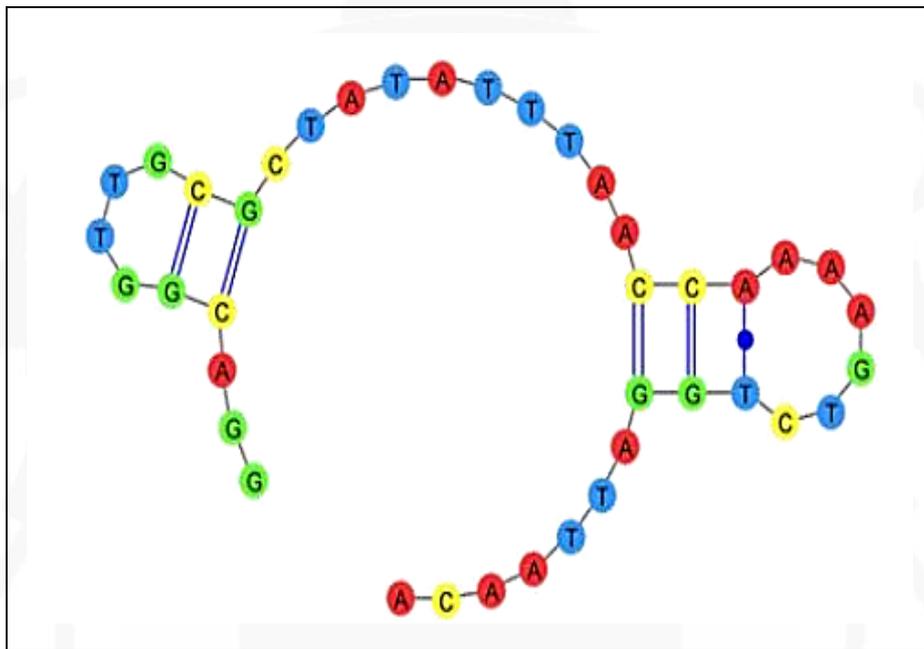


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

Detección de biomarcadores proteicos de cáncer de páncreas
mediante ensayos basados en aptámeros



Inés Díaz Martínez

Química Física y Analítica/Grupo de Electroanálisis Universidad de Oviedo

Junio/2021



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA



RESUMEN

El adenocarcinoma ductal de páncreas es una de las principales causas de mortalidad asociadas al cáncer, con una tasa de supervivencia a cinco años menor del 7%. Típicamente, es diagnosticado en fases tardías debido a la ausencia de biomarcadores específicos. Actualmente, la búsqueda de nuevos marcadores se encuentra dirigida a la detección de glicoproteínas con alteraciones en su patrón de glicosilación presentes en sueros de pacientes con este tipo de cáncer. Existen receptores naturales (anticuerpos y lectinas) y artificiales (ácidos borónicos y aptámeros) capaces de reconocer la porción glicosilada de una proteína. Los aptámeros, pequeños oligonucleótidos sintetizados químicamente, son empleados como alternativas a los anticuerpos como agente de captura y/o detección en ensayos conocidos como ELASA. La proteína amiloide sérica P o SAP es una glicoproteína que presenta un aumento en sus patrones de sialilación y de fucosilación en pacientes con cáncer de páncreas, postulándose como un posible biomarcador de este tipo de cáncer. En el presente trabajo, se describe el desarrollo de un biosensor electroquímico tipo sándwich para la detección de la proteína amiloide sérica P empleando un anticuerpo específico de esta glicoproteína como receptor de captura y dos tipos de receptores de detección: la lectina SNA, que reconoce ácidos siálicos, y el aptámero PSA-1, capaz de reconocer la estructura glicosilada de la proteína PSA. La estrategia de inmovilización orientada del anticuerpo de captura a través de sus azúcares sobre electrodos serigrafados de oro modificados con el ácido 3-aminofenilborónico dio mejores resultados que sobre electrodos funcionalizados con proteína A. La plataforma sensora resultante empleando la lectina como receptor de detección no permitió observar cambios específicos, si bien su sustitución por el aptámero PSA-1 hizo posible detectar la proteína SAP a niveles de ng/mL con una reproducibilidad inferior al 10%.

ABSTRACT

The pancreatic ductal adenocarcinoma is one of the leading cause of cancer-related mortality, with a five year survival rate of less than 7%. It is typically diagnosed in late stages due to the lack of specific biomarkers. Nowadays, the search of new markers focuses on detection of glycoproteins with an anomalous glycosylation process and its role in pancreatic cancer. There are natural receptors (antibodies and lectins) and artificial receptors (boronic acids and aptamers) capable of recognizing the glycosylated portion of a protein. The aptamers, small oligonucleotides chemically synthesized, are used as an alternative to antibodies as a capture and / or detection agent in assays known as ELASA. The serum amyloid P or SAP is a glycoprotein that shows an increase in its sialylation and fucosylation patterns in patients with pancreatic cancer, being postulated as a possible biomarker of this type of cancer. In the present work, the development of a sandwich-type electrochemical biosensor for the detection of serum amyloid P using a specific antibody of this glycoprotein as a capture receptor and two types of detection receptors: SNA lectin, which recognizes sialic acids, and the PSA-1 aptamer, capable of recognizing the glycosylated structure of the PSA protein is described. The strategy of oriented immobilization of the capture antibody through its sugars on gold screen-printed electrodes modified with 3-aminophenylboronic acid showed better results than on electrodes functionalized with protein A. The resulting sensor platform using lectin as a detection receptor did not allow observe specific changes, although its substitution by the PSA-1 aptamer made it possible to detect the SAP protein at levels of ng / mL with a reproducibility of less than 10%.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Rebeca Miranda, por su gran ayuda y orientación para la realización de este trabajo, por enseñarme con gran paciencia el mundo de la Química Analítica y ser un apoyo durante todo el proceso de elaboración de este Trabajo Fin de Grado

Al Grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo, por su compañerismo, amabilidad, cercanía y por sus palabras alentadoras en el laboratorio.

A mi familia, por su apoyo incondicional y especialmente a mi padre, responsable de la elección de este TFG ya que antes de que el cáncer se lo llevara, me transmitió la importancia de la investigación en esta disciplina.

A mis amigos de biotecnología, por su amistad, compañía y vivencias en estos años de carrera.

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Declaro la originalidad de los contenidos presentes en este Trabajo Fin de Grado. Los textos, datos e ilustraciones procedentes de otros autores han sido debidamente citados siguiendo los procedimientos usuales en este campo de la Ciencia.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

6FAM	6-carboxifluoresceína
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AntiF-POD	Enzima peroxidasa conjugada al fragmento Fab anti-fluoresceína
APBA	Ácido 3-aminofenilborónico
ARN	Ácido ribonucleico
EDC	Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELASA	<i>Enzyme-Linked Apta-sorbent Assay</i> – Ensayo de aptasorción ligado a enzimas
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> - Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos
K_d	Constante de disociación
MH	6-mercapto-1-hexanol
MUA	Ácido 11-mercaptoundecanoico
NaAc	Acetato de sodio
NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	<i>Phosphate Buffer saline</i> - Tampón salino de fosfato
PDAC	<i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i> – Adenocarcinoma Ductal de Páncreas
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i> - Antígeno Prostático Específico
rPSA	Proteína PSA recombinante
SAM	<i>Self-assembled monolayer</i> - Monocapa autoensamblada
SAP	<i>Serum amyloid P protein</i> – Proteína amiloide sérica P
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i> - Evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial
SNA	<i>Sacumbus nigra</i>
Strep-POD	Enzima peroxidasa conjugada a estreptavidina
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El cáncer de páncreas	1
1.2 Estrategias para detectar glicoproteínas	2
1.3 Aptámeros como receptores de afinidad	4
1.4 Proteína amiloide sérica P (SAP)	8
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1 Instrumentación	9
3.2 Reactivos	10
3.3 Protocolos	11
3.3.1. Reconstitución del liofizado de proteína SAP	11
3.3.2. Ensayo ELISA	11
3.3.3. Acondicionamiento de los electrodos	12
3.3.4. Construcción de la fase sensora sobre electrodos serigrafados de oro	13
3.3.4.1. Inmovilización del anticuerpo a través de la proteína A	13
3.3.4.2. Inmovilización del anticuerpo a través de un derivado del ácido borónico	14
3.3.5. Ensayo sándwich electroquímico	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1 Cuantificación de la proteína amiloide sérica P mediante un inmunoensayo ELISA	17
4.2 Diseño de un bioensayo electroquímico de formato sándwich	20
4.2.1. Transducción electroquímica	20
4.2.2. Diseño de un bioensayo sándwich mixto	21
4.2.2.1. Empleo de la lectina SNA como receptor de detección	21
4.2.2.2. Empleo del aptámero PSA-1 como receptor de detección	26
5. CONCLUSIONES	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29



1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cáncer de páncreas

El páncreas es una glándula mixta que consta de dos componentes: uno endocrino y otro exocrino que se encuentra situado en la cavidad abdominal, detrás del estómago. El páncreas endocrino, se encarga de secretar hormonas involucradas en el control glucémico, la motilidad intestinal, las secreciones intestinales y el apetito¹ y consta de cuatro tipos de células: 1) células alfa o A, productoras de glucagón, 2) células beta o B, productoras de insulina, 3) células delta o D, productoras de somatostatina y 4) células PP, productoras de polipéptido pancreático, que se agrupan formando los islotes de Langerhans². Por otra parte, su función exocrina es fundamental para la coordinación y regulación de la digestión¹, ya que el páncreas suministra al intestino enzimas digestivas producidas y secretadas por las células acinares que posteriormente son transportadas al intestino a través del sistema ductal pancreático².

El tumor maligno más frecuente del páncreas es el adenocarcinoma ductal de páncreas (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC), generalmente denominado cáncer de páncreas³. Existen diversos factores de riesgo asociados a este tipo de cáncer entre los que se encuentra el tabaquismo, la diabetes, la pancreatitis crónica, el alcoholismo o los antecedentes familiares, entre otros⁴. El PDAC representa la séptima causa de muerte por cáncer a nivel mundial y se prevé que para la próxima década sea la segunda causa principal de mortalidad por cáncer en Estados Unidos, solo por detrás del cáncer de pulmón⁵. Solo en el año 2020 se diagnosticaron 495.773 nuevos casos y 466.003 muertes⁶. A pesar de que su tasa de incidencia no es de las más altas, 10 casos por 100.000 habitantes por año, presenta una elevada tasa de mortalidad debido a su detección tardía y a la resistencia del tumor a la mayoría de los tratamientos convencionales. Esto también ha derivado en una probabilidad de supervivencia después de cinco años de su diagnóstico menor del 7%³.

El enfoque más prometedor para mejorar la supervivencia de los pacientes con PDAC se basa en el cribado de marcadores en fluidos biológicos. Los marcadores tumorales son moléculas producidas por las células cancerosas, o inducidas por el cáncer en células normales, que están presentes en algún material biológico que pueda obtenerse del paciente y que refleja la actividad maligna⁷. El único biomarcador de PDAC aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) es el antígeno sérico 19-9 o antígeno sializado de Lewis (CA19-9), que posee un valor diagnóstico limitado, ya que se puede encontrar elevado en otras patologías como pancreatitis, ictericia, quistes hepáticos y pancreáticos, y otros cánceres como el colorrectal y el de mama. Además, el 10-20% de la población caucásica no expresa



CA19-9 debido a una deficiencia genética de fucosiltransferasa. Por ello resulta muy importante encontrar marcadores más específicos y sensibles de adenocarcinoma ductal de páncreas⁸.

Existen evidencias claras de que los cambios en el patrón de glicosilación de una proteína juegan un papel muy importante en su proceso de transformación oncogénica y dan como resultado la presencia de un fenotipo de glicosilación aberrante en casi todas las proteínas (tanto secretadas como asociadas a la membrana) expresadas en una célula tumoral⁹. Entre ellos destacan las alteraciones en los patrones de sialilación y de fucosilación. Estos cambios se hacen más presentes a medida que el tumor se vuelve más agresivo, y suelen ser más pronunciados que las alteraciones que se pueden producir en la expresión de proteínas. Es por ello que actualmente la búsqueda de nuevos marcadores tumorales se encuentra dirigida a la detección de glicofomas alteradas de una glicoproteína, ya que su especificidad es mucho mayor que los niveles variables de expresión de la propia proteína⁸.

