	

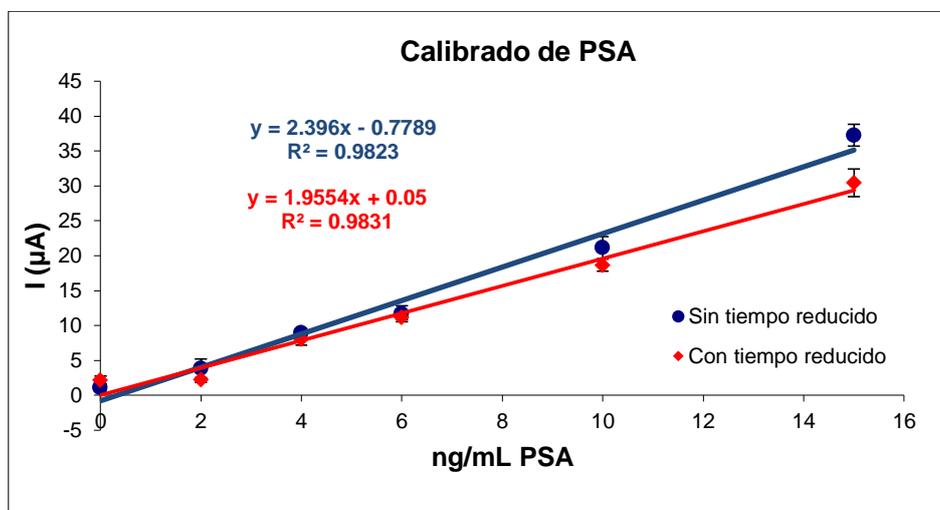
Tabla 3.2.2. Disminución del tiempo de la etapa de incubación con el Sustrato



- Una vez analizados los resultados se decide realizar dos calibrados, uno con los tiempos utilizados hasta el momento (1 hora de incubación con el anticuerpo secundario y 20 minutos de reacción con el sustrato) y otro disminuyendo la etapa de incubación de la mezcla (PSA, Ac-biot, y S-AP) de una hora a 45 min. y la etapa enzimática con el sustrato de 20 a 15 minutos ya que la diferencia señal-blanco no se ve muy afectada. Los resultados obtenidos así como las rectas de calibrado correspondientes se muestran a continuación:

Tiempos normales Reac. Inmun.= 1 hora Sustrato = 20 min		Tiempos reducidos Reac. Inmun.= 45 min Sustrato = 15 min		PSA (ng/mL)
Señal media (μA)	Desvest	Señal media (μA)	Desvest	
1.12	0.52	2.17	0.58	0
3.80	1.42	2.20	0.33	2
8.94	0.64	8.00	0.78	4
11.71	1.15	11.16	0.35	6
21.14	1.62	18.66	0.91	10
37.27	1.55	30.46	1.99	15

Tabla 3.2.3. Calibrados de PSA con distinta duración de etapas



3.3. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS PROPIOS:

La generación de anticuerpos propios fue desarrollada en conjunto por la empresa spin-off del Hospital Universitario Central de Asturias, Healthsens SL., la empresa Abyntek Biopharma S.L. y el laboratorio de ensayos Biotecnológicos y Biomédicos de la Unidad de Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.

Este proceso comenzó con una búsqueda bibliográfica de patentes (fuentes: Oficina Española de Patentes y Marcas OEPM, la web ESPACENET.COM, ...) para valorar las secuencias de aminoácidos de la PSA adecuadas para las que se quería generar los anticuerpos, así como la confirmación de la posible exposición de estas regiones ya que si se encuentran en el interior de la proteína nunca podrían ser reconocidas en un posterior ensayo por los anticuerpos generados.

