



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**Estrategias innovadoras para detectar
biomarcadores de cáncer en sangre**

RAMÓN LORENZO GÓMEZ

Julio 2017, Oviedo



Noemí de los Santos Álvarez, Profesora del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

que el presente Trabajo, titulado “Estrategias innovadoras para detectar biomarcadores de cáncer en sangre”, ha sido realizado por el alumno Ramón Lorenzo Gómez bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2016-17, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 12 de Julio de 2017

Fdo. Noemí de los Santos Álvarez

ÍNDICE

Epígrafe	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El cáncer y los marcadores tumorales	1
1.2. Los aptámeros como receptores de afinidad	3
1.3. Sensores químicos basados en aptámeros	6
1.3.1. Sensores químicos: aspectos generales	6
1.3.2. Construcción de aptasensores electroquímicos	7
1.4. Estrategias en el diseño de aptaensayos	9
1.4.1. Ensayos directos	10
1.4.2. Ensayos tipo sándwich	13
1.4.3. Ensayos competitivos	14
1.4.4. Ensayos ELASA	15
1.5. Amplificación de círculo rodante (RCA)	15
1.5.1. Aspectos generales	15
1.5.2. Ventajas de la RCA	17
2. OBJETIVOS	19
3. EXPERIMENTAL	20
3.1. Instrumentación	20
3.2. Reactivos	21
3.3. Procedimientos	23
3.3.1. Ensayos sobre electrodos serigrafados de oro	23
3.3.1.1. <i>Modificación de los electrodos</i>	23

3.3.1.2. <i>Detección por espectroscopía de impedancias</i>	24
3.3.1.3. <i>Detección por cronoculombimetría</i>	25
3.3.1.4. <i>Detección por cronoamperometría</i>	25
3.3.2. Ensayos sobre partículas magnéticas	26
3.3.2.1. <i>Modificación de las partículas magnéticas con NGAL</i>	26
3.3.2.2. <i>Ensayo para el estudio de la interacción aptámero-NGAL con RCA</i>	28
3.3.2.3. <i>Ensayo para el estudio de la interacción aptámero-NGAL sin RCA</i>	30
3.3.2.4. <i>Magneto-aptensayo competitivo para la determinación de NGAL</i>	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Optimización de la RCA sobre electrodos serigrafados de oro	33
4.1.1. <i>Detección por espectroscopia de impedancia</i>	34
4.1.2. <i>Detección por cronoculombimetría</i>	38
4.1.3. <i>Detección por cronoamperometría</i>	40
4.2. Estudio de la interacción aptámero-NGAL sobre partículas magnéticas	44
4.3. Magneto-aptensayo competitivo para la determinación NGAL	46
5. CONCLUSIONES	48
6. BIBLIOGRAFÍA	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

6-FAM	6-Carboxifluoresceína
ADN	Ácido desoxirribonucleico
antiFITC	Fragmentos Fab procedentes de anticuerpos antifluoresceína policlonales
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Seroalbúmina bovina
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
HRP	Peroxidasa de rábano picante
MCH	6-Mercapto-1-hexanol
NGAL (LCN-2)	Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (Lipocalina-2)
PADC	Adenocarcinoma de páncreas
<i>p</i>-ATP	<i>p</i> -Aminotiofenol (tioanilina)
PBS	Tampón salino de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RCA	Amplificación de círculo rodante
SAM	Monocapa autoensamblada
SELEX	Evolución sistemática de ligando mediante enriquecimiento exponencial
SSPE	Tampón salino de fosfato sódico-AEDT (ácido etilendiaminotetraacético)
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
Tris-HCl	Hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer y los marcadores tumorales

El término cáncer engloba un gran grupo de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento anormal de células más allá de sus límites habituales, pudiendo invadir partes adyacentes del cuerpo y/o propagarse a otros órganos. También conocido como tumores malignos o neoplasias, el cáncer puede afectar a casi cualquier parte del organismo¹. Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, tanto en los países económicamente desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. En el año 2012 se registraron 14 millones de nuevos casos de cáncer y 8 millones de muertes debido a esta enfermedad, lo cual se corresponde con una incidencia de 182 y una mortalidad de 102 por cada 100.000 personas, respectivamente. En hombres, los cánceres más frecuentes son el de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado, mientras que en mujeres predominan el cáncer de mama, colorrectal, pulmón, cérvix y estómago².

Los marcadores tumorales son moléculas producidas por las células cancerosas, o inducidos por el cáncer en células normales, que están presentes en algún material biológico que puede obtenerse de un paciente y que refleja la actividad maligna³. Esta definición ha sido ampliada para incluir cualquier característica que se pueda medir de forma objetiva y pueda servir como indicador de procesos biológicos normales o patológicos, o de respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas⁴. Así definidos, los biomarcadores deben tener un uso clínico potencial para diagnosticar, monitorizar la actividad de la enfermedad guiando la terapia molecular o evaluar la respuesta terapéutica. Hasta el momento ningún biomarcador individual puede detectar un tumor con una sensibilidad (sin falsos negativos) y una selectividad (sin falsos positivos) del 100%³.

El adenocarcinoma de páncreas (PADC) es uno de los cánceres con peor pronóstico y más difícil de diagnosticar. La supervivencia a los 5 años es muy baja y su tasa no ha variado significativamente en las últimas décadas. En el manejo de esta enfermedad, el biomarcador de referencia es el CA19-9, un carbohidrato que tiene un limitado valor diagnóstico, ya que puede estar elevado en otras patologías benignas del páncreas.

Además, el 5-10% de la población carece del antígeno de Lewis genéticamente, por lo que no expresan este marcador aún en estadios avanzados de cáncer⁵. Debido a estas limitaciones, es extraordinariamente importante encontrar biomarcadores más específicos y sensibles para PADC.

La lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL por sus siglas en inglés) o lipocalina-2 (LCN-2), una glicoproteína secretora de 24 kDa, presenta niveles de expresión anormalmente elevados en las lesiones displásicas tempranas de páncreas (80-235 ng/mL en suero de enfermos, frente a 30,5-44,6 ng/mL en individuos sanos), lo que sugiere un posible papel como biomarcador para el diagnóstico temprano de PADC^{6,7}. Se cree que la principal función de NGAL está relacionada con el transporte de pequeños ligandos implicados en procesos inflamatorios, en el metabolismo del hierro y la apoptosis⁸.

Los métodos ELISA (“Enzyme-Linked InmunoSorbent Assay”) tradicionales, con detección colorimétrica o fluorimétrica, se consideran el estándar de oro para la cuantificación de proteínas en muestras biológicas^{9,10}. Sin embargo, las bajas concentraciones de los biomarcadores en el suero y las interferencias debidas a interacciones no específicas de las proteínas séricas más abundantes dificultan enormemente la obtención de resultados fiables en los análisis clínicos. Existe, por tanto, una urgente necesidad por desarrollar ensayos analíticos que tengan un intervalo de respuesta lineal en rangos de concentraciones inferiores a los ng/mL y que sean simples para su aplicación a pruebas clínicas¹¹.

Recientemente se ha descrito un ensayo tipo sándwich basado en aptámeros para la determinación de NGAL en muestras de suero humano, en el rango de concentración de 2,5-500 ng/mL y con un límite de detección de 0,6 ng/mL. Estos resultados son comparables a los obtenidos con los kits ELISA comerciales y la metodología propuesta ofrece ventajas adicionales como la minimización de las etapas del ensayo, ya que no se requiere dilución previa de la muestra de sangre o suero¹².

1.2. Los aptámeros como receptores de afinidad

Los aptámeros son oligonucleótidos sintéticos de ARN o ADN de cadena sencilla (normalmente 20-80 nucleótidos con pesos moleculares de entre 6 y 30 kDa), capaces de adoptar conformaciones tridimensionales únicas que les permiten reconocer y, por lo tanto, enlazarse con gran afinidad y especificidad a casi cualquier tipo de diana, desde iones hasta células¹³. La propiedad más importante de un aptámero (del latín *aptus*, adaptar) es su elevada selectividad. A diferencia de otras sondas moleculares basadas en ácidos nucleicos, los aptámeros interaccionan y se unen a sus correspondientes dianas mediante un proceso de reconocimiento estructural, similar a la reacción antígeno-anticuerpo (Figura 1). Es por ello que a los aptámeros también se les conoce por el nombre de “anticuerpos químicos”¹⁴.

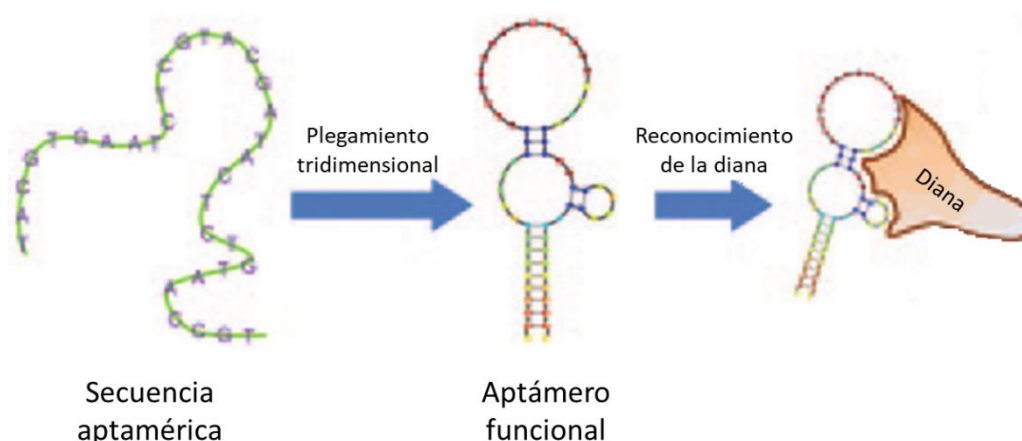


Figura 1. Representación esquemática de la unión de un aptámero a su diana¹⁴.

Los aptámeros se obtienen mediante un proceso de selección *in vitro* denominado SELEX (“Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment”), que simula la selección natural y que fue descrito por primera vez en 1990^{15,16}. Este proceso consiste en la sucesión de un cierto número de ciclos o rondas de selección, cada uno de los cuales conformado por 5 etapas: incubación, separación de hebras no enlazadas, elución de secuencias enlazadas, amplificación y acondicionamiento para recuperar hebras monocatenarias.

El método SELEX convencional comienza con una colección aleatoria de 10^{15} - 10^{16} secuencias de ácidos nucleicos diferentes, que constan de una región central variable (típicamente de 30 – 60 nucleótidos) y unas regiones cortas y constantes en los extremos,

las cuales actúan como cebadores y permiten realizar amplificaciones mediante PCR. Estas secuencias aleatorias de la librería inicial se pliegan formando estructuras secundarias y terciarias únicas, que se incuban con la diana (inmovilizada en un soporte sólido o libre) bajo condiciones óptimas para la formación de complejos aptámero- diana. A continuación, las secuencias no enlazadas se separan de los complejos aptámero-diana mediante diferentes técnicas (por ejemplo, filtración en membranas o electroforesis capilar). Una vez eliminadas las secuencias no enlazadas, se lleva a cabo la desnaturalización de los complejos aptámero-diana y los oligonucleótidos liberados se amplifican mediante PCR, obteniéndose ácidos nucleicos de hebra doble (Figura 2). Las moléculas de ADN de doble cadena obtenidas se separan en hebras simples en una etapa de acondicionamiento, para poder comenzar así un nuevo ciclo con estas secuencias. Normalmente, se requieren entre 8 y 20 rondas de selección para obtener aptámeros funcionales con una afinidad adecuada, por lo que el proceso completo puede durar varias semanas. Por último, los aptámeros potenciales se identifican mediante diferentes métodos de secuenciación^{13,17}.

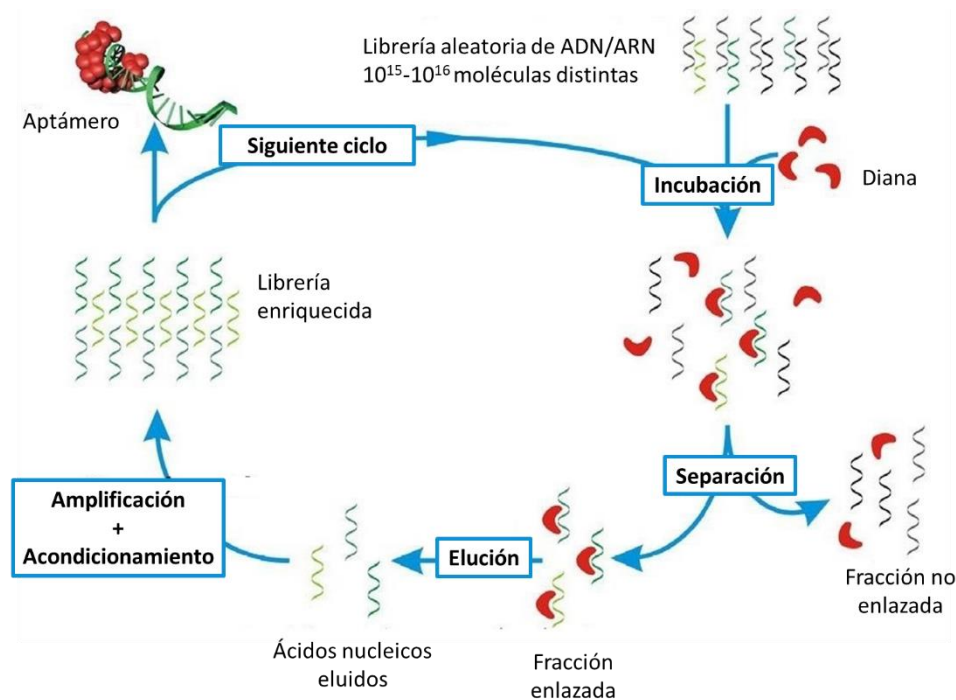


Figura 2. Esquema de un procedimiento SELEX convencional¹⁸.

Cada etapa puede realizarse mediante estrategias y técnicas diferentes, por lo que se puede adaptar a los requerimientos de la diana dirigiendo la selección hacia el dominio o región de interés de forma mucho más eficaz y sencilla que en el caso de la obtención de

anticuerpos. Desde su desarrollo, la obtención de aptámeros para moléculas de interés clínico, tanto terapéutico como diagnóstico ha sido una de las áreas más exploradas¹⁴.

Las ventajas que presentan frente a los tradicionales anticuerpos, mayor estabilidad térmica y química, obtención sintética, reproducible y de bajo coste, los convierten en moléculas ideales para resolver infinidad de problemas analíticos de diversa índole (clínica, medioambiental, alimentaria)^{19,20}. Además, el proceso SELEX ha sido utilizado para la selección de aptámeros en matrices complejas como el suero, el plasma o la sangre¹⁹. La baja o nula inmunogenicidad de los aptámeros ha creado grandes expectativas para su uso terapéutico sin efectos secundarios y como herramientas de diagnóstico *in vivo* (técnicas de imagen) o la integración de ambas funciones conocida como teranóstico (terapia+diagnóstico). Sin embargo, y a pesar de haber sido descubiertos hace más de 25 años, aún son bastante desconocidos por muchos investigadores y, sobre todo, por los emprendedores. Esto unido a la gigantesca inversión realizada por la industria en el desarrollo de anticuerpos humanizados está ralentizando la explotación masiva de los aptámeros y su brillante futuro en áreas como el diagnóstico de enfermedades infecciosas y cáncer²⁰.

Como reactivos analíticos, los aptámeros poseen características que los hacen únicos. Son estables química y térmicamente, se pueden marcar con facilidad con todo tipo de moléculas indicadoras (fluoróforos, moléculas electroactivas, haptenos, enzimas) o con grupos funcionales que permitan su inmovilización sobre cualquier tipo de soporte y, sobre todo, son fácilmente manipulables con la amplia gama de herramientas de la biología molecular (polimerasas, nucleasas, ligasas), lo que abre un universo de posibilidades de amplificación que están vedadas a los anticuerpos.

Los aptámeros tienen numerosas aplicaciones en la investigación en cáncer que incluyen el descubrimiento y detección de nuevos marcadores, así como su empleo como agentes terapéuticos²¹. Se han seleccionado aptámeros de gran afinidad frente a una amplia variedad de dianas terapéuticas, entre las que se incluyen citoquinas, proteasas, moléculas de adhesión celular y receptores de superficie²². El potencial de estos aptámeros para el desarrollo de aplicaciones analíticas dirigidas al diagnóstico temprano de tumores es enorme, especialmente en el diseño de sensores.