1.2 Estrategias para detectar glicoproteínas

En la actualidad, las técnicas para caracterizar el perfil de glicanos de una molécula se basan en la hidrolización química y/o enzimática de los glicanos y su posterior análisis por medio de la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear, la electroforesis capilar, la cromatografía de líquidos y sus combinaciones. Aunque se trata de técnicas muy sensibles y precisas, requieren protocolos largos y costosos, además de personal cualificado para interpretar los resultados obtenidos.

Por tanto, existe una clara necesidad de desarrollar ensayos más sencillos y económicos que permitan detectar cambios en los perfiles de glicosilación asociados a cáncer de manera eficiente y sensible como es el caso de los bioensayos. Para diseñar y desarrollar este tipo de tests se requiere de receptores con elevada afinidad y selectividad hacia los glicanos de una proteína marcadora del cáncer. Se han descrito diversas estrategias para el reconocimiento de la parte glicosilada de una proteína las cuales se basan en el empleo de receptores naturales (anticuerpos y lectinas) y artificiales (ácido borónico y sus derivados) que se describen a continuación:

- **Anticuerpos**

Los anticuerpos son moléculas producidas por los linfocitos como respuesta a un agente extraño o antígeno. El reconocimiento antígeno-anticuerpo se lleva a cabo por medio de la unión epítipo-paratopo. El epítipo o determinante antigénico es la porción del antígeno reconocida por el anticuerpo formado por unos pocos aminoácidos o monosacáridos. El paratopo es la parte de un anticuerpo que reconoce el epítipo.



Actualmente, es difícil desarrollar anticuerpos anti-glicanos con elevada selectividad y afinidad. Esto es debido a que los glicanos son poco inmunogénicos y se expresan de forma propia en la mayoría de los organismos hospedadores que se utilizan para producir anticuerpos¹⁰.

Con el objetivo de mejorar su afinidad, típicamente del orden de micromolar, se ha descrito la obtención de anticuerpos multivalentes que contienen dos o más sitios de unión a glicanos, o la formación de oligómeros con múltiples sitios de unión mediante interacciones no covalentes. Pero a pesar de estos esfuerzos, muchos anticuerpos anti-glicanos muestran bajas afinidades por sus dianas y falta de especificidad debido a que reconocen familias de glicanos relacionadas estructuralmente, en lugar de una única estructura. Además, la disponibilidad de anticuerpos anti-glicanos es reducida, pues solo se encuentran disponibles para un pequeño conjunto de familias de glicanos y epítomos, por lo que muchos glicanos importantes todavía carecen de su correspondiente anticuerpo¹⁰.

- **Lectinas**

Las lectinas son proteínas de naturaleza no inmunogénica que se unen a carbohidratos presentes en animales, plantas y microorganismos. Desempeñan muchas funciones clave en el control de diversos procesos fisiológicos y patológicos en los organismos vivos, y se emplean como herramientas de marcaje de células, cribado de glicanos, purificación de glicoproteínas y en la detección del cáncer y otras enfermedades¹¹.

Las lectinas interactúan con los carbohidratos mediante uniones no covalentes que suelen ser reversibles, de manera que las asociaciones lectina-carbohidrato suelen ser débiles, con constantes de disociación en el orden de milimolar para los monosacáridos, y en el orden de micromolar para los oligosacáridos y los glicanos de glicoproteínas. Esto se debe a que los sitios de unión se encuentran en la superficie de la lectina y están expuestos al disolvente, compitiendo con este por la interacción con los glicanos^{10, 11}.

Actualmente, gracias al desarrollo de la ingeniería de lectinas, es posible producir lectinas de elevada afinidad por el carbohidrato de interés. De esta manera se dispone del orden de centenar de lectinas comerciales para diferentes aplicaciones como su uso en micromatrices (*microarrays*) para la caracterización de los distintos tipos glicanos presentes en una muestra^{8, 9}.

- **Ácido borónico**

El ácido borónico y sus derivados son capaces de unirse covalentemente a los 1,2- y 1,3-dioles de los glicanos para formar un éster. Se trata de una reacción reversible que depende del pH al que tiene lugar. También se ha aprovechado su versatilidad química para integrarlos en otros receptores como péptidos o polímeros molecularmente impresos, y de esta forma dotarlos de la capacidad de enlace a los glicanos.



Sin embargo, el empleo del ácido borónico y sus derivados presenta algunas limitaciones. Concretamente, estos grupos poseen buena capacidad de unión a azúcares en forma de furanosa, si bien la mayoría de los carbohidratos en las moléculas biológicamente más relevantes están en forma de piranosa. Además, las mejores constantes de enlace se observan a valores de pH básicos, que pueden no ser compatibles con algunos sistemas biológicos¹⁰.

Para superar las limitaciones asociadas a los receptores anteriormente descritos, se ha propuesto el empleo de un tipo de receptores sintéticos de naturaleza oligonucleotídica llamados aptámeros, cuyas características principales se detallan en la siguiente sección.

1.3 Aptámeros como receptores de afinidad

Los aptámeros (palabra que deriva del latín *aptus* que significa encajar y del término griego *mero* que significa partícula) son oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenarios de secuencia corta (entre 15-100 nucleótidos), capaces de adoptar estructuras tridimensionales características que les permiten unirse con elevada afinidad y selectividad a casi cualquier tipo de dianas, en una reacción de afinidad similar a la reacción antígeno-anticuerpo¹². Así, los complejos aptámero-diana se estabilizan por medio de interacciones no covalentes como fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, puentes de hidrógeno, o interacciones entre anillos aromáticos (interacciones π - π).

La fuerza de la interacción entre la diana y el aptámero viene definida por su constante de disociación (K_d) de forma que a menor valor de esta constante, mayor es la afinidad del aptámero por la molécula diana. El valor de K_d para el complejo aptámero-diana suele oscilar entre niveles de micromolar (baja afinidad) y picomolar (alta afinidad)¹³. Por sus propiedades de unión, los aptámeros se han utilizado ampliamente para el reconocimiento y detección de diversas dianas, como iones metálicos, fármacos, cofactores, metabolitos, aminoglicósidos, proteínas o incluso células completas, lo que refleja su tremendo potencial¹⁴.

La Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX, por sus siglas en inglés) es el proceso habitual de producción de aptámeros *in vitro*. Fue descrito por primera vez en 1990 por dos grupos independientes. Así, Ellington y Szostak¹⁵ aislaron secuencias de ARN que se unen específicamente a moléculas de colorantes orgánicos. En paralelo, Tuerk y Gold¹⁶ aislaron secuencias de ARN de alta afinidad hacia la enzima ADN polimerasa del bacteriófago T4.

La metodología SELEX para la producción de aptámeros es un proceso que imita la selección natural de las especies mediante la repetición iterativa de ciclos o rondas de selección. Se parte de una colección aleatoria de oligonucleótidos de ADN o ARN, generalmente alrededor de 10^{14} - 10^{15} secuencias diferentes, que se pone en contacto con la molécula de interés. Estas



secuencias de partida poseen una región central aleatoria (20-80 nucleótidos) flanqueada por dos regiones constantes de unión a cebadores (15-25 nucleótidos) que permiten su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR¹⁷.

Como se representa en la Figura 1, cada ciclo comienza con la incubación de una genoteca combinatorial de oligonucleótidos con la diana de interés. A continuación, las secuencias no enlazadas se separan de aquellas que sí se unieron a la diana y posteriormente éstas se eluyen. Las secuencias enlazadas se amplifican mediante PCR y, antes de iniciar un nuevo ciclo de selección, se realiza una etapa de acondicionamiento para recuperar el ADN de cadena sencilla. El proceso se repite y en cada ciclo las condiciones de interacción se hacen cada vez más exigentes para obtener aptámeros con alta afinidad por la diana. Normalmente se necesitan de 8 a 18 ciclos de SELEX para obtener aptámeros con las características deseadas. Por último, las secuencias presentes en la última ronda de selección se clonan, secuencian y analizan para determinar su selectividad y afinidad¹⁸.

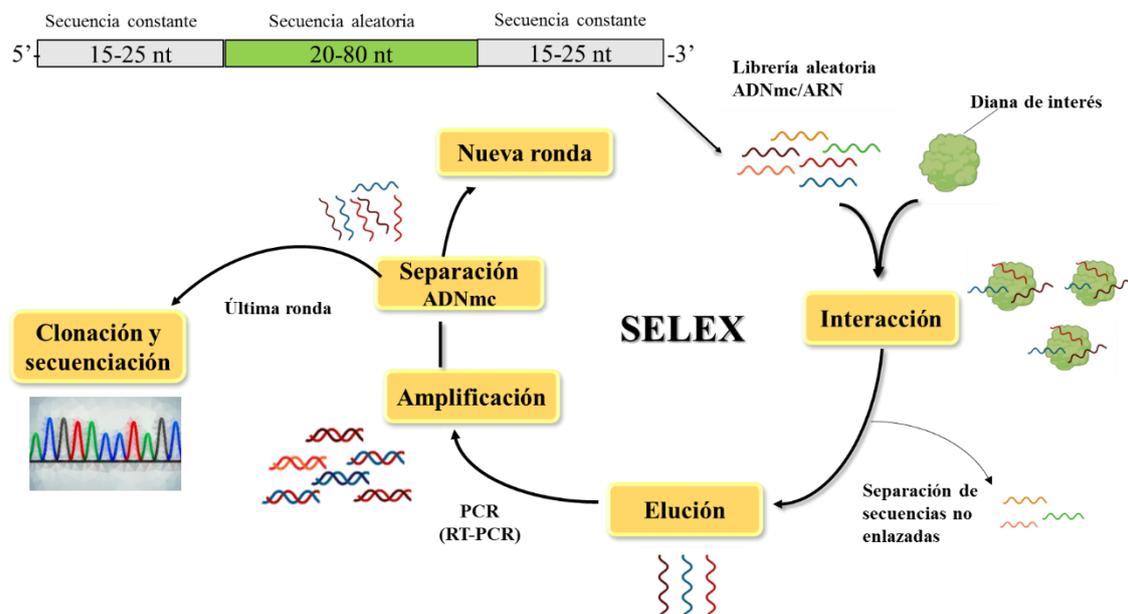


Figura 1. Esquema del proceso SELEX para la obtención de aptámeros.

Sin embargo, el proceso SELEX tradicional es largo, tedioso y puede ser que no se logren aptámeros con la selectividad y afinidad deseadas. Es por ello que para aumentar la eficacia y rapidez del método tradicional han surgido diversas variantes como el SELEX de una sola ronda, el SELEX automatizado, o el SELEX con nucleótidos modificados, entre otros¹². De todas ellas, cabe destacar el *counter*-SELEX, metodología empleada para generar aptámeros con gran afinidad y selectividad capaces de discriminar estructuras estrechamente relacionadas. Esta estrategia consiste en incluir diversas etapas de selección negativa o contra-selección en el proceso SELEX tradicional mediante la interacción de la colección de oligonucleótidos con un



compuesto de estructura similar a la molécula diana. Las secuencias no enlazadas en la etapa de contra-selección son las de interés y se utilizan en la ronda de selección posterior¹⁸. Un ejemplo clásico es la obtención de aptámeros frente a la teofilina utilizando la cafeína para la etapa de contra-selección. A pesar de que ambas moléculas se diferencian entre sí únicamente en un grupo metilo, se consiguió obtener un aptámero con una afinidad hacia la teofilina diez mil veces superior que hacia la cafeína¹⁴.

El *counter-SELEX* fue la estrategia escogida por el Grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo para obtener un aptámero frente a la región glicosilada del antígeno prostático específico o PSA, proteína biomarcadora del cáncer de próstata. Para ello se incorporaron etapas de contra-selección frente a una forma recombinante no glicosilada de la PSA, la PSA recombinante (rPSA) obtenida de *Escherichia coli*. De esta forma, las secuencias enlazadas a la rPSA se descartaron y las no enlazadas a esta forma recombinante se aislaron para proseguir con la selección. Como resultado se obtuvo un aptámero que reconoce los glicanos de esta proteína con una constante de disociación de 357 ± 42 nM¹⁹.