Una vez elegidos los epítomos, se inmunizan los ratones en repetidas ocasiones (4 fases), extrayéndoles semanas después el suero (sangrado de ratón), los cuales fueron valorados por ensayos ELISA para escoger los ratones que presentan una mayor respuesta inmune. Los ratones elegidos fueron sacrificados 2 meses después para extraer los linfocitos B a partir de los cuales se obtienen los hibridomas positivos en un estadio policlonal; después de un cribado mediante ELISA se seleccionó los de mayor actividad para realizar la primera clonación y obtener los hibridomas positivos en un primer estadio monoclonal. Una vez más fueron cribados mediante ELISA para realizar una segunda clonación.

Para seleccionar los anticuerpos con mayor afinidad y especificidad contra la PSA se realizó una serie de ensayos “ELISA” de estos últimos clones con el fin de seleccionar 3 clones finales, utilizando el protocolo que se detalla a continuación:

PROTOCOLO ENSAYOS “ELISA”:

✓ DÍA 1:

- Colocar 1 µg/pocillo del antígeno (PSA) en la placa de 96 pocillos.
- Meter en estufa a 37°C durante 6 horas.
- Vaciar la placa y secar los pocillos dando varios golpes con la placa invertida sobre un papel.
- Bloquear añadiendo 200 µL de PBS 1% BSA-azida sódica 0.1% pH 7.25.
- Dejar 1 hora en estufa a 37°C.
- Guardar en nevera a 4°C hasta el día siguiente.

✓ DÍA 2:

- Lavar 3 veces con 200 µL/pocillo de PBS 0.1M-0.05% Tween.
- Añadir 100 µL de cada uno de los monoclonales de 2ª generación a testar en diluciones 1/100, 1/500 y 1/1000.
- Añadir también los sangrados preinmunes a las mismas concentraciones para usar como control negativo.
- Dejar 3 horas en estufa a 37°C.
- Vaciar la placa y secar los pocillos.
- Colocar 100 µL/pocillo de anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa y diluido 1/500 y 1/1000).
- Dejar 3 horas en estufa a 37°C.
- Vaciar la placa y lavar 3 veces con 200 µL/pocillo de PBS-0.05 Tween.
- Revelado utilizando peroxidasa: para ello se mezclan TMB (peroxidase substrate) y H₂O₂ (peroxidase solution) en proporción 1:1 y se ponen 100 µL/pocillo extremando la precaución de no contaminar los pocillos.
- Dejar 30 minutos en estufa a 37°C.
- El color azul es positivo.

A continuación se muestra esquemáticamente el proceso que tiene lugar en los pocillos de la placa ELISA:

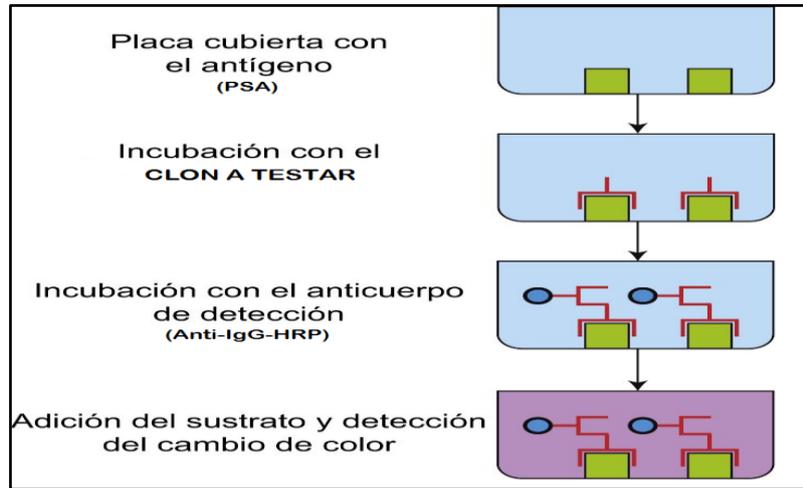


Figura 3.3.1. Esquema del proceso que tiene lugar en cada pocillo de la placa ELISA

