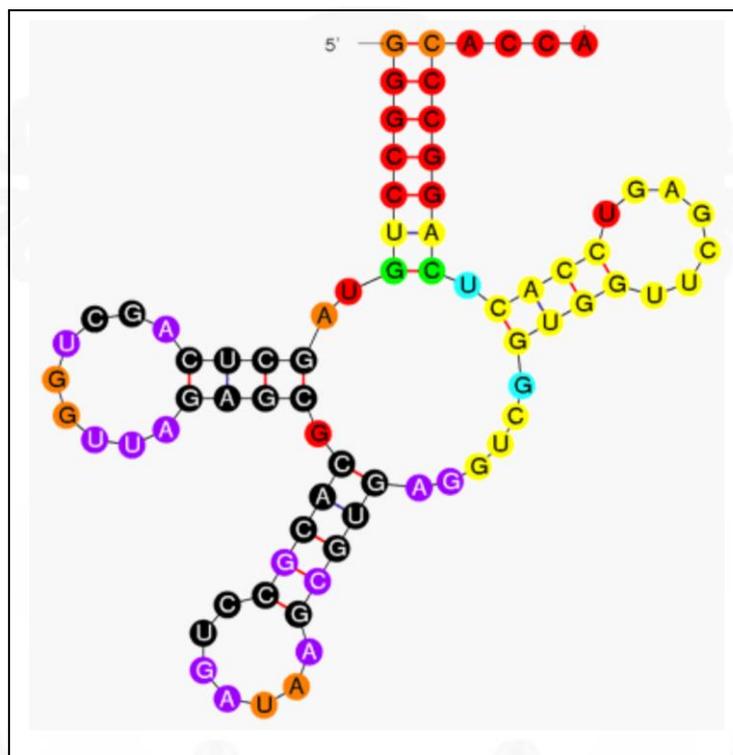


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

Estrategias de amplificación isotérmica combinadas con aptasensores: aplicación a la detección de biomarcadores de cáncer



Patricia Alcázar González

Química Física y Analítica/Equipo de Electroanálisis Universidad de Oviedo

Febrero/2020



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



RESUMEN

El cáncer de próstata es una de las patologías con mayor incidencia actualmente en hombres en todo el mundo. El biomarcador más utilizado para su detección y diagnóstico es la glicoproteína PSA, o antígeno prostático específico. Los aptámeros, pequeños oligonucleótidos de síntesis química, son una atractiva alternativa a los anticuerpos usados tradicionalmente en ensayos tipo ELISA para la cuantificación de PSA. Los aptámeros pueden seleccionarse para el reconocimiento específico de los glicanos de la PSA, que siguen patrones determinados, algunos de los cuales se hallan correlacionados con el cáncer. El desarrollo de un sensor electroquímico para la detección de PSA con determinados patrones de glicosilación se consigue utilizando dos aptámeros que reconocen la PSA en distintas zonas de la molécula, una de ellas los glicanos. Además, la naturaleza nucleotídica de los aptámeros permite el posterior acoplamiento de una estrategia de amplificación de DNA, que permitirá aumentar las señales derivadas de la unión proteína-aptámero, siendo capaz de detectar concentraciones de PSA clínicamente relevantes. Se escoge para ello la amplificación isotérmica de círculo rodante o RCA. Primeramente, se evalúa la capacidad de la RCA de amplificar las señales en una sencilla prueba de afinidad de uno de los aptámeros por la proteína. Debido a los resultados positivos obtenidos, se decide acoplar la RCA al ensayo sándwich para la cuantificación de PSA. A causa de la degradación de la proteína utilizada para realizar los ensayos, no es posible establecer claras conclusiones. No obstante, los estudios preliminares sugieren que el sensor está capacitado para proporcionar señales que permitan distinguir concentraciones de PSA por debajo del límite de detección del ensayo sin amplificación.

ABSTRACT

Prostate cancer is currently one of the pathologies with most incidence in men worldwide. PSA glycoprotein, or the prostate specific antigen, is the most commonly used biomarker for its detection and diagnosis. Aptamers, small oligonucleotides chemically synthesized, appear as an attractive alternative for the traditionally used antibodies in ELISA-type assays for PSA quantification. Aptamers can be selected for the specific recognition towards PSA glycans, which follow particular patterns, some of them related to cancer. The development of an electrochemical sensor for PSA detection with specific glycosilation patterns can be achieved by using two aptamers which recognise different parts of the molecule, the glycans amongst them. Furthermore, aptamers nucleotide nature allows the attachment of subsequent DNA amplification strategies, which will lead to an increase in the signals generated by protein-aptamer unions, thus allowing us to detect clinically relevant PSA concentrations. RCA or rolling circle amplification is chosen for that purpose. First of all, RCA ability to amplify signals is evaluated by carrying out a simple test to measure one of the aptamers affinity towards the PSA. Due to the positive results that were obtained, RCA was decided to be attached to the sandwich assay for PSA quantification. Owing to the protein deterioration that was used to carry out the experiments, a clear conclusion could not be reached. However, these preliminary studies suggest that the sensor is capable of providing signals that could allow us to distinguish PSA concentrations below the limit of detection of the assay without amplification.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

6-FAM	6-carboxifluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
EDC	Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> - Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ELONA	<i>Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay</i> - Ensayo de oligonucleótidos ligado a enzimas
K_A	Constante de afinidad
K_D	Constante de disociación
MH	6-mercaptohexanol
MUA	Ácido 11-mercaptoundecanoico
NaAc	Acetato de sodio
NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	<i>Phosphate Buffer saline</i> - Tampón salino de fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reacción en Cadena de la Polimerasa
POD	Enzima peroxidasa conjugada al fragmento Fab anti-fluoresceína
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i> - Antígeno Prostático Específico
RCA	<i>Rolling Circle Amplification</i> - Amplificación mediante Círculo Rodante
RNA	Ácido ribonucleico
rPSA	Proteína PSA recombinante
SAM	<i>Self-assembled monolayer</i> - Monocapa autoensamblada
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i> - Evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i> - DNA de cadena sencilla
TBE	Disolución reguladora formada por tris, borato y EDTA
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. El cáncer de próstata.....	4
1.2. Aptámeros como receptores de afinidad alternativos a los anticuerpos	5
1.3. Estrategias de amplificación isotérmica.....	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. Instrumentación	11
3.2. Reactivos	12
3.3. Procedimientos	13
3.3.1. Acondicionamiento de los electrodos.....	13
3.3.2. Ensayo de afinidad del aptámero PSA1 por la proteína PSA.....	14
3.3.3. Estudio de RCA en disolución.....	15
3.3.4. Ensayo de afinidad acoplado a RCA	16
3.3.5. Ensayo sándwich acoplado a RCA	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. Evaluación de afinidad del aptámero PSA1 por la proteína PSA	18
4.2. Diseño de la amplificación mediante círculo rodante o RCA	20
4.2.1. Estudio termodinámico in silico	20
4.2.2. Análisis de RCA en disolución	21
4.3. Evaluación de afinidad del aptámero PSA1 acoplado a RCA	22
4.4. Aptaensayo tipo sándwich acoplado a RCA	24
5. CONCLUSIONES	28
6. REFERENCIAS	29
ANEXO	31



1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer de próstata

La próstata es la principal glándula asociada al sistema reproductor masculino, se sitúa delante del recto, debajo de la vejiga urinaria y rodea a la uretra. Su función principal es, junto a las vesículas seminales, la formación del semen.¹

El cáncer de próstata es el segundo cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en hombres en todo el mundo, precedido únicamente por el cáncer de pulmón. Solo en el año 2018 se diagnosticaron 1.276.106 nuevos casos y se contabilizaron 358.989 muertes. La enfermedad tiene especial relevancia en varones de edad avanzada, pues la incidencia aumenta con la edad; así, aunque solo 1 de cada 350 varones menores de 50 años es diagnosticado con cáncer de próstata, la incidencia aumenta a 1 de cada 52 cuando la edad se encuentra entre 50 y 59 años. Para hombres mayores de 65 años, la incidencia es de un 60%.²

Dada la importancia clínica a nivel mundial, durante las últimas décadas la investigación en torno al cáncer de próstata ha aumentado considerablemente. El biomarcador más empleado en la actualidad es el *Antígeno Prostático Específico* (PSA por sus siglas en inglés), que lleva siendo utilizado desde su aprobación en 1994 para la detección de este tipo de cáncer.³ El test de PSA revolucionó, desde sus inicios, la capacidad para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes, y en las últimas décadas su uso ha llevado a un notable aumento de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata.

La PSA, también conocida como *hK3* o *calicreína humana 3*, es una glicoproteína de tipo serín proteasa, de cadena única de 33-34 kDa, compuesta por un 93% de aminoácidos y un 7% de carbohidratos. Es la más abundante en el líquido seminal segregado por la próstata y tiene como función la lisis proteica del coágulo seminal, para la correcta licuefacción del semen. La próstata, en condiciones normales, mantiene la mayor parte de la PSA confinada en su interior, y solo una pequeña parte se libera a la circulación sanguínea.^{4,5} El aumento de la PSA sérica es consecuencia de una anomalía en la estructura de la próstata, que sucede en cáncer de próstata, pero también en patologías no cancerosas e incluso benignas, como la prostatitis y la Hiperplasia Prostática Benigna (BPH por sus siglas en inglés).³ La PSA, por tanto, es una proteína específica de próstata, pero no de cáncer, lo que genera controversia respecto a su uso como biomarcador, debido al sobrediagnóstico y sobretratamiento que conlleva. El test de PSA suele combinarse con otros ensayos, como el estudio de isoformas de PSA o la PSA libre



en suero, pero la búsqueda continúa en la actualidad hacia biomarcadores con mayor selectividad y sensibilidad.⁶

Se sabe que cambios en los patrones de glicosilación de proteínas (tanto asociadas a la membrana celular como las secretadas) son comunes en el desarrollo de distintos tipos de cáncer. Esto se demostró por primera vez cuando anticuerpos dirigidos hacia células cancerosas reconocían carbohidratos con estructuras anormales.⁷ Recientemente, se han llevado a cabo numerosos estudios para evaluar si el patrón de glicosilación de la PSA puede ser utilizado para mejorar la utilidad clínica del test. Se han descrito aproximadamente 50 glicofomas de la PSA, pero solo algunas de ellas se encuentran relacionadas con cáncer de próstata agresivo. La PSA se glicosila en el aminoácido Asparragina en posición 89; cuando se obtiene del líquido seminal de donantes sanos presenta glicanos complejos sialilados en los extremos, con un núcleo de manosas. Cuando se analizan pacientes con cáncer de próstata, se detecta un aumento de ácido siálico y fucosas en la zona interna del carbohidrato (Figura 1A-B). También se ha constatado que una mayor ramificación de los glicanos en la PSA está ligada a la enfermedad (Figura 1C). La detección de PSA con patrones de glicosilación aberrantes podría, por tanto, mejorar los actuales ensayos de detección de cáncer de próstata, para permitir discernir entre esta y otras patologías asociadas a dicha glándula.^{8,9}