Los aptámeros presentan numerosas ventajas sobre los anticuerpos como receptores de afinidad, y pueden utilizarse como alternativa a estos en muchos campos de aplicación diferentes. Es por ello que comúnmente se les denomina anticuerpos químicos. Entre estas ventajas destacan su facilidad de producción (los aptámeros se producen mediante síntesis química, lo que elimina la variación entre lotes y reduce el coste y el tiempo necesarios para su producción), su capacidad de recobrar su estructura nativa tras un aumento de la temperatura (los anticuerpos, por su naturaleza proteica, se desnaturalizan irreversiblemente cuando experimentan un aumento de temperatura), poseen constantes de disociación que pueden llegar a niveles de picomolar-femtomolar, son de menor tamaño, menos inmunogénicos, presentan mayor facilidad para su modificación y marcaje y se pueden emplear para detectar una amplia variedad de dianas con alta capacidad de discriminación entre moléculas similares (mediante la estrategia *counter-SELEX* explicada anteriormente). A pesar de todas sus ventajas, los aptámeros también presentan limitaciones como su susceptibilidad a la degradación por nucleasas, especialmente los aptámeros de ARN, dificultando su incorporación en sistemas *in vivo*. Sin embargo, esta inestabilidad puede minimizarse mediante modificaciones químicas que permiten aumentar la vida media de los aptámeros^{14, 20}.

Debido a estas características, los aptámeros tienen un enorme potencial para su uso en diagnóstico y tratamiento clínico. De hecho, la FDA aprobó el primer medicamento basado en aptámeros, Macugen (inyección de *pegaptanib* sódico), para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad, al unirse al factor de crecimiento endotelial vascular e inhibir su actividad.



Los aptámeros pueden sustituir a los anticuerpos como agentes de captura y/o de detección en los inmunoensayos ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), y los ensayos resultantes reciben el nombre de ensayos ELASA (*Enzyme-Linked Apta-sorbent Assay*). En la Tabla 1 se realiza una comparación de algunos aspectos importantes entre ambos tipos de ensayo.

Tabla 1. Comparación de las características de los ensayos ELISA y ELASA²⁰.

	ELISA	ELASA
Sensibilidad	Similar	Similar
Requerimientos de temperatura	Almacenamiento en nevera o frigorífico cuando los anticuerpos son utilizados	No tiene, los aptámeros son capaces de tolerar temperaturas mayores de 60°C
Posibilidad de automatización	Sí	Sí
Coste	Elevado	Bajo
Durabilidad	Corta	Larga
Reutilización	Único uso	Usos repetidos

Al igual que ocurre con el ELISA, existen diversas configuraciones para el ensayo ELASA como son el ELASA directo, competitivo y de tipo sándwich. Este último formato (en todas sus variantes: aptámero-antígeno-anticuerpo, anticuerpo-antígeno-aptámero, aptámero-antígeno-aptámero) es el más empleado ya que proporciona mayor selectividad como consecuencia de las dos reacciones de reconocimiento molecular que tienen lugar²⁰.

Asimismo los aptámeros son ampliamente utilizados para diseñar y desarrollar biosensores debido a su fácil adaptabilidad a diferentes plataformas. Los biosensores que emplean aptámeros como receptores de afinidad se les denomina aptasensores. Estos se basan en el reconocimiento de la molécula de interés por parte del aptámero para formar el complejo aptámero-diana, y la señal química derivada de esa unión es transformada por el transductor en una señal medible. Los aptasensores se pueden clasificar según el tipo de transductor en electroquímicos, ópticos, colorimétricos, sensibles a la masa o térmicos. Los aptasensores electroquímicos se han convertido en una alternativa muy prometedora para el análisis clínico debido a su alta sensibilidad, rápida respuesta, fácil manejo, portabilidad y capacidad para detectar múltiples analitos en una misma plataforma²¹.



1.4 Proteína amiloide sérica P (SAP)

La proteína amiloide sérica P (*Serum amyloid P*, SAP), es una glicoproteína pentamérica de 25 kDa perteneciente a la familia de las pentraxinas, una superfamilia de proteínas plasmáticas altamente conservadas dependientes de calcio. La SAP está compuesta por 223 aminoácidos y se encuentra N-glicosilada con una cadena compleja de oligosacáridos biantenarios con un ácido siálico al final. Se produce principalmente en el hígado por los hepatocitos y secretada a la sangre. Se trata de un precursor del componente amiloide P que se encuentra en la membrana basal y está asociado con depósitos de amiloide. Su principal función es participar en la regulación de varios aspectos del Sistema Inmune Innato²².

La evaluación comparativa de sueros de pacientes con PDAC, pancreatitis crónica, e individuos control empleando micromatrices (*microarrays*) de proteínas indicó un aumento en los patrones de fucosilación y de sialilación en diversas glicoproteínas de pacientes con PDAC. Concretamente, tras una etapa de inmunodepleción para facilitar la detección de proteínas menos abundantes, las glicoproteínas separadas se inmovilizaron sobre láminas de nitrocelulosa y se incubaron con 5 lectinas diferentes que cubren más del 95% de los tipos de N-glicanos, y el enlace se visualizó mediante la interacción biotina-estreptavidina-fluoróforo²³.

Entre las glicoproteínas que presentaron este tipo de alteraciones en su perfil de glicosilación se encuentra la proteína SAP, reconocida por la lectina *Sambucus nigra* o SNA que se une preferentemente al ácido siálico enlazado a la galactosa terminal mediante un enlace (α -2,6) y en menor grado mediante un enlace (α -2,3), postulándose como un potencial biomarcador para la detección temprana de cáncer de páncreas.

Más recientemente se han desarrollado inmunoensayos de formato sándwich empleando anticuerpos de captura inmovilizados sobre placas²⁴ o sobre micropartículas²⁵ junto con la lectina SNA para la detección de la proteína SAP. Los resultados obtenidos señalan la capacidad de estos tests para distinguir sueros de pacientes con cáncer de páncreas de sueros control.



2. OBJETIVOS

Recientemente, en el Grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo se ha seleccionado, mediante metodología SELEX, un aptámero frente a la glicoproteína PSA denominado PSA-1 capaz de distinguir entre la forma natural glicosilada y su forma recombinante (sin glicanos). Mediante ensayos de desglicosilación selectiva de la PSA se concluyó que el aptámero PSA-1 reconoce los azúcares externos, fundamentalmente a los ácidos siálicos y a las galactosas, y no a la región peptídica. Por ello, este aptámero podría emplearse como receptor genérico para la detección de glicanos de otras proteínas, imitando así a los receptores naturales, las lectinas, pero con una afinidad más elevada y con las ventajas de estabilidad y síntesis características de un receptor sintético²⁷.

En este contexto, el objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado es el desarrollo de un biosensor electroquímico tipo sándwich para la detección de la proteína amiloide sérica P (SAP), potencial biomarcador de cáncer de páncreas, combinando un anticuerpo específico de esta glicoproteína y el aptámero PSA-1 como receptores de captura y detección, respectivamente.

Con el propósito de alcanzar este objetivo principal se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Selección de un patrón de proteína amiloide sérica P adecuado para desarrollar un biosensor basado en el reconocimiento no solo de la región peptídica de la proteína sino también de sus azúcares.
- 2.- Diseño y evaluación de diferentes estrategias de inmovilización del anticuerpo de captura a una plataforma conductora (electrodo serigrafiado de oro) empleando la lectina *Sambucus nigra* como receptor de detección natural de ácidos siálicos.
- 3.- Evaluación de la posibilidad de sustitución de la lectina *Sambucus nigra* por el aptámero PSA-1 como receptor de detección de los glicanos de la proteína SAP.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Instrumentación

Para la realización de los ensayos electroquímicos se han empleado celdas electroquímicas serigrafiadas (SPCs) del modelo DRP-220BT de Metrohm-DropSens (España). Estas celdas están formadas por tres electrodos: el electrodo de trabajo y el auxiliar o contraelectrodo son de oro mientras que el de referencia es de plata (Figura 2A). El electrodo de trabajo es circular y presenta un diámetro de 4 mm. Para ayudar a su modificación, se bloquearon los electrodos de referencia y el auxiliar de la celda serigrafiada comercial con una capa de esmalte transparente no tensioactivo y se sustituyeron por un electrodo de referencia de Ag | AgCl | KCl (3M) y un

electrodo auxiliar de platino (Pt) externos, sumergidos en un puente salino de KNO_3 (3M) en un dispositivo de jeringa (Figura 2B).

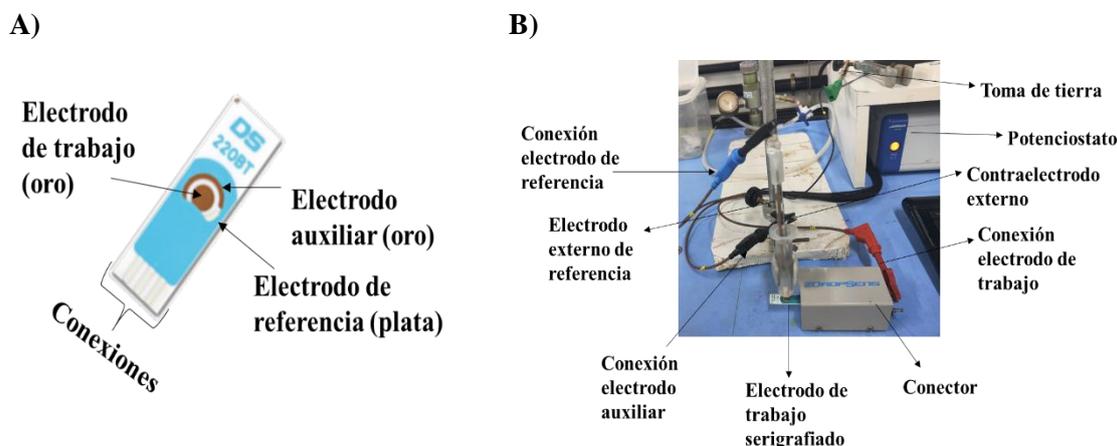


Figura 2. A) Electrodo serigrafiado de oro comercial. B) Esquema de la celda electroquímica empleada formada por un electrodo de referencia externo de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ (3M), un contraelectrodo de platino externo, ambos insertados en una jeringa con KNO_3 3M y un electrodo de trabajo serigrafiado de oro.

Las medidas electroquímicas se realizaron con un potenciostato μ -AutoLab II de Eco Chemie B.V. (Países Bajos) controlado por ordenador mediante el software NOVA 2.1. Se utilizó un conector específico suministrado por Metrohm-DropSens como interfase entre la celda electroquímica serigrafiada y el potenciostato. Para controlar la temperatura de las diferentes etapas del ensayo se empleó una estufa Heraeus Vacutherm de Thermo Fisher Scientific y un Vortex genius 3 de IKA para la homogenización de disoluciones. Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Biotek Eon con lector de microplacas de Biotek (VT, EE.UU.).

3.2 Reactivos

El kit ELISA para la cuantificación de proteína SAP (SEB539Hu-24T) de la casa comercial Cloud-Clone Corporation (EE.UU.) fue proporcionado por bioNova Científica, S.L.. El anticuerpo de captura anti-SAP (ab27313) empleado en el ensayo electroquímico fue suministrado por Abcam (UK). El aptámero PSA-1 cuyo extremo 5' se encuentra marcado con biotina (Biotina-GGA CGG TTG CGC TAT ATT TAA CCA AAA GTC TGG ATT AAC A) fue suministrado por Metabion (Alemania) en formato liofilizado. La proteína SAP humana en forma de lisado celular liofilizado se compró a la casa comercial Lifespan Biosciences (WA, EE.UU.).

El 6-mercaptop-1-hexanol (MH), ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), etanolamina, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB_{red}) en un formato que incluye el H_2O_2 , el ácido 3-aminofenilborónico (APBA, de sus siglas en inglés) y D(+)-glucosa fueron suministrados por Sigma Aldrich (España). La enzima peroxidasa conjugada al fragmento Fab anti-fluoresceína (antiF-POD) fue suministrada por Roche Diagnostics GmbH (Alemania), mientras que el



conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa (strep-POD), la proteína A y la lectina *Sacumbus nigra* (Elderberry Bark) marcada con fluoresceína fueron adquiridas en Thermo Fisher Scientific (España). La PNGasa F y α 2-3,6,8,9 neuraminidasa A o sialidasa A (enzimas glicosidasas) fueron proporcionadas por New England Biolabs (MA, EE.UU.).

Los reactivos necesarios para preparar las disoluciones reguladoras PBS (0,1 M fosfato, 0,154 M NaCl pH 7,4), acetato de sodio o NaAc (10 mM pH 5,5) y HEPES (20 mM pH 8,5) fueron adquiridos en Sigma Aldrich, mientras que el etanol (96%) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado fueron suministrados por J.T. Baker. Todas las disoluciones acuosas empleadas durante este trabajo se prepararon con agua desionizada de alta pureza (18 M Ω ·cm de resistividad) obtenida a partir de un sistema Direct-Q, MilliPore (España).