Una vez realizados los ensayos ELISA para los distintos anticuerpos (concretamente 10) se seleccionaron los tres clones que ofrecen una mayor afinidad y especificidad. Estos fueron etiquetados como HS-1, HS-5 y el HS-8 (hibridomas). Para decidir los tres clones con mayor afinidad y especificidad se tuvo en cuenta la intensidad de color azul mostrada por cada clon en los ELISAS realizados eligiendo aquellos que presentaban mayor intensidad de color a mayor dilución. A continuación se muestra una imagen de una placa ELISA una vez finalizado el ensayo donde se pueden apreciar las distintas intensidades de color azul:

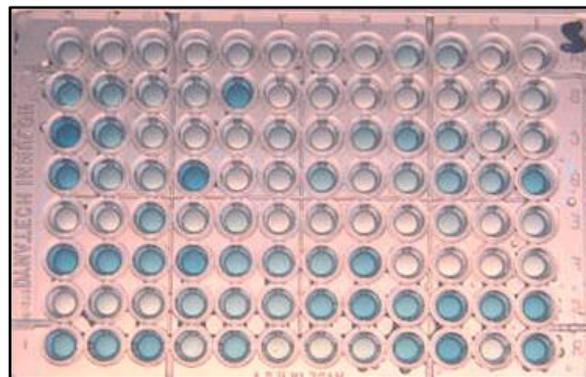


Figura 3.3.2. Imagen de una placa ELISA una vez finalizado el ensayo

Se realizó un cultivo celular de los hibridomas seleccionados para obtener el anticuerpo monoclonal correspondiente y purificarlo. De esta manera se garantiza disponer de cantidades ilimitadas de un anticuerpo propio el cual siempre tendrá la misma afinidad y especificidad.

Alícuotas de estos anticuerpos fueron conservadas en congelador con una concentración de 1 mg/mL en PBS 10 mM pH 7.3. A continuación se muestra una tabla con la secuencia de aminoácidos del péptido contra el que responde cada uno de los anticuerpos seleccionados:

Anticuerpo seleccionado	Péptido contra el que se inmuniza
HS-1	MSLLKNRFLRPGDD
HS-5	GSIEPEEFLTPKKL
HS-8	CEKHSQP

Tabla 3.3.1. Péptidos contra el que se inmuniza el ratón para producir los anticuerpos

La imagen que se muestra a continuación obtenida con tratamientos de datos cristalográficos de PSA refleja la ubicación de los péptidos seleccionados en la proteína, en amarillo la del péptido con el que se inmunizó el ratón para obtener el HS-5, en rojo el HS-1 y en verde el HS-8:

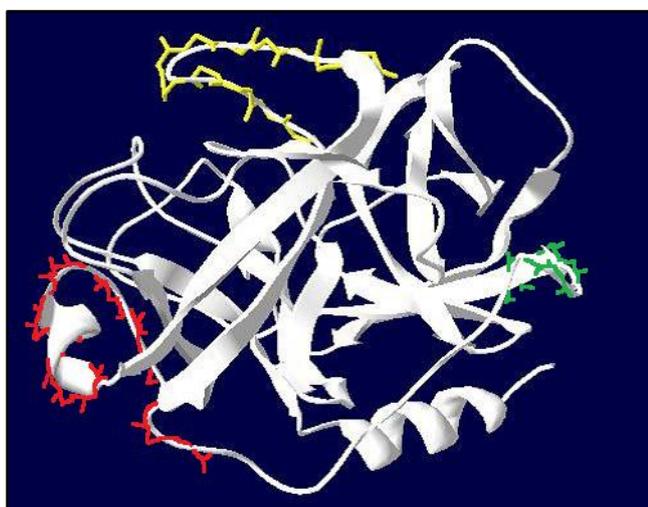


Figura 3.3.3. Ubicación de los epítomos inmunizados de la molécula de PSA

Cabe destacar que el parátopo del HS-1 reacciona con el epítopo de la PSA al que se une a la ACT cuando ésta no está conjugada, mientras que los parátopos del HS-5 y del HS-8 reaccionan con epítopos distintos al anterior, distintos entre sí y suficientemente alejados unos de otros, algo esencial para poder formar el “sándwich” del inmunosensor explicado previamente.