1.3. Sensores químicos basados en aptámeros

1.3.1. Sensores químicos: aspectos generales

Un sensor químico es un dispositivo autónomo capaz de proporcionar información analítica en tiempo real de una muestra. Por información analítica se entiende la concentración de una o más especies químicas, así como de microorganismos o virus, que pueden ser detectados a partir de biocompuestos específicos como sus ácidos nucleicos o sus componentes de membrana²³. Los sensores químicos constan en general de dos componentes básicos conectados entre sí: un elemento de reconocimiento químico, normalmente molecular (receptor), y un transductor físico-químico (Figura 3). La función del elemento de reconocimiento es interactuar de forma muy selectiva (idealmente específica) con la molécula diana o analito, mientras que el transductor debe transformar la energía química puesta en juego en esa interacción en una señal medible²⁴.

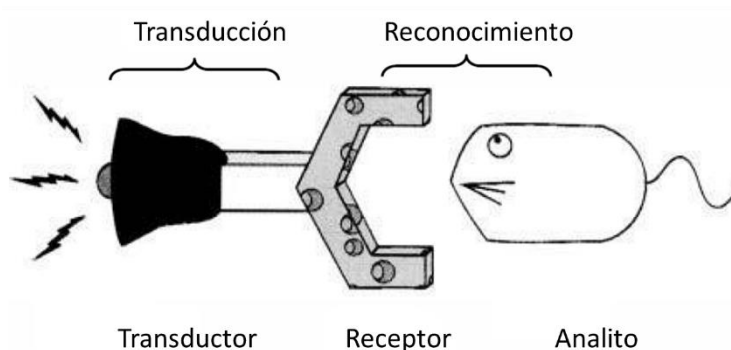


Figura 3. Esquema de un sensor químico²³.

Los biosensores son sensores químicos en los que el receptor utiliza un mecanismo de reconocimiento bioquímico. Pueden clasificarse en función del mecanismo del proceso de reconocimiento en:

- **Sensores biocatalíticos.** Se basan en una reacción catalizada por macromoléculas, que están presentes en su entorno biológico original, han sido aisladas previamente o se han fabricado. El analito puede ser el sustrato enzimático, o bien una especie que participe de forma indirecta en la reacción. Los elementos de reconocimiento empleados en este tipo de biosensores son enzimas, células y tejidos^{23,24}.

- **Sensores de bioafinidad:** se fundamentan en la unión de dos especies mediante múltiples interacciones no covalentes para formar un agregado molecular llamado complejo. Estas interacciones de afinidad tienen lugar en los seres vivos y se asocian con importantes funciones fisiológicas. Entre los sensores de este tipo destacan los inmunosensores, que utilizan reactivos inmunológicos (anticuerpos, antígenos o fragmentos de anticuerpos) como elementos de reconocimiento, y los sensores basados en receptores artificiales que imitan el reconocimiento molecular de los anticuerpos, como los aptámeros (aptasensores)²³ y los polímeros molecularmente impresos (MIPs)²⁵.

Los biosensores también se pueden clasificar según la naturaleza del transductor y el tipo de señal analítica que genera en: sensores electroquímicos, sensores ópticos, sensores piezoeléctricos (de masa) y sensores térmicos²⁴. Entre todas las alternativas de transducción, la detección electroquímica es especialmente atractiva, ya que presenta ventajas como simplicidad de la instrumentación utilizada, rapidez de las medidas, bajo coste, sensibilidad y selectividad, robustez y fácil miniaturización^{26,27}.

1.3.2. Construcción de aptasensores electroquímicos

La inmovilización de los aptámeros en la superficie del transductor es una de las etapas más críticas y fundamentales en el diseño de un aptasensor electroquímico²⁷. Es esencial conocer la química de superficies para asegurar un recubrimiento adecuado del transductor sin comprometer la reactividad, accesibilidad y estabilidad del aptámero que se va a utilizar, y minimizar las uniones y adsorciones inespecíficas²⁸.

Los materiales electródicos más ampliamente utilizados para la fabricación de aptasensores electroquímicos son el oro y el carbono²⁷ y entre estos dos, es de especial interés la inmovilización de aptámeros sobre superficies de oro. La inmovilización de aptámeros sobre estas superficies se efectúa generalmente mediante la quimisorción del aptámero derivatizado con un grupo alcanotiol sobre un sustrato de oro, formándose una monocapa autoensamblada (SAM, del inglés “Self-Assembled Monolayer”).

El oro presenta múltiples ventajas como sustrato para la fabricación de sensores: es estable al aire y está disponible en múltiples formatos comerciales (p. e. láminas, partículas); presenta una gran afinidad por el azufre; las capas formadas por quimisorción de receptores tiolados sobre oro son estables en los complejos medios líquidos en los que están disueltas las biomoléculas diana; es adecuado no solo para la formación de las monocapas de aptámeros, sino también para la caracterización de su estructura, composición y propiedades de enlace²⁹.

El diseño de la terminación tiolada del aptámero es muy importante para su adecuada inmovilización en el material de oro. Normalmente, el aptámero derivatizado consta de tres segmentos: un grupo tiol (-SH) o disulfuro terminal (-SSR), un espaciador hidrocarbonado (p. e. $-(CH_2)_6-$) y la secuencia de nucleótidos. La mayoría de estos aptámeros tiolados se obtienen de forma comercial como disulfuros asimétricos (aptámero-espaciador-SSR, en donde R generalmente es $-(CH_2)_6OH$), y antes de su utilización para la formación de SAMs es necesario reducir el enlace disulfuro, lo cual suele llevarse a cabo con ditioneitol (DTT). Tras la reducción, los restos de DTT y SR se eliminan mediante cromatografía de exclusión por tamaños, ya que ambas especies pueden quimisorberse de forma efectiva sobre el sustrato de oro bloqueando la unión del aptámero tiolado.

La formación de monocapas autoensambladas de aptámeros tiolados sobre superficies de oro se lleva a cabo típicamente en dos etapas (Figura 4). Primero, la superficie metálica se lava de forma exhaustiva con etanol absoluto y agua desionizada y se seca con corriente de nitrógeno. A continuación, se pone en contacto con una disolución reguladora que contiene el aptámero tiolado, durante varias horas²⁹. Es muy importante controlar la fuerza iónica de la disolución de aptámero, ya que los oligonucleótidos son moléculas con carga negativa y se repelen entre sí. En condiciones de alta fuerza iónica (superior a 400 mM), las repulsiones electrostáticas entre cadenas de ADN adyacentes se minimiza, ya que sus cargas negativas se ven apantalladas, y la cantidad de aptámero que se puede inmovilizar de forma efectiva se incrementa notablemente^{29,30}.

Durante la formación de la monocapa pueden tener lugar adsorciones inespecíficas del aptámero sobre el oro a través de los átomos de nitrógeno de las bases nucleotídicas,

pudiendo alterar su funcionalidad. Para eliminar estas adsorciones inespecíficas, la superficie de oro se trata con una segunda disolución de un alcanotiol inerte (“cotiol” o “tiol diluyente”), normalmente 6-mercapto-1-hexanol (MCH), para formar una monocapa mixta. Este segundo tiol elimina las adsorciones inespecíficas, orientando los aptámeros de forma adecuada y bloqueando la superficie de oro frente a sustratos como proteínas. La concentración de tiol diluyente debe controlarse, para evitar el desplazamiento del aptámero previamente inmovilizado^{29,31}. Recientemente, se ha demostrado que los tioles aromáticos (p.e. 4-aminotiofenol) permiten obtener SAMs mixtas más estables y con mejores prestaciones analíticas que los tioles alifáticos³¹.

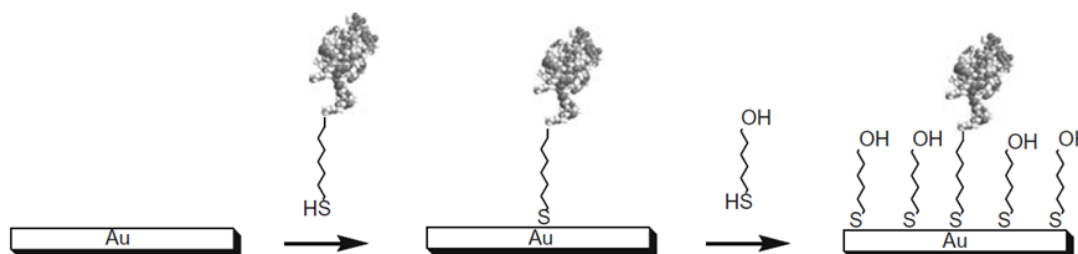


Figura 4. Representación esquemática del procedimiento en dos etapas para la formación de una monocapa autoensamblada mixta de aptámero sobre un sustrato de oro. En este caso, el aptámero tiolado está separado del grupo -SH por un espaciador de 6 átomos de carbono y como tiol diluyente se utiliza 6-mercapto-1-hexanol²⁹.

1.4. Estrategias en el diseño de aptaensayos

Las propiedades únicas de los aptámeros y la posibilidad de desarrollar aptámeros que reconozcan distintos sitios de unión en la molécula diana permiten la existencia de multitud de formatos de análisis²⁸. Los ensayos basados en aptámeros tienen por objetivo determinar la concentración de analito en la muestra con la mayor exactitud, precisión y sensibilidad posibles, utilizando para ello uno o varios aptámeros como elemento de reconocimiento que se unan de forma selectiva al analito. Existen varios formatos de ensayos, que se pueden clasificar en tres grandes grupos: ensayos directos, ensayos tipo sándwich y ensayos competitivos.

Los ensayos directos y tipo sándwich pueden considerarse como métodos de "exceso de aptámero", en el sentido de que se utiliza un exceso del receptor, de manera que después del evento de reconocimiento prácticamente todo el analito estará formando

parte del complejo aptámero-diana, que se cuantifica (o la fracción libre de aptámero) y se relaciona con la concentración de analito en la muestra. Los ensayos directos se basan en un formato de un único sitio de unión (sólo se emplea un aptámero para el proceso de reconocimiento), mientras que los ensayos tipo sándwich implican el enlace simultáneo de dos aptámeros al analito por dos centros de unión diferentes.

Por el contrario, los ensayos competitivos son métodos de "reactivo limitante" y de una sola unión, ya que se basan en la competición entre el analito y un trazador para unirse a una cantidad limitada de aptámero. Después del reconocimiento, la fracción ligada o libre del trazador se mide y se relaciona con la concentración de analito en la muestra. En muchos casos, los ensayos dependen del uso de sustancias marcadas para la generación y amplificación de la señal. Además, los ensayos pueden ser homogéneos y heterogéneos. La falta de una etapa de separación antes de la medición, que es el sello distintivo de los ensayos homogéneos, puede ser ventajoso en términos de rapidez. Sin embargo, la inclusión de una etapa para separar el complejo aptámero-diana (ensayo heterogéneo) puede mejorar el rendimiento analítico, reduciendo las interacciones inespecíficas, particularmente en matrices complejas³².

1.4.1. Ensayos directos

Los ensayos directos basados en aptámeros pueden dividirse en dos categorías: los que no usan reactivos marcados y los que sí los utilizan, aprovechando los cambios conformacionales del aptámero después del evento de reconocimiento para detectar la cantidad de complejo³².

En el formato más sencillo de un ensayo sin marcas, el aptámero inmovilizado en la superficie del transductor reconoce de forma específica una diana y cualquier cambio en una propiedad física causado por la formación del complejo aptámero-diana se puede utilizar para la transducción del evento de reconocimiento³³. Estas estrategias requieren el empleo de técnicas muy sensibles capaces de monitorizar cambios físicos mínimos de magnitudes como la masa, el índice de refracción o a la conductividad, que ocurren en la superficie de la fase sensora tras la interacción receptor-diana, ya que la sensibilidad del ensayo depende principalmente del mecanismo de transducción. Algunas de las técnicas

de transducción empleadas en este tipo de formatos son las medidas de onda acústica con microbalanza de cuarzo (QCM), la espectroscopia de resonancia de plasmón superficial (SPR) y la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS).

Sin embargo, estos principios de transducción son bastante inespecíficos y la selectividad, que es uno de los rasgos más importantes de un sensor químico, depende de la correcta combinación de los mecanismos de reconocimiento y transducción. Aunque la falta de selectividad del sistema de transducción suele verse compensada con la elevada selectividad del aptámero, una estrategia diferente para desarrollar ensayos directos basados en aptámeros con sensibilidad y selectividad mejoradas es incorporar un sistema indicador, es decir, una marca o indicador que proporcione la señal analítica, de tal manera que la interacción aptámero-diana module su actividad. El sistema indicador puede ser una molécula electroactiva u ópticamente activa y la modulación de la señal se produce como resultado del evento de reconocimiento, aprovechando los cambios de conformación que normalmente experimenta el aptámero durante el proceso.

Se han desarrollado ensayos basados en aptámeros marcados con fluoróforos cuya emisión fluorescente depende de la unión receptor-diana a través de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Estos ensayos se basan en la transferencia de energía no radiante de dadores (p.e. colorantes orgánicos fluorescentes, puntos cuánticos semiconductores) a aceptores (desactivantes o “quenchers” como grafeno o nanopartículas de oro) cuando están muy próximos entre sí. El evento de reconocimiento provoca un cambio en la distancia entre los dadores y aceptores, ya sea disminuyéndola o aumentándola, lo que daría lugar a la desactivación de la fluorescencia (ensayos de señal decreciente o signal-off) o a un aumento de la emisión radiante del fluoróforo (ensayos de señal creciente o signal-on), respectivamente (Figura 5A)³².

Del mismo modo, los aptámeros pueden estar unidos en un extremo a una molécula redox activa (típicamente azul de metileno o ferroceno), mientras que el otro extremo está unido a una superficie de electrodo (Figura 5B). Estos aptasensores podrán utilizarse si el reconocimiento de la diana induce una modificación estructural del aptámero lo suficientemente grande como para alterar la distancia de la marca redox con respecto a la superficie del electrodo, provocando un cambio medible en la señal electroquímica de la

marca³⁴. Se han desarrollado configuraciones de señal creciente y decreciente para la detección de un número reducido de dianas, principalmente la trombina y la cocaína³⁵.

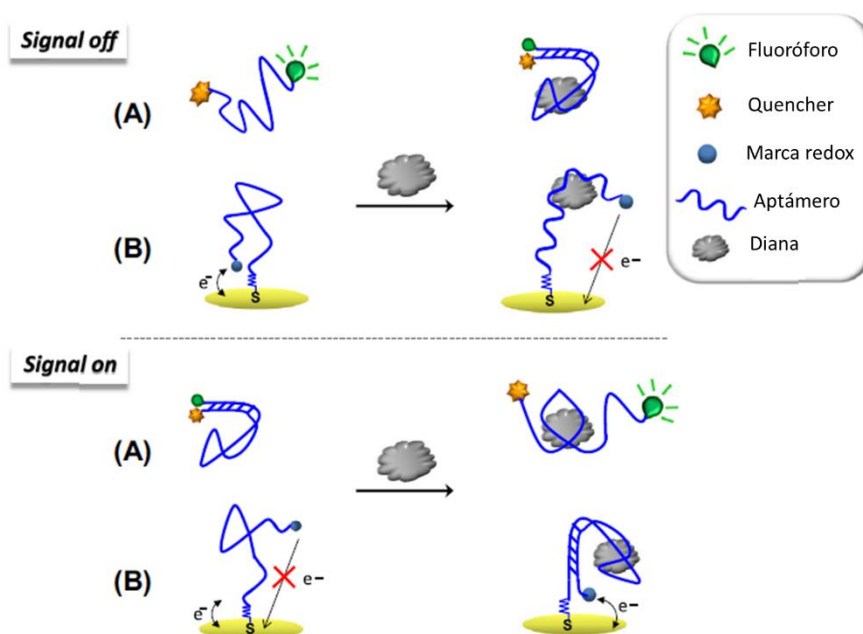


Figura 5. Representación esquemática de aptasensayos directos basados en estrategias autoindicadoras. Ensayos de señal creciente (signal-on) y decreciente (signal-off) en combinación con detección (A) óptica y (B) electroquímica³².

El éxito de las estrategias autoindicadoras mencionadas depende de la estructura del aptámero, que preferentemente debe adoptar una conformación específica (p.e., horquilla, cuarteto de G), y de la extensión de su plegamiento durante el reconocimiento biomolecular. Desafortunadamente, en la mayor parte de los casos se desconoce cómo es ese cambio conformacional y el diseño del ensayo es puramente empírico.

Un formato alternativo y más fácil de generalizar es el que se basa en la transición estructural inducida por hibridación, también denominada desplazamiento de hebra inducido por la diana. En este caso, el aptámero se hibrida inicialmente con una hebra completamente o parcialmente complementaria, que actúa como una especie competidora. Esta hebra auxiliar se une al aptámero en ausencia de diana, pero es desplazada al formarse el complejo receptor-diana, provocando un cambio en la señal de la marca o sistema indicador, que puede estar unido tanto al aptámero como a la cadena complementaria.