3.3 Protocolos

3.3.1. Reconstitución del liofilizado de proteína SAP

El lisado celular donde se encuentra la proteína SAP sobreexpresada se reconstituyó siguiendo las directrices de la casa comercial. En primer lugar, se centrifugó el vial a 5000 rpm durante 15 minutos para recuperar el liofilizado y se guardó en nevera durante 4 días. Posteriormente, se añadió 200 μ L de agua desionizada, se agitó suavemente y se hirvió durante cinco minutos. Teniendo en cuenta que la cantidad inicial proporcionada fue de 300 μ g, la concentración del lisado reconstituido es de 1500 μ g/mL. Una vez reconstituido, el liofilizado se alícuotó para su almacenaje a -80°C para su uso a largo plazo y a 4°C para su utilización inmediata.

3.3.2. Ensayo ELISA

El kit ELISA seleccionado para la cuantificación de la proteína SAP consta de los siguientes componentes: una placa de pocillos de microtitulación recubiertos con el anticuerpo de captura, el anticuerpo de detección marcado con biotina y el conjugado enzimático avidina-peroxidasa que se diluyen 100 veces con una disolución reguladora apropiada, la disolución de sustratos de la enzima peroxidasa, y un patrón liofilizado de proteína SAP que se reconstituye en 1 mL de disolución reguladora adecuada, agitando suavemente para evitar la formación de espuma. La disolución resultante de proteína SAP o disolución madre posee una concentración de 200 ng/mL, y a partir de ella se preparan estándares de diferente concentración mediante diluciones seriadas.

El ensayo se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante y consta de las siguientes etapas:

1. Se añaden 100 μ L del estándar o la muestra a cada pocillo y se incuban durante una hora a 37°C .



2. Pasado el tiempo de reacción, se aspira la disolución de los pocillos y se añaden 100 μL del anticuerpo de detección biotinilado y se deja interaccionar durante una hora a $37\text{ }^\circ\text{C}$.
3. Se retira la disolución de los pocillos y se lava 3 veces con la disolución de lavado del kit.
4. Se añaden 100 μL del conjugado enzimático avidina-peroxidasa y se incuba durante media hora a $37\text{ }^\circ\text{C}$.
5. Se aspira la disolución y se realizan 5 lavados con la disolución de lavado.
6. Tras los lavados se retira la disolución de los pocillos, se añaden 90 μL de la mezcla de sustratos de la enzima ($\text{TMB}_{\text{red}} + \text{H}_2\text{O}_2$), y se incuba en oscuridad durante 10 minutos a $37\text{ }^\circ\text{C}$.
7. Finalmente se detiene la reacción enzimática añadiendo 50 μL de ácido sulfúrico e inmediatamente se mide la absorbancia en un lector de placas fijando una longitud de onda de 450 nm.

3.3.3. Acondicionamiento de los electrodos

En primer lugar, es necesario realizar una etapa de limpieza y acondicionamiento electroquímico de la superficie de los electrodos previa su modificación, para ello se lavan con etanol y agua desionizada, y se secan con una corriente de nitrógeno. A continuación, los tres electrodos se cubren con 50 μL de una disolución H_2SO_4 0,5 M y se aplica durante 5 segundos un potencial positivo de 1,3 V. Seguidamente se realizan 10 barridos cíclicos de potencial entre 0 V y 1,3 V a una velocidad de 100 mV/s hasta conseguir un voltagrama cíclico estable (≈ 10 ciclos).

En la Figura 3 se muestra el voltamperograma cíclico característico de oro limpio en el medio indicado. Posteriormente, las celdas serigrafiadas se lavan con agua, se secan con nitrógeno y el electrodo de referencia y el contraelectrodo de la celda serigrafiada se bloquean con una capa de esmalte de uñas de secado rápido.

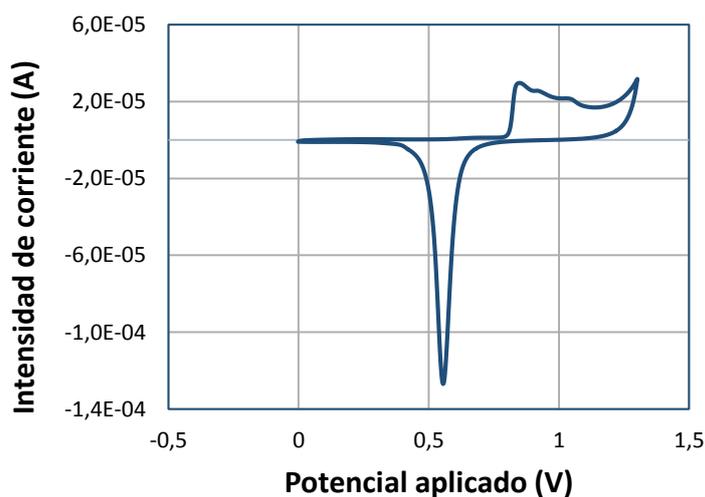


Figura 3. Voltamperograma cíclico resultante de la limpieza del electrodo serigrafiado de oro en medio de ácido sulfúrico 0,5 M.



3.3.4. Construcción de la fase sensora sobre electrodos serigrafiados de oro

La inmovilización del receptor, en este caso el anticuerpo anti-SAP, se lleva a cabo mediante dos estrategias distintas: una basada en el empleo de proteína A y otra que utiliza el ácido 3-aminofenilborónico (APBA). En ambos casos se construye una monocapa autoensamblada o SAM (del inglés *self-assembled monolayer*) funcionalizada con proteína A o con el derivado del ácido borónico APBA para posterior anclaje del anticuerpo anti-SAP.

El método más frecuente para la obtención de SAMs consiste en enlazar compuestos tiolados sobre superficies de oro. En este caso, se escogió el ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) que permite formar un enlace tipo amida entre su grupo carboxilo y los grupos amino presentes en la proteína A o en el ácido 3-aminofenilborónico. Además, se incorpora 6-mercapto-1-hexanol (MH) como diluyente para minimizar impedimentos estéricos derivados de una alta densidad de grupos carboxilo.

A continuación se detalla el procedimiento experimental de inmovilización del anticuerpo de captura anti-SAP para ambas estrategias. Entre las distintas etapas se realizan lavados empleando la disolución reguladora del paso siguiente y se seca la superficie modificada con una corriente de nitrógeno.

3.3.4.1. Inmovilización del anticuerpo a través de la proteína A

Esta estrategia basada en la interacción de afinidad entre la proteína A y el fragmento cristalizante del anticuerpo de captura consta de 5 etapas:

- *Formación de una SAM mixta de ácido 11-mercaptoundecanoico y 6-mercapto-1-hexanol*

Tras la etapa de acondicionamiento, los electrodos serigrafiados de oro se modifican con 10 μL de una disolución 3:1 de 6-mercapto-1-hexanol (MH): ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) para construir una SAM mixta. Para ello, se preparan disoluciones 1 mM de cada tiol en una disolución de acetato de sodio (NaAc) 10 mM (pH 5,5), obtenidas a partir de disoluciones 100 mM en etanol (96%). La mezcla se incubó sobre el electrodo de oro durante toda la noche a 4 °C en atmósfera con humedad controlada para asegurar la correcta formación y organización de la monocapa y evitar la evaporación de la gota. (Figura 4, etapa 1).

- *Activación de los grupos carboxilos de la SAM*

Se añaden 10 μL una disolución 1:1 de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida 100 mM y N-hidroxisuccinimida 25 mM en agua y se deja durante actuar media hora. (Figura 4, etapa 2).

- *Inmovilización de la proteína A*

Una vez realizada la etapa de lavado y secado, se aplican 10 μL de proteína A 250 $\mu\text{g/mL}$ preparada en NaAc, y se incubó durante 30 minutos. (Figura 4, etapa 3).

- *Bloqueo de los grupos carboxilos activados que no hayan unido proteína A*

Los grupos carboxilo activados que no se unieron a la proteína A deben ser bloqueados para prevenir uniones inespecíficas. La etapa de bloqueo se llevó a cabo con etanolamina 1M en PBS dejándola reaccionar 15 minutos a temperatura ambiente (Figura 4, etapa 4).

- *Inmovilización del anticuerpo de captura*

La superficie del electrodo de trabajo funcionalizada con proteína A se incubó durante 30 minutos con 10 μ L de una disolución 75 μ g/mL del anticuerpo de captura anti-SAP en PBS. (Figura 4, etapa 5).

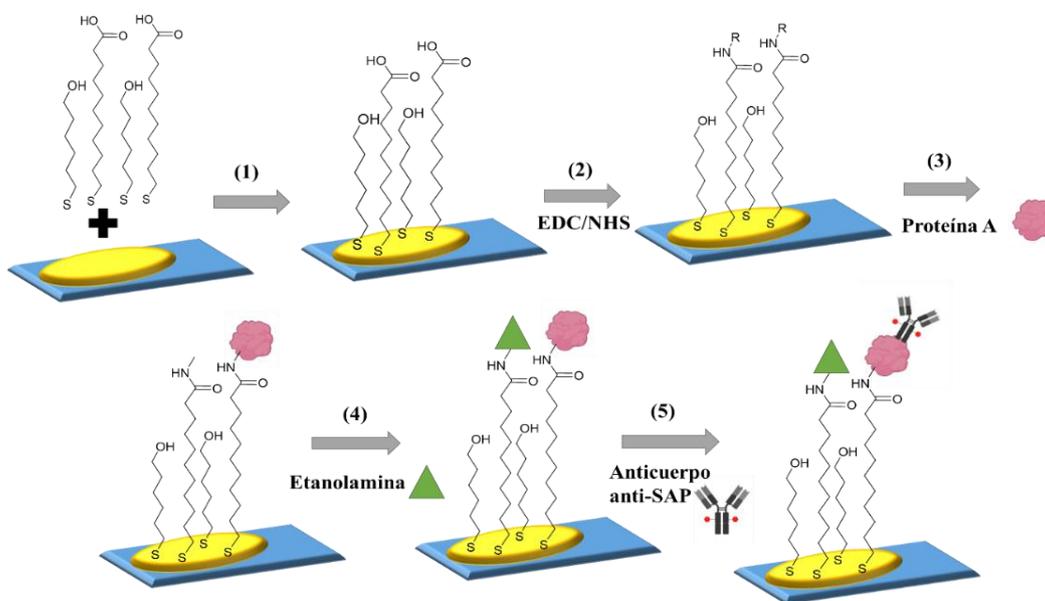


Figura 4. Esquema de la preparación de la fase sensora siguiendo la estrategia basada en la proteína A: (1) formación de la SAM mixta, (2) activación de los grupos carboxilo, (3) inmovilización covalente de la proteína A, (4) bloqueo de los grupos carboxilo activados, (5) enlace de afinidad del anticuerpo.

3.3.4.2. Inmovilización del anticuerpo a través de un derivado del ácido borónico

Para anclar el anticuerpo anti-SAP sobre electrodos serigrafados de oro empleando el derivado del ácido borónico, ácido 3-aminofenilborónico (APBA) se procedió como sigue:

- *Formación de una SAM mixta de ácido 11-mercaptoundecanoico y 6-mercapto-1-hexanol*

Los electrodos serigrafados de oro previamente acondicionados se cubren con 10 μ L de una disolución 3:1 de MH:MUA y se incuban durante toda la noche a 4 $^{\circ}$ C en atmósfera con humedad controlada para obtener la SAM mixta correspondiente. (Figura 5, etapa 1).

- *Activación de los grupos carboxilos de la SAM*

Se añaden 10 μ L una disolución 1:1 de EDC 100 mM y NHS 25 mM en agua y se incubó durante media hora. (Figura 5, etapa 2).



- **Preparación de la superficie funcionalizada con APBA**

Tras la etapa de lavado y secado, se añaden 10 μL de APBA 50 mM preparado en PBS y se deja reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente en presencia de una atmósfera saturada de agua para prevenir la evaporación de la gota sobre el electrodo. (Figura 5, etapa 3).

- **Bloqueo de los grupos carboxilos activados que no hayan enlazado APBA**

Se añade a los electrodos 10 μL de etanolamina 1M en PBS durante 15 minutos. (Figura 5, etapa 4).