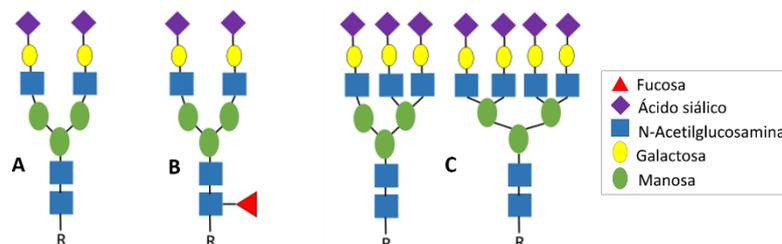


Figura 1. Alteraciones de glicanos en cáncer de próstata. Se correlacionan con cáncer de tipo agresivo los glicanos que presentan (A) ácido siálico en los extremos y (B) fucosas en la zona interna. La presencia de ramificaciones (C) se asocia a procesos de metástasis.⁸

1.2. Aptámeros como receptores de afinidad alternativos a los anticuerpos

Los aptámeros, también conocidos como “anticuerpos químicos”, son oligonucleótidos sintéticos de DNA o RNA de secuencia corta (entre 15 y 100 pares de bases) que interaccionan de manera específica y con elevada afinidad con diferentes tipos de dianas, desde iones hasta moléculas celulares complejas, proteínas e incluso células.¹⁰

Los aptámeros adquieren estructuras tridimensionales únicas en función de sus secuencias de nucleótidos, y se unen a sus respectivas dianas mediante una combinación de fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Debido a su amplia versatilidad, los aptámeros presentan un gran potencial en campos como la



biotecnología, medicina, farmacología, biología celular y química, y aplicaciones en el desarrollo de sensores y nanotecnología. A modo de ejemplo, solo quince años después de su descubrimiento, un medicamento basado en aptámeros, el *pegaptanib* (comercializado como Macugen) ya se encontraba disponible en el mercado. Fue el primer aptámero aprobado por la *Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos* (FDA por sus siglas en inglés) para uso terapéutico en el tratamiento de degeneración macular asociada a la edad.^{11, 12}

En la actualidad, los aptámeros se consideran una posible alternativa al uso de anticuerpos en el reconocimiento de moléculas, actuando por tanto como receptores de afinidad. A pesar de que las funciones son similares, presentan numerosas ventajas frente a los receptores proteicos tradicionales. En primer lugar, los aptámeros pueden producirse por síntesis química, lo que elimina las variaciones entre lotes de producción y reduce el coste y tiempo necesario para ello. En segundo lugar, los anticuerpos, debido a su naturaleza proteica, sufren cambios irreversibles en su estructura a causa del aumento de temperatura. Los aptámeros, por el contrario, pueden recuperar fácilmente su conformación original cuando se revierte la temperatura. Además tienen menor tamaño, lo que permite su interacción con dianas intracelulares, y son menos inmunogénicos que los anticuerpos. Pero a pesar de todas las ventajas citadas, los aptámeros tienen un inconveniente: son muy sensibles a nucleasas (especialmente los aptámeros de RNA). Esto hace difícil su introducción en sistemas *in vivo*; no obstante, su estabilidad puede ser mejorada a través de modificaciones químicas dirigidas tras el proceso de síntesis. En la Tabla 1 se realiza una comparación de algunos aspectos importantes entre ambos tipos de receptores de afinidad.

Tabla 1. Comparación de propiedades de aptámeros y anticuerpos como receptores de afinidad.^{11, 12}

	Anticuerpo	Aptámero
Tipo de diana	Dianas con inmunogenicidad	Amplia variedad
Peso molecular	125 KDa	5-25 KDa
Especificidad y afinidad por la diana	Alta: K_D de pM a nM para proteínas	Alta: K_D de pM a nM para proteínas
Producción	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Variación entre lotes	Elevada	Baja
Modificación química	Limitada	Sencilla
Toxicidad	Reacciones inmunes	No observada
Vida media	Limitada	Años como liofilizado
Estabilidad	Sensible a cambios de temperatura	Estable
Sensibilidad a nucleasas	No	Sí

Los aptámeros fueron obtenidos por primera vez en 1990 por dos laboratorios independientes; en ambos se llevaron a cabo procesos de selección de ácidos nucleicos con afinidad por distintas dianas a partir de una colección de ácidos nucleicos de secuencias



aleatorias. Por una parte, el grupo de investigación de C. Tuerk¹³ aisló dos secuencias con elevada afinidad por la DNA polimerasa del fago T4, mientras que el grupo de W. Szostak¹⁴ aisló secuencias con afinidad por moléculas orgánicas de distintos tipos, y les dio el nombre de “aptámeros”, del latín *aptus*, que significa *encajar*, y del griego *mero* que significa *partícula*. En esencia, los dos grupos seguían la misma metodología, y el proceso se denominó *Evolución Sistemática de Ligandos mediante enriquecimiento EXponencial* (SELEX por sus siglas en inglés).

El método SELEX para la obtención de aptámeros, representado en la Figura 2, parte de una colección de oligonucleótidos de secuencias aleatorias (habitualmente en torno a 10^{14} - 10^{15} moléculas distintas) que se expone a la diana de interés (Figura 2, etapa 1). A continuación, las secuencias que se unen con cierta afinidad a la molécula diana se separan de las secuencias no enlazadas (Figura 2, etapa 2). Posteriormente, las secuencias enlazadas se separan de la diana por elución (Figura 2, etapa 3) y se amplifican mediante la *reacción en cadena de la polimerasa* o PCR (Figura 2, etapa 4). Finalmente, se lleva a cabo una etapa de acondicionamiento en la que las secuencias bicatenarias resultantes de la PCR se separan para obtener secuencias de cadena sencilla o ssDNA (Figura 2, etapa 5) que permiten iniciar un nuevo ciclo o ronda de selección. Estos pasos se repiten entre 8 y 15 veces, en condiciones cada vez más exigentes, hasta obtener secuencias con gran afinidad por la diana. La clonación y el análisis de las secuencias resultantes mediante programas informáticos adecuados permiten identificar las secuencias homólogas (Figura 2, etapa 6). Los clones que presentan secuencias consenso se someten a ensayos de unión para determinar su afinidad y especificidad.^{10, 12}

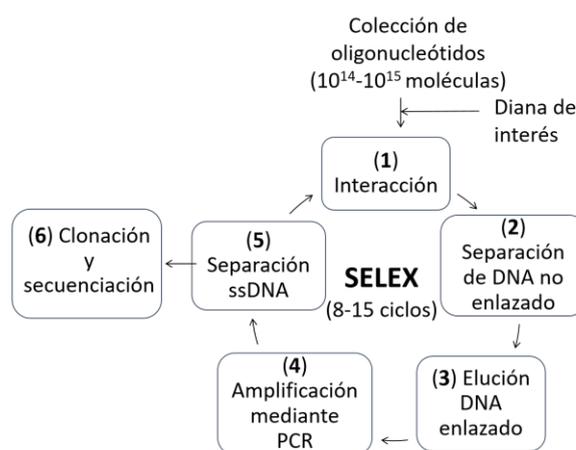


Figura 2. Esquema del método SELEX para la obtención de aptámeros.

En la actualidad existen variantes de la metodología SELEX dirigidas a producir aptámeros con alta afinidad a través de métodos más rápidos y eficaces; algunos de ellos son el SELEX



automatizado, el de ronda única o el *cell*-SELEX. Otra variante con aplicaciones interesantes es el denominado *counter*-SELEX, que consiste en la adición de varias etapas al SELEX convencional: las secuencias unidas a la diana de interés se eluyen y se hacen interactuar (rondas “negativas”) con una molécula cuya estructura es similar, por ejemplo, la isoforma de una proteína. Las secuencias unidas se descartan y las no unidas se hacen interactuar de nuevo con la diana de interés en otra ronda de SELEX. Esto permite dirigir la obtención de aptámeros de manera mucho más eficiente y específica.⁶ Este tipo de SELEX ha permitido, por ejemplo, obtener un aptámero de tipo RNA con una afinidad 10.000 veces mayor hacia la teofilina (un broncodilatador) que hacia la cafeína, que difiere de la primera únicamente en un grupo metilo en el nitrógeno en posición 7.¹⁵

Para obtener aptámeros que permitan reconocer la parte glicosilada de la PSA, el *counter*-SELEX resulta ser una técnica muy prometedora. Esta variante del método SELEX ha permitido al grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo obtener un aptámero capaz de unirse a los glicanos de la PSA⁶. El proceso consta de seis ciclos de selección con dos contraselecciones, en las que se realiza una incubación previa de las secuencias con PSA recombinante (no glicosilada). De esta forma, las secuencias que se unen a la proteína recombinante se descartan, y las que no se unieron se hacen interaccionar con la PSA glicosilada. Así, se consigue seleccionar aptámeros dirigidos específicamente hacia los glicanos de la proteína.

Como se ha comentado anteriormente, las propiedades intrínsecas de los aptámeros han facilitado su empleo en numerosos campos, entre ellos el análisis clínico. El equipo de investigación de Drolet¹⁶ en 1996 fue el primero en describir un ensayo enzimático con oligonucleótidos (ELONA, por sus siglas en inglés), y a partir de ese momento su uso como elementos de bioreconocimiento en aplicaciones analíticas no ha cesado de crecer, alcanzando especial relevancia en el desarrollo de biosensores, también denominados *aptasensores* en alusión al tipo de receptor de afinidad empleado.