La sonda auxiliar de ADN se puede diseñar tanto para formatos de señal creciente como decreciente (Figura 6). Por ejemplo, puede estar unido a un inhibidor de la fluorescencia mientras que el aptámero se modifica con un fluoróforo, de tal manera que la hibridación provoca la aproximación de fluoróforo y desactivante. En presencia de la diana se libera la hebra complementaria y se mide el aumento de la fluorescencia. Si la hebra complementaria tiene una estructura secundaria de horquilla y se funcionaliza con un fluoróforo y un “quencher” en cada extremo, se puede evitar el marcaje del aptámero³².

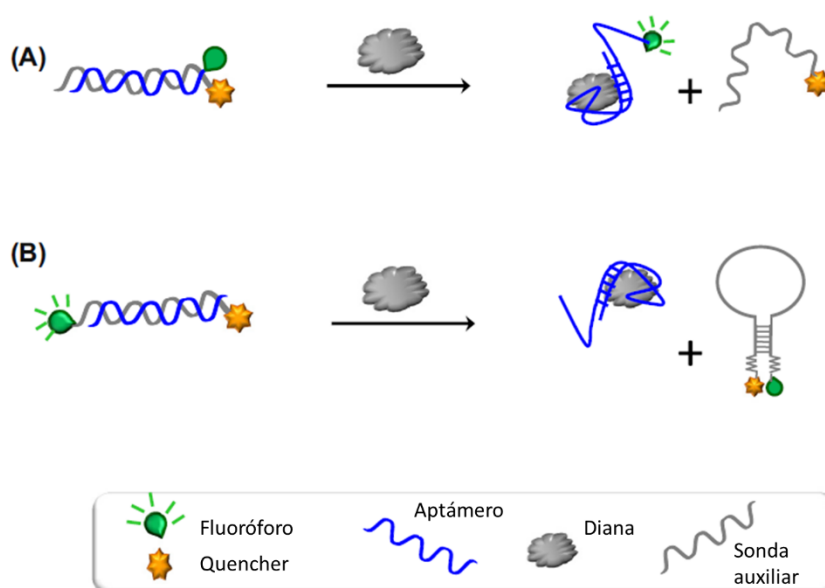


Figura 6. Representación esquemática de aptaensayos directos de desplazamiento de hebra inducido por la diana con detección óptica de señal (A) creciente y (B) decreciente³².

1.4.2. Ensayos tipo sándwich

Los ensayos tipo sándwich requieren de la participación de 3 moléculas, por ejemplo, la molécula diana y dos aptámeros (uno de captura y uno de señalización o detección) que reconocen dos sitios de unión no superpuestos en la diana (Figura 7), proporcionando una selectividad marcadamente aumentada en comparación a los formatos de una sola unión. Los factores que determinan el límite de detección de estos ensayos son la constante de afinidad de los aptámeros, la unión no específica del aptámero marcado y la detectabilidad del trazador unido al aptámero de señalización. Por lo tanto, el uso de sistemas de amplificación como marcadores, tales como enzimas o nanopartículas metálicas, conducen a ensayos de señal creciente (signal-on) altamente sensibles, aunque debe observarse que

la capacidad de reconocimiento de los aptámeros así como la capacidad de detección de las marcas deben preservarse después de su conjugación.

Otro factor clave y que limita la aplicabilidad de este tipo de ensayos es la disponibilidad de dos aptámeros diferentes que reconozcan la misma diana. Una alternativa es la combinación de un aptámero y un anticuerpo, y dado que es más fácil modificar con marcas los aptámeros que los anticuerpos, los primeros suelen utilizarse como elemento de detección³².

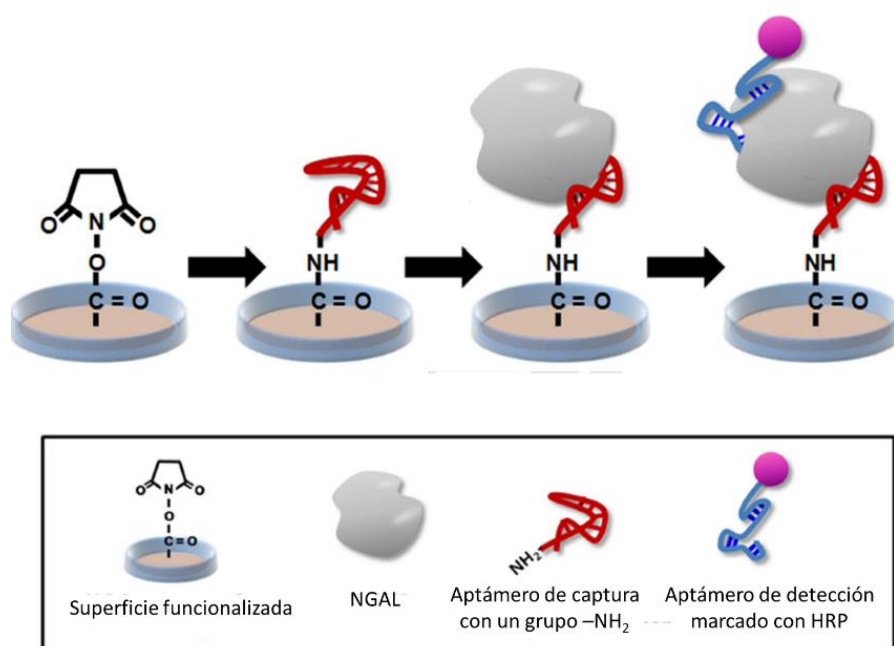


Figura 7. Representación esquemática de un aptaensayo tipo sándwich para la determinación de lipocalina-2 (NGAL), basado en la utilización de aptámero inmobilizado en un soporte y un aptámero marcado con HRP, que se unen a la diana por distintas regiones¹².

1.4.3. Ensayos competitivos

Los ensayos competitivos son muy adecuados para la detección de pequeñas moléculas que carecen de múltiples epítomos. En un posible formato, el analito no marcado (diana) presente en la muestra puede determinarse mediante su habilidad para competir con su análogo marcado por el sitio de unión en el aptámero. De acuerdo con esto, la señal registrada será inversamente proporcional a la concentración de diana en la muestra.

Sin embargo, el marcaje de las dianas manteniendo sus propiedades de reconocimiento molecular a veces no es factible. Como solución a este problema, se han

desarrollado ensayos competitivos de inhibición, en los que la molécula que se marca es el aptámero. Estos ensayos se basan en la competición del analito libre en disolución y su análogo inmovilizado en un soporte por una cantidad limitada de aptámero marcado. Por tanto, la presencia de analito en la muestra impide la unión de la diana inmovilizada al aptámero marcado, conduciendo a un decrecimiento de la señal. Una de las marcas más utilizadas son las enzimas, conjugadas al aptámero por medio de la interacción biotina-estreptavidina o antígeno-anticuerpo³². La utilización de un marcaje monovalente por medio de fragmentos Fab de anticuerpos para acoplar la enzima mejora significativamente la sensibilidad de los ensayos en comparación con aquellos que utilizan el sistema biotina-estreptavidina³⁶.

1.4.4. Ensayos ELASA

Al igual que los anticuerpos, los aptámeros pueden participar en ensayos de unión con amplificación enzimática conocidos como ELISA. En este caso se denominarían ELASA (Enzyme-Linked Apta-Sorbent Assay) y los aptámeros no suelen estar marcados directamente con el enzima sino con moléculas pequeñas. Al igual que los métodos ELISA, pueden diseñarse diferentes configuraciones, dependiendo de la disponibilidad de aptámeros u otros receptores de afinidad como anticuerpos que puedan unirse a regiones diferentes de la diana. Por ejemplo, el ELASA directo, que suele utilizarse para la determinación de la constante de disociación de los complejos aptámero-diana, se basa en la inmovilización de la diana en una plataforma y en la utilización de aptámero biotinilado, al que luego se le une la enzima HRP conjugada a estreptavidina. Otros formatos incluyen el ELASA indirecto, ELASA competitivo y ELASA sándwich, del cual existen múltiples variantes³⁷.

1.5. Amplificación de círculo rodante (RCA)

1.5.1. Aspectos generales

Debido a la naturaleza nucleotídica de los aptámeros, las técnicas de amplificación que se concibieron originalmente para los ácidos nucleicos pueden extenderse a la detección

de otras moléculas de gran interés que pueden ser reconocidas de forma específica por aptámeros.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el estándar de oro para la amplificación y cuantificación de ácidos nucleicos, y ha sido utilizada con éxito en diferentes ensayos basados en aptámeros. En esta tecnología, llamada apta-PCR, el propio aptámero o un sustituto, dependiendo de si el ensayo es directo, competitivo o tipo sándwich, actúa como molde para ser amplificado de forma exponencial vía PCR³².

Los métodos basados en PCR requieren del uso de termocicladores, personal formado e instalaciones específicas. Sin embargo, existen muchas enfermedades infecciosas que son endémicas en entornos de bajos recursos, donde la ausencia de suministros de energía fiables es una barrera crítica para realizar ensayos basados en PCR. Recientemente, se han desarrollado nuevos tipos de amplificación que no requieren la ciclación de temperaturas, como la amplificación dependiente de helicasa (HDA) y la amplificación de círculo rodante (RCA), entre otras³⁸. Estos métodos utilizan una gran variedad de herramientas de la biología molecular para amplificar de forma específica las dianas de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas, y los amplicones se pueden detectar en algunos casos directamente, sin la necesidad de un instrumento³⁹.

La amplificación de círculo rodante (RCA) es un método isotérmico *in vitro* para la síntesis de cientos a miles de copias lineales de pequeñas sondas circulares de ADN de hebra simple. Las largas repeticiones de secuencias de ADN obtenidas de este modo pueden servir como amplificación de la señal para la detección ultrasensible de ácidos nucleicos específicos y de otras moléculas de importancia biológica⁴⁰.

La RCA fue descubierta a mediados de los años 90^{41,42}. En su formulación original, también conocida como RCA lineal, la amplificación consiste en numerosas rondas de síntesis enzimática a temperatura constante (desde temperatura ambiente hasta 37 °C), en la cual ciertas ADN y ARN polimerasas (phi29, Bst, Vent *exo*-ADN polimerasa para ADN y T7 ARN polimerasa para ARN)⁴³ extienden un cebador hibridado a una pequeña sonda circular de ADN de hebra simple, de varias decenas de nucleótidos, progresando continuamente alrededor de dicha sonda para replicar su secuencia una y otra vez. Este proceso se

caracteriza por tener una cinética lineal, produciendo fácilmente en una hora varios miles de repeticiones de la secuencia complementaria al molde circular de ADN. En el caso de la RCA lineal, el producto de amplificación generado es un ADN o ARN de hebra simple, por lo que puede utilizarse para hibridar con sondas nucleotídicas con diferentes marcas que permitan su detección⁴⁰.

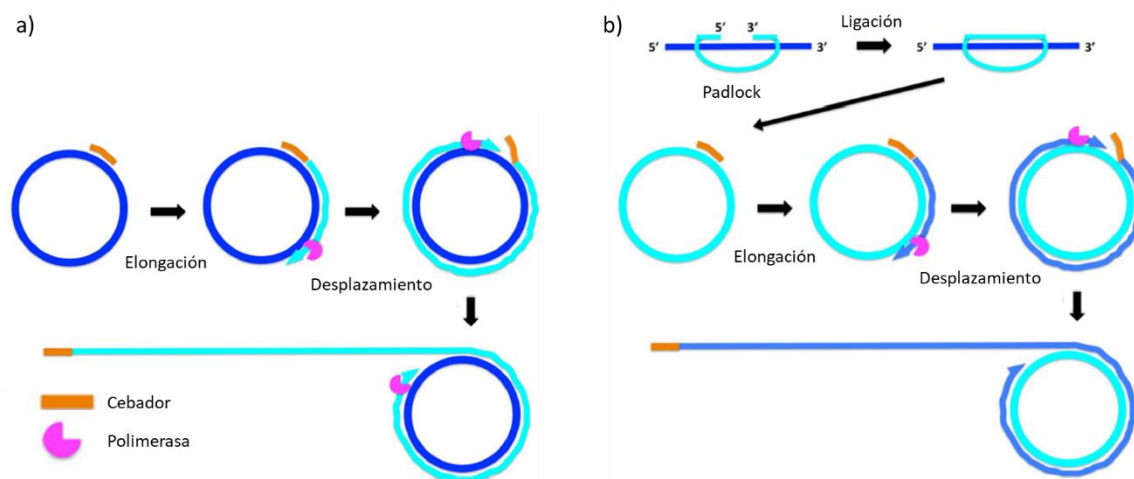


Figura 8. Esquema del mecanismo de reacción de la RCA utilizando (a) sondas circulares de ADN preformadas y (b) sondas lineales tipo padlock, que requieren una reacción de ligación previa a la RCA para su circularización³⁸.

Existen dos grupos de RCA: (I) las que utilizan sondas circulares de ADN preformadas (Figura 8a) y (II) las que implican la circularización de sondas lineales hibridadas y su ligación previa a la RCA (Figura 8b). En este último caso, los minicírculos de ADN formados *in situ*, que reciben el nombre de “padlocks” y “earrings” (candados y pendientes), proporcionan al ensayo una mayor especificidad de secuencia, ya que para formar esos minicírculos la sonda lineal debe reconocer dos cebadores y la no correspondencia de bases cerca del lugar de ligación interfiere enormemente en el proceso de ligación⁴⁰.

1.5.2. Ventajas de la RCA

La principal ventaja de la RCA es que al ser una amplificación isotérmica no requiere el uso de instrumentación para ciclar la temperatura, la cual es necesaria en métodos basados en PCR, tal y como se comentó anteriormente. Además, su naturaleza isotérmica, junto con su atractivo y simple mecanismo, hace que sea muy adecuada para la miniaturización y

automatización⁴⁴. En comparación con la PCR, que solo puede ser ejecutada por enzimas termoestables, la RCA puede llevarse a cabo con una gran variedad de polimerasas.

Las principales dificultades de los ensayos basados en RCA es que requieren cierto cuidado para evitar posibles contaminaciones y falsos positivos. En algunos casos es necesaria la liberación de las sondas hibridadas a las secuencias diana y la eliminación de las hebras de ADN interferentes mediante tratamiento adicional con endo- y exonucleasas para alcanzar los requisitos de sensibilidad en la detección⁴⁰.

En el caso de su empleo en aptaensayos supone una alternativa de amplificación de la señal totalmente vedada a los anticuerpos, que puede competir e incluso superar la amplificación enzimática clásica.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto es el desarrollo de estrategias de amplificación de ADN para incrementar la señal analítica de aptaensayos para la detección de biomarcadores específicos del cáncer de páncreas, uno de los tumores con peor pronóstico de supervivencia y para el que se están buscando alternativas de diagnóstico temprano no invasivas (biopsia líquida). Para ello se seleccionó uno de los biomarcadores más prometedores para los que ya se han descrito aptámeros, la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) o lipocalina-2 (LCN-2) y se propone como estrategia de amplificación, la amplificación de círculo rodante (RCA), por su naturaleza isotérmica y su mecanismo sencillo, que permite aprovechar la naturaleza nucleotídica de los aptámeros para multiplicar la señal electroquímica asociada al evento de reconocimiento.

Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos parciales:

1. Optimización de los parámetros que afectan a la amplificación utilizando para ello un aptámero funcionalizado en un extremo con un grupo tiol que permite su anclaje a un sustrato de oro y en el otro con secuencias complementarias a los extremos de una sonda circularizable, que actuará como molde para la RCA.
2. Evaluación comparada de varios métodos de transducción electroquímica de la amplificación RCA: espectroscopia electroquímica de impedancias, cronocoulombimetría y cronoamperometría tras hibridación y marcaje enzimático.
3. Aplicación al desarrollo de ensayos de unión para la detección de NGAL mediante aptámeros con amplificación RCA y detección electroquímica.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentación

Para la realización del presente trabajo se utilizaron celdas electroquímicas serigrafiadas (SPCs) de los modelos DRP-220BT y DRP-110 (DropSens, España). Las SPCs del modelo DRP-220BT consisten en un electrodo de trabajo de oro de 4 mm de diámetro, un contraelectrodo de oro y un electrodo de pseudorreferencia de plata, integrados en una tira plana de alúmina de dimensiones 33×10×0,5 mm, y un material dieléctrico hidrofóbico que define un volumen de celda de 50 μ L. Las SPCs del modelo DRP-110 son iguales que las anteriores salvo que el electrodo de trabajo y el contraelectrodo son de carbono.

Las medidas electroquímicas por cronoamperometría y cronocoulombimetría se llevaron a cabo con un potenciostato μ -AutoLab type II (Eco Chemie B. V., Países Bajos) controlado por ordenador con el software GPES 4.9. Las medidas de impedancia se realizaron con un potenciostato AutoLab PGSTAT 12 (Eco Chemie B. V.) controlado por un equipo informático provisto del software NOVA 2.1. Como interfase entre la celda electroquímica serigrafiada y el potenciostato se empleó un conector específico suministrado por DropSens. Todos los potenciales están referidos al electrodo de pseudorreferencia serigrafiado de Ag y para cada ensayo se utilizaron celdas electroquímicas serigrafiadas nuevas. Las disoluciones preparadas se homogeneizaron con ayuda de un agitador VORTEX Genius 3 (IKA, Alemania).