- **Inmovilización del anticuerpo de captura sobre la superficie funcionalizada con APBA**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación con APBA, se procede al lavado y secado de la superficie modificada. A continuación, se añaden 10 μL de anticuerpo anti-SAP 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en HEPES de pH 8,5 durante una hora. (Figura 5, etapa 5).

- **Bloqueo de los sitios de unión del APBA a los que no ha enlazado el anticuerpo**

Los grupos APBA a los que no se ha unido anticuerpo se bloquearon con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de glucosa en PBS durante 15 minutos para evitar las interacciones indeseadas entre el ácido borónico y los carbohidratos de la proteína SAP. (Figura 5, etapa 6).

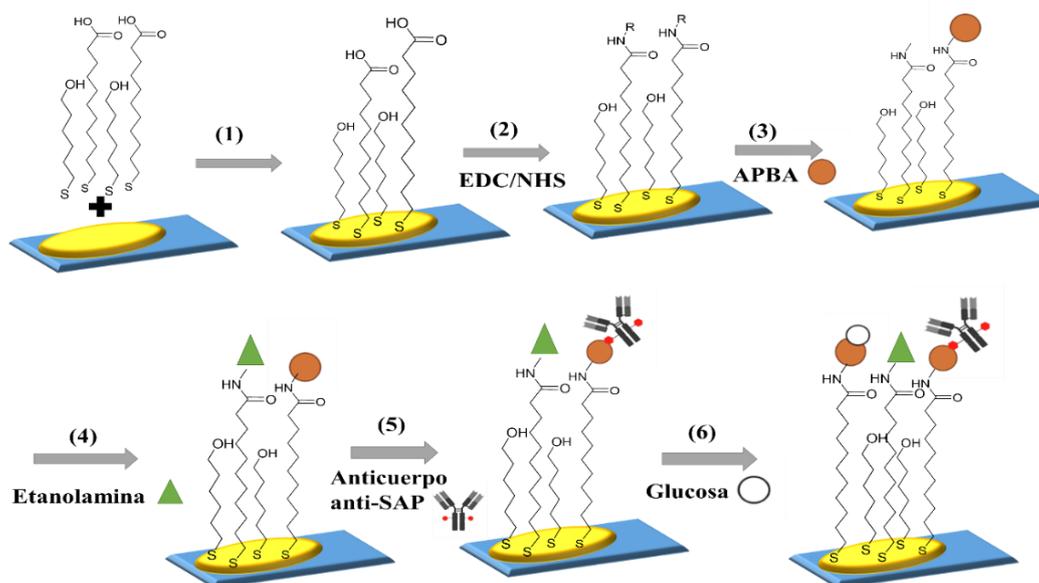


Figura 5. Esquema de la preparación de la fase sensora siguiendo la estrategia basada en el derivado del ácido borónico: (1) formación de la SAM mixta, (2) activación de los grupos carboxilo, (3) inmovilización covalente del APBA, (4) bloqueo de los grupos carboxilo activados, (5) enlace de afinidad del anticuerpo, (6) bloqueo de los ácidos borónicos que no han enlazado anticuerpo.

3.3.5. Ensayo sándwich electroquímico

Para la cuantificación de la proteína SAP empleando el anticuerpo anti-SAP como receptor de captura inmovilizado sobre superficies de oro funcionalizadas bien con proteína A o bien con el ácido 3-aminofenilborónico, se procedió como sigue:



- **Captura de la proteína SAP:**

Los electrodos de oro modificados con la fase sensora se incuban con 10 μL del lisado celular que contiene la proteína SAP en la concentración deseada, y se deja reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- **Unión del receptor de detección**

La superficie de oro modificada se cubre con 10 μL del receptor de detección: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lectina SNA-6FAM preparada en PBS o 1 μM de aptámero PSA-1 modificado con biotina, y se incuban durante media hora a temperatura ambiente. Cuando se trabaja con la lectina marcada con fluoresceína, ésta se debe proteger de la luz.

- **Marcaje enzimático**

Se añaden 10 μL del conjugado enzimático adecuado, fragmento Fab-anti fluoresceína-peroxidasa (antiF-POD) o estreptavidina-peroxidasa dependiendo de si se emplea la lectina SNA marcada con 6FAM o el aptámero PSA-1 biotinilado, respectivamente, en una concentración de 0,5 U/mL preparado en PBS-0,5% caseína. La reacción se deja que transcurra durante 30 minutos.

- **Reacción enzimática y medida electroquímica**

Se cubren los tres electrodos de la celda electroquímica con 35 μL de la disolución comercial que contiene los sustratos de la enzima (TMB_{red} y H_2O_2). Tras 30 s de reacción enzimática, se mide la cantidad de TMB_{ox} generado mediante cronoamperometría aplicando al electrodo de trabajo un potencial de -0,2 V durante 60 s. En la Figura 6 se ilustran las etapas implicadas en este protocolo.

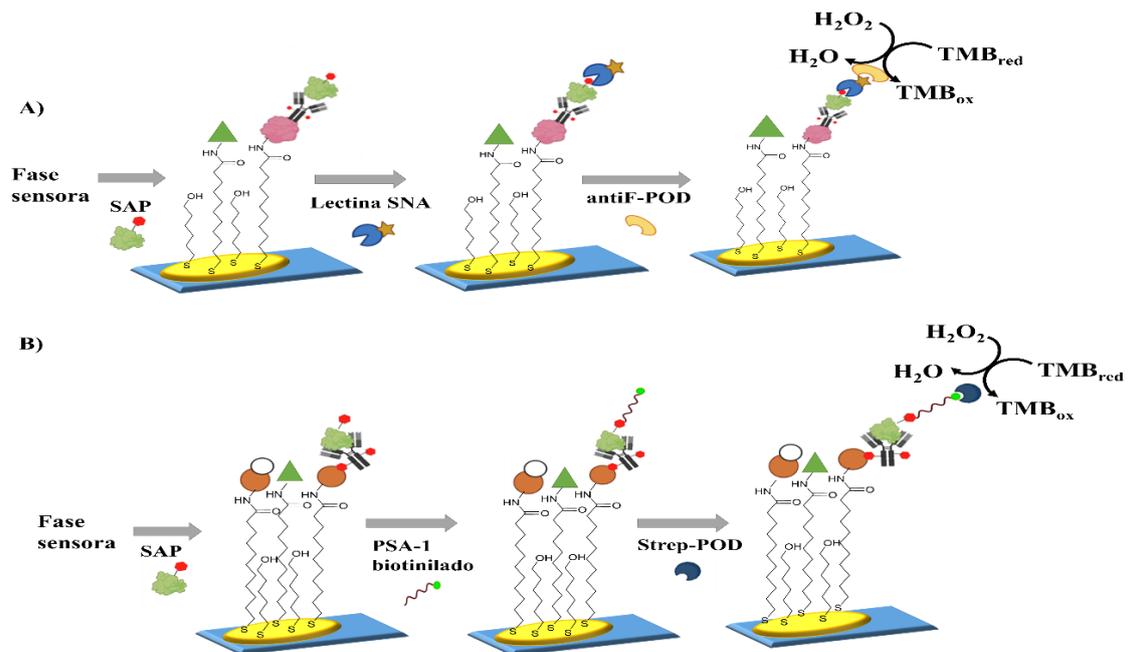


Figura 6. Esquema del ensayo sándwich electroquímico. El apartado A) ilustra el ensayo sándwich electroquímico utilizando la lectina y el B) el aptámero PSA-1 como receptores de detección, respectivamente.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cuantificación de la proteína amiloide sérica P mediante un inmunoensayo ELISA

La proteína amiloide sérica P disponible comercialmente se encuentra en forma de lisado celular liofilizado, por lo que se procedió a su reconstitución siguiendo las recomendaciones del fabricante para evitar la formación de agregados (ver sección 3.3.1 de la memoria). La casa comercial no indica el porcentaje de proteína SAP presente en el producto adquirido; por tanto, para determinar su concentración en el liofilizado reconstituido se decidió emplear un kit ELISA diseñado para cuantificar esta proteína en muestras de suero, plasma, tejidos y otros fluidos biológicos.

Se trata de un inmunoensayo de formato sándwich en el que participan dos anticuerpos: un anticuerpo de captura adsorbido sobre la superficie del soporte donde se lleva a cabo el ensayo y un anticuerpo de detección marcado con biotina. De acuerdo con la información proporcionada por la casa comercial, el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal de ratón, y el anticuerpo de detección es un anticuerpo policlonal de conejo, ambos específicos de la proteína SAP. Si en la disolución evaluada está presente la proteína SAP, ésta será reconocida por ambos anticuerpos y sobre el soporte sólido se formará un complejo sándwich anticuerpo de captura-proteína SAP-anticuerpo de detección. A continuación, se incorpora la enzima peroxidasa (POD) que actúa como marca a través de la reacción de afinidad biotina-avidina.

La etapa final del inmunoensayo consiste en la medida de la actividad enzimática inmovilizada sobre los pocillos, la cual está relacionada con la cantidad de proteína SAP presente inicialmente en la disolución. Para ello se emplea un método de tiempo fijo, midiendo la cantidad de producto enzimático formado después de que la reacción catalizada por la enzima POD ha transcurrido un tiempo controlado, en este caso 10 minutos. El sustrato de la enzima, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, TMB_{red}, es oxidado por el peróxido de hidrógeno en presencia de POD que actúa como biocatalizador, el producto de oxidación es de color azul y tras la adición de ácido sulfúrico adopta un color amarillo que posee un máximo de absorbancia a 450 nm.

Para determinar la concentración de proteína SAP en la disolución del liofilizado comercial se construyó una curva de calibrado empleando 7 estándares del patrón de proteína proporcionado por el kit, de concentraciones comprendidas entre 1,56 ng/mL(0,086 nM) y 100 ng/mL(5,53 nM), además de un blanco que no contiene proteína. Los valores de absorbancia registrados a 450 nm se representaron frente a la concentración de proteína en el estándar, obteniendo los datos recogidos en la Figura 7.

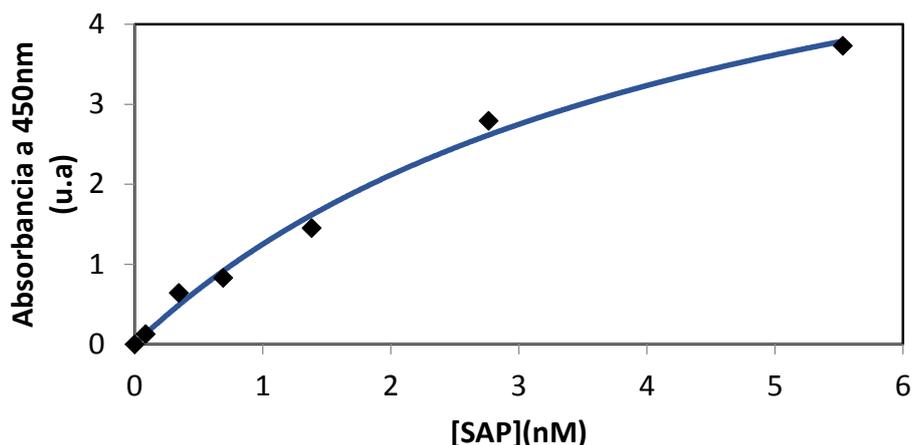


Figura 7. Curva de calibrado obtenido para la proteína SAP con el kit ELISA. Los rombos representan los valores de absorbancia registrados. La línea azul representa el ajuste de los datos a la Ecuación 1 empleando el programa Origin 8.5.1.

Empleando el programa informático Origin 8.5.1., los datos experimentales se ajustaron a la Ecuación 1 que se corresponde con una hipérbola equilátera:

$$y = \frac{y_{max} x}{C_{50} + x} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde y es la absorbancia a 450 nm; x es la concentración de proteína expresada en nanomolar; y_{max} es la respuesta a concentración infinita de proteína, es decir, el máximo valor de absorbancia que corresponde a la saturación de los sitios de unión del anticuerpo de captura; C_{50} se corresponde con la concentración de proteína para la cual la absorbancia registrada es la mitad del valor máximo.

Los valores obtenidos a partir del ajuste fueron $y_{max} = (6,9 \pm 0,8)$ u.a. y $C_{50} = (4,5 \pm 1,0)$ nM, con un valor de $R^2=0,991$ indicativo de un buen ajuste.