Un biosensor es un dispositivo que permite la medición cuantitativa de un analito o diana de interés mediante la transformación de una reacción biológica en una señal medible de interés analítico. Integra un elemento de reconocimiento molecular (un aptámero, en el caso de aptasensores) y un sistema de transducción de la señal producida por la reacción biológica. Atendiendo a este último, se distinguen biosensores ópticos, térmicos, piezoeléctricos (sensibles a la masa) y electroquímicos.¹⁷

Entre los aptasensores descritos en la literatura, merecen especial atención los electroquímicos, debido a las numerosas ventajas que presentan. Por una parte, la sencillez de



la instrumentación posibilita el desarrollo de dispositivos sensores más baratos, de fácil manejo y miniaturizados. Por otro lado, la escasa presencia de interferentes electroactivos en muestras reales que puedan afectar a las medidas electroquímicas contrasta con la abundancia de fluoróforos y moléculas que desactivan la fluorescencia en muestras reales y afectan a las medidas registradas por métodos ópticos.¹⁸

Las estrategias de diseño de aptasensores electroquímicos para la determinación de proteínas se pueden agrupar en cuatro tipos de ensayos: directos, de tipo sándwich, competitivos y basados en cambios conformacionales de la estructura tridimensional del aptámero. Los ensayos de tipo sándwich resultan particularmente interesantes, al proporcionar mayor selectividad derivada del empleo de dos aptámeros: el de captura o primario se encuentra inmovilizado sobre una superficie, y el de detección o secundario incorpora una marca responsable de la señal analítica. El diseño de un aptasensor tipo sándwich requiere disponer de, al menos, dos sitios de unión no superpuestos en la misma molécula diana. Asimismo, su aplicación práctica está limitada por la disponibilidad de dos aptámeros distintos capaces de reconocer la misma molécula diana. Para ampliar la variedad de analitos para los que es posible diseñar un aptasensor tipo sándwich, se han propuesto estrategias combinadas en las que uno de los dos receptores de afinidad, primario o secundario, es un aptámero y el otro un anticuerpo.¹²

1.3. Estrategias de amplificación isotérmica

La *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR por sus siglas en inglés) es el método de amplificación de ácidos nucleicos más empleado en la actualidad. La PCR permite la amplificación de muestras de DNA cuando este se encuentra en pequeña cantidad, pero también puede ser acoplada a ensayos con anticuerpos (inmuno-PCR) o aptámeros (apta-PCR) para amplificar las señales. El acoplamiento de técnicas de amplificación en un ensayo sándwich con aptámeros permite detectar la diana a niveles de concentración muy bajos, que no serían alcanzables sin la amplificación. No obstante, la PCR es una técnica no isotérmica, que precisa de continuos aumentos y descensos de la temperatura. Esto encarece la instrumentación asociada y requiere el empleo de enzimas resistentes a altas temperaturas. Estos problemas son solventados por los métodos de amplificación isotérmica.¹⁹

La *Amplificación mediante Círculo Rodante* (RCA por sus siglas en inglés) es una técnica *in vitro* de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, que utiliza DNA polimerasas especiales capaces de generar largas moléculas de DNA monocatenarias partiendo de un pequeño molde circular de DNA. Una de las polimerasas más utilizadas en la RCA es la del bacteriófago phi29,



que va añadiendo nucleótidos a un cebador hibridado a un molde circular monocatenario, progresando continuamente alrededor de dicha sonda para replicar su secuencia una y otra vez. Todo el proceso puede llevarse a cabo a temperatura constante (desde temperatura ambiente hasta 37 °C) tanto en disolución como en soportes sólidos.^{20,21}

En lugar de utilizar un molde circular preformado, la RCA puede llevarse a cabo también a partir de un molde lineal que se circulariza mediante ligación de sus extremos 5' y 3' *in situ* (Figura 3). En este caso, los moldes circularizables, que reciben el nombre de “candado” (en inglés *padlock*), aportan al ensayo una mayor especificidad de secuencia, pues la ligación y RCA solo tienen lugar si el molde está correctamente hibridado con el cebador, impidiendo posibles uniones a otras secuencias presentes en la muestra.²²

El análisis del producto generado en la RCA puede realizarse mediante el uso de sondas oligonucleotídicas complementarias a una parte del DNA sintetizado. La RCA puede acoplarse, al igual que la PCR, en aptasayos de tipo sándwich, permitiendo incrementar la señal obtenida por la unión entre el aptámero y su diana. En estos casos, el aptámero de detección o secundario se encuentra alargado con la secuencia del cebador, y tras la RCA la señal obtenida será proporcional a la cantidad de aptámero unido a la diana de interés: la PSA, en el presente trabajo.^{23,24}

La principal ventaja de la amplificación RCA radica en su naturaleza isotérmica, es decir, no requiere de la utilización de ciclos de temperatura, imprescindibles en la PCR. Además, su sencillo mecanismo hace posible el acoplamiento a sistemas miniaturizados y automatizados.¹⁹

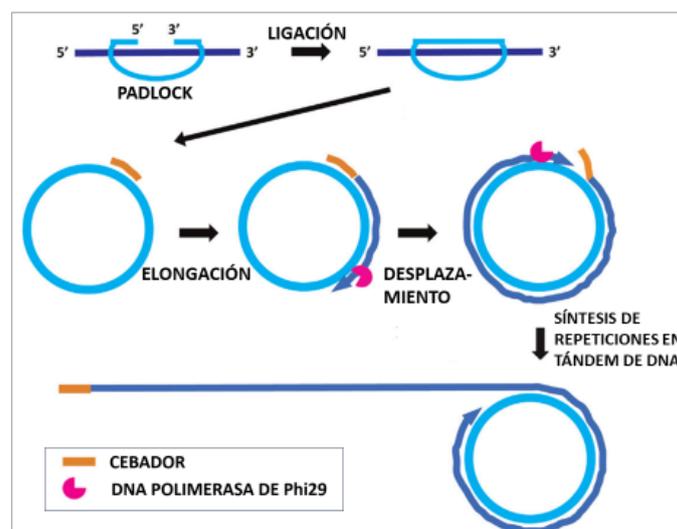


Figura 3. Mecanismo de amplificación RCA utilizando el padlock lineal con posterior ligación de extremos 5' y 3'.²⁰



2. OBJETIVOS

El objetivo general que se plantea en este Trabajo Fin de Grado es la evaluación de la afinidad del aptámero PSA1 obtenido por el grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo hacia el antígeno prostático específico o PSA, tradicionalmente empleado como biomarcador de cáncer de próstata, así como el desarrollo de una estrategia de amplificación de ácidos nucleicos que permita incrementar la señal analítica registrada con un aptasensor tipo sándwich para la detección de la PSA. Debido a su naturaleza isotérmica, sencillez de operación y excelente selectividad se propone la amplificación mediante círculo rodante o RCA.

Para alcanzar el objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Evaluación de la afinidad del aptámero PSA1 por la glicoproteína PSA inmovilizada en electrodos serigrafiados de oro a través de su constante de disociación K_D .
- 2.- Adaptación de un diseño de amplificación de círculo rodante previamente descrito en la bibliografía a un aptasensor de formato sándwich para detectar la proteína PSA.
- 3.- Reevaluación de la afinidad del aptámero PSA1 por la proteína PSA inmovilizada incorporando la etapa de amplificación RCA en superficie electródica.
- 4.- Acoplamiento del diseño de RCA óptimo con aptasensores electroquímicos de formato sándwich para la determinación de PSA a niveles clínicamente relevantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Instrumentación

En este trabajo se han utilizado celdas electroquímicas serigrafiadas (SPCs) del modelo DRP-220BT de Metrohm-DropSens (España). Cada celda consta de tres electrodos: el electrodo de trabajo y el auxiliar son de oro mientras que el de referencia es de plata (Figura 4A). El electrodo de trabajo presenta una geometría circular con un diámetro de 4 mm. Para facilitar su modificación, los electrodos de referencia y el auxiliar de la celda serigrafiada comercial se bloquearon con una capa de esmalte 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 4B).

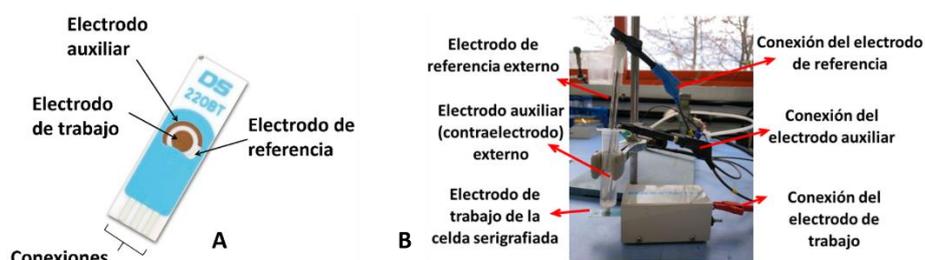


Figura 4. (A) Celda electroquímica serigrafiada comercial. (B) Celda electroquímica compuesta por un electrodo serigrafiado de oro como electrodo de trabajo, uno de referencia externo de Ag|AgCl|KCl (3M) y un contraelectrodo de platino también externo, ambos en una jeringa que contiene KNO_3 3M.

Las medidas electroquímicas por cronoamperometría y voltametría cíclica se llevaron a cabo con un potencióstato μ -AutoLab II de Eco Chemie B.V. (Países Bajos) controlado por un ordenador provisto del software NOVA 2.1. Como interfase entre la celda electroquímica serigrafiada y el potencióstato se empleó un conector específico suministrado por Metrohm-DropSens. Para regular la temperatura de las distintas etapas se empleó una estufa Heraeus VacuTherm de Thermo Fisher Scientific, mientras que la agitación de muestras y control de temperatura simultáneo se hizo mediante el Thermomixer Comfort de Eppendorf. Para la homogenización de disoluciones se empleó el Vortex Genius 3 de IKA; para llevar a cabo la electroforesis se utilizó la fuente de alimentación PowerPac 300 de BioRad, y para la visualización del gel se empleó una lámpara de luz UV de Vilber Lourmat.

3.2. Reactivos

Los oligonucleótidos utilizados, cuyas secuencias y funciones se indican en la Tabla 2, fueron suministrados en forma de polvo liofilizado por Metabion (Alemania).

Tabla 2: Características de los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.