En los experimentos con partículas magnéticas, las etapas de lavado se realizaron con un separador magnético DynaMag™ 2 (Thermo Fisher Scientific, España), mientras que las etapas de incubación se llevaron a cabo en una rueda de agitación Dynabeads MX Mixer (Thermo Fisher Scientific) y en un agitador termostatizado Thermomixer Comfort (Eppendorf, Alemania), según necesidad. Para las medidas cronoamperométricas, las partículas magnéticas modificadas se depositaron en el electrodo de trabajo de las celdas serigrafiadas DRP-110 con ayuda de un imán de 4 mm de diámetro.

3.2. Reactivos

Todos los oligonucleótidos sintéticos utilizados en el presente trabajo (Tabla 1) fueron adquiridos en forma de polvo liofilizado en Metabion (Alemania).

Tabla 1. Nombre y secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Función	Secuencia de bases (5'→3')
LCN2-1^a	Aptámero de captura tiolado para la NGAL (LCN-2) con cebadores para RCA	HS-(CH ₂) ₆ -ATA CCA GCT TAT TCA ATT CGG AGG GCG GAA GCA AAG CGT AAC AGA AAG CCA ACA CGC <u>GAG ATA GTA AGT GCA ATC T</u>
LCN2-2^a	Aptámero de detección para la NGAL (LCN-2) con cebador para RCA	CCA CAG TAG GTG AGG TTC ACT GAG TTA TCC ATT GTT GGC ATT TTT TTT TTA <u>GAT AGT AAG</u> <u>TGC AAT CT</u>
LCN2-3	Aptámero de detección para la NGAL (LCN-2) marcado con 6-FAM	6-FAM-CCA CAG TAG GTG AGG TTC ACT GAG TTA TCC ATT GTT GGC A
Padlock^{a,b}	Círculo rodante, molde para la RCA	<u>TTA CTA TCT TAA CAA CAT GAA GAT TGT AGG</u> TCA GAA CTC ACC TGT TAG AAA CTG TGA AGA TCG CTT <u>AGA TTG CAC</u>
RCA-SP^b	Sonda marcada con 6-FAM, complementaria al producto de RCA	6-FAM- <u>AAC AAC ATG AAG ATT GTA</u>

^a Las bases subrayadas en rojo y azul indican las regiones en las que se produce la hibridación entre el padlock (círculo rodante) y el aptámero LCN2-1, hibridación que conduce a la circularización del padlock en presencia de la correspondiente ligasa.

^b Las bases subrayadas en amarillo indican la región del padlock que coincide con la secuencia de bases de la sonda RCA-SP. Ello se debe a que ambos nucleótidos se diseñaron de forma que varias moléculas de la sonda marcada con 6-FAM se unan al producto de la RCA, cuya secuencia está constituida por múltiples repeticiones de la hebra complementaria al padlock (y, por tanto, complementaria a RCA-SP).

Los aptámeros funcionalizados con un grupo tiol en el extremo 5' fueron suministrados en forma de disulfuros. Para reducir los enlaces S-S y obtener los grupos -SH terminales, estos reactivos se trataron con una disolución 0,1 M del agente reductor ditioneitol (DTT) durante 16 h a temperatura ambiente. Los ADN-SH obtenidos se purificaron utilizando una columna desechable empaquetada con Sephadex G25 (modelo NAP-10, GE Healthcare, Reino Unido). Tras eluir con agua Milli-Q, la concentración de oligonucleótido tiolado se midió espectrofotométricamente a 260 nm (espectrofotómetro UV-Vis GENESIS™, Thermo Scientific)⁴⁵. Las disoluciones de todas las secuencias empleadas se alicuotaron y diluyeron a las concentraciones convenientes utilizando agua Milli-Q y se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso.

Las partículas magnéticas de 2,8 µm tosilactivadas (funcionalizadas con *p*-toluensulfonilo) Dynabeads™ M-280 fueron suministradas por Thermo Fisher Scientific (España), en forma de suspensión de concentración 30 mg/mL. Para la bioconjugación de las partículas con NGAL humana recombinante (Abcam, Reino Unido) se prepararon disoluciones con los siguientes reactivos: NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ (Merck, España) y (NH₄)₂SO₄ (Probus, España). La determinación de proteína inmovilizada se llevó a cabo con reactivo de Bradford (preparación comercial del colorante Coomassie brilliant blue G-250) concentrado 5X de SERVA Electrophoresis GmbH (Alemania).

Los reactivos *p*-aminofenol (*p*-ATP), 6-mercapto-1-hexanol (MCH), seroalbúmina bovina (BSA) 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en un formato lista para utilizar (sustrato K-blue de baja actividad, que incluye H₂O₂), Tween 20 (70%), cloruro de hexaaminrutenio (III) y hexacianoferratos (II) y (III) de potasio fueron comprados a Sigma-Aldrich (España). Las disoluciones reguladoras PBS (0,01 M fosfato, 0,154 M NaCl, pH 7,4), 10 veces concentrada (PBS 10X), SSPE 20X (0,2 M fosfato, 0,02 M AEDT, 2,98 M NaCl, pH 7,4) y Tris-HCl (hidrocloruro de tris(hidroximetil)aminometano 1 M, pH 7,4), fueron adquiridas también en Sigma-Aldrich. Los enzimas ADN ligasa T4 (5 weiss U/µL), con su respectivo medio de reacción (10X T4 DNA Ligase Buffer), y ADN polimerasa phi29 (10 U/µL), también con su medio de reacción (10X phi29 Reaction Buffer) se compraron a Thermo Fisher Scientific, junto con disolución bloqueante de caseína al 1% (m/v) en PBS 1X y ácido sulfúrico (95%). Los desoxiribonucleósidos trifosfato (dNTPs) se obtuvieron de Bioline

(EEUU). Los fragmentos Fab procedentes de anticuerpos antifluoresceína policlonales conjugados a peroxidasa de rábano picante (antiFITC-HRP, 150 U/mL) se compraron a Roche Diagnostics GmbH (Alemania). El etanol (96%) y el cloruro de potasio fueron suministrados por J.T. Baker (España). Todos los reactivos son de grado analítico y se usaron tal como se recibieron.

Todas las disoluciones acuosas se prepararon utilizando agua desionizada de alta pureza (18 M Ω -cm de resistividad) producida con un sistema Milli-Q (Direct-Q[®], Millipore Corporation).

3.3. Procedimientos

3.3.1. Ensayos sobre electrodos serigrafiados de oro

3.3.1.1. Modificación de los electrodos

En primer lugar, los electrodos se lavaron con etanol y agua desionizada y se secaron en corriente de nitrógeno para obtener una superficie reproducible. A continuación, se llevó a cabo un acondicionamiento electroquímico. Para ello, se colocaron 50 μ L de una disolución de H₂SO₄ 0,5 M y se aplicó un potencial positivo de 1,3 V durante 30 s. Tras esto, el electrodo se sometió a varios barridos cíclicos de potencial entre 0 y 1,3 V, a una velocidad de barrido de 100 mV/s, hasta obtenerse un voltograma cíclico estable³¹. Finalmente, los electrodos se lavaron con PBS 1X y se secaron con nitrógeno inmediatamente antes de la formación de la monocapa de ADN.

Para la formación de la monocapa de aptámero, el electrodo de trabajo de oro, recién lavado y acondicionado se expuso a una disolución de sonda de captura tiolada (LCN2-1) 1 μ M en tampón PBS 1X y se incubó durante toda la noche en atmósfera saturada de agua a 4 °C (Etapa 1, Figura 9). Tras una etapa de lavado con tampón PBS 2X para eliminar las interacciones Au-ADN no específicas, la película de sonda de captura se trató con una disolución 1 mM de tiol diluyente en tampón PBS 2X durante 50 minutos a temperatura ambiente y se lavó con PBS 1X³¹ (Etapa 2, Figura 9). En los experimentos de cronoamperometría se utilizó como tiol diluyente *p*-aminotiofenol, mientras que en los ensayos de impedancia se estudiaron tanto este diluyente como el 6-mercapto-1-hexanol.

Tras el bloqueo con tiol diluyente, se llevó a cabo la hibridación del círculo rodante, molde de la RCA, y la ligación de sus extremos. Para ello, el electrodo de trabajo de la celda serigrafiada se puso en contacto con una disolución 10 nM de padlock con 0,125 U/ μ L de ADN ligasa T4 en su respectivo buffer de reacción, durante 30 minutos y a temperatura ambiente (Etapa 3, Figura 9). Al terminar esta etapa, se lavó de nuevo el electrodo con PBS 1X.

Una vez circularizado el padlock, se puede llevar a cabo la RCA. Para la realización de dicha etapa, el electrodo de trabajo de la celda serigrafiada se trató con una disolución que contenía 0,25 U/ μ L de ADN polimerasa phi29, 0,5 mM de dNTPs y el correspondiente buffer de reacción, en la concentración recomendada por el fabricante. La amplificación se llevó a cabo durante 15 minutos a 37 °C en estufa (Etapa 4, Figura 9). Una vez transcurrido ese tiempo, se lavó con PBS 1X.

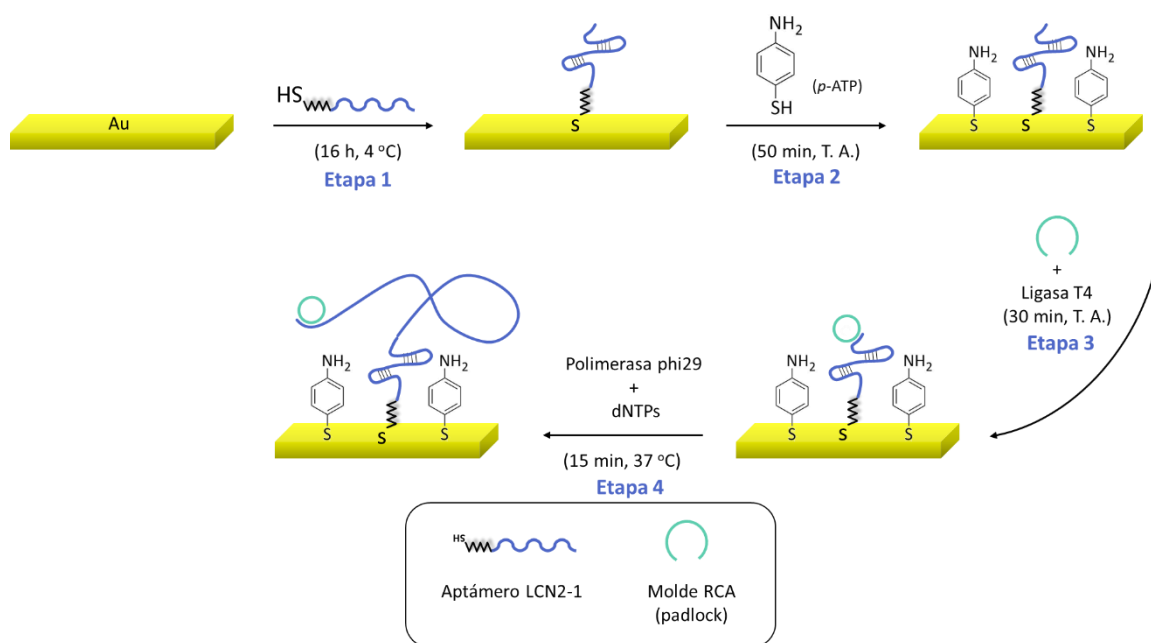


Figura 9. Representación esquemática del protocolo de modificación de los electrodos serigrafiados de oro.

3.3.1.2. Detección por espectroscopía de impedancias

Sobre la celda electroquímica se depositaron 50 μ L de una disolución 100 mM de KCl en Tris-HCl 10 mM que contenía una concentración 5 mM de los compuestos electroactivos $K_3[Fe(CN)_6]$ y $K_4[Fe(CN)_6]$. Como potencial de trabajo se seleccionó el potencial formal del

sistema reversible utilizado como indicador. Dicho potencial se estimó previamente realizando una voltamperometría cíclica del par redox indicador, y resultó ser 0,19 V. El espectro de impedancias se obtuvo variando la frecuencia del potencial de excitación en el intervalo entre 10 mHz y 10 kHz.

3.3.1.3. Detección por cronoculombimetría

La cantidad de ADN inmovilizada en la superficie del electrodo se estimó utilizando el método de Tarlov⁴⁶, que se basa en la interacción electrostática entre el esqueleto de grupos fosfato del ADN, cargado negativamente, y un catión electroactivo como $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. La carga asociada al proceso de reducción del catión unido electrostáticamente está directamente relacionada con la densidad de ADN inmovilizado. Las medidas de cronoculombimetría se realizaron en una disolución reguladora de baja fuerza iónica (Tris-HCl 10 mM de pH 7,4) en ausencia y presencia de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 100 μM , cubriendo los tres electrodos de la celda serigrafiada con dicha disolución. Primero se aplicó un potencial de 0,1 V durante 30 s para acondicionar el electrodo, seguido de una etapa de 8 s a -0,35 V. Las disoluciones mencionadas se purgaron con nitrógeno antes de realizar las medidas.

3.3.1.4. Detección por cronoamperometría

El electrodo de trabajo modificado se trató con una disolución 100 nM de la sonda RCA-SP marcada con 6-carboxifluoresceína en PBS 1X, complementaria al producto de RCA, durante 30 minutos a temperatura ambiente (Etapa 1, Figura 10). A continuación, se lavó con la misma disolución reguladora y se llevó a cabo la unión del conjugado antiFITC-HRP, incubando el electrodo con una disolución que contenía 0,5 U/mL de enzima en PBS 1X con un 0,5% de caseína, para bloquear la superficie del electrodo y evitar adsorciones inespecíficas (Etapa 2, Figura 10). Finalmente, el electrodo se lavó con PBS 1X.

Para realizar las medidas, los tres electrodos de la celda serigrafiada se cubrieron con 40 μL de TMB, sustrato de la peroxidasa, y se dejó transcurrir la reacción enzimática durante 30 s (Etapa 3, Figura 10). La medida electroquímica del producto electroactivo generado se llevó a cabo mediante cronoamperometría aplicando un potencial de -0,2 V

durante 1 minuto, adquiriendo un valor de corriente cada 0,2 segundos. Como señal analítica se tomó el valor absoluto del promedio de los últimos 10 segundos de la medida cronamperométrica.

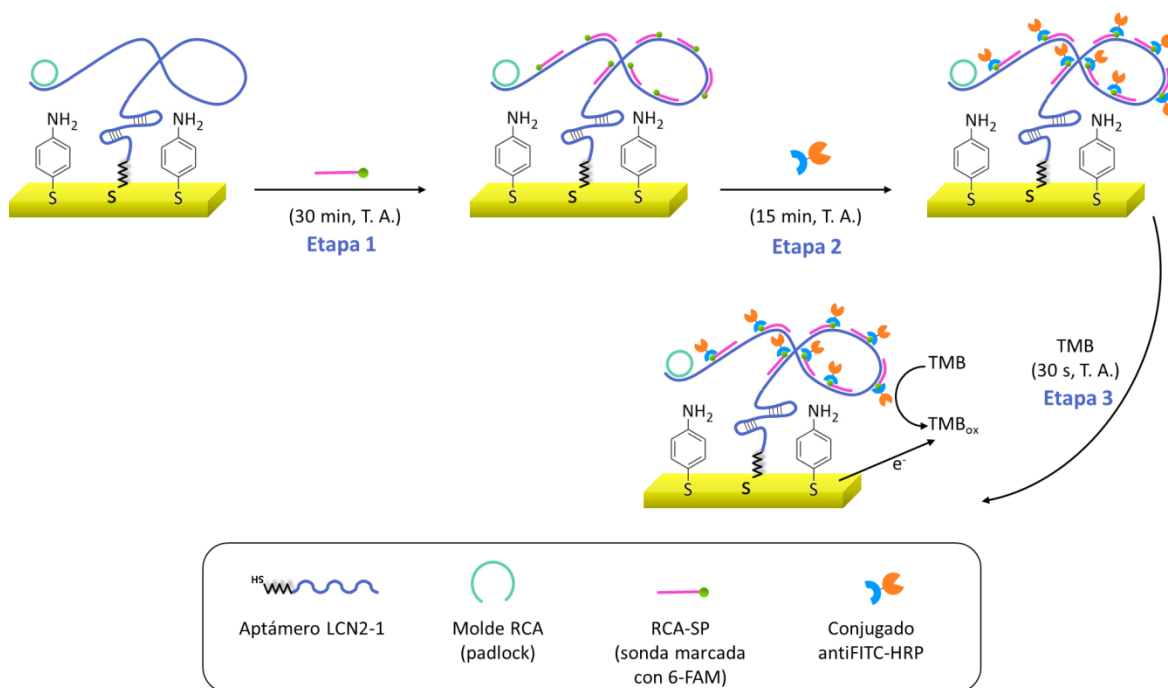


Figura 10. Representación esquemática del protocolo de detección por cronamperometría en los ensayos con electrodos serigrافيados de oro.