3.3.1. INTRODUCCIÓN DE LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS EN LA CONSTRUCCIÓN DEL SENSOR Y RESPUESTA DE ÉSTE:

Los anticuerpos seleccionados fueron:

HS-1: Como anticuerpo anti-PSA libre.

HS-5: Como anticuerpo anti-PSA total.

HS-8: Como anticuerpo anti-PSA total (en un epítopo distinto al HS-5)

En una primera etapa se realizó un estudio de los anticuerpos seleccionados para confirmar que estos responden en el sensor, para ello se utilizaron los tres anticuerpos como anticuerpos de captura, usando como anticuerpo de detección el Ac-Biotinilado del kit de CanAg. El procedimiento analítico llevado a cabo para realizar este estudio consta de los siguientes pasos:

1. Al SPCE se le añade una gota de 40 μL de una disolución de AuCl_4^- 1mM en HCl 0.1M y se le aplica un potencial de +0.43V durante 5 minutos seguido de otro potencial constante de +0.1V durante 60 segundos.
2. Se lava el electrodo con un chorro de agua del grifo y después con agua Milli-Q.
3. Se deposita una gota de 10 μL del anticuerpo de captura correspondiente de concentración 10 ng/mL (HS-1, HS-5 o HS-8) sobre la superficie del electrodo de trabajo y se deja toda la noche en nevera a 4°C con humedad constante.
4. Al día siguiente se lava el electrodo con disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M pH 7.2.

5. Se deposita una gota de 40 μL de BSA al 2% en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M pH 7.2 y se deja durante 20 minutos.
6. Se lava el electrodo con disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 2mM Mg(II) pH 7.2.
7. Se deposita una gota de 40 μL de una mezcla que contiene PSA total de concentración variable (6 o 15 ng/mL), anticuerpo biotilado de 300 ng/mL y S-AP de $5 \cdot 10^{-10}\text{M}$ en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 2mM Mg(II) pH 7.2 y se deja reaccionar durante una hora.
8. Se lava el electrodo con disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 20mM Mg(II) pH 9.8.
9. Se deposita de 40 μL una gota de una mezcla de AgNO_3 y 3-indoxil fosfato (3-IP) (concentración de plata 0.4 mM y 1mM de 3-IP) en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 20mM Mg(II) pH 9.8 y se deja reaccionar durante 20 minutos.
10. Transcurridos los 20 minutos se lleva a cabo el registro de la señal analítica, haciendo un barrido de potenciales cíclico, desde -0.015 V hasta +0.5 V con una velocidad de barrido de 50 mV/s.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Ac-Captura	PSA (ng/mL)	Señal media (μA)	Desvest
HS-1	6	5.63	0.46
	15	10.38	1.03
HS-5	6	3.09	0.28
	15	11.88	1.54
HS-8	6	5.17	1.31
	15	11.55	2.33

Tabla 3.3.2. HS-1, HS-5, HS-8 como anticuerpos de captura, Ac-Biot de CanAg como anticuerpo de detección

NOTA: Las medidas fueron realizadas por triplicado

El segundo paso que se realizó fue la biotinylación del anticuerpo HS-8 para poder usarlo como anticuerpo de detección; para ello se usó un protocolo de biotinylación que se detalla a continuación:

PROTOCOLO DE BIOTINYLACIÓN DE ANTICUERPO HS-8 (Protocolo obtenido de PIERCE para el reactivo Biotin-LC-Hydrazide):

- Preparar una disolución de MES 0.1 M y pH entre 4.7 y 5.5 (Ajustar el pH con NaOH)
- A 985 μL MES 0,1 M pH=4.7-5.5 se le añaden 15 μL del HS-8 (Anticuerpo) de 0,65 mg/mL (esto serían 10 μg de proteína).
- Preparar una disolución madre de BIOTIN-LC de 5mM en MES 0.1 M pH entre 4.7 y 5.5. Realizar las diluciones correspondientes para obtener una disolución de BIOTIN-LC de 0.05 mM.
- A 433 μL de MES 0.1 M pH=4.7-5.5 se le añaden 5 μL de EDC (se prepara en el momento). Diluir 1:100
- A 1 mL del anticuerpo HS-8 diluido en MES (preparado en el punto 2) se le añaden 25 μL de Biotin-LC de 0.05 mM y 12.5 μL de EDC-MES (preparado en el punto 4) y se mantiene agitando durante un día a temperatura ambiente.