Oligonucleótido	Función	Secuencia (5' -> 3')
Anti-PSA	Aptámero de captura de PSA biotinilado	Btn- TTT TTA ATT AAA GCT CGC CAT CAA ATA GCT TT
PSA1	Aptámero de detección de PSA con marca de fluoresceína 6-FAM (6-carboxifluoresceína)	GGA CGG TTG CGC TAT ATT TAA CCA AAA GTC TGG ATT AAC A - 6-FAM
PSA1-RCA^{1,2}	Aptámero de detección de PSA con cebador para RCA	GGA CGG TTG CGC TAT ATT TAA CCA AAA GTC TGG ATT AAC <u>ATT TTT TTT TTA GAT AGT AAG TGC AAT CT</u>
Padlock^{2,3}	Círculo rodante, molde para RCA	<u>TTA CTA TCT TAA CAA CAT GAA GAT TGT</u> <u>AGG TCA GAA CTC ACC TGT TAG AAA CTG TGA AGA TCG CTT <u>AGA TTG CAC</u>*</u>
RCA-SP³	Sonda marcada con 6-FAM, complementaria al producto de RCA	6-FAM- <u>AAC AAC ATG AAG ATT GTA</u>

*La secuencia del padlock fue suministrada con un grupo fosfato en el extremo 5' para su posterior circularización in situ.

¹En color verde se señalan las timinas añadidas para la separación entre la secuencia del aptámero y el cebador.

²Se subrayan en rojo las zonas complementarias entre el aptámero PSA1-RCA y el padlock.

³Los nucleótidos en azul se corresponden con la parte de secuencia idéntica entre la sonda de detección y el padlock. Dado que la sonda debe ser complementaria a una parte del DNA sintetizado a partir del padlock, su secuencia es idéntica a una parte de este último.



El 6-mercaptohexanol (MH), ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), etanolamina, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), en un formato que incluye el H_2O_2 , y estreptavidina fueron suministrados por Sigma Aldrich (España). Por otra parte, las enzimas DNA ligasa T4 y DNA polimerasa del bacteriófago phi29 en sus respectivos medios de reacción fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific (España). La enzima Peroxidasa conjugada al fragmento Fab anti-fluoresceína (POD) fue suministrada por Roche Diagnostics GmbH (Alemania). La PSA humana en forma de material certificado se obtuvo de las casas comerciales Sigma Aldrich y BBI Solutions (UK), mientras que la PSA recombinante (no glicosilada) obtenida a partir de *Escherichia coli* fue suministrada por Abcam (UK).

Los reactivos necesarios para preparar las disoluciones reguladoras de PBS (0,1 M fosfato, 0,154 M NaCl pH 7,4) y acetato de sodio o NaAc (10 mM pH 5,5) fueron adquiridas en Sigma Aldrich, mientras que el etanol (96%) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4) fueron suministrados por J.T. Baker. La agarosa se obtuvo de la casa comercial Lonza (EEUU) y el tampón de carga de DNA fue suministrado por Novagen; los marcadores de peso molecular de DNA se obtuvieron de Invitrogen. Por último, el tampón TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8,3) se obtuvo de Sigma Aldrich y el agente intercalante SimplySafe fue adquirido de Eurx (Polonia). Las disoluciones acuosas empleadas en el transcurso de este trabajo se prepararon con agua desionizada de alta pureza (18 $M\Omega \cdot cm$ de resistividad) obtenida por el sistema Direct-Q, MilliPore (España).

3.3. Procedimientos

3.3.1. Acondicionamiento de los electrodos

Antes de llevar a cabo la modificación de la superficie de los electrodos es necesario el acondicionamiento electroquímico de los mismos. Para ello, se lavan con etanol y agua desionizada y se secan en corriente de nitrógeno. A continuación, se colocan 50 μL de una disolución de H_2SO_4 0,5 M y se aplica un potencial positivo de 1,3 V durante 5 segundos. Inmediatamente después se realizan 10 barridos cíclicos de potencial entre 0 V y 1,3 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s hasta obtener un voltagrama cíclico estable (Figura 5).

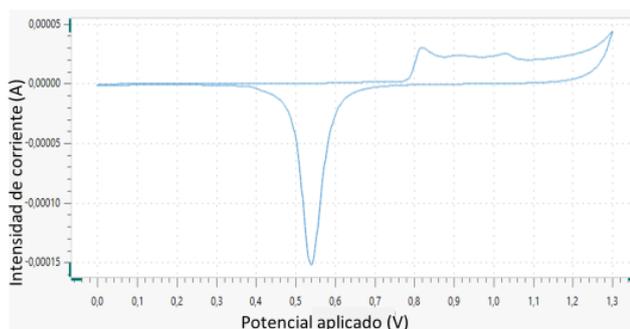


Figura 5. Voltagrama cíclico correspondiente a una superficie de oro limpia.



Después se lavan con agua, se secan con nitrógeno y se aplica la capa de esmalte de uñas de secado rápido para bloquear el electrodo de referencia y el auxiliar de la tarjeta serigrafada.

3.3.2. Ensayo de afinidad del aptámero PSA1 por la proteína PSA

Inmediatamente después de su acondicionamiento, los electrodos se modifican con 10 μ L de una disolución 3:1 de mercaptohexanol (MH) y ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) para formar la monocapa autoensamblada mixta (SAM). Para ello, se mezclan disoluciones 1 mM de cada reactivo en NaAc 10 mM (pH 5,5), obtenidas previamente a partir de disoluciones 100 mM en EtOH (96%). Las celdas electroquímicas se incuban durante la noche a -4°C en atmósfera saturada de agua para la formación y organización de la monocapa.

Para evaluar la afinidad del aptámero de detección seleccionado (PSA1) por la proteína PSA, es necesario inmovilizar esta sobre la superficie del electrodo (Figura 6). Los pasos se detallan a continuación, y entre etapas se realizan lavados con la disolución reguladora del paso posterior.

- ♦ Activación de los grupos carboxílicos de la SAM: se aplican 10 μ L de una mezcla 1:1 200 mM de EDC y 50 mM NHS, durante 30 minutos.
- ♦ Inmovilización de PSA: tras el lavado y secado, se aplican 10 μ L de PSA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, preparada en NaAc, y se incuba durante 30 minutos.
- ♦ Bloqueo de los grupos carboxílicos que no han unido PSA: se incuban los electrodos con etanolamina 1M en PBS durante 15 minutos.

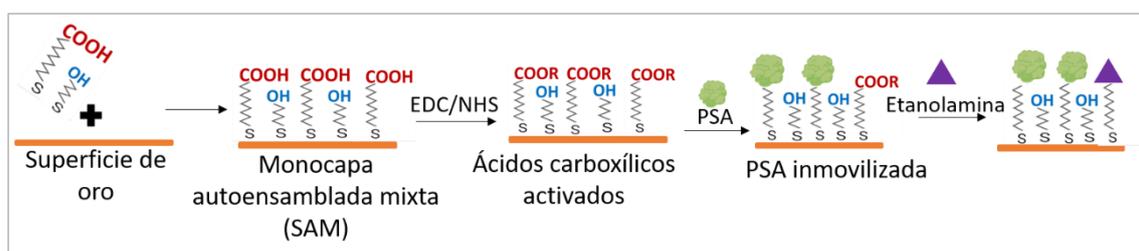


Figura 6. Inmovilización de PSA sobre la superficie del electrodo de trabajo en ensayo de afinidad.

A continuación, se procede a ensayar distintas concentraciones de aptámero de detección (marcado con 6-carboxifluoresceína, 6-FAM) y detectar la cantidad enlazada (Figura 7).

- ♦ Unión del aptámero de detección: se aplican 10 μ L del aptámero PSA1, preparado en PBS en las concentraciones a ensayar, y se incuba durante 30 minutos.
- ♦ Marcaje enzimático: se añaden 10 μ L de una disolución del fragmento Fab antifluoresceína-Peroxidasa (POD) a 0,5 U/mL en PBS con un 0,5% de caseína y se incuba 20 minutos.



- ♦ **Medida electroquímica:** se agregan 35 μL de una mezcla comercial de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y H_2O_2 sobre el electrodo; se deja reaccionar durante 30 segundos y se realiza la cronoamperometría a -0,2 V durante 1 minuto.

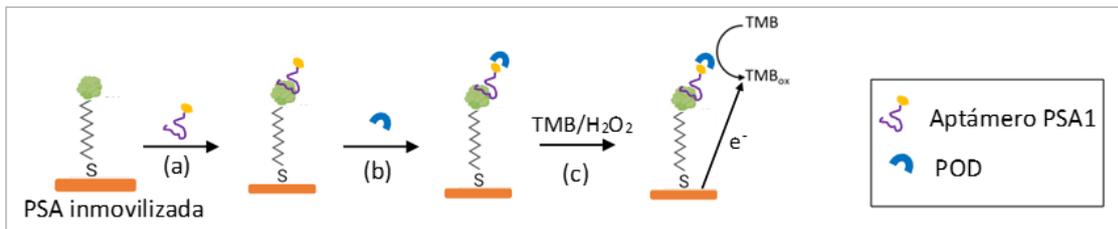


Figura 7. Ensayo de afinidad entre la proteína PSA inmovilizada y el aptámero PSA1: (a) interacción con el aptámero, (b) marcaje enzimático y (c) reacción enzimática y detección electroquímica.

3.3.3. Estudio de RCA en disolución

Para comprobar si la amplificación mediante RCA funciona en disolución, y cuánto tiempo es necesario para que dé lugar a cantidades de DNA medibles, el aptámero de detección convenientemente modificado con el cebador (aptámero PSA1-RCA) se somete a la amplificación con distintos tiempos de reacción. El análisis de los productos resultantes se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa. Las etapas se detallan a continuación:

- ♦ **Reacción de hibridación/ ligación:** El aptámero PSA1-RCA en concentración 1 μM se incubó con 10 nM de padlock (molde circularizable) y 0,125 U/ de ligasa T4 en su tampón de reacción, durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C), en un volumen de 20 μL . Se preparan 3 volúmenes para evaluar la amplificación a 3 tiempos distintos. Se evalúa también si la presencia de PSA afecta al proceso de amplificación, y para ello se realiza otra disolución en la que se añade PSA a una concentración de 62,5 ng/mL.
- ♦ **Desactivación de ligasa T4:** se calienta a 70°C durante 5 minutos. A continuación, se enfría la mezcla a 0°C durante 5 minutos para recuperar la temperatura.
- ♦ **Reacción de amplificación:** Se toman 4 μL de cada una de las disoluciones anteriores y se agregan 0,5 mM de dNTPs y 0,25 U/ μL de polimerasa phi29 en su tampón de reacción en un volumen de 20 μL . Las mezclas se incuban a 37°C durante los distintos tiempos a ensayar.
- ♦ **Desactivación de la polimerasa:** calentamiento a 65°C durante 10 minutos.
- ♦ **Hibridación con padlock:** para que el DNA generado sea detectable mediante electroforesis, es necesario transformarlo en DNA bicatatenario. Para ello, los productos de la RCA se incuban con una disolución 100 nM de padlock, pues su secuencia es complementaria al DNA recién sintetizado. La reacción de hibridación se realiza durante 30 minutos a temperatura ambiente.