3.3.2. Ensayos sobre partículas magnéticas.

3.3.2.1. Modificación de las partículas magnéticas con NGAL

Las partículas magnéticas están funcionalizadas con *p*-toluensulfonilo, por lo que se pueden bioconjugarse por unión covalentemente a biomoléculas con grupos amino y sulfhidrilo, como las proteínas (Figura 11).

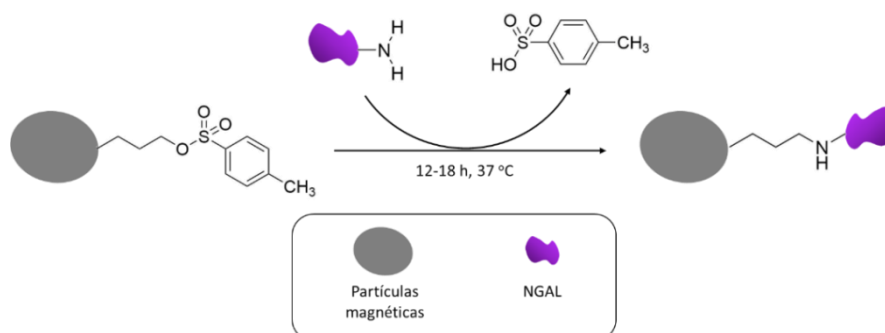


Figura 11. Esquema de la reacción de bioconjugación de la proteína NGAL a partículas magnéticas funcionalizadas con *p*-toluensulfonilo.

Para la unión covalente de NGAL a las partículas magnéticas, se utilizaron las siguientes disoluciones, recomendadas por el fabricante (Thermo Fisher Scientific):

- Disolución A (prelavado y modificación): fosfato sódico 0.1 M de pH 7.4 (19 mM NaH_2PO_4 , 81 mM Na_2HPO_4).
- Disolución B (modificación): sulfato amónico 3 M en disolución A.
- Disolución C (primer lavado): PBS 1X con 0,5% de BSA.
- Disolución D (segundo lavado y almacenamiento): PBS 1X con 0,1% de BSA.

En primer lugar, se realizó un lavado de las partículas magnéticas para eliminar la disolución con conservantes en la que se suministran. Para ello, se transfirieron 165 μL de la suspensión comercial de partículas a un tubo de 1,5 mL y se añadió 1 mL de disolución A. Después de agitar en vórtex, se eliminó el sobrenadante con ayuda de un separador magnético (imán) que provoca la acumulación de las partículas en la pared del tubo. A continuación, se realizó un segundo lavado con 165 μL de disolución A, seguido de agitación y eliminación del líquido.

Una vez lavadas, las partículas se pusieron en contacto con 60 μg de NGAL en un volumen de 150 μL de disolución A y 100 μL de disolución B (mezcla 3:2), se homogeneizó en vórtex y se incubó a 37 °C durante 12-18 h con agitación (Thermomixer). Transcurrido ese tiempo, se eliminó el sobrenadante con ayuda del separador magnético y se añadió 1 mL de disolución C, que contiene BSA para bloquear la superficie de las partículas y evitar posibles adsorciones inespecíficas posteriores. Las partículas se resuspendieron y se incubaron en dicha disolución a 37 °C durante 1 h con agitación (Thermomixer). A continuación, se eliminó el líquido y se realizaron dos lavados con 1 mL de disolución D, resuspendiendo las partículas mediante agitación con vórtex y eliminando el sobrenadante con ayuda del imán entre cada lavado. Finalmente, se reconstituyeron en 250 μL de disolución D (concentración final de partículas: 20 mg/mL) y se almacenaron hasta el momento de su utilización a 4 °C.

La cantidad de proteína inmovilizada sobre las partículas se determinó mediante el método Bradford, basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas⁴⁷. Para ello, se analizó

mediante dicho método el sobrenadante resultante de la etapa de incubación de las partículas con NGAL, siguiendo el protocolo estipulado por el fabricante del reactivo de Bradford empleado (SERVA Electrophoresis GmbH), que se resume a continuación.

Se prepararon un blanco y 5 disoluciones patrón de BSA en el rango de concentraciones 100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluyendo con la misma disolución acuosa que la del sobrenadante analizado (mezcla 3:2 de disoluciones A y B). Seguidamente, se tomaron 100 μL de blanco, patrones y muestra y se trataron (en tubos diferentes) con 5 mL de reactivo de Bradford 1X (dilución 1:5 del formato comercial). Tras agitar e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595 nm de cada tubo. Con los valores de absorbancia obtenidos para los patrones de BSA se construyó una curva de calibrado, a partir de la cual se determinó la concentración de NGAL en el sobrenadante.

3.3.2.2. Ensayo para el estudio de la interacción aptámero-NGAL con RCA

Se tomaron alícuotas de 30 μL de la disolución stock de partículas modificadas con NGAL (20 mg/mL de partículas y 0,19 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de NGAL) y se incubaron durante 30 minutos con diferentes concentraciones de aptámero LCN2-2 (0,5 pM-500 nM) en un medio de PBS 1X y un volumen total de 250 μL (Etapa 1, Figura 12). Seguidamente, se colocaron en el imán, se retiró el sobrenadante para eliminar el posible exceso de aptámero y se realizaron dos lavados con PBS 1X/Tween 20 0,01%.

A continuación, se llevó a cabo la hibridación del molde de la RCA y la ligación de sus extremos. Para ello, las partículas se resuspendieron en un volumen de 30 μL de una disolución 10 nM de padlock y 0,125 Weiss U/ μL de ADN ligasa T4 en su respectivo buffer de reacción y se incubaron durante 30 minutos (Etapa 2, Figura 12). Trascorrido ese tiempo, los tubos con partículas se colocaron en el imán para eliminar el líquido y realizar dos lavados, primero con PBS 1X/Tween 20 0,01% y después con PBS 1X.

Tras la hibridación del padlock, la RCA se llevó a cabo reconstituyendo las partículas en 30 μL de una disolución 0,5 mM de dNTPs y 0,25 U/ μL de ADN polimerasa phi29 en su correspondiente medio de reacción, incubando durante 15 minutos a 37 °C en el

Thermomixer (Etapa 3, Figura 12). Al terminar la amplificación, se eliminó el exceso de reactivos con ayuda del imán y se lavó con PBS 1X/Tween 20 0,01% y después con PBS 1X.

A continuación, las partículas se resuspendieron en 250 μ L de una disolución 100 nM en PBS 1X de sonda marcada con 6-FAM (RCA-SP), complementaria al producto de RCA, y se incubaron con agitación durante 30 minutos (Etapa 4, Figura 12). Después de eliminar el sobrenadante en el separador magnético y lavar 2 veces (PBS 1X/Tween 20 0,01% y PBS 1X), se llevó cabo el marcaje enzimático con antiFITC-HRP (0,5 U/mL en PBS 1X con 0,5% de caseína) durante 15 minutos (Etapa 5, Figura 12). Tras el marcaje, se retiró el sobrenadante con ayuda del imán y se realizaron dos lavados, primero con PBS 1X/Tween 20 0,01% y después con PBS 1X. Finalmente, las partículas se reconstituyeron en PBS 1X. Todas las incubaciones se realizaron bajo agitación constante y a temperatura ambiente, excepto la RCA, que se llevó a cabo a 37°C, tal y como se indicó anteriormente.

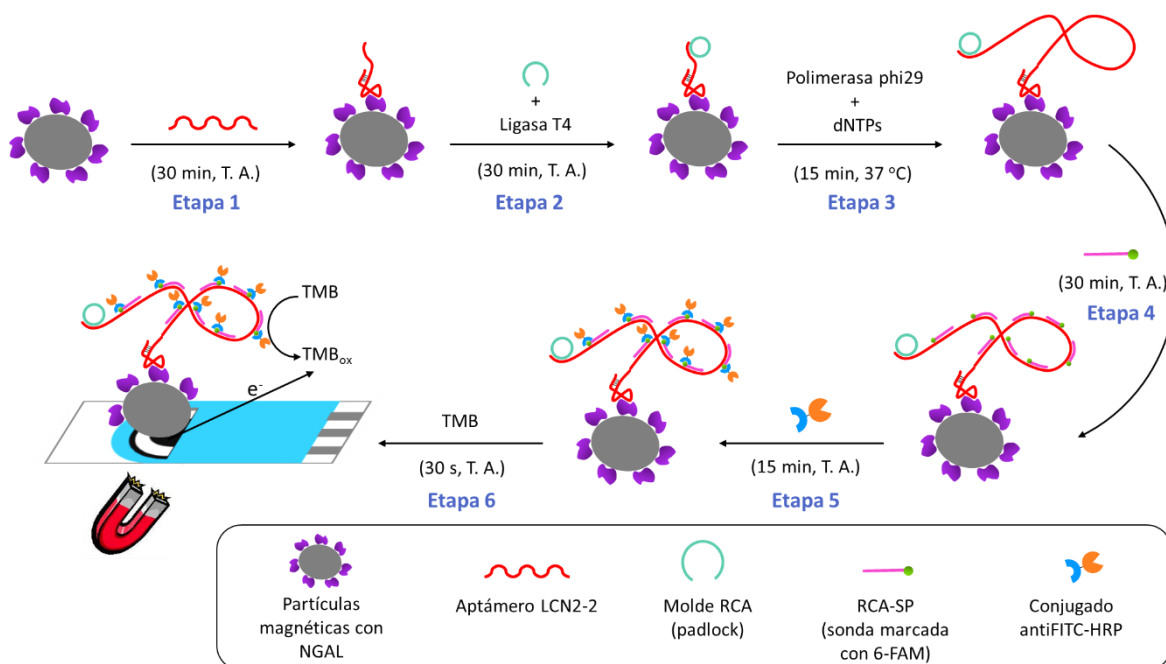


Figura 12. Representación esquemática del ensayo para el estudio de la interacción aptámero-NGAL con RCA.

Las medidas se realizaron por cronoamperometría utilizando celdas serigrafadas con electrodos de carbono (DRP-110, DropSens). Para atrapar las partículas magnéticas en el electrodo de trabajo, se colocó un imán de igual tamaño por debajo del mismo, empleando cinta adhesiva de doble cara (Figura 13). A continuación, se depositaron 10 μ L de partículas sobre el electrodo de trabajo y se incubó durante un minuto para que el imán las atrapase

por acción del campo magnético. Pasado ese tiempo, se añadieron 30 μL de TMB, sustrato de la peroxidasa, de manera que se cubriesen los tres electrodos de la celda serigrafiada y se dejó transcurrir la reacción enzimática durante 30 s (Etapa 6, Figura 12). La medida electroquímica del producto electroactivo generado se llevó a cabo aplicando un potencial de 0 V durante 1 minuto, adquiriendo un valor de corriente cada 0,2 segundos. Como señal analítica se tomó el valor absoluto del promedio de los últimos 10 segundos de la medida cronoamperométrica.

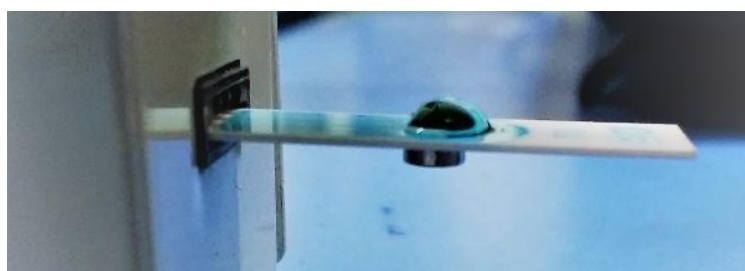


Figura 13. Montaje experimental empleado para realizar las medidas cronoamperométricas con partículas magnéticas, consistente en la celda serigrafiada de carbono (DRP-110) acoplada por su parte posterior (con cinta adhesiva) a un imán del mismo tamaño que el electrodo de trabajo.

3.3.2.3. Ensayo para el estudio de la interacción aptámero-NGAL sin RCA

Al igual que en el ensayo anterior, se tomaron alícuotas de 30 μL de la disolución stock de partículas modificadas con NGAL y se incubaron durante 30 minutos con diferentes concentraciones de aptámero LCN2-3 (0,5 pM-500 nM), marcado con 6-FAM, en un medio de PBS 1X y un volumen total de 250 μL (Etapa 1, Figura 14). Seguidamente, se colocaron en el imán, se retiró el sobrenadante para eliminar el posible exceso de aptámero y se realizaron dos lavados con PBS 1X/Tween 20 0,01%.

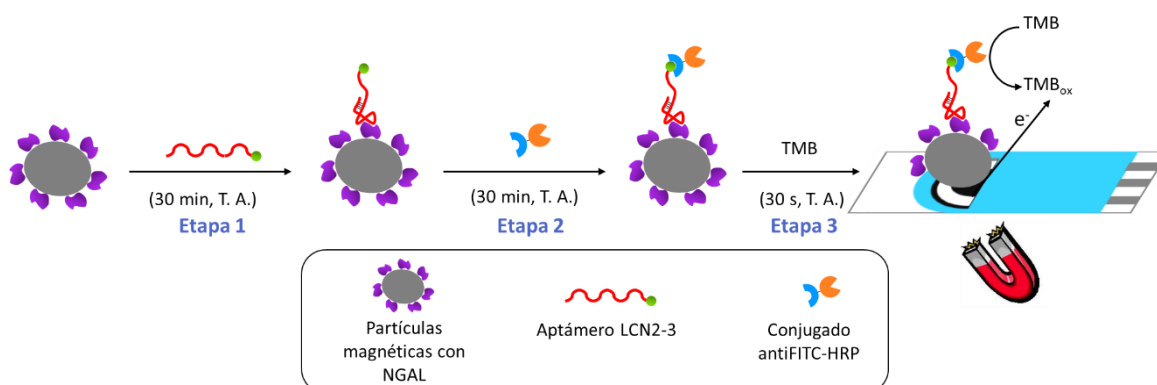


Figura 14. Representación esquemática del ensayo para el estudio de la interacción aptámero-NGAL sin RCA.

A continuación, se llevó cabo el marcaje enzimático con antiFITC-HRP (0,5 U/mL en PBS 1X con 0,5% de caseína) durante 30 minutos (Etapa 2, Figura 14). Tras el marcaje, se retiró el sobrenadante con ayuda del imán y se realizaron dos lavados, primero con PBS 1X/Tween 20 0,01% y después con PBS 1X. Finalmente, las partículas se reconstituyeron en PBS 1X. Todas las incubaciones se realizaron bajo agitación constante y a temperatura ambiente.

Para la realización de las medidas de cronoamperometría se siguió el mismo protocolo que en el ensayo anterior (sección 3.3.2.2.).

3.3.2.4. Magneto-aptensayo competitivo para la determinación de NGAL

En este ensayo, se tomaron alícuotas de 30 μ L de la disolución stock de partículas modificadas con NGAL y se incubaron en una disolución 15 pM de aptámero LCN2-2 en PBS 1X con diferentes concentraciones de NGAL (0, 50 y 500 ng/mL) durante 30 minutos (Etapa 1, Figura 15). Seguidamente, se colocaron en el imán, se retiró el sobrenadante para eliminar el complejo aptámero-NGAL que está en disolución y se realizaron dos lavados con PBS 1X/Tween 20 0,01%.

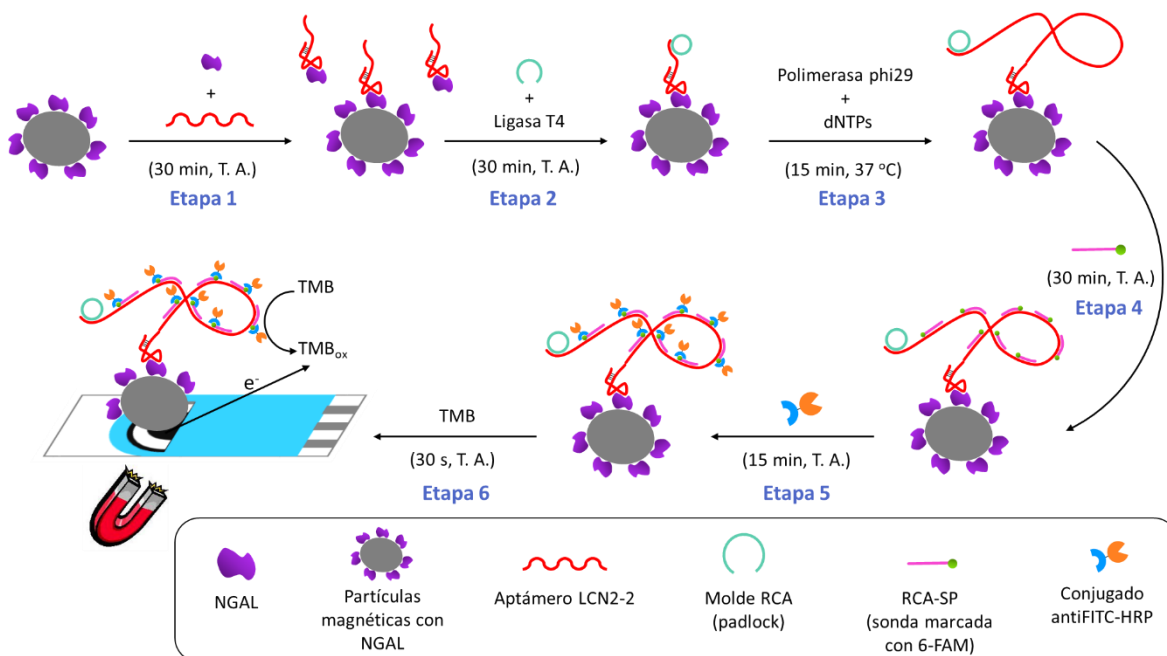


Figura 15. Representación esquemática del ensayo competitivo para NGAL con partículas magnéticas.