Al efectuar este protocolo de biotinylación el EDC debe de actuar como reactivo entrecruzante uniendo el Anticuerpo HS-8 a la Biotina del reactivo BIOTIN-LC como se muestra en el siguiente esquema:

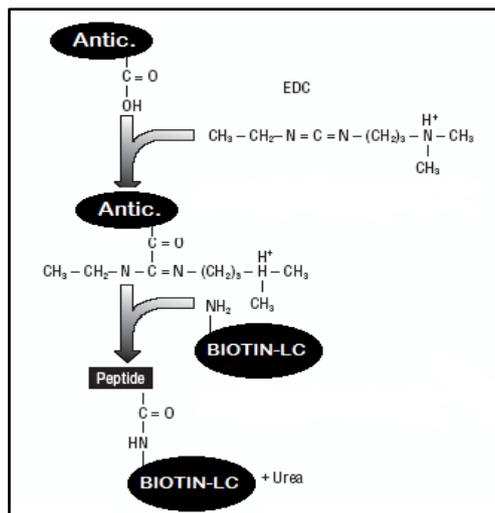


Figura 3.3.4. Esquema del proceso de Biotinylation del HS-8

Una vez marcado con Biotina el anticuerpo (HS-8), se incorporaron los anticuerpos generados en la construcción del sensor para comprobar la respuesta de éste usando como anticuerpos de captura el HS-1 (libre) y el HS-5 (total), y como anticuerpo de detección el HS-8-biotinilado. El procedimiento analítico llevado a cabo para realizar este estudio es similar a los anteriores pero por etapas (ya que se desconoce la respuesta del nuevo HS-8-biotinilado en la mezcla con la S-AP y la PSA) de la siguiente manera:

1. Al SPCE se le añade una gota de 40 μL de una disolución de AuCl_4^- 1mM en HCl 0.1M y se le aplica un potencial de +0.43V durante 5 minutos seguido de otro potencial constante de +0.1V durante 60 segundos.
2. Se lava el electrodo con un chorro de agua del grifo y después con agua Mili-Q.
3. Se deposita una gota de 10 μL del anticuerpo de captura correspondiente de concentración 10 ng/mL (HS-1, HS-5) sobre la superficie del electrodo de trabajo y se deja toda la noche en nevera a 4°C con humedad constante.
4. Al día siguiente se lava el electrodo con disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M pH 7.2.
5. Se deposita una gota de 40 μL de BSA al 2% en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M pH 7.2 y se deja durante 20 minutos.
6. Se lava el electrodo con disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 2mM Mg(II) pH 7.2.

7. Se deposita una gota de 40 μL de PSA total de concentración variable (6 o 15 ng/mL) y se deja reaccionar una hora.
8. Se lava el electrodo con disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 2mM Mg(II) pH 7.2.
9. Se deposita una gota de 40 μL de anticuerpo HS-8-biotinilado de 240 ng/mL y se deja reaccionar una hora.
10. Se lava el electrodo con disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 2mM Mg(II) pH 7.2.
11. Se añaden 40 μL de S-AP de $5 \cdot 10^{-10}\text{M}$ en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 2mM Mg(II) pH 7.2 y se deja reaccionar durante 30 min (para asegurarnos de la interacción biotina-estreptavidina, aunque esta debería ser inmediata).
12. Se lava el electrodo con disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 20mM Mg(II) pH 9.8.
13. Se deposita una gota de 40 μL de una mezcla de AgNO_3 y 3-indoxil fosfato (3-IP) (concentración de plata 0.4 mM y 1mM de 3-IP) en disolución reguladora Tris- HNO_3 0.1M 20mM Mg(II) pH 9.8 y se le deja reaccionar durante 20 minutos.
14. Transcurridos los 20 minutos se lleva a cabo el registro de la señal analítica, haciendo un barrido de potenciales cíclico, desde -0.015 V hasta +0.5 V con una velocidad de barrido de 50 mV/s.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Ac-Captura	Ac-detección	PSA (ng/mL)	Señal media (μA)	Desvest
HS-1	HS-8-biot	6	13.22	4.89
		15	16.73	3.28
HS-5	HS-8-biot	6	16.20	3.66
		15	15.93	7.40