Tras enfriar las muestras a temperatura ambiente, se procede a realizar la electroforesis. En primer lugar, se preparan 50 mL una disolución de agarosa al 1% en TBE 1x, se añaden 5 μL de agente intercalante y se vierte la mezcla sobre el molde. A continuación, se permite su gelificación durante 30 minutos y se cargan las muestras en los pocillos; para ello, se mezclan 10 μL de muestra con 2 μL de tampón de carga. La electroforesis se lleva a cabo durante 90 minutos aplicando un potencial de 80 V y el resultado se visualiza mediante luz UV.

3.3.4. Ensayo de afinidad acoplado a RCA

Para acoplar la RCA al ensayo de afinidad del aptámero PSA1, se inmoviliza la PSA en la superficie del electrodo de trabajo de la forma descrita en el apartado 3.3.2. A continuación, se incuba con distintas concentraciones de aptámero de detección, PSA1-RCA, que se encuentra modificado con el cebador para la RCA. Las siguientes etapas son similares a las descritas para la RCA en disolución, con la diferencia de que no es necesaria la desactivación de las distintas enzimas. Todos los pasos se esquematizan en la Figura 8.

Tras la unión del aptámero PSA1-RCA y las reacciones de hibridación, ligación del *padlock* y amplificación de DNA, se procede a la unión de una sonda (RCA-SP) marcada con 6-FAM complementaria al producto de RCA. Para ello, el electrodo de trabajo se incuba con una disolución 100 nM de la sonda en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Dado que la sonda RCA-SP está modificada con fluoresceína, es posible realizar el marcaje enzimático con POD. A continuación, se detecta la señal mediante cronoamperometría, al igual que en el ensayo de afinidad sin RCA.

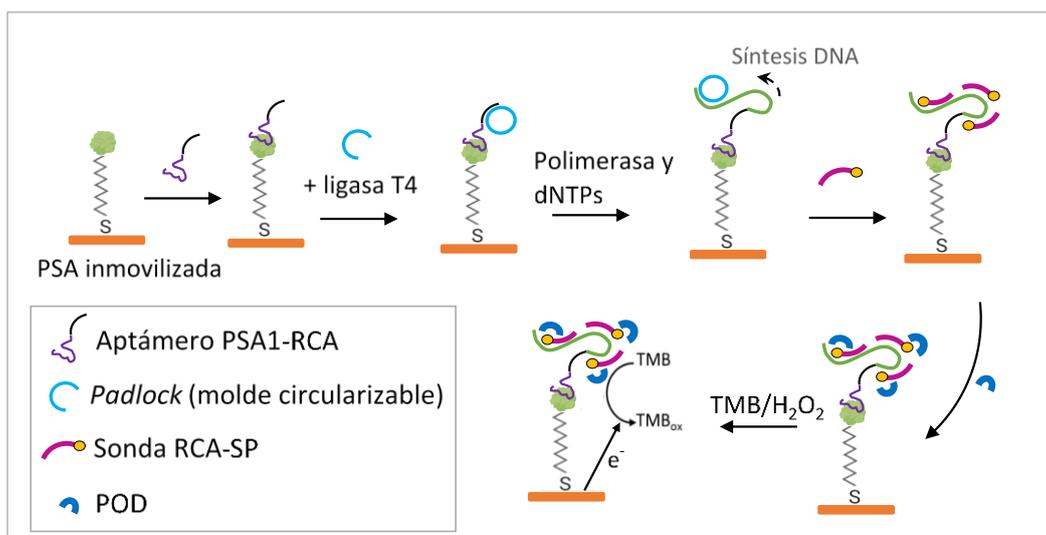


Figura 8. Ensayo de afinidad del aptámero de detección acoplado a RCA hacia la PSA inmovilizada en la superficie del electrodo de trabajo.



3.3.5. Ensayo sándwich acoplado a RCA

En el caso del ensayo sándwich la fase sensora se construye inmovilizando el aptámero de captura sobre el electrodo mediante unión estreptavidina-biotina. El protocolo empleado fue el optimizado previamente por el grupo de investigación receptor⁶, al que se incorporaron las etapas necesarias para la amplificación por RCA.

En primer lugar, se construye la monocapa autoensamblada (SAM) de MUA:MH sobre la superficie del electrodo de trabajo previamente acondicionado (ver apartado 3.3.1.). A continuación, se activan los grupos carboxilo con EDC y NHS, tal como se ha descrito en el apartado 3.3.2. Posteriormente, se inmoviliza la estreptavidina sobre la monocapa, empleando una disolución de 50 µg/mL de estreptavidina en NaAc mediante incubación durante 30 minutos. Tras el bloqueo con etanolamina de los grupos carboxilo que no han unido estreptavidina, se deposita una disolución 1 µM del aptámero de captura anti-PSA biotinilado en PBS y se incuba durante 30 minutos. El paso siguiente es la incubación de la fase sensora con cantidades variables de PSA en PBS durante 30 minutos para permitir su unión específica.

Para minimizar la señal inespecífica debida a la hibridación entre el aptámero de captura y el de detección, se añade la proteína PSA recombinante (rPSA), que es reconocida por el primero y no por el segundo. De esta forma, se bloquean los sitios del aptámero de captura que no hayan unido PSA en el paso anterior. Para ello, se añade rPSA 100 ng/mL (preparada en PBS) sobre el electrodo, y se incuba 30 minutos. Los siguientes pasos son análogos a los explicados para el ensayo de afinidad acoplado a RCA (ver apartado 3.3.4.): se une el aptámero PSA1-RCA, se llevan a cabo las reacciones de hibridación y ligación del *padlock*, amplificación a 37°C, unión de la sonda marcada RCA-SP, marcaje enzimático, reacción de la peroxidasa y medida por cronoamperometría. En la figura 9 se muestra una representación esquemática.

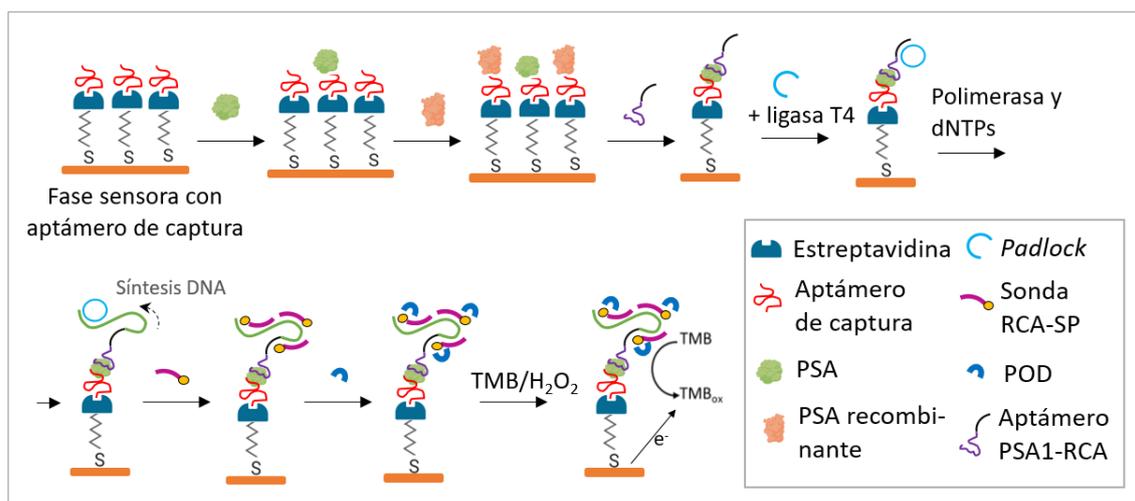


Figura 9. Esquema del ensayo sándwich acoplado a RCA.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de afinidad del aptámero PSA1 por la proteína PSA

En primer lugar, se realizó un estudio para valorar el grado de afinidad del aptámero PSA1, previamente seleccionado por el grupo de investigación receptor mediante la metodología SELEX⁶, por la proteína PSA. Para ello, se siguió el protocolo descrito en la sección 3.3.2. de esta memoria, que consiste en la inmovilización de la PSA sobre la superficie del electrodo y la aplicación de concentraciones crecientes de aptámero. La utilización de secuencias modificadas con 6-FAM permite realizar el marcaje enzimático con el conjugado antiluoresceína-peroxidasa, mediante la interacción antígeno-anticuerpo. La peroxidasa cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a agua, oxidándose (POD_{ox}). La forma reducida del enzima puede regenerarse utilizando TMB como cosustrato, que se oxida (TMB_{ox}). Por tanto, la medida cronoamperométrica consiste en la aplicación en el electrodo de un potencial, en este caso, inferior al potencial de pico de reducción de la TMB, mientras se registra la variación en el tiempo de la corriente catódica originada por la reducción de TMB_{ox}. Teniendo en cuenta que se trabaja en condiciones de saturación por sustrato, la corriente catódica medida es directamente proporcional a la concentración de enzima peroxidasa, y por tanto también directamente proporcional a la de aptámero enlazado. El potencial fijado durante la detección cronoamperométrica es de -0,2 V, seleccionado a partir del voltagrama cíclico correspondiente.

El estudio de la interacción de cantidades crecientes de aptámero con una cantidad fija de proteína permite obtener la denominada “curva de enlace” que se muestra en la Figura 10. En ella se representa la intensidad de corriente medida como porcentaje del valor máximo, al que se adjudica el 100% de señal, frente a la concentración de aptámero en μM . Se observa que al aumentar la concentración de aptámero PSA1 se produce un incremento de la señal electroquímica registrada, lo que confirma el enlace entre la proteína inmovilizada y el aptámero PSA1.

La afinidad del aptámero PSA1 por la proteína PSA se puede cuantificar mediante la constante de disociación K_D . Considerando la formación de un complejo proteína-aptámero de estequiometría 1:1, es decir, que existe un único sitio de unión entre ambas moléculas, se establece el siguiente equilibrio:



donde P es la proteína PSA, A el aptámero y PA el complejo PSA-aptámero.