La cantidad de proteína SAP en la disolución del liofilizado se determina interpolando en la Ecuación 1 el valor de absorbancia registrado a 450 nm. De esta forma, se obtuvo un valor de $(0,95 \pm 0,08)$ nM para la disolución más concentrada de proteína SAP que equivale a 24 ± 2 ng/mL. Para este cálculo se tuvo presente que el patrón del kit ELISA se trata de un fragmento de 159 aminoácidos (Ala65-Val223), mientras que la proteína completa presente en el liofilizado comercial consta de 223 aminoácidos (Met1-Val223) con un peso molecular de 25387 Da.

Al tratarse de una concentración de proteína relativamente baja que además no se encuentra en forma pura, se planteó la posibilidad de emplear el patrón de proteína SAP suministrado con el kit ELISA para el desarrollo del aptasensor electroquímico. Como se ha comentado, este patrón es un fragmento que corresponde al 71 % de la proteína total, se encuentra purificado y su concentración es perfectamente conocida, por lo que podría ser una alternativa al lisado celular.



Sin embargo, resulta imprescindible que este fragmento peptídico se encuentre glicosilado para poder estudiar la idoneidad del aptámero como receptor.

Para evaluar si el péptido patrón se encuentra o no glicosilado, se decidió realizar el ensayo ELISA sustituyendo el anticuerpo de detección por el aptámero PSA-1 biotinilado, que como se ha comentado reconoce los glicanos de la proteína PSA, o por la lectina *Sacubus nigra* (SNA) capaz de reconocer los ácidos siálicos presentes en la proteína SAP natural, como se detalla en la introducción de esta memoria. Así, diferencias de absorbancia entre el control negativo (sin patrón) y el control positivo (en presencia del patrón) apuntarían a que el péptido patrón suministrado con el kit ELISA estaría glicosilado.

Se comenzó utilizando el aptámero como receptor de detección del ensayo sándwich espectrofotométrico, y se realizaron dos controles negativos y dos controles positivos empleando 0 y 25 ng/ mL de péptido patrón, respectivamente. Tanto en ausencia como en presencia del patrón de SAP se obtuvieron valores de absorbancia muy bajos, del orden de 0,06 u.a. En paralelo, también se evaluó un control negativo del ensayo comercial empleando el anticuerpo de detección del kit. En este caso, la absorbancia registrada estaba dentro del intervalo de valores habituales (0,27±0,02 u.a.), de lo que se dedujo que la estabilidad de los reactivos del kit no estaba comprometida. El registro de señales tan bajas cuando se utiliza el aptámero PSA-1 biotinilado parece indicar que éste no se está uniendo al péptido patrón del kit ya sea porque éste no está glicosilado o bien porque el aptámero PSA-1 no es capaz de reconocer los azúcares del patrón.

Para tratar de aclarar esta cuestión, a continuación se llevó a cabo el ensayo sándwich espectrofotométrico empleando la lectina SNA. Esta se encuentra disponible comercialmente modificada con fluoresceína, por lo que fue necesario sustituir el conjugado enzimático avidina-POD del kit ELISA por el conjugado enzimático fragmento Fab anti-fluoresceína-POD. Se realizaron controles negativos y positivos equivalentes a los evaluados con el ensayo que involucra al aptámero PSA-1 y tampoco se observaron diferencias significativas en las señales obtenidas. Resultó llamativo los elevados valores de absorbancia registrados en ausencia y presencia del péptido patrón, próximos al máximo registrado por el espectrofotómetro, lo que parece indicar que la lectina se une de forma inespecífica a algún reactivo del kit ELISA.

Los resultados experimentales apuntan a que el péptido patrón incluido en el kit ELISA no se encuentra glicosilado. Recientemente fue posible confirmar con el fabricante que, efectivamente, esto era así pues el péptido patrón es un péptido recombinante producido en *E. coli*, bacteria que carece de la maquinaria de glicosilación. Por tanto, el péptido patrón del kit no resulta útil para los objetivos del trabajo, y se retomó el empleo del lisado celular reconstituido y con su contenido en proteína SAP determinado mediante el kit ELISA.



4.2. Diseño de un bioensayo electroquímico de formato sándwich

Para la detección de la proteína amiloide sérica P o SAP, se propone el desarrollo de un biosensor electroquímico tipo sándwich que involucra dos etapas de reconocimiento molecular, lo que aporta una mayor selectividad al ensayo resultante.

4.2.1. Transducción electroquímica

En este trabajo se seleccionó un método cronoamperométrico para convertir la señal química derivada del reconocimiento molecular entre la proteína SAP y sus receptores en una señal eléctrica medible. Como molécula informadora o marca se emplea una enzima debido a su enorme poder amplificador de la señal, concretamente se seleccionó la peroxidasa (POD), también usada en el kit ELISA comercial. Ésta se incorpora al complejo sándwich inmovilizado a través de una interacción de afinidad biotina-estreptavidina, o bien entre 6-carboxifluoresceína (6FAM) y el fragmento Fab antifluoresceína (antiF), según el receptor de detección evaluado.

Durante la reacción enzimática, la forma reducida de la enzima (POD_{red}) cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua, generándose la forma oxidada de la enzima (POD_{ox}). Para completar el ciclo catalítico y obtener de nuevo la forma reducida de la enzima, se utiliza como cosustrato la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina en su forma reducida (TMB_{red}), que se oxida. Esta especie oxidada se reduce sobre la superficie del electrodo serigrafado cuando se aplica el potencial adecuado, generándose una corriente catódica, que es la señal analítica (Figura 8).

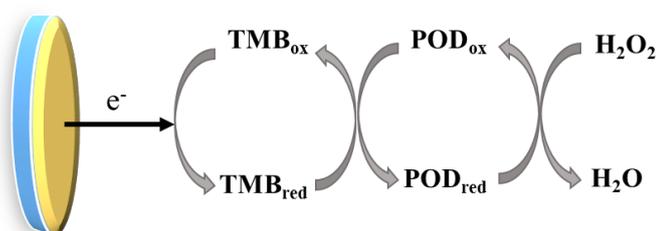


Figura 8. Reacción de oxidación enzimática del TMB catalizada por el enzima peroxidasa en presencia de H_2O_2 y posterior detección electroquímica.

La cronoamperometría es una técnica que permite registrar, de forma rápida y sencilla, la corriente generada en función del tiempo sobre el electrodo de trabajo a un determinado potencial constante, al cual una especie electroactiva se encuentra totalmente oxidada o reducida. La corriente generada es proporcional al gradiente de concentración formado sobre la superficie del electrodo. El potencial aplicado para realizar las medidas cronoamperométricas se determinó estudiando el comportamiento electroquímico del sustrato TMB_{red} mediante voltamperometría cíclica, técnica que registra la intensidad de corriente generada cuando se produce una variación lineal en el tiempo de potencial de manera cíclica sobre el electrodo de trabajo²⁶. En este caso, se realizó un barrido cíclico de potencial entre -0,3 V y +0,8 V a una velocidad de barrido de 100



mV/s que permitió obtener el voltamperograma cíclico mostrado en la Figura 9. A partir de él se seleccionó un valor de -0,2 V para realizar la cronoamperometría que asegura la reducción completa de TMB.

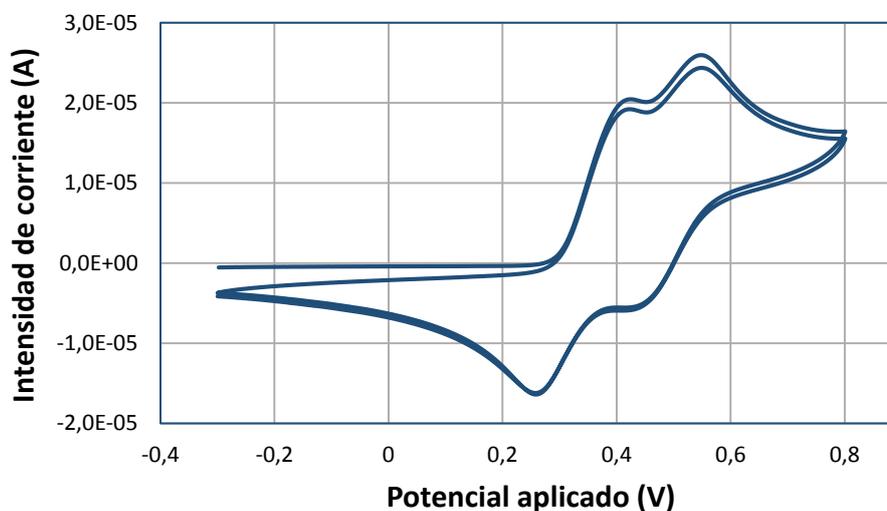


Figura 9. Voltamperograma cíclico de TMB sobre el electrodo serigrafado de oro. Velocidad de barrido 100 mV/s.

4.2.2. Diseño de un bioensayo sándwich mixto

Para el desarrollo del biosensor de formato sándwich con amplificación enzimática se propone utilizar un anticuerpo de captura monoclonal tipo IgG1 de ratón (anti-SAP) y como receptor de detección se evaluará comparativamente el empleo de la lectina SNA con afinidad por los ácidos siálicos y el aptámero PSA-1 que reconoce los azúcares de la glicoproteína PSA asociada al cáncer de próstata.

4.2.2.1. Empleo de la lectina SNA como receptor de detección

La inmovilización del anticuerpo anti-SAP es una etapa muy importante en el desarrollo del biosensor que afecta directamente a su sensibilidad. Sería deseable que el número de anticuerpos anclados sobre la superficie del electrodo fuese elevado y con una orientación adecuada que le permita unirse a la proteína SAP.

Las estrategias de inmovilización de anticuerpos descritas en la literatura se pueden agrupar en dos categorías:

- (a) inmovilización al azar
- (b) inmovilización orientada o a través de una región específica.

La inmovilización por adsorción es un método muy sencillo que no requiere modificar la superficie con grupos funcionales. Sin embargo, proporciona un escaso control de la orientación



del anticuerpo que podría adsorberse a través de la región Fab impidiendo la unión posterior del antígeno.

La inmovilización orientada se basa en el anclaje del anticuerpo a través de su fragmento cristalizable o región Fc lejos del sitio de unión al antígeno (ver Figura 10), lo que resulta una opción más interesante que la adsorción. Dentro de esta categoría se seleccionó la estrategia basada en la proteína A. Se trata de una proteína de la pared celular bacteriana de *Staphylococcus aureus* capaz de unirse a la región Fc de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, especialmente a inmunoglobulinas de tipo G o IgG, resultando muy adecuada para inmovilizar el anticuerpo anti-SAP. Este tipo de inmovilización de anticuerpos ha sido ampliamente utilizado para el desarrollo de inmunosensores electroquímicos²⁸⁻³⁰.

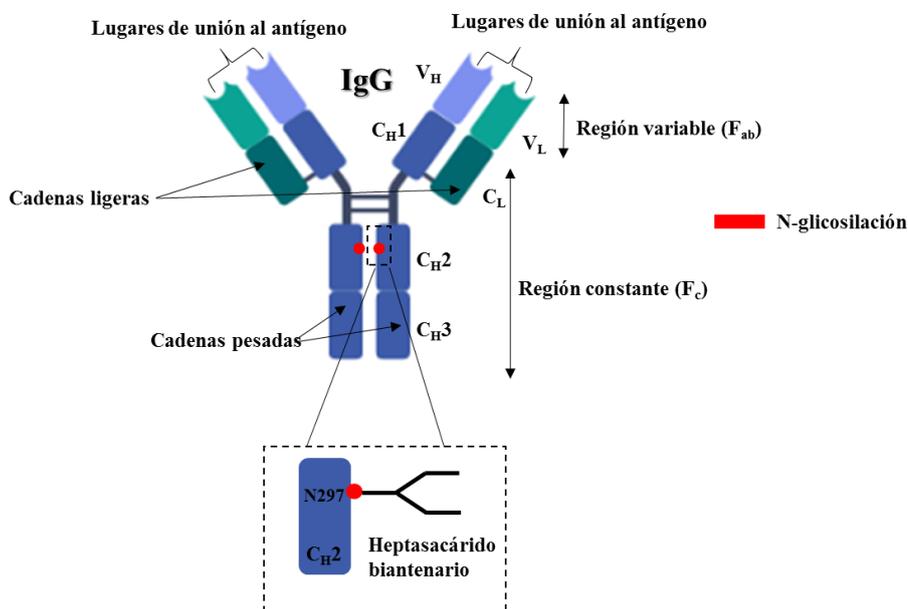


Figura 10. Estructura general de una inmunoglobulina G. Se representa y detallan los sitios de unión al antígeno (fragmentos Fab) y los fragmentos cristalizables (Fc) cuyo dominio C_{H2} se encuentra N-glicosilado.