El resto de etapas del ensayo competitivo (Etapas 2-6, Figura 15) son idénticas a las del ensayo para el estudio de la interacción aptámero-NGAL con RCA (Etapas 2-6, Figura 12) y fueron ejecutadas tal y como se describe en la sección 3.3.2.2. del presente Trabajo Fin de Máster.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de la RCA sobre electrodos serigrafiados de oro

Para investigar de forma sencilla la posibilidad de realizar una amplificación de círculo rodante en la superficie de oro serigrafiado y poder aplicarla a una metodología para la determinación de NGAL, el aptámero de captura del aptaensayo tipo sándwich descrito por Lee, K.-A. *et al*¹² para la determinación de este biomarcador se modificó con un grupo tiol en su extremo 5' y se aprovecharon las secuencias de su extremo 3' (que se habían utilizado como cebadores de PCR en el proceso SELEX), para diseñar una sonda de ADN de hebra simple tipo padlock que actúa como molde para la RCA, cuyos extremos son complementarios a dicha región del aptámero (LCN2-1, Tabla 1). El grupo -SH permite su inmovilización sobre la superficie de electrodos serigrafiados de Au, y dicho anclaje se ejecutó tal y como se describe en la sección 3.3.1.1.

Con el fin de diseñar una metodología rápida y de precio asequible, se optimizaron las siguientes variables que afectan a la reacción de amplificación:

- Concentración de reactivos: molde de la RCA (padlock, 10-100 nM), ADN ligasa T4 (0,125-1 weiss/ μ L) y ADN polimerasa phi29 (0,25-1 U/ μ L).
- Duración de las etapas: hibridación del padlock, reacción de la ligasa (ligación de los extremos de la hebra molde, 30-120 min) y RCA (15-60 minutos).

Para simplificar el proceso de optimización, no se evaluó la interacción del aptámero con la NGAL durante el mismo. Además, tal y como está diseñado el aptámero utilizado, sin un espaciador (p. e. de timinas) entre la región que participa en el reconocimiento de la proteína y los cebadores de la RCA, y al no trabajar en las condiciones para las que fue concebido originalmente, la interacción receptor-diana podría verse afectada.

Se estudiaron tres estrategias para la detección electroquímica del producto de la amplificación:

1. Medida de la resistencia a la transferencia electrónica entre un indicador redox y la superficie electródica mediante espectroscopia de impedancia faradaica.
2. Unión electrostática del catión electroactivo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ y medida cronocoulombimétrica.
3. Hibridación con sonda complementaria marcada con fluoresceína, marcaje con HRP y medida cronoamperométrica del producto generado en la reacción enzimática.

4.1.1. Detección por espectroscopia de impedancia

La impedancia eléctrica (Z) es la propiedad física que cuantifica la resistencia de un circuito eléctrico al flujo de corriente alterna cuando se aplica un potencial alterno. En el campo de los sensores químicos, la variación de la impedancia de las celdas electroquímicas como consecuencia de fenómenos superficiales es de especial interés. Las reacciones electroquímicas son procesos que comprenden varias etapas, desde la difusión y migración de los iones hasta el intercambio de electrones en la interfase electrodo/disolución. La doble capa eléctrica que se forma en esta interfase se comporta como un condensador, proporcionando una vía adicional para el flujo de corriente, además del proceso de intercambio electrónico. Las medidas de impedancia permiten caracterizar cada una de las etapas implicadas en las reacciones electroquímicas y, además, proporcionan información sobre las características de la doble capa eléctrica. Se pueden construir sensores químicos inmovilizando un receptor en una celda electroquímica, de manera que alguno de los procesos mencionados anteriormente se vea afectado por la interacción con el analito, provocando una variación medible en la impedancia electroquímica de la celda.

La espectroscopia de impedancia faradaica (Z_F) permite estudiar pequeñas perturbaciones en el estado de equilibrio de un sistema electroquímico y consiste en la medida de la impedancia del sistema en función de la frecuencia angular (ω) del potencial de excitación en un amplio rango de frecuencias, típicamente de 10 mHz a 100 kHz, en presencia de un par redox indicador como $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. En estas condiciones, y para modelizar fenómenos interfásicos, la celda electroquímica puede representarse como un circuito equivalente (modelo de Randles y Ershler) en el que se distinguen 4 elementos

(Figura 16a): la resistencia óhmica de la disolución (R_s), la impedancia asociada a la difusión de iones hacia la superficie electroda (Z_w), la capacidad diferencial de la doble capa (C_{dl}) y la resistencia a la transferencia electrónica (R_{et}). Los dos primeros representan propiedades generales de la disolución y características de difusión de la especie electroactiva en esa disolución, mientras que los otros dos dependen de las propiedades de la interfase electrodo/disolución²³. En sensores químicos, la señal analítica que normalmente se monitoriza son los cambios que se producen en la resistencia a la transferencia electrónica (R_{et}) en el sistema electroquímico transductor.

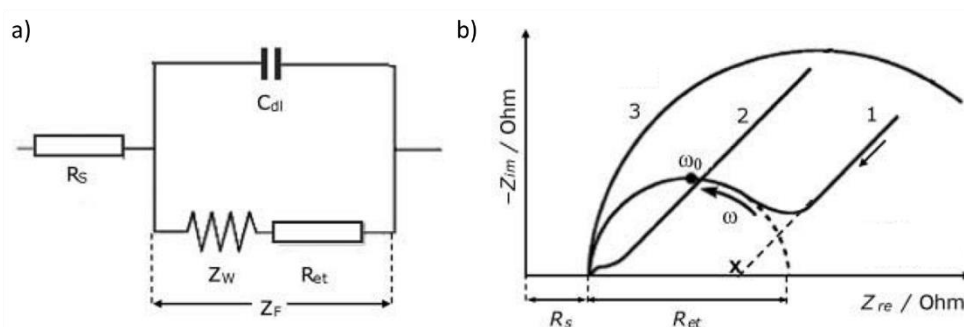


Figura 16. (a) Representación esquemática del circuito equivalente de una celda electroquímica en una medida de impedancia faradaica. (b) Diagrama de Nyquist para un electrodo modificado. Las flechas indican frecuencia (ω) creciente²³.

Una forma de representar los espectros de impedancias son los diagramas de Nyquist, en los que cada punto de un eje cartesiano se corresponde con la impedancia obtenida con una frecuencia angular determinada del potencial de excitación. Si la impedancia está controlada por la difusión del indicador redox en todo el rango de frecuencias angulares estudiado (baja R_{et}) su representación en el diagrama de Nyquist tiene forma de línea recta (Curva 2, Figura 16 b) mientras que si está controlada por la transferencia electrónica entre el electrolito y la superficie electroda en todo ω tiene forma de semicírculo (Curva 3, Figura 16b). Si Z está limitada por la difusión de la especie electroactiva a bajas ω y por la transferencia electrónica a altas ω , su representación en el diagrama de Nyquist será una combinación de los dos casos anteriores (Curva 1, Figura 16b). La resistencia a la transferencia electrónica se puede obtener de la representación de Nyquist a partir del diámetro de la región semicircular de la curva (Figura 16b).

En el presente trabajo, se utilizó la espectroscopia de impedancia faradaica, empleando como indicador electroactivo el par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM en KCl 100

mM/Tris-HCl 10 mM) para detectar el producto de la RCA, ya que al aumentar la longitud del ADN sobre la superficie se espera que aumente la R_{et} . Como punto de partida, se midió la R_{et} del electrodo modificado con la SAM mixta aptámero/cotiol y este valor se comparó con el obtenido tras la amplificación RCA en ausencia (blanco) y presencia de círculo rodante. Las condiciones experimentales empleadas en los ensayos de impedancias fueron las siguientes:

- Construcción de la SAM mixta: primera incubación con aptámero 1 μ M durante 16 h, segunda incubación con cotiol 1 mM durante 50 minutos.
- Hibridación de la sonda molde de la RCA y reacción de la ligasa: incubación de 1 h con sonda 100 nM y 0,125 weiss/ μ L de ligasa T4.
- RCA: incubación durante 1 h a 37 $^{\circ}$ C con dNTPs 0,5 mM y 1 U/ μ L de polimerasa phi29.

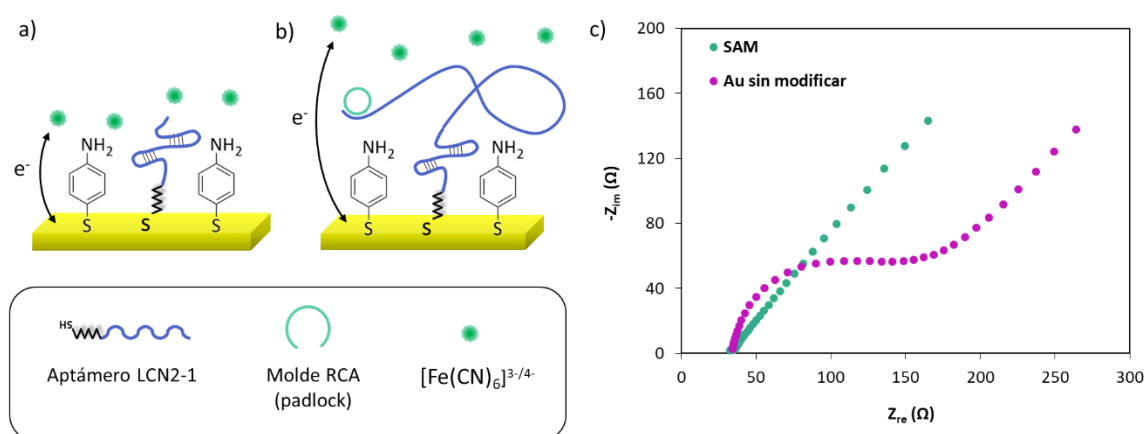


Figura 17. Representación esquemática de las medidas de impedancia (a) después de la formación de la SAM ADN/*p*-ATP y (b) tras la RCA. (c) Representaciones de Nyquist de electrodos modificados con *p*-ATP como cotiol.

Como se comentó en el protocolo de modificación de los electrodos (sección 3.3.1.1.) en los experimentos de impedancias se utilizaron como tioles diluyentes tanto *p*-ATP como MCH. En los diagramas de Nyquist obtenidos con electrodos modificados con tioanilina, se observa que la resistencia a la transferencia electrónica sobre un electrodo modificado con una SAM es muy inferior a la del Au sin modificar (Figura 17c, no se aprecia casi el semicírculo), a pesar de que la interacción de la superficie electródica con el par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

⁴ debería verse dificultada por la repulsión electrostática que ejercen los grupos fosfato, con carga negativa, que forman parte del ADN inmovilizado (Figura 17a).

Esto se puede atribuir a que *p*-ATP es conductor de la electricidad³¹, y su elevada densidad de empaquetamiento en el electrodo hace que la resistencia a la transferencia electrónica que pudiese ejercer el esqueleto fosfato del aptámero inmovilizado sea casi nula, y que disminuya respecto a la del electrodo sin modificar (Figura 17c). Este hecho, impide que esta SAM pueda ser usada para la detección. Por ello se decidió sustituir el cotiol por 6-mercapto-1-hexanol.

En este caso sí se obtuvieron espectros de impedancias en los que se observa una R_{et} apreciable tras la formación de la SAM (Figura 18). Una vez realizada la RCA, la cantidad de ADN inmovilizado en el electrodo aumenta, por lo que aumenta también el número de cargas negativas y R_{et} debería incrementarse (crecimiento del diámetro del semicírculo en el espectro de impedancias) al ser mayor la repulsión electrostática de la superficie electródica (Figura 17b). Esto solo debería ocurrir en los electrodos a los que se les añadió padlock, mientras que en los blancos la resistencia a la transferencia electrónica debería de experimentar menores cambios, puesto que no se va a producir la amplificación de ADN.

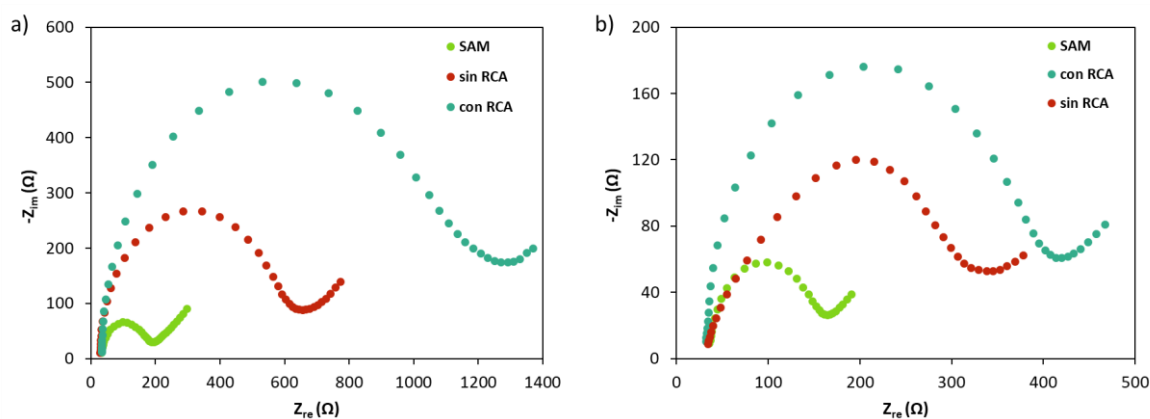


Figura 18. Representaciones de Nyquist obtenidas con electrodos modificados con MCH como cotiol, en los que la inmovilización del aptámero se realizó en un medio de (a) PBS 1X y (b) SSPE 2X.

Sin embargo, en los experimentos realizados se observó un aumento inespecífico de R_{et} en los blancos (sin RCA), que se atribuyó a la adsorción de los reactivos que se utilizan en las diferentes etapas de modificación, y aunque hay una diferencia clara entre la señal del electrodo donde se ha producido la RCA y la del blanco, la diferencia entre R_{et} (con RCA)-

$R_{et}(SAM)$ no es suficientemente grande para utilizarse analíticamente (Figura 18a). Se llevó a cabo un experimento utilizando SSPE 2X como disolución reguladora para realizar la inmovilización del aptámero (Etapa 1, Figura 9), puesto que se sospechó que la incapacidad para discriminar las señales de blancos y ensayos se debía a un recubrimiento deficiente de ADN sobre el electrodo. Esta disolución tampón tiene una mayor concentración de sales que PBS 1X, lo que hace que disminuyan las repulsiones electrostáticas entre moléculas de ADN adyacentes por apantallamiento de sus cargas y que aumente la cantidad de receptor que puede ser inmovilizado. Con todo, se obtuvieron resultados similares a los anteriores (Figura 18b), por lo que la detección del producto de RCA por espectroscopia de impedancias se descartó.

4.1.2. Detección por cronoculombimetría

Se evaluó una segunda alternativa para la detección del producto de la RCA, basada en medida cronoculombimétrica de un catión electroactivo que se asocia electrostáticamente al esqueleto aniónico de grupos fosfato del ADN y que, por tanto, es una medida de la densidad de ADN inmovilizado en la superficie del electrodo a partir de la. Estas medidas se realizan en un medio de baja fuerza iónica en presencia de un catión redox multivalente, que en esas condiciones queda unido electrostáticamente al ADN presente sobre la superficie electródica.