En el equilibrio, las velocidades de asociación y disociación del complejo se igualan, y se obtiene la denominada constante de afinidad, K_A :

$$K_A = \frac{[PA]}{[P][A]} = \frac{1}{K_D} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde $[P]$, $[A]$ y $[PA]$ son las concentraciones de PSA, aptámero y complejo PSA-aptámero, respectivamente. El inverso de la constante de afinidad es K_D , la constante de disociación, que es indicadora de la afinidad de un ligando por su receptor: cuanto menor sea el valor de la K_D , mayor será la afinidad del aptámero por la PSA. Aunque ambas pueden ser utilizadas con el mismo propósito, K_D tiene unidades de concentración, y por ello su uso es más común.

Mediante ajuste no lineal empleando el programa informático *Origin 8.5.1.*, los valores experimentales obtenidos mediante cronoamperometría se ajustaron al modelo de Langmuir, que supone que la interacción entre el aptámero y la proteína es uno a uno y que todos los sitios de unión son equivalentes. La ecuación general se corresponde con una hipérbola equilátera cuya expresión es la indicada en la Ecuación 2:

$$q = \frac{(q_{\max}[A])}{K_D + [A]} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde q es la cantidad de complejo aptámero PSA1-proteína PSA que se forma en el equilibrio, A la cantidad de aptámero libre, K_D es constante de disociación y q_{\max} la cantidad total de proteína PSA inmovilizada.

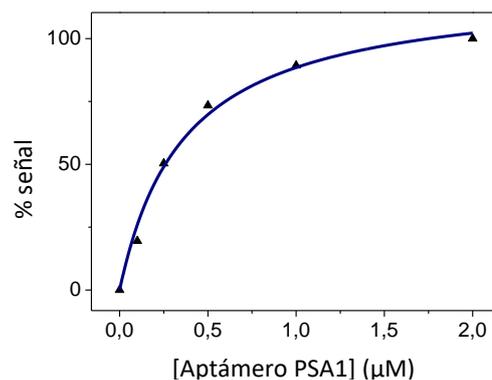


Figura 10. Curva de enlace del aptámero PSA1 frente a la proteína PSA inmovilizada en el electrodo. Los triángulos representan los valores experimentales, y la curva corresponde al ajuste de Langmuir realizado por el sistema Origin 8.5.1.

La ecuación resultante del ajuste de los datos obtenidos es la siguiente:

$$\% \text{ señal} = \frac{(121 \pm 7) \cdot [\text{PSA1}] (\mu\text{M})}{(0,37 \pm 0,06) \mu\text{M} + [\text{PSA1}] (\mu\text{M})} \quad (\text{Ecuación 3})$$



A partir de la Ecuación 3 se obtiene el valor de la constante de disociación del complejo aptámero-proteína en este ensayo de afinidad, $K_D = 0,37 \pm 0,06 \mu\text{M}$ con $R^2 = 0,990$. Este valor coincide, dentro del error experimental, con el descrito en la literatura⁶, y permite asegurar que el aptámero reconoce adecuadamente la proteína y es capaz de proporcionar una señal que permita su cuantificación.

4.2. Diseño de la amplificación mediante círculo rodante o RCA

4.2.1. Estudio termodinámico in silico

Las señales debidas a la interacción entre aptámero y proteína pueden amplificarse para aumentar la sensibilidad del ensayo y poder detectar concentraciones de PSA que de otra forma no sería posible. Para ello, en el presente trabajo se escogió la RCA, un método de amplificación isotérmica cuyas ventajas frente a los métodos no isotérmicos, como la PCR, se comentan en el apartado de Introducción.

Para acoplar la RCA a los ensayos basados en aptámeros se utilizaron las secuencias de *padlock* y sonda de detección previamente seleccionadas en otro trabajo de investigación²⁵ y el aptámero de detección PSA1 se alargó con una secuencia de 18 nucleótidos complementarios a una parte del *padlock*, para actuar como cebador. Las secuencias primarias de todos los oligonucleótidos se recogen en la Tabla 2 de *Materiales y Métodos*.

Antes de solicitar el envío de las secuencias de DNA diseñadas, se realizaron varios estudios de hibridación mediante el simulador de libre acceso *MFold Web Server*²⁶. Este programa permite obtener simulaciones de estructuras secundarias de ácidos nucleicos en función de su secuencia de nucleótidos, en unas condiciones de temperatura y concentración salina dadas. Además, es posible predecir las uniones entre varias cadenas por complementariedad de bases; el sistema proporciona imágenes con posibles estructuras, así como los parámetros termodinámicos asociados a dicha unión. Las estructuras secundarias de los aptámeros predichas por Mfold en las condiciones del experimento se recogen en el Anexo.

Para que la RCA suceda de manera exitosa, se necesita que la fuerza de unión entre el cebador y el molde sea elevada, así como la hibridación entre la sonda de detección y su secuencia complementaria en el DNA sintetizado. Para valorar estas uniones se utiliza la energía libre de Gibbs (ΔG), parámetro termodinámico cuyo valor negativo es indicativo de la espontaneidad de la reacción. En la Tabla 3 se recogen todos los valores de energía de Gibbs estudiados, y se observa que para esas dos uniones se obtienen valores de -12,0 y -21,7 kcal/mol, respectivamente; dado que las secuencias son complementarias entre sí, los valores



obtenidos son elevados, en valor absoluto. Entre ellas, se observa que la unión entre el cebador y el *padlock* es menos fuerte que la segunda, debido posiblemente a la presencia del aptámero, que adquiere su característica estructura secundaria y provoca que la hibridación esté impedida en cierto grado.

Se estudia también la posibilidad de que la RCA se vea afectada por la unión inespecífica de la sonda de detección al aptámero, así como por la formación de homohíbridos de este último. En ambos casos, las energías de hibridación, de -8,9 y -6,4 kcal/mol, respectivamente, no superan (en valor absoluto) las anteriormente descritas, necesarias para que suceda la amplificación.

Hibridación	Energía libre de Gibbs (kcal/mol)
PSA1-RCA y <i>padlock</i>	-12,0
RCA-SP y zona complementaria del DNA	-21,7
PSA1-RCA y PSA1-RCA	-8,9
PSA1-RCA y RCA-SP	-6,4

Tabla 3. Energía libre de Gibbs asociada a la unión entre las distintas secuencias de oligonucleótidos necesarias para la amplificación mediante RCA (temperatura 20°C, [Na⁺]=154mM)]. Datos obtenidos con el programa MFold.

Estos resultados, a pesar de ser estimaciones, proporcionan una idea aproximada de la viabilidad del diseño.

4.2.2. Análisis de RCA en disolución

Antes de acoplar la amplificación isotérmica RCA al ensayo de afinidad en superficie, para tratar de aumentar las señales derivadas de la unión aptámero-PSA, se realizó un estudio previo en disolución con el objetivo de determinar la viabilidad del diseño propuesto. Para revelar el resultado de la amplificación en disolución se recurrió a la electroforesis en gel de agarosa. En esta técnica, la aplicación de un campo eléctrico y la resistencia generada por el gel provocan que las moléculas migren hacia uno de los electrodos en función de su carga y masa. Los ácidos nucleicos presentan siempre carga negativa, que además es proporcional al número de pares de bases; por tanto, en todas las moléculas de DNA la relación carga/masa es idéntica, y la distancia recorrida a lo largo del gel dependerá únicamente de su peso molecular.

Se prepararon cinco muestras de acuerdo con el protocolo detallado en la sección 3.3.2. Una de ellas es el blanco o control negativo al que no se añadió el molde para la RCA. Otras tres muestras contenían todos los reactivos necesarios para la amplificación RCA y cada una de ellas se sometió a distinto tiempo de polimerización (7,5; 15; 30 minutos). La quinta muestra se obtuvo añadiendo a la mezcla anterior la proteína PSA para evaluar si esta interfiere en el



proceso de amplificación. El gel de agarosa resultante se visualizó mediante una lámpara de luz ultravioleta (UV) y el resultado se recoge en la Figura 11.

En el caso del control negativo no se observó ninguna banda, lo que parece indicar que no se produjo amplificación de DNA (pocillo B, Figura 11), resultado esperable al no incluir el molde para la síntesis. En las muestras en las que se incorporaron todos los reactivos requeridos (aptámero elongado con el cebador, molde, nucleótidos y enzimas) se aprecia un efecto del tiempo de polimeración. Así, aunque tras 7,5 minutos de reacción con la polimerasa no se observaron bandas definidas (pocillo E, Figura 11), para 15 y 30 minutos de amplificación aparecen dos bandas que se corresponden con DNA de longitud superior a 10.000 pares de bases en ambos casos (pocillos D y F, respectivamente, de la Figura 11). Esto parece indicar que la amplificación ha tenido lugar; además, la longitud del producto de RCA aumenta con el tiempo de reacción. También es importante destacar que la presencia de la proteína PSA en el medio no afecta significativamente al resultado (pocillo C, Figura 11).

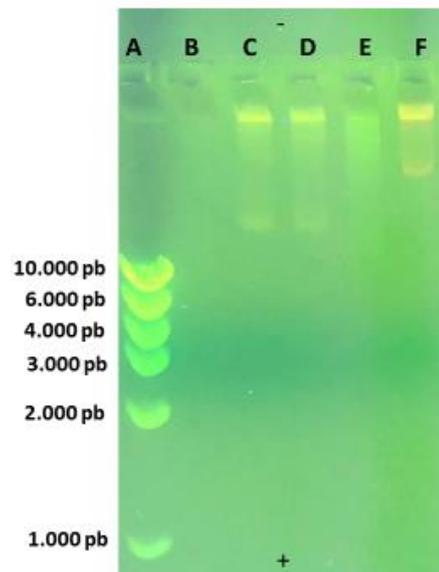


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. (A) Marcador de peso molecular (bp=pares de bases) (B) Control negativo sin molde para RCA (C) 15 minutos de RCA en presencia de PSA (D) 15 minutos (E) 7,5 minutos y (F) 30 minutos de RCA.

El siguiente paso consistió en estudiar el proceso de RCA sobre electrodos serigrafados modificados con PSA tras su interacción con el aptámero PSA1 elongado convenientemente con el cebador para la RCA (PSA1-RCA). De acuerdo con los resultados obtenidos en disolución, se seleccionó un tiempo de polimerización de 15 minutos.