Tabla 3.3.2. HS-1, HS-5 como anticuerpos de captura, HS-8-Biotinilado como anticuerpo de detección

Los resultados obtenidos muestran que la biotinilación realizada fracasó, tal vez debido a que el protocolo utilizado era dado para una cantidad de anticuerpo elevada (10 mg) y nuestra cantidad disponible era del orden de 10 μg por lo que el protocolo fue escalado a dicha cantidad. El proceso no dio los resultados esperados.

4. CONCLUSIONES Y FUTURO INMEDIATO DEL SENSOR

4.1. CONCLUSIONES:

Las conclusiones obtenidas al término de este Trabajo Fin de Máster son las siguientes:

- La optimización de la etapa de bloqueo sigue siendo una asignatura pendiente en el desarrollo de este sensor. Esto puede ser debido a los diferentes lotes de producción de los SPCEs que pueden presentar propiedades físicas ligeramente diferentes, ya que la etapa de bloqueo es un proceso de adsorción en superficie, pequeñas variaciones en estas superficies pueden implicar cambios en el bloqueo.
- Es posible reducir el tiempo de análisis debido a que la pendiente de las rectas de calibrado obtenidas son prácticamente iguales por lo que la sensibilidad no se vería alterada. En el presente trabajo se consiguió bajar el tiempo total de análisis en 20 minutos.
- Con los resultados obtenidos en el presente trabajo fin de máster podemos afirmar que los anticuerpos desarrollados responden adecuadamente cuando los introducimos en el dispositivo como anticuerpos de captura a medida que aumentamos la cantidad de PSA. Sin embargo cuando intentamos biotinilar uno de ellos para usarlo como anticuerpo de detección los resultados obtenidos nos confirmaron que la biotinilación realizada fue errónea por lo que se debe seguir haciendo estudios hasta conseguir una correcta biotinilación.

4.2. FUTURO INMEDIATO DEL INMUNOSENSOR:

El futuro inmediato del sensor pasa por dos etapas fundamentales:

- Optimización de la etapa de bloqueo: como ya se ha dicho en las conclusiones de este trabajo es una de las asignaturas pendientes en el desarrollo del sensor de PSA. Los siguientes estudios que se llevarán a cabo para intentar dar solución a este problema se basan en la adición de un nuevo reactivo sobre el SPCE con un doble objetivo:
 - ✓ Por una parte la adición de otros materiales nanométricos basados en carbono (grafeno, nanofibras de carbono, ...) puede suponer un bloqueo indirecto de las adsorciones inespecíficas al mismo tiempo que una mejora en la transferencia electrónica (se espera mejorar los blancos así como obtener una mejor diferencia señal-blanco).
 - ✓ Por otro lado se emplearán reactivos que permitirán fijar y orientar el anticuerpo de captura sobre la superficie del electrodo (estreptavidina, avidina, neutravidina) de modo que la fase sensora sea más estable y duradera en el tiempo.
- Biotinilación de los anticuerpos propios: Actualmente la spin-off HEALTHSENS S.L. tiene pedido un kit para biotinilar cantidades de anticuerpo del orden de los microgramos. Estaba previsto haber realizado la biotinilación de los anticuerpos con este kit durante este trabajo fin de máster pero un retraso en la entrega del producto lo hizo inviable.