Un aspecto atractivo de la cronoculombimetría es que la carga de la doble capa y la carga debido a reacciones de especies adsorbidas en el electrodo puede diferenciarse de la carga debida a la reacción de moléculas electroactivas que difunden hacia el electrodo. Por tanto, la medida de la especie redox confinada en la superficie puede realizarse en presencia de indicador redox en disolución, para trabajar de esa manera en condiciones de equilibrio. En un experimento cronoculombimétrico, se aplica un salto de potencial desde un potencial donde el indicador redox no se reduce (0,1 V) a un potencial donde éste se reduzca totalmente (-0,35 V). Se registra la carga Q en función del tiempo t en ausencia y en presencia del indicador redox, que viene dada por la ecuación integrada de Cottrell,

$$Q = \frac{2nFAD_o^{1/2}C_o^*}{\pi^{1/2}}t^{1/2} + Q_{dl} + nFA\Gamma_o \quad (\text{Ecuación 1})$$

en donde n es el número de electrones por molécula de reducción, F la constante de Faraday (C/mol de electrones), A el área del electrodo (cm^2), D_o es el coeficiente de difusión (cm^2/s), C_o^* la concentración de indicador redox en el seno de la disolución (mol/cm^3), Q_{dl} la carga capacitiva (C), y $nFA \Gamma_o$ la carga procedente de la reducción del indicador redox adsorbido. El símbolo Γ_o designa el exceso superficial y representa la cantidad de indicador redox confinado cerca de la superficie del electrodo (sobre el ADN). Los datos cronocoulombimétricos se representan como Q frente $t^{1/2}$, y la ordenada a $t=0$, que se corresponde con $Q_{dl} + nFA \Gamma_o$, se determina por extrapolación de un ajuste por mínimos cuadrados de la parte lineal. Asumiendo que la capacitancia de la doble capa se mantiene prácticamente constante en las medidas con y sin indicador redox, Q_{dl} es constante para el salto de potencial escogido para realizar el experimento cronocoulombimétrico y $nFA \Gamma_o$ se calcula como la diferencia entre las ordenadas a $t=0$ de las medidas en presencia y ausencia de catión electroactivo.

La densidad del recubrimiento de ADN se puede determinar a partir del exceso superficial de indicador redox como

$$\Gamma_{ADN} = \Gamma_o \left(\frac{z}{m} \right) N_a \quad (\text{Ecuación 2})$$

en donde Γ_{ADN} es la densidad de recubrimiento de ADN ($\text{moléculas}/\text{cm}^2$), m es el número de grupos fosfato de las moléculas de ADN inmovilizadas, z es la carga del indicador redox y N_a es el número de Avogadro⁴⁶.

En el presente trabajo, como marcador redox se utilizó $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, la modificación de los electrodos se llevó a cabo aplicando las condiciones de los experimentos de impedancias, utilizando MCH como tiol diluyente, y las disoluciones se desoxigenaron con N_2 durante 5 min.

Al igual que en las medidas de impedancia, se estudió la respuesta cronocoulombimétrica antes y después de llevar a cabo la amplificación RCA. Tras la RCA aumenta la cantidad de ADN inmovilizado en el electrodo, con lo que la cantidad de marcador redox que se puede unir electrostáticamente es mayor y se espera, por tanto, un aumento de la señal (Figuras 19a y 19b). Sin embargo, los resultados obtenidos son similares en todos los casos por lo que no es posible apreciar el aumento de la longitud del

ADN tras la amplificación. (Figura 19c). Ello puede deberse a una desoxigenación deficiente de las disoluciones de trabajo, de forma que los procesos redox del oxígeno disuelto no eliminado interfieren en las señales. Por lo tanto, se descartó la utilización de este sistema de medida para la detección del producto de la RCA por las razones expuestas anteriormente.

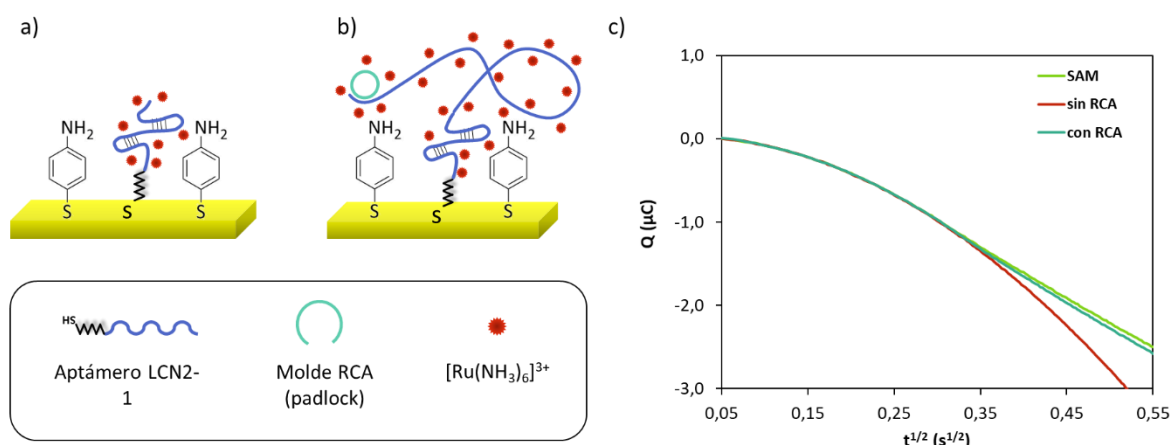


Figura 19. Representación esquemática de las medidas de impedancia (a) después de la formación de la SAM ADN/*p*-ATP y (b) tras la RCA. (c) Gráficas de Q frente $t^{1/2}$ de electrodos modificados con MCH como cotiol.

Con todo, se calculó densidad de recubrimiento de ADN (Ecuación 2) tras la formación de la SAM mixta ADN/MCH, y resultó ser $(1,35 \pm 0,84) \times 10^{12}$ moléculas/cm². Esta cifra es muy similar a la estimada en otras publicaciones para recubrimientos adecuados para su uso en genosensores^{46,48}, lo que desmiente la hipótesis que se comentó en la sección anterior de un posible recubrimiento deficiente de ADN sobre el electrodo como causante de los resultados obtenidos.

4.1.3. Detección por cronoamperometría

La hibridación de sondas complementarias al producto de la RCA (que contiene múltiples repeticiones en tándem de la secuencia molde) modificadas con algún tipo de marca es una de las alternativas más utilizadas para su detección. En el presente trabajo se seleccionó una secuencia de ADN sintética, complementaria al producto de la amplificación, que está marcada en su extremo 5' con una molécula de 6-carboxifluoresceína (RCA-SP, Tabla 1). La hibridación de dicha sonda al ADN amplificado e inmovilizado en el electrodo de oro permite, a través de la interacción antígeno-anticuerpo,

la incorporación posterior de la peroxidasa conjugada a fragmentos Fab antifluoresceína (antiFITC-HRP), consiguiéndose así el marcaje enzimático.

La HRP cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno para formar agua, oxidándose (HRP_{ox}). Para regenerar la forma reducida de la enzima se utiliza un cosustrato, la tetrametilbencidina (TMB_{red}), que se oxida y es esta especie oxidada la que se reduce en la superficie del electrodo serigrafiado si se aplica un potencial adecuado. La medida cronoamperométrica consiste en la aplicación en la celda serigrafiada de un potencial, en este caso, inferior al potencial formal de reducción de TMB (que se averiguó previamente mediante voltamperometría cíclica), mientras se registra la variación con el tiempo de la corriente catódica originada por la reducción de este cosustrato. Como potencial aplicado se escogió -0,20 V, ya que en esas condiciones la forma oxidada de TMB no es estable y se reduce (Figura 20).

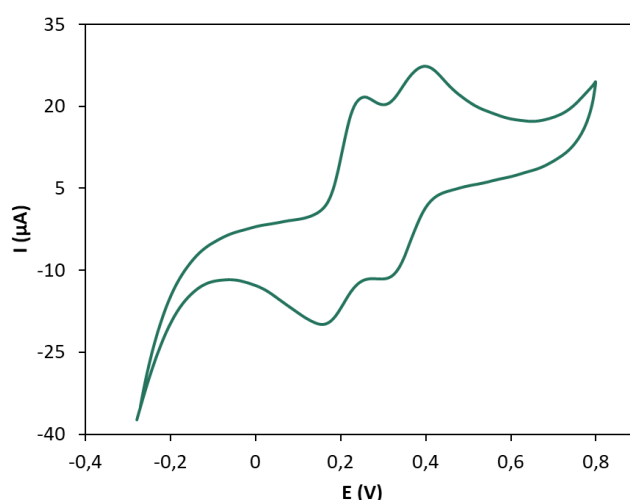


Figura 20. Voltamperograma cíclico de TMB obtenido sobre electrodos serigrafiados de oro modificados.

Puesto que se trabaja en condiciones de saturación por sustrato, la corriente catódica es directamente proporcional a la concentración de HRP. Cuanto mayor es la cantidad de ADN generada por RCA, mayor es el número de moléculas de sonda marcada con 6-FAM que se pueden hibridar, por lo que la cantidad de conjugado enzimático que se puede unir posteriormente a través del reconocimiento epítipo-parátipo también se ve incrementada. Ello trae consigo un aumento de la señal medida, puesto que a mayor cantidad de HRP inmovilizada, mayor es la cantidad de TMB necesaria para regenerar la

forma reducida del enzima, incrementándose por tanto el valor absoluto de la corriente catódica producida por la reducción del cosustrato oxidado en el electrodo.

Con este protocolo de detección, además de las variables que afectan a la RCA (concentración de enzimas y tiempo de reacción, fundamentalmente), se optimizaron los siguientes parámetros: concentración de la sonda marcada con 6-FAM (RCA-SP, 10-500 nM) y duración del tiempo de hibridación de dicha sonda con el producto de la RCA (30-60 minutos) y de la unión posterior del conjugado antiFITC-HRP (15-30 minutos). Se llevaron a cabo 9 experimentos (Tabla 2) en los que se variaron una o más de las variables de estudio de forma simultánea. En cada prueba se realizaron blancos, a los que no se les añadió padlock en la etapa correspondiente, y ensayos, a los que sí se les añadió, con el fin de comprobar las interferencias causadas por todos los reactivos que entran en contacto con la superficie electródica y verificar que la amplificación tiene lugar.

Tabla 2. Resumen de las condiciones experimentales de las distintas pruebas que se llevaron a cabo para la optimización de le RCA sobre electrodos de oro, utilizando detección cronoamperométrica. El sombreado azul indica las variables que se modificaron en cada experimento.

(I) Formación SAM	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8	Exp. 9
[Aptámero] (μM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
t (h)	16	16	16	16	16	16	16	16	16
(II) Bloqueo									
[<i>p</i> -ATP] (mM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
t (min)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
(III) Hibridación padlock + ligación									
[Padlock] (μM)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05	0,01	0,01
[Ligasa T4] (weiss/ μL)	1	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
t (min)	120	60	60	60	60	60	30	30	30
(IV) RCA									
[polimerasa] (U/ μL)	1	1	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
[dNTPs] (mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
t (min)	60	60	60	30	15	15	15	15	15
(V) Hibridación sonda detección									
[RCA-SP] (μM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,01	0,1
t (min)	60	60	60	60	60	30	30	30	30
(VI) Unión antiFITC-HRP									
[antiFITC-HRP] (U/mL)	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
t (min)	30	30	30	30	30	30	15	15	15
Tiempo TOTAL (h)	5,3	4,4	4,4	3,9	3,7	3,2	2,4	2,4	2,4

En el experimento 1, las etapas de hibridación del molde de la RCA y ligación de sus extremos por acción de la ligasa se realizaron por separado. En primer lugar, se llevó a cabo la hibridación de la sonda circularizable, incubando los electrodos con una disolución 100 nM de dicho oligonucleótido en PBS 1X durante 1 h. A continuación, tras un lavado con PBS 1X, los electrodos se pusieron en contacto durante 1 h con una disolución de ligasa (1 weiss/ μL) en su respectivo medio de reacción. En el resto de experimentos, estas dos etapas se llevaron a cabo de forma conjunta, incluyendo la sonda en la mezcla de reacción de la ligasa al comprobar que no afecta negativamente a la señal analítica y se acorta significativamente el tiempo de ensayo (Tabla 2).

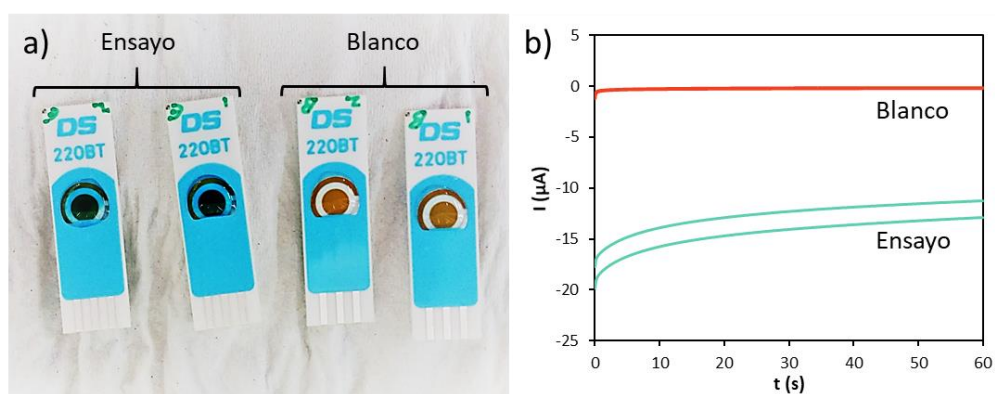


Figura 21. (a) Imagen de 4 electrodos empleados en el experimento 9 y (b) cronoamperogramas obtenidos. La coloración azul del líquido depositado sobre las SPCs en los ensayos indica la presencia de la forma oxidada de TMB.

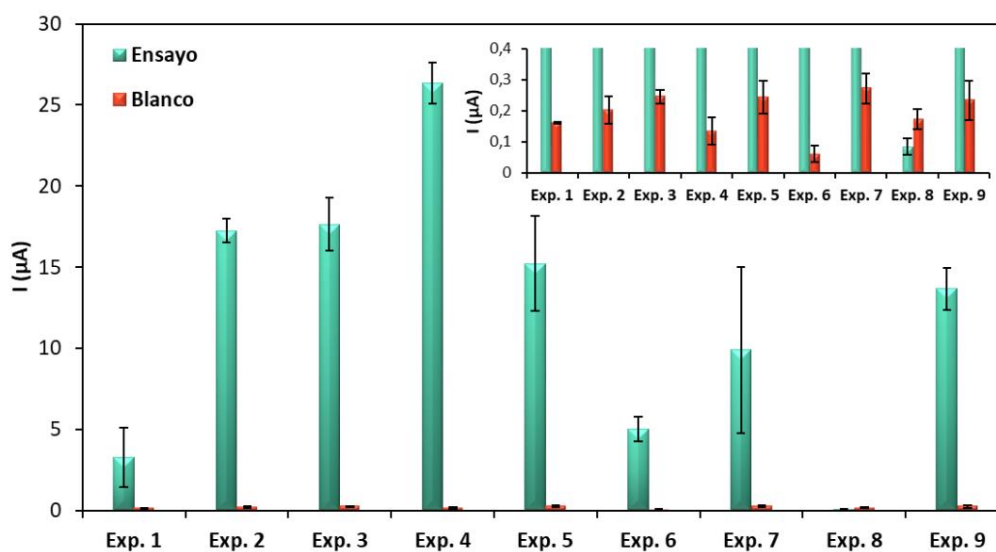


Figura 22. Intensidades de corriente medidas cronoamperométricamente para blancos y ensayos en distintas condiciones experimentales (Tabla 2).

Como se puede apreciar en las Figuras 21 y 22, en todos los experimentos se obtuvieron señales para los blancos de en torno a 100-300 nA, mientras que para los ensayos se registraron señales superiores a de 10 μ A, dos órdenes de magnitud por encima de las señales de los blancos, salvo en el experimento 8, en cual se obtuvieron señales muy bajas debido a que la cantidad de sonda marcada con 6-FAM utilizada para la hibridación con el producto de amplificación (10 nM) resultó insuficiente.

El objetivo de la optimización es, como se dijo anteriormente, la reducción de las cantidades de reactivos empleados y de la duración de las diferentes etapas, manteniendo señales lo suficientemente altas como para poder discriminar blancos de ensayos. Por tanto, se consideraron como óptimas las condiciones del experimento 9 ya que, en comparación con el experimento 1, la cantidad de ligasa utilizada es 8 veces menor, la de polimerasa 4 veces, la de padlock 10 y la de RCA-SP 5. Además, el tiempo total de análisis disminuyó 3 h, todo ello sin producirse una reducción de la señal que comprometiese la aplicabilidad del protocolo evaluado para la detección del producto de amplificación (Tabla 2, Figura 22).

4.2. Estudio de la interacción aptámero-NGAL sobre partículas magnéticas

Una vez que se optimizó la RCA sobre electrodos serigrafados de oro, este sistema de amplificación se utilizó para estudiar la interacción receptor-diana del otro aptámero desarrollado para la determinación de NGAL (el descrito como aptámero de detección en el formato sándwich propuesto por Lee, K.-A. *et al*)¹². Para ello, se utilizó una versión truncada del aptámero original, es decir, un fragmento del aptámero en el que se mantuvo la secuencia central de 40 bases y se eliminaron los cebadores de PCR de los extremos (LCN2-2, Tabla 1), a pesar de que el estudio original empleó el aptámero completo (76 bases). Con ello se pretende comprobar si la afinidad del aptámero por la proteína depende principalmente de esa parte central. En el extremo 5' se añadió un espaciador de 10 timinas y la secuencia de cebador previamente descrita, complementaria al molde circularizable de RCA.