4.3. Evaluación de afinidad del aptámero PSA1 acoplado a RCA

Tras comprobar que funciona correctamente en disolución, se procede a acoplar la RCA al ensayo de afinidad (protocolo detallado en el apartado 3.3.4.) para evaluar si tiene lugar correctamente en la superficie del electrodo y estudiar si permite aumentar la sensibilidad del ensayo.

Al igual que en el ensayo de afinidad realizado en ausencia de RCA (apartado 4.1.), los datos experimentales se ajustan a la expresión de la isoterma de Langmuir mediante el programa *Origin 8.5.1*.



$$\% \text{ señal} = \frac{(122 \pm 11) \cdot [\text{PSA1}] (\mu\text{M})}{(0,022 \pm 0,005) \mu\text{M} + [\text{PSA1}] (\mu\text{M})} \quad (\text{Ecuación 4})$$

De la Ecuación 4 se extrae el valor de la constante de disociación: $K_D = 22 \pm 5$ nM. Este valor es 16 veces inferior al obtenido en el ensayo sin amplificación RCA, lo que indica una mejora de sensibilidad al acoplar la etapa de amplificación de círculo rodante.

En la Figura 12A se representa la curva de enlace del aptámero a la proteína inmovilizada incorporando la amplificación RCA, y en la Figura 12B se representan de manera conjunta las curvas de enlace con y sin la etapa de RCA, en forma semilogarítmica para facilitar su comparación.

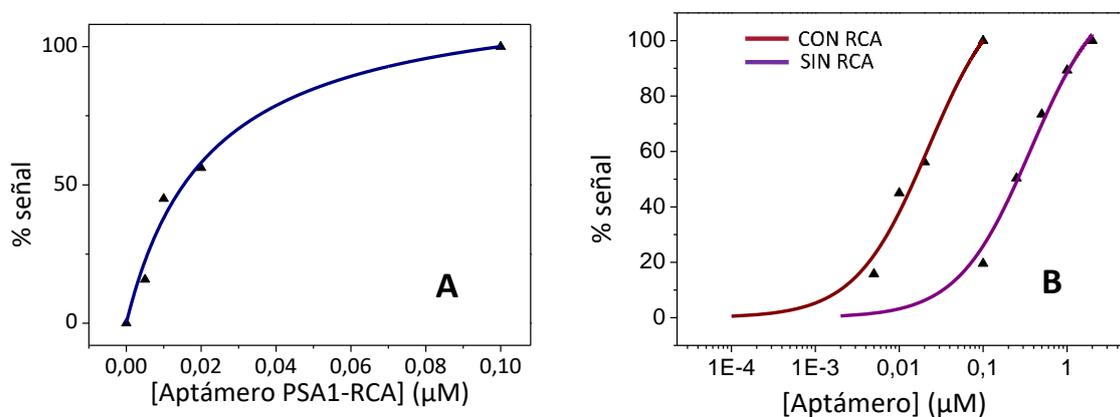


Figura 12. (A) Curva de enlace del aptámero PSA1-RCA frente a la proteína PSA. Los triángulos representan los valores experimentales, ajustados mediante el programa Origin 8.5.1. a la isoterma de Langmuir. (B) Representación conjunta en gráfica semilogarítmica de las curvas de enlace del aptámero PSA1 con (rojo) y sin (morado) amplificación RCA.

De la Figura 12B se puede extraer información particularmente relevante. En primer lugar, en los dos ensayos el aptámero reconoce eficientemente a la proteína, pues hay un incremento de señal proporcional a la concentración de aptámero, alcanzándose la saturación en 0,1 y 2 μM de aptámero con y sin amplificación RCA, respectivamente, lo que indica que la elongación del aptámero PSA1 con el cebador necesario para la RCA no interfiere en la unión proteína-aptámero. En segundo lugar, la curva de enlace con amplificación RCA se encuentra desplazada hacia concentraciones menores de aptámero, indicativo de que el sistema presenta mayor sensibilidad, siendo capaz de proporcionar señales que permiten distinguir concentraciones mucho menores de aptámero unido a la PSA.

Tendiendo en cuenta los resultados obtenidos, se plantea la posibilidad de utilizar el aptámero elongado con el cebador (PSA1-RCA) como aptámero de detección en un ensayo sándwich acoplado a amplificación RCA, con el objetivo de evaluar su capacidad para detectar



y cuantificar concentraciones de PSA inferiores a las logradas con el aptaensayo sándwich sin RCA.

4.4. Aptaensayo tipo sándwich acoplado a RCA

El aptaensayo llevado a cabo en el presente trabajo toma como modelo el diseñado por el equipo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo⁶ para la cuantificación de PSA. En dicho trabajo se desarrolló un aptasensor electroquímico tipo sándwich para detectar la proteína de manera más efectiva que los ensayos tradicionales basados en anticuerpos, o ELISA. La selectividad del ensayo radica en el uso de dos aptámeros dirigidos hacia distintas partes de la glicoproteína. Mientras los anticuerpos permiten únicamente la cuantificación de PSA de forma genérica, los aptámeros pueden seleccionarse hacia estructuras específicas de las proteínas. En primer lugar, se seleccionó el aptámero PSA1 dirigido específicamente hacia los glicanos de la PSA, y a continuación se acopló en el ensayo sándwich junto a otro aptámero denominado anti-PSA que reconoce la proteína independientemente de su estado de glicosilación. De esta forma, el aptasensor solo proporciona señal asociada a la PSA que presenta un patrón de glicosilación específico, el reconocido por el aptámero PSA1.

El ensayo descrito presenta un límite de detección de 0,66 ng/mL de PSA; por debajo de ese umbral, no es posible discernir entre distintas concentraciones de proteína. El acoplamiento de una etapa de amplificación mediante RCA podría incrementar las señales y aumentar la detectabilidad del ensayo. Se ha comprobado en el apartado 4.3. que la RCA es capaz de aumentar la sensibilidad en la detección de PSA enlazada al aptámero de detección, y por tanto el próximo paso consistirá en la fabricación del aptasensor tipo sándwich utilizando los dos aptámeros para el reconocimiento específico de PSA glicosilada e incorporando la etapa de amplificación RCA.

Resulta de suma importancia minimizar en lo posible las señales debidas a interacciones inespecíficas que puedan darse entre las distintas moléculas, especialmente en el caso del aptaensayo acoplado a RCA debido a su previsiblemente elevado poder de amplificación. Por este motivo se estimó la fuerza del enlace entre cada uno de los aptámeros y la proteína PSA, calculando la energía de Gibbs del enlace a partir de la constante de disociación K_D , de acuerdo con la Ecuación 5.

$$\Delta G = -RTLnK_A = -RTLn(1/K_D), \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde R es la constante universal de los gases ($1,987 \cdot 10^{-3}$ kcal/K·mol) y T la temperatura (en kelvin).



La constante K_D del aptámero de detección PSA1 fue calculada mediante la aproximación de la isoterma de Langmuir, en el apartado 4.1 de esta memoria, obteniendo un valor de 366 nM, y la del aptámero de captura anti-PSA, 229 nM, se obtuvo de la literatura⁶. Las energías de Gibbs de ambas uniones a temperatura ambiente (20°C) tras aplicar la Ecuación 5 resultan ser -8,8 y -9,1 kcal/mol, respectivamente.

Mediante el programa MFold, se estima también una energía de unión entre los aptámeros de -5,051 kcal/mol a temperatura ambiente, un valor (absoluto) menor que cada uno de los calculados anteriormente, lo que indica que la complementariedad entre los oligonucleótidos no interfiere en la unión de la proteína, a la que se unen con preferencia. No obstante, en ausencia de PSA (control negativo) se produce la hibridación parcial del aptámero de detección PSA1 con el aptámero de captura anti-PSA inmovilizado, dando lugar a una señal inespecífica que, aunque es baja en el caso del aptaensayo sin RCA, podría llegar a ser importante en el caso del aptaensayo acoplado a RCA.

Para evitarlo, se plantea la posibilidad de añadir una etapa de incubación con una proteína similar a la PSA, que sea reconocida únicamente por el aptámero de captura, siendo capaz de bloquear los sitios de unión de la fase sensora que no hayan enlazado PSA y evitar la unión posterior del aptámero de detección. Se escoge para ello la PSA recombinante de *Escherichia coli* (rPSA), que no está glicosilada, y por tanto es reconocida por el anti-PSA y no por el PSA1. Para evaluar si resulta útil en la práctica, se realiza el ensayo sándwich con amplificación RCA con y sin PSA recombinante, y no se añade PSA porque se pretende evaluar la capacidad de reducción de señales inespecíficas en los controles negativos. Los resultados mostrados en la Figura 13 indican una reducción de la señal del 71% en presencia de PSA recombinante. Esto confirma que parte de la señal en ausencia de PSA es debida a hibridaciones inespecíficas que, si bien pueden resultar irrelevantes en el sándwich original, al añadir la etapa de amplificación se verían aumentadas, limitando la sensibilidad que se pretende conseguir. Se decide por tanto acoplar la etapa de incubación con rPSA al ensayo sándwich con amplificación RCA.

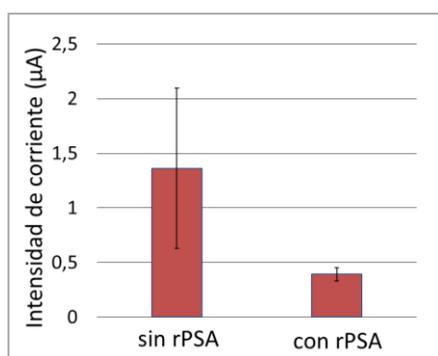


Figura 13. La adición de PSA recombinante en el aptaensayo tipo sándwich con amplificación RCA reduce las señales debidas a interacciones inespecíficas.



Se comenzó estudiando la respuesta del ensayo sándwich acoplado a RCA para 3 concentraciones de PSA distintas comprendidas entre 0,66 y 4 ng/mL, incorporando, según lo razonado en el apartado anterior, una etapa de incubación con PSA recombinante tras la interacción con PSA (Figura 14, Curva azul). Para la menor concentración ensayada (0,66 ng/mL) se obtiene una señal neta (tras restar la señal correspondiente al blanco de reactivos) de 0,24 μ A, sin embargo, para concentraciones superiores de PSA las señales no difieren del blanco. Además, todas ellas son menores a las obtenidas en el ensayo sin RCA tomado como punto de partida⁶. Estos resultados son inesperados, pues la etapa de amplificación conllevaría un aumento de las señales y, en el caso de que esta no tuviera lugar, las señales deberían ser similares a las del ensayo sin RCA. Se plantea entonces la posibilidad de que la cantidad de aptámero de captura que se inmoviliza sobre el electrodo no sea suficiente. En los aptaensayos sin RCA se utiliza una disolución 50 μ g/mL de estreptavidina para su inmovilización sobre la superficie electródica y posterior unión del aptámero de captura anti-PSA mediante el enlace estreptavidina-biotina; sin embargo, podría no ser suficiente para lograr una monocapa compacta del aptámero de captura. Por este motivo se decidió duplicar la concentración de estreptavidina empleada en la formación de la fase sensora (100 μ g/mL) y evaluar cantidades de PSA iguales o inferiores a 0,66 ng/mL (Figura 14, Curva roja).

