



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Química Física y Analítica

TESIS DOCTORAL

---

**Aptámeros como herramientas analíticas en  
diagnóstico clínico: selección, caracterización y  
aplicaciones**

---

RAMÓN LORENZO GÓMEZ

DIRECTORAS

Dra. Noemí de los Santos Álvarez

Dra. María Jesús Lobo Castañón

Programa de Doctorado en Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y  
Modelización Computacional

2022



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: <b>Aptámeros como herramientas analíticas en diagnóstico clínico: selección, caracterización y aplicaciones</b>	Inglés: <b>Aptamers as analytical tools in clinical diagnosis: selection, characterization and applications</b>

2.- Autor	
<b>Nombre:</b> Ramón Lorenzo Gómez	<b>DNI/Pasaporte/NIE:</b> 400000000
<b>Programa de Doctorado:</b> <b>Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional</b>	
<b>Órgano responsable:</b> <b>Centro Internacional de Postgrado</b>	

### RESUMEN (en español)

Los anticuerpos son los principales receptores de afinidad utilizados en diagnóstico clínico *in vitro*, pero pueden proporcionar resultados poco fiables debido a variaciones entre lotes