El protocolo empleado para modificar los electrodos de oro con la proteína A para posterior anclaje del anticuerpo anti-SAP aparece detallado en la sección 3.3.4.1 de la memoria. Brevemente, se construye una monocapa autoensamblada mixta de los tioles 11-mercaptopundecanoico (MUA) y 6-mercaptop-1-hexanol (MH) sobre la superficie del electrodo de trabajo previamente acondicionado. A continuación, se activan los grupos carboxilo de MUA con carbodiimida y succinimida para la posterior inmovilización de la proteína A a través de sus grupos amino. Tras el bloqueo con etanolamina de los grupos carboxilo que no han unido proteína A, se inmoviliza el anticuerpo anti-SAP (ver Figura 4).

Para determinar la viabilidad de esta estrategia, se procedió a realizar el ensayo sándwich como se describe en la sección 3.3.5 y se esquematiza en la Figura 6, incubando la fase sensora



descrita anteriormente con cantidades variables de proteína SAP. Seguidamente, la superficie se incubaba con un exceso de lectina SNA que se encuentra marcada con 6-carboxifluoresceína. A continuación, se realiza una etapa de marcaje con el conjugado enzimático fragmento Fab-anti-fluoresceína-peroxidasa (antiF-POD). Finalmente, para determinar la actividad enzimática inmovilizada sobre la fase sensora, la cual está directamente relacionada con la cantidad de proteína SAP enlazada, se incorporan los sustratos de la enzima, peróxido de hidrógeno y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB_{red}), sobre la superficie del electrodo serigrafiado para que tenga lugar la reacción enzimática durante un tiempo controlado, en este caso 30 segundos. La cantidad de TMB_{ox} generado enzimáticamente se cuantifica mediante cronoamperometría aplicando un potencial de -0,2 V sobre el electrodo de trabajo durante 1 minuto. Como señal analítica se emplea la media de los valores de intensidad de corriente registrados durante los últimos 10 segundos en valor absoluto (según el criterio IUPAC, las corrientes de reducción se consideran negativas).

Como se muestra en la Figura 11A, las señales medidas en ausencia de proteína SAP (control negativo) fueron muy elevadas e irreproducibles, y la incorporación de la proteína a niveles de 24 ng/mL no supuso un cambio significativo de señal respecto al control negativo. La elevada intensidad de corriente registrada en ausencia de proteína SAP indica que la lectina se está uniendo de forma inespecífica a otro componente del ensayo. Dado que el anticuerpo de captura pertenece a la clase G de inmunoglobulinas, se encuentra N-glicosilado en la asparagina 297 de los dominios C_H2 de la región Fc (ver Figura 10). Por ello, es posible que la lectina SNA, que se une preferentemente a los ácidos siálicos, se enlace a esta región glicosilada del anticuerpo anti-SAP. En la Figura 11B se muestra un esquema que ilustra la hipótesis propuesta.

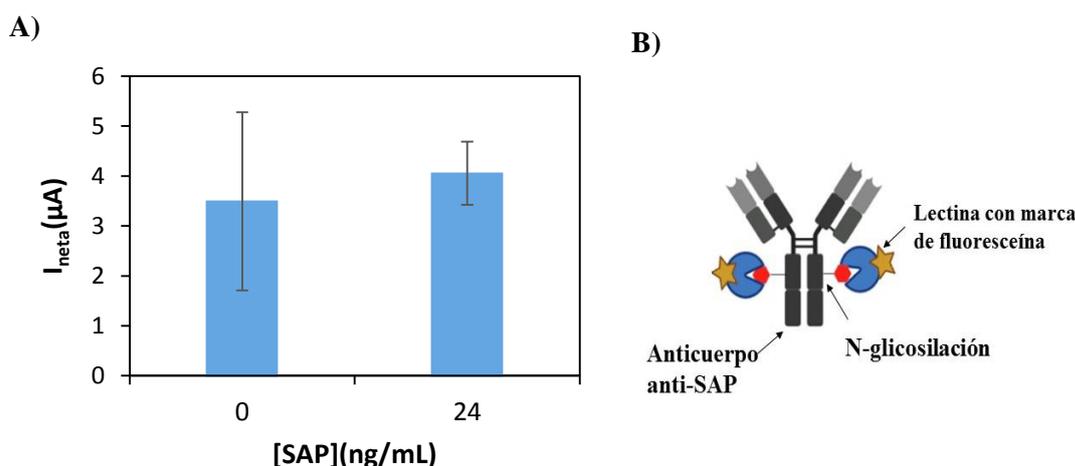


Figura 11. A) Intensidades de corriente obtenidas con el biosensor electroquímico de formato sándwich inmovilizando el anticuerpo de captura a través de la proteína A en ausencia (0 ng/mL) y presencia (24 ng/mL) proteína SAP. B) Posible unión de la lectina SNA a la región glicosilada del anticuerpo de captura causando señales de blanco muy elevadas e inespecíficas.



Para tratar de evitar la posible interacción de la lectina SNA con los azúcares del anticuerpo de captura anclado a la superficie del electrodo, se propone el empleo de enzimas glicosidasas capaces de hidrolizar determinados enlaces glicosídicos de los glicanos unidos a proteínas. Concretamente, se seleccionaron dos glicosidasas, la péptido-N-glicosidasa F, también conocida como PNGasa F, una amidasa que rompe el enlace entre residuos N-acetilglucosamina (GlcNAc) y asparagina (Asn) de las glicoproteínas, y la α 2-3, 6, 8, 9 neuraminidasa A o sialidasa A, que cataliza la hidrólisis de todos los ácidos siálicos terminales, lineales o ramificados, de glicoproteínas humanas (NeuAc). En la Figura 12 se representa el tipo de hidrólisis catalizada por estas enzimas.

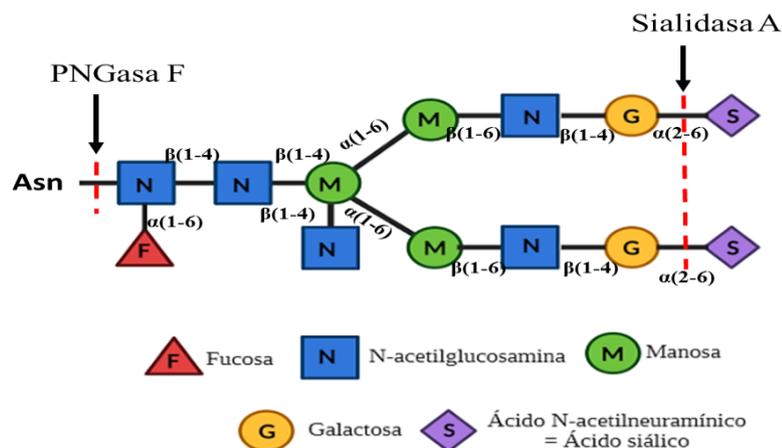


Figura 12. Representación esquemática de la estructura general de N-glicanos complejos y los enlaces hidrolizados por las glicosidasas PNGasa F y sialidasa A.

Se repitió el ensayo sándwich descrito anteriormente incorporando una etapa adicional de desglicosilación enzimática con PNGasa F o sialidasa A tras la inmovilización del anticuerpo y antes del bloqueo con etanolamina. En el caso de la PNGasa F, al tratarse de una endoglicosidasa (enzima que rompe la cadena de polisacáridos entre residuos que no ocupan una posición terminal) requiere un tiempo de reacción largo. El fabricante recomienda realizar la desglicosilación a 37 °C durante 4-24 horas cuando la glicoproteína se encuentra en disolución. En este caso, como el anticuerpo anti-SAP está unido a la superficie del electrodo, se decidió llevar a cabo la incubación durante 24 horas en una estufa a 37±1 °C, en atmósfera saturada de humedad para evitar la evaporación de la disolución. La sialidasa A, sin embargo, es una exoglicosidasa, es decir, rompe la cadena de polisacáridos en el residuo terminal, por lo que con 2 h de reacción a 37 °C resulta suficiente. Para detener ambas reacciones, en lugar de inactivar la enzima calentando a 65-75 °C como recomienda el fabricante, una vez transcurrido el tiempo deseado simplemente se retiró la disolución y se lavó el electrodo, para evitar la degradación térmica de la fase sensora.



Con ninguna de las dos estrategias ensayadas fue posible reducir la señal del control negativo por debajo de los 4 microamperios. Esto puede ser debido a que, en el caso de la PNGasa F, la eliminación completa de los glicanos de la estructura de lugar a una pérdida parcial de la funcionalidad y especificidad del anticuerpo³¹. Por otra parte, la ausencia de éxito mediante el empleo de la sialidasa A podría deberse a que el anticuerpo de captura no presente ácidos siálicos en su estructura. También es importante destacar que estas enzimas se emplean principalmente en técnicas electroforéticas y cromatográficas por lo que resulta difícil lograr una reacción enzimática completa y controlada sobre electrodos serigrafados de oro³².

Ante las dificultades encontradas con la estrategia de inmovilización del anticuerpo basada en la reacción de afinidad con la proteína A enlazada al electrodo, se decidió explorar una estrategia alternativa. Continuando con la idea original de conseguir la inmovilización orientada del anticuerpo, y tratando de sortear la posible interacción inespecífica de la lectina SNA y los carbohidratos del anticuerpo de captura, se evaluó la posibilidad de anclar el anticuerpo a través de sus azúcares. Esto puede realizarse de dos formas, ambas basadas en la química característica de los dioles vecinales presentes en los N-glicanos unidos al anticuerpo. Una de ellas consiste en la oxidación de dioles a aldehídos para su posterior interacción con grupos nucleófilos enlazados a superficie. La otra opción se basa en la reacción de *cis*-dioles con ácidos borónicos anclados a superficie para formar ésteres borónicos (ver Figura 13). Esta última presenta tres ventajas importantes: (a) los sitios de unión del anticuerpo quedan libres y alejados de la superficie, (b) no requiere modificación previa del anticuerpo, a diferencia de la oxidación de dioles con peryodato, (c) es más económica cuando se compara con la unión de la región Fc a superficies modificadas con la proteína A.

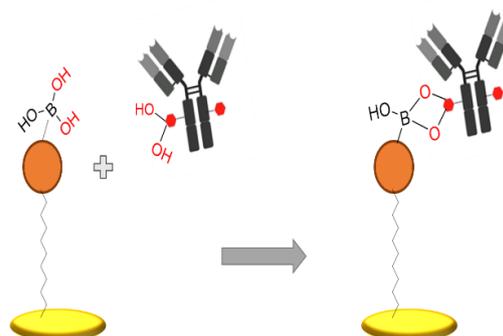


Figura 13. Principio de inmovilización de anticuerpos orientados utilizando ácidos borónicos. A la izquierda se muestra de forma separada el ácido borónico inmovilizado sobre la superficie y un esquema de una inmunoglobulina con su región glicosilada resaltada. A la derecha se muestra el éster borónico.

Por todo lo anterior, se decidió explorar la inmovilización del anticuerpo anti-SAP a electrodos serigrafados de oro funcionalizados con un derivado del ácido borónico, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.4.2 de esta memoria. Este consiste en la formación de una monocapa autoensamblada mixta de los tioles MUA y MH sobre oro para posteriormente enlazar el amino derivado del ácido borónico ácido 3-aminofenilborónico (APBA) a los grupos carboxilo de MUA mediante la reacción de la carbodiimida. Tras bloquear con etanolamina los grupos ácido de MUA que no enlazaron APBA, se inmoviliza el anticuerpo anti-SAP. Por último, para evitar la unión no deseada de los azúcares de la proteína SAP al APBA libre, se realiza una etapa de bloqueo con glucosa. En la Figura 5 se muestra un esquema completo del protocolo.



Con la fase sensora resultante se llevó a cabo el ensayo sándwich empleando la lectina SNA marcada con 6FAM como receptor de detección, y el conjugado enzimático antiF-POD para amplificar la señal electroquímica registrada. Sorprendentemente, al igual que con la estrategia de inmovilización del anticuerpo basada en la proteína A, no se observaron diferencias significativas entre la señal del control negativo y la correspondiente a una concentración de 24 ng/ mL de proteína SAP. Estos resultados descartarían la hipótesis del enlace de la lectina a los azúcares del anticuerpo.