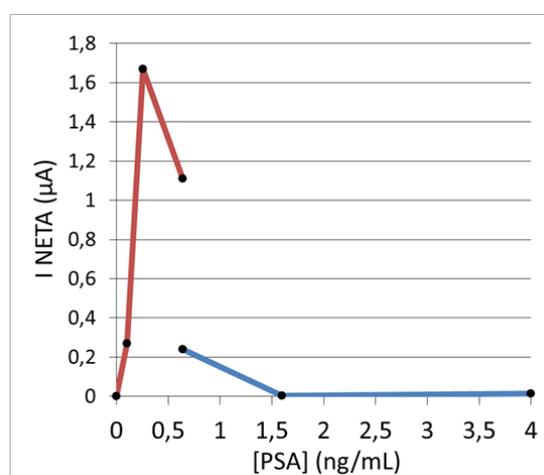


Figura 14. Resultados del aptaensayo tipo sándwich acoplado a RCA. Concentración de estreptavidina empleada en la construcción de la fase sensora: 50 μ g/mL (azul); 100 μ g/mL (rojo).

Los resultados muestran que la señal neta para 0,66 ng/mL es aproximadamente 5 veces superior a la obtenida anteriormente (1,11 frente a 0,24 μ A). Además, las señales para concentraciones de PSA inferiores también se distinguen claramente del blanco, obteniéndose una señal neta máxima de 1,67 μ A para una concentración de PSA de 0,256 ng/mL. Estos resultados indican que realmente se está produciendo un reconocimiento aptámero-proteína detectable por el aptasensor, que al amplificar la señal alcanza un límite de detección mucho



menor que en ausencia de RCA y podría resultar útil para detectar concentraciones de proteína muy reducidas.

Tras esta primera prueba con resultados prometedores, se repite el ensayo para evaluar su reproducibilidad, pero las señales que se obtienen son similares al blanco para todas las concentraciones de PSA ensayadas, en el intervalo de 0 a 4 ng/mL, lo que resulta inesperado. Para tratar de solventar el problema y poder continuar con el estudio, se solicita el envío de un nuevo lote de PSA, y durante el periodo que transcurre hasta la recepción se continúa realizando pruebas con un patrón de proteína de otra casa comercial. De acuerdo con la literatura, el aptasensor tipo sándwich sin RCA proporciona señales sin diferencias significativas para los dos tipos de patrones⁶, y por tanto se esperaba que al utilizar el segundo patrón el ensayo acoplado a RCA funcionase correctamente. Tras realizar varias pruebas, las señales obtenidas para concentraciones de PSA en el intervalo 0,66-4 ng/mL presentan todas una diferencia de 0,2 μ A respecto al blanco, sin cambios de señal con la cantidad de PSA. A la vista de estos resultados, se considera que la proteína de esta casa comercial podría estar sufriendo degradación, que, aunque parcial, pues hay cierto reconocimiento aptámero-proteína, resulta claramente perjudicial para el funcionamiento del sensor, pues no permite diferenciar distintas concentraciones de PSA.

Para estudiar si el origen del problema se encuentra en el reconocimiento de la proteína por parte del aptámero de detección, se realiza de nuevo el ensayo de afinidad del aptámero PSA1 hacia la PSA sin y con amplificación RCA (apartados 4.1. y 4.3., respectivamente), y las señales obtenidas, aunque presentan una tendencia similar, pues aumentan a medida que se incrementa la concentración de aptámero según el modelo de Langmuir, son 10 veces menores que las obtenidas previamente. Dado que el aptámero PSA1 está dirigido específicamente hacia los glicanos de la proteína, estos resultados sugieren que la degradación de la PSA podría producirse en esa zona de la molécula; es posible que la presencia de enzimas en la muestra de PSA, aunque mínima, sea la causante de la lisis de los carbohidratos, que tras largos periodos de almacenamiento comienzan a escindirse. Esta alteración en los glicanos impide un correcto reconocimiento por parte del aptámero PSA1, el complejo proteína-aptámero no se forma correctamente y hay una pérdida sistemática de señal en los ensayos.

En este punto, procedería continuar los ensayos con los patrones de PSA nuevos, para asegurar que la proteína se encuentra correctamente a nivel estructural; no obstante, la demora en el envío por parte de las casas comerciales hace imposible continuar los ensayos dentro de plazo previsto del proyecto.



Durante la primera semana de febrero de 2020, en el periodo que corresponde a la redacción de la presente memoria y fuera del plazo del trabajo experimental, se recibió finalmente la proteína de la casa comercial solicitada en primer lugar, y una integrante del grupo de investigación de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo llevó a cabo el ensayo sándwich sin amplificación RCA obteniendo las señales descritas con anterioridad⁶, confirmando que la progresiva degradación de la glicoproteína era el origen de la ausencia de las señales.

5. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo, basado en el estudio de una estrategia de amplificación isotérmica acoplada a la detección de PSA en aptasayos de tipo sándwich, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- El estudio de afinidad del aptámero PSA1 por la proteína PSA a través de su constante de disociación K_D ha permitido comprobar que el reconocimiento entre ambas moléculas tiene lugar eficientemente.
- 2.- El proceso de amplificación de DNA por círculo rodante o RCA diseñado tiene lugar de manera adecuada en disolución, lo que supone la base para su posterior aplicación en superficies electrónicas.
- 3.- El acoplamiento de la RCA al ensayo de afinidad del aptámero PSA1 por la PSA da lugar a una eficiente amplificación de las señales derivadas de la unión aptámero-proteína. El ensayo ve incrementada su sensibilidad, permitiendo la detección del complejo proteína-aptámero en menor concentración que en ausencia de RCA.
- 4.- El estudio de un aptasensor de formato sándwich acoplado a amplificación RCA para la detección de PSA parece indicar que el sensor está capacitado para detectar y cuantificar concentraciones de proteína PSA por debajo del límite de detección del ensayo en ausencia de RCA. No obstante, la degradación del patrón de la proteína PSA empleado en este estudio impidió comprobar la reproducibilidad de estos resultados.



6. REFERENCIAS

1. Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*, 13(7), 379-386.
2. Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, 10(2), 63-89.
3. Nogueira, L., Corradi, R., & Eastham, J. (2009). Prostatic specific antigen for prostate cancer detection. *International Brazilian Journal of Urology*, 35(5), 521-531.
4. Alapont Alacreu, J., Navarro Rosales, S., Budía Alba, A., España Furió, F., Morera Martínez, F., & Jiménez Cruz, J. (2019). PSA y hK2 en el diagnóstico de cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*, 32(6) 575-588.
5. Balk, S., Ko, Y., & Bubley, G. (2003). Biology of Prostate-Specific Antigen. *Journal of Clinical Oncology*, 21(2), 383-391.
6. Díaz-Fernández, A., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Rodríguez, E., & Lobo-Castañón, M. (2019). Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, 128, 83-90.
7. Reis, C., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C., & David, L. (2010). Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *Journal Of Clinical Pathology*, 63(4), 322-329.
8. Scott, E., & Munkley, J. (2019). Glycans as Biomarkers in Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1389.
9. Drake, R., Jones, E., Powers, T., & Nyalwidhe, J. (2015). Altered Glycosylation in Prostate Cancer. *Advances In Cancer Research*, 345-382.
10. Wu, Y., & Kwon, Y. (2016). Aptamers: The “evolution” of SELEX. *Methods*, 106, 21-28.
11. Banerjee, J., & Nilsen-Hamilton, M. (2013). Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research. *Journal of Molecular Medicine*, 91(12), 1333-1342.
12. Toh, S., Citartan, M., Gopinath, S., & Tang, T. (2015). Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 392-403.
13. Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968), 505-510.
14. Ellington, A., & Szostak, J. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818-822.
15. Jenison, R., Gill, S., Pardi, A., & Polisky, B. (1994). High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, 263(5152), 1425-1429.



16. Drolet, D. W., Moon-McDermott, L., & Romig, T. S. (1996). An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nature Biotechnology*, 14(8), 1021–1025.
17. Cheng, A., Sen, D., & Yu, H. (2009). Design and testing of aptamer-based electrochemical biosensors for proteins and small molecules. *Bioelectrochemistry*, 77(1), 1-12.
18. Ghorbani, F., Abbaszadeh, H., Dolatabadi, J., Aghebati-Maleki, L., & Yousefi, M. (2019). Application of various optical and electrochemical aptasensors for detection of human prostate specific antigen: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 142, 111484.
19. Mohsen, M., & Kool, E. (2016). The Discovery of Rolling Circle Amplification and Rolling Circle Transcription. *Accounts of Chemical Research*, 49(11), 2540-2550.
20. Feng, C., Mao, X., Yang, Y., Zhu, X., Yin, Y., & Li, G. (2016). Rolling circle amplification in electrochemical biosensor with biomedical applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 781, 223-232.
21. Li, J., & Macdonald, J. (2015). Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 196-211.
22. Kuhn, H. (2002). Rolling-circle amplification under topological constraints. *Nucleic Acids Research*, 30(2), 574-580.
23. Ali, M., Li, F., Zhang, Z., Zhang, K., Kang, D., & Ankrum, J. et al. (2014). Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chemical Society Reviews*, 43(10), 3324.
24. Gu, L., Yan, W., Liu, L., Wang, S., Zhang, X., & Lyu, M. (2018). Research Progress on Rolling Circle Amplification (RCA)-Based Biomedical Sensing. *Pharmaceuticals*, 11(2), 35.
25. Lorenzo-Gómez, R., Fernández-Alonso, N., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., & Lobo-Castañón, M. (2019). Unravelling the lipocalin 2 interaction with aptamers: May rolling circle amplification improve their functional affinity?. *Talanta*, 197, 406-412.
26. Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406-3415.