El ensayo se realizó sobre partículas magnéticas modificadas con 0,19 μ g/ μ L de NGAL. La concentración de proteína inmovilizada se calculó por diferencia de la concentración

inicial de NGAL utilizada para la bioconjugación (60 μg en 250 μL : 0,24 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y la concentración de proteína no inmovilizada que quedó en el sobrenadante, que se determinó por el método Bradford (0,047 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Para evaluar las características de la interacción receptor-diana, se expuso una cantidad constante de NGAL inmovilizada en las partículas a concentraciones del aptámero de estudio en el rango 0,5 pM-500 nM. Los resultados se compararon con un ensayo sin amplificación RCA (ensayo competitivo ELASA) empleando el mismo aptámero de 40 bases modificado en su extremo 5' con una molécula de 6-FAM (LCN2-3, Tabla 1), en lugar del cebador para RCA, que permite realizar la unión posterior del conjugado antiFITC-HRP y la medida cronoamperométrica.

De esta forma se obtuvo una curva de enlace para cada sistema de amplificación de la interacción aptámero-proteína y los datos se ajustaron a un modelo logístico de cuatro parámetros

$$y = A + \frac{B - A}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^p} \quad (\text{Ecuación 3})$$

en donde A es la respuesta obtenida para una concentración infinita de analito, B es la respuesta obtenida para una concentración 0 de analito, IC_{50} es la concentración de analito que se corresponde con el 50% de la señal máxima y p es la pendiente de Hill, que representa la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoidea. Las ecuaciones que se calcularon para los dos aptámeros se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Ajustes obtenidos por regresión logística de cuatro parámetros para los dos aptámeros estudiados.

Aptámero	Ecuación	r
LCN2-2 (con RCA)	$I(\mu A) = 14,5 + \frac{14,5 - 0,8}{1 + \left(\frac{[\text{Aptámero (nM)}]}{0,014}\right)^{1,2}}$	0,9939
LCN2-3 (sin RCA)	$I(\mu A) = 4,8 + \frac{4,8 + 0,07}{1 + \left(\frac{[\text{Aptámero (nM)}]}{9,3}\right)^{0,8}}$	0,9774

Las curvas de enlace obtenidas (Tabla 3, Figura 23) indican que el aptámero truncado de 76 a 40 nucleótidos (zona central) mantiene su afinidad por la proteína cuando ésta se inmoviliza sobre partículas magnéticas. Además, mediante amplificación por RCA, se obtuvo una IC_{50} de 15 pM de aptámero, mientras que sin RCA la IC_{50} es 3 órdenes de magnitud mayor (10 nM), lo cual indica una mejora en la sensibilidad conseguida con la amplificación estudiada.

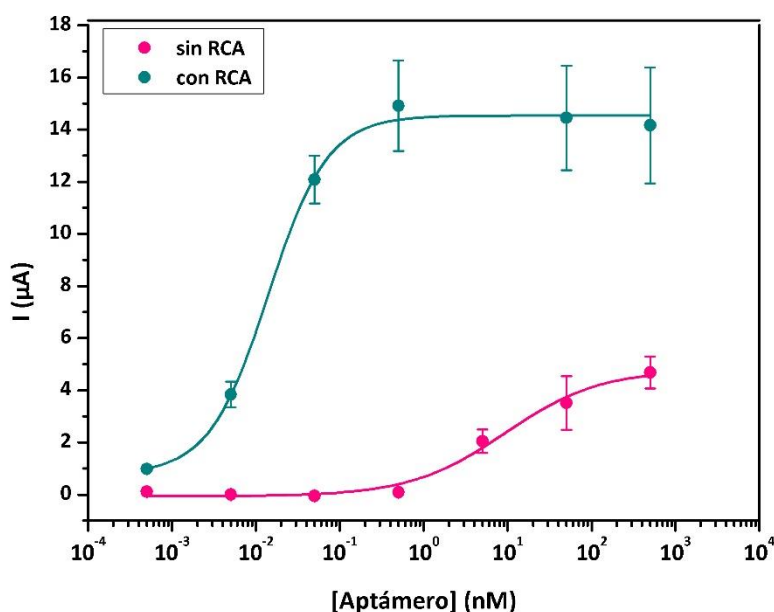


Figura 23. Curvas de enlace del aptámero anti-NGAL a la proteína inmovilizada sobre partículas magnéticas tosilyladas con amplificación por RCA y detección cronoamperométrica (azul) y con amplificación enzimática ELASA sin RCA y detección cronoamperométrica (rosa).

4.3. Magneto-aptasensado competitivo para la determinación NGAL

Se investigó la posibilidad de realizar un ensayo competitivo de inhibición sobre las partículas magnéticas, seleccionando una cantidad limitante de aptámero igual a la concentración IC_{50} de la ecuación de la curva de enlace con RCA⁴⁹, 15 pM. El experimento se llevó a cabo incubando el aptámero con las partículas modificadas y con diferentes concentraciones de NGAL en disolución (500, 50 y 0 ng/mL). Se observó un decrecimiento de las señales con el aumento de la concentración de NGAL disuelta (Figura 24), lo que indica que tiene lugar la competición de la proteína inmovilizada con su análoga en disolución por el aptámero. Este ensayo preliminar es una prometedora alternativa para la determinación de NGAL con fines clínicos, una vez se proceda a su optimización completa.

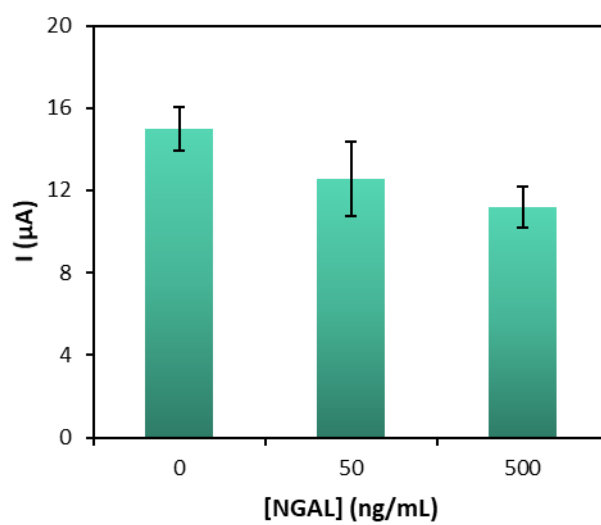


Figura 24. Señales cronoamperométricas obtenidas para las tres concentraciones de proteína evaluadas mediante un ensayo competitivo de inhibición sobre partículas magnéticas.

5. CONCLUSIONES

En vista a los resultados del presente trabajo de investigación, en el que se ha evaluado la aplicación de la amplificación de círculo rodante a un ensayo para la determinación de lipocalina-2, biomarcador de adenocarcinoma de páncreas, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha optimizado con éxito un protocolo de amplificación de círculo rodante sobre electrodos serigrafiados de oro, reduciendo el tiempo de ensayo de 5,3 h a 2,4 h así como la cantidad de reactivos.
2. De las tres estrategias para la detección del producto de la RCA evaluadas, la hibridación de sondas cortas a la secuencia amplificada junto con el marcaje enzimático con HRP y medida cronoamperométrica del sustrato es la que permite obtener una mayor sensibilidad.
3. Se ha diseñado un aptámero anti-NGAL basado en el previamente descrito que permite realizar la amplificación de la señal mediante RCA. Se ha demostrado que el aptámero truncado de 76 a 40 nucleótidos (zona central) mantiene su afinidad por la proteína cuando ésta se inmoviliza sobre partículas magnéticas. Mediante amplificación por RCA, se obtuvo una IC_{50} de 15 pM de aptámero, mientras que sin RCA la IC_{50} es 3 órdenes de magnitud mayor (10 nM).
4. Los resultados preliminares indican que la mejora en la sensibilidad conseguida con la amplificación RCA permiten la detección de NGAL mediante un ensayo competitivo sobre partículas magnéticas, lo que supone una prometedora alternativa para la determinación de NGAL con fines clínicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. www.who.int (Página web oficial de la Organización Mundial de la Salud). Disponible en: <http://www.who.int/cancer/en/>. (último acceso: 6 julio 2017)
2. Stewart, B. W. & Wild, C. P. World cancer report 2014. *World Health Organization* 16 (2014).
3. Peracaula, R., Barrabés, S., Sarrats, A., Rudd, P. M. & De Llorens, R. Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Disease Markers* **25**, 207-218 (2008).
4. Bensalah, K., Montorsi, F. & Shariat, S. F. Challenges of Cancer Biomarker Profiling. *European Urology* **52**, 1601-1609 (2007).
5. Fong, Z. V. & Winter, J. M. Biomarkers in Pancreatic Cancer. *The Cancer Journal* **18**, 530-538 (2012).
6. Moniaux, N., Chakraborty, S., Yalniz, M., Gonzalez, J., Shostrom, V. K., Standop, J., Lele, S. M., Ouellette, M., Pour, P. M., Sasson, A. R., Brand, R. E., Hollingsworth, M. A., Jain, M. & Batra, S. K. Early diagnosis of pancreatic cancer: neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of pancreatic intraepithelial neoplasia. *British Journal of Cancer* **98**, 1540-1547 (2008).
7. El-Mesallamy, H. O., Hamdy, N. M., Zaghloul, A. S. & Sallam, A. M. Clinical value of circulating lipocalins and insulin-like growth factor axis in pancreatic cancer diagnosis. *Pancreas* **42**, 149-154 (2013).
8. Yang, J., Goetz, D., Li, J., Wang, W., Mori, K., Setlik, D., Du, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Strong, R. & Barasch, J. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Molecular Cell* **10**, 1045-1056 (2002).

9. Portsmann, T. & Kiessig, S. T. Enzyme Immunoassay Techniques . An Overview Enzyme immunoassay techniques An overview. *Journal of Immunological Methods* **150**, 5-21 (1992).
10. Self, C. H. & Cook, D. B. Advances in immunoassay technology. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 60-65 (1996).
11. Mishra, A. & Verma, M. Cancer biomarkers: Are we ready for the prime time? *Cancers* **2**, 190-208 (2010).
12. Lee, K., Ahn, J., Lee, S., Singh Sekhon, S., Kim, D., Min, J. & Kim, Y. Aptamer-based Sandwich Assay and its Clinical Outlooks for Detecting Lipocalin-2 in Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Scientific Reports* **5**, 10897 (2015).
13. Sun, H. & Zu, Y. A highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules* **20**, 11959-11980 (2015).
14. Sun, H. Zhu, X., Lu, P. Y., Rosato, R. R., Tan, W. & Zu, Y. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **3**, e182 (2014).
15. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **249**, 505-510 (1990).
16. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818-822 (1990).
17. Sharma, T. K., Bruno, J. G. & Dhiman, A. ABCs of DNA aptamer and related assay development. *Biotechnology Advances* **35**, 275-301 (2017).
18. Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C. & Zhao, J. Aptamer-based biosensors. *Trends in Analytical Chemistry* **27**, 108-117 (2008).
19. Hu, M. & Zhang, K. The application of aptamers in cancer research: an up-to-date review. *Future Oncology* **9**, 369-376 (2013).

20. Bruno, J. & G., J. Predicting the Uncertain Future of Aptamer-Based Diagnostics and Therapeutics. *Molecules* **20**, 6866-6887 (2015).
21. Ma, H. Liu, J., Ali, M. M., Mahmood, M. A. I., Labanieh, L., Lu, M., Iqbal, S. M., Zhang, Q., Zhao, W. & Wan, Y. Nucleic acid aptamers in cancer research, diagnosis and therapy. *Chemical Society Reviews* **44**, 1240-1256 (2015).
22. Keefe, A. D., Pai, S. & Ellington, A. Aptamers as Therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **9**, 537-550 (2010).
23. Banica, F.-G. *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. (Wiley, 2012).
24. Thevenot, D. Toth, K., Durst, R. & Wilson, G. Electrochemical biosensors : recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics* **16**, 121-131 (2001).
25. Uzun, L. & Turner, A. P. F. Molecularly-imprinted polymer sensors: Realising their potential. *Biosensors and Bioelectronics* **76**, 131-144 (2016).
26. Cho, E. J., Lee, J.-W. & Ellington, A. D. Applications of Aptamers as Sensors. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2**, 241-264 (2009).
27. Hayat, A. & Marty, J. L. Aptamer based electrochemical sensors for emerging environmental pollutants. *Frontiers in Chemistry* **2**, 1-9 (2014).
28. Hianik, T. & Wang, J. Electrochemical aptasensors - recent achievements and perspectives. *Electroanalysis* **21**, 1223-1235 (2009).
29. Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, S. A. & Spivak, D. A. Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**, 1009-1021 (2008).
30. Herne, T. M. & Tarlov, M. J. Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *Journal of The American Chemical Society* **119**, 8916-8920 (1997).

31. Miranda-Castro, R. Sánchez-Salcedo, R., Suarez-Álvarez, B., De-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres & A. J., Lobo-Castañón, M. J. Thioaromatic DNA monolayers for target-amplification-free electrochemical sensing of environmental pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics* **92**, 162-170 (2017).
32. Miranda-Castro, R., De-los-Santos-Álvarez, N. & Lobo-Castañón, M. J. Aptamers as Synthetic Receptors for Food Quality and Safety Control. en *Biosensors for Sustainable Food - New Opportunities and Technical Challenges* (eds. Scognamiglio, V., Rea, G., Arduini, F. & Palleschi, G.) 155-191 (Elsevier, 2016).
33. De-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J. & Tuñón-Blanco, P. Aptamers as recognition elements for label-free analytical devices. *Trends in Analytical Chemistry* **27**, 437-446 (2008).
34. Lubin, A. A. & Plaxco, K. W. Folding-based electrochemical biosensors: The case for responsive nucleic acid architectures. *Accounts of Chemical Research* **43**, 496-505 (2010).
35. Miranda-Castro, R., De-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J. & Tuñón-Blanco, P. Structured nucleic acid probes for electrochemical devices. *Electroanalysis* **21**, 2077-2090 (2009).
36. González-Fernández, E., De-Los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A. J. & Lobo-Castañón, M. J. Monovalent labeling system improves the sensitivity of aptamer-based inhibition assays for small molecule detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **182**, 668-674 (2013).
37. Toh, S. Y., Citartan, M., Gopinath, S. C. B. & Tang, T. H. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosensors & bioelectronics* **64**, 392-403 (2015).
38. Li, J. & Macdonald, J. Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes. *Biosensors and Bioelectronics* **64**, 196-211 (2015).

39. Carinelli, S., Kühnemund, M., Nilsson, M. & Pividori, M. I. Yoctomole electrochemical genosensing of Ebola virus cDNA by rolling circle and circle to circle amplification. *Biosensors and Bioelectronics* **93**, 65-71 (2017).
40. Demidov, V. V. Rolling-circle amplification (RCA). en *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* (eds. Fuchs, J. & Podda, M.) 1175-1179 (Taylor & Francis Inc, 2005).
41. Fire, A. & Xu, S. Q. Rolling replication of short DNA circles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4641-4645 (1995).
42. Liu, D., Daubendiek, S. L., Zillman, M. A., Ryan, K. & Kool, E. T. Rolling circle DNA synthesis: Small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 1587-1594 (1996).
43. Feng, C. Mao, X., Yang, Y., Zhu, X., Yin, Y. & Li, G. Rolling circle amplification in electrochemical biosensor with biomedical applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **781**, 223-232 (2016).
44. Demidov, V. V. Introduction: 20+ Years of Rolling the DNA Minicircles—State of the Art in the RCA-Based Nucleic Acid Diagnostics and Therapeutics. en *Rolling Circle Amplification (RCA). Toward New Clinical Diagnostics and Therapeutics* (ed. Demidov, V. V) 1-7 (Springer, 2016).
45. Miranda-Castro, R., De-Los-Santos-Álvarez, P., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J. & Tuñón-Blanco, P. Hairpin-DNA probe for enzyme-amplified electrochemical detection of *Legionella pneumophila*. *Analytical Chemistry* **79**, 4050-4055 (2007).
46. Steel, A. B., Herne, T. M. & Tarlov, M. J. Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. *Analytical Chemistry* **70**, 4670-4677 (1998).
47. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **254**, 248-254 (1976).

48. Bin, X., Sargent, E. H. & Kelley, S. O. Nanostructuring of sensors determines the efficiency of biomolecular capture. *Analytical Chemistry* **82**, 5928-5931 (2010).
49. Johannsson, A. Heterogeneous enzyme immunoassay. en *Principles and Practice of Immunoassay* (eds. Price, C. P. & Newman, D. J.) 295-325 (Stockton Press, 1991).