Ante la dificultad de obtener un ensayo sándwich para detectar la proteína de interés empleando la lectina SNA modificada con 6FAM, se decidió explorar las estrategias de inmovilización del anticuerpo anti-SAP evaluadas anteriormente, pero utilizando el aptámero PSA-1 biotinilado como receptor de detección, en sustitución de la lectina SNA.

4.2.2.2. Empleo del aptámero PSA-1 como receptor de detección

Como se ha comentado en la Introducción, la proteína amiloide sérica P es una glicoproteína cuyo patrón de glicosilación en pacientes con cáncer de páncreas se ve alterado, observándose un incremento de ácidos siálicos y fucosas en la estructura glicosilada⁸. Por otra parte, se ha demostrado que el aptámero PSA-1 se une de forma selectiva a los glicanos de la glicoproteína PSA, con una elevada afinidad¹⁹. Concretamente, distintos estudios apuntan a que el aptámero PSA-1 se enlaza a los azúcares externos (ácidos siálicos y galactosa) de la PSA, postulándose como un posible receptor para la detección de otras glicoproteínas humanas que presenten este tipo de azúcares, entre ellas la empleada en este estudio²⁷. Es por ello que se procedió a evaluar la idoneidad de utilizar el aptámero PSA-1 como receptor de detección en el ensayo sándwich para la cuantificación de la proteína SAP.

Se comenzó estudiando la respuesta del ensayo sándwich en el que el anticuerpo de captura se encuentra inmovilizado sobre electrodos funcionalizados con la proteína A, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.5. La corriente eléctrica obtenida en ausencia de proteína SAP disminuyó más de 3 veces respecto al valor registrado con un ensayo equivalente empleando la lectina SNA. Además, como muestra la Figura 14, la señal medida aumenta con la concentración de proteína, lo que apunta a que el aptámero PSA-1 es capaz de enlazarse a la proteína SAP.

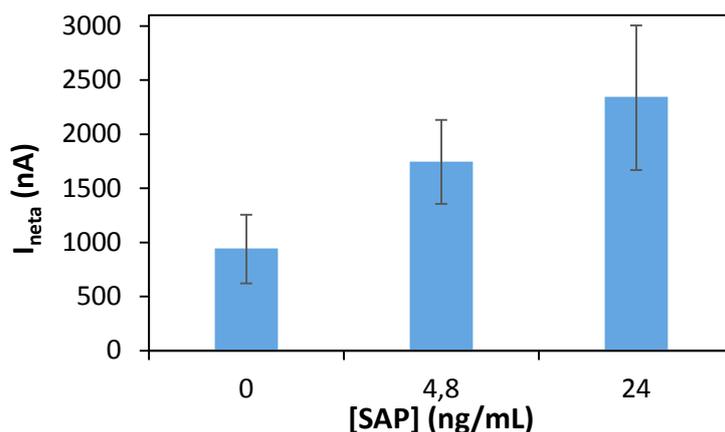


Figura 14. Resultados del aptaensayo tipo sándwich mediante la técnica de inmovilización del anticuerpo anti-SAP basada en la proteína A. En el gráfico se muestran las intensidades de señal obtenidas por cronamperometría a $-0,2V$ para distintas concentraciones de proteína SAP.

A pesar de las diferencias de señal en ausencia y presencia de proteína amiloide sérica P, la señal del blanco sigue siendo relativamente alta (promedio en torno a $1 \mu A$). Esto puede deberse a que el aptámero PSA-1 es capaz de reconocer y unirse a los glicanos presentes en el anticuerpo inmovilizado. Por ello, con el objetivo de reducir la corriente eléctrica del control negativo se exploró la respuesta del ensayo sándwich donde el anticuerpo de captura se inmoviliza sobre un electrodo de oro funcionalizado con el derivado del ácido borónico APBA, de acuerdo con el protocolo detallado en la sección 3.3.4.2.

Como se muestra en la Figura 15, la señal del blanco obtenida es mucho más pequeña y reproducible que la registrada empleando el método de inmovilización anterior (194 ± 51 nA frente a 939 ± 317 nA) y se diferencia de las señales medidas para concentraciones crecientes de SAP. Asimismo, con este aptasensor la señal crece al aumentar la concentración de proteína hasta que se alcanza la saturación a una concentración de SAP de 24 ng/mL, a partir de esta concentración no se aprecian variaciones significativas de señal. La reproducibilidad promedio del ensayo es del 9,4%.

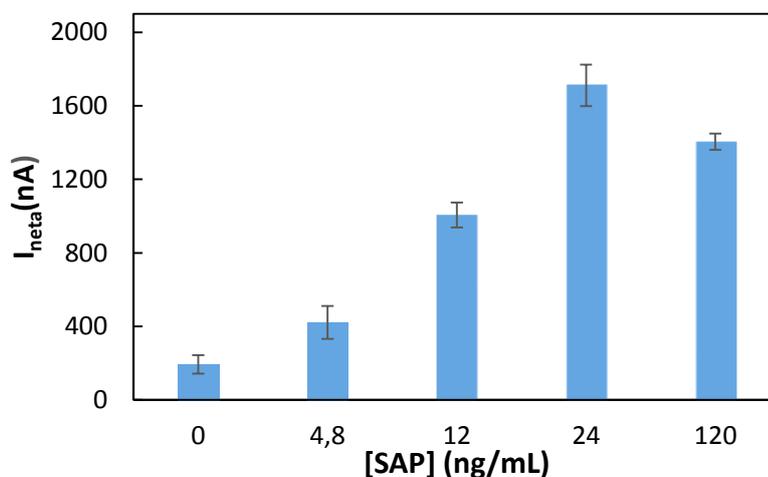


Figura 15. Resultados del aptaensayo tipo sándwich mediante la técnica de inmovilización orientada con ácido 3-aminofenilborónico. En el gráfico se muestran las intensidades de corriente obtenidas por cronamperometría a $-0,2V$ para distintas concentraciones de proteína SAP.



5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Grado, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- Para el desarrollo del biosensor electroquímico de la proteína amiloide sérica P se empleó como patrón un lisado celular comercial donde fue preciso cuantificar la cantidad de proteína mediante un kit ELISA. Aunque se valoró el empleo del patrón incluido en el kit, al comprobar que este no se encontraba glicosilado, se descartó esta opción.
- 2.- La estrategia de inmovilización orientada del anticuerpo de captura a través sus azúcares a una monocapa autoensamblada funcionalizada con el ácido 3-aminofenilborónico dio lugar a mejores resultados que la estrategia basada en la interacción de afinidad entre el fragmento cristalizable del anticuerpo y la proteína A inmovilizada. Esto parece estar relacionado con la unión inespecífica del receptor de detección a los glicanos del anticuerpo.
- 3.- El empleo de la lectina *Sambucus nigra* como receptor de detección del ensayo sándwich condujo a señales electroquímicas elevadas que no permitieron distinguir entre la presencia y ausencia de la proteína SAP, indicativo de interacciones inespecíficas con algún componente del ensayo.
- 4.- La combinación del anticuerpo de captura anti-SAP y el aptámero de detección PSA-1 permitió obtener un biosensor electroquímico de formato sándwich sobre electrodos serigrafiados de oro para la determinación de la proteína amiloide sérica P. Este dispositivo posee un intervalo de respuesta entre 4,8 y 24 ng/ mL, con una reproducibilidad inferior al 10%.



6. BIBLIOGRAFÍA

1. Cade, J. E.; Hanison, J. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* **2017**, 18(10), 527-531.
2. Edlund, H. *Nat Rev Genet* **2002**, 3(7), 524-532.
3. Kleeff, J.; Korc, M.; Apte, M.; La Vecchia, C.; Johnson, C.D.; Biankin, A.V.; Neale, R.E.; Tempero, M.; Tuveson, D.A.; Hruban, R.H.; Neoptolemos, J. P. *Nature Reviews Disease Primers* **2016**, 2(1), 16022.
4. McGuigan, A.; Kelly, P.; Turkington, R. C.; Jones, C.; Coleman, H. G.; McCain, R. S. *World Journal of Gastroenterology* **2018**, 24(43), 4846-4861.
5. Rahib, L.; Smith, B. D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A. B.; Fleshman, J. M.; Matrisian, L. M.; *Cancer Res* **2014**, 74(11), 2913-2921.
6. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. *CA Cancer J Clin* **2021**, 71(3), 209-249.
7. Peracaula, R.; Barrabés, S.; Sarrats, A.; Rudd, P. M.; de Llorens, R. *Dis Markers* **2008**, 25(4-5), 207-218.
8. Llop, E.; E Guerrero, Pedro.; Duran, A.; Barrabés, S.; Massaguer, A.; José Ferri, M.; Albiol-Quer, M.; de Llorens, R.; Peracaula, R. *World Journal of Gastroenterology* **2018**, 24(24):2537-2554.
9. Pan, S.; Brentnall, T. A.; Chen, R. *World Journal of Gastroenterology* **2016**, 22(42), 9288-9299.
10. Tommasone, S.; Allabush, F.; Tagger, Y. K.; Norman, J.; Köpf, M.; Tucker, J.H.; Mendes, P. M. *Chem Soc Rev* **2019**, 48(22), 5488-5505.
11. Ambrosi, M.; Cameron, N. R.; Davis, B. G. *Org Biomol Chem* **2005**, 3(9), 1593-1608.
12. Wu, Y.X.; Kwon, Y. J. *Methods* **2016**, 106, 21-28.
13. Ștefan, G.; Hosu, O.; De Wael, K.; Lobo-Castañón, M. J.; Cristea, C. *Electrochimica Acta* **2021**, 376, 137994.
14. Houwena, F. P.; Kageb, A. *Antibodies Applications and New Developments* **2012**, 300-314.
15. Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, 346(6287), 818-822.
16. Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, 249(4968), 505-510.
17. Jayasena, S. D. *Clin Chem* **1999**, 45(9), 1628-1650.



18. Dong, Y.; Wang, Z.; Wang, S.; Wu, Y.; Ma, Y.; Liu, J. *Aptamers for Analytical Applications* **2018**, 345-344.
19. Díaz Fernández, A.; Miranda Castro, R.; de los Santos Álvarez, N.; Rodríguez, E. M.; Lobo Castañón, M. J. *Biosensors and Bioelectronics* **2019**, 128, 83-90.
20. Toh, S. Y.; Citartan, M.; Gopinath, S. C.; Tang, T. H. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, 64, 392-403.
21. Topkaya, S. N.; Cetin, E. A. *Electroanalysis* **2021**, 33(2), 277-291.
22. Pilling, D.; Gomer, R. H. *Frontiers in Immunology* **2018**, 9,2328.
23. Zhao, J.; Patwa, T. H.; Qiu, W.; Shedden, K.; Hinderer, R.; Misek, D. E.; Anderson, M. A.; Simeone, D. M.; Lubman, D. M. *J Proteome Res* **2007**, 6(5), 1864-1874.
24. Li, C.; Simeone, D. M.; Brenner, D. E.; Anderson, M. A.; Shedden, K. A.; Ruffin, M. T.; Lubman, D. M. *J Proteome Res* **2009**, 8(2), 483-492.
25. Li, C.; Zolotarevsky, E.; Thompson, I.; Anderson, M. A.; Simeone, D. M.; Casper, J. M.; Mullenix, M. C.; Lubman, D. M. *Electrophoresis* **2011**, 32(15), 2028-2035.
26. Strovel, A. H.; William, R. H.. *Chemical instrumentation: A systematic approach* . John Wiley & Sons. **1989**, 3rd ed. Nueva York, Estados Unidos.
27. Díaz Fernández, A. *Detección de cambios en la glicosilación de la PSA asociados al cáncer de próstata: selección de aptámeros y diseño de aptasensores electroquímicos*. Tesis Doctoral, **2020**. Universidad de Oviedo.
28. Bin, Lu.; Malcolm, R. S.; O'Kennedy, R. *Analytica Chimica Acta*, **1996**, 331(1-2), 97-102.
29. Zacco, E.; Pividori, M. I.; Llopis, X.; del Valle, M.; Alegret, S. *Journal of Immunological Methods* **2004**, 286(1), 35-46.
30. Valat, C.; Limoges, B.; Huet, D.; Romette, J. *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 404(2), 187-194.
31. Zheng, K.; Bantog, C.; Bayer, R. *MAbs*, **2011**, 3(6), 568-576.
32. Küster, B.; Wheeler, S. F.; Hunter, A. P.; Dwek, R. A.; Harvey, D. J. *Analytical biochemistry*, **1997**, 250(1), 82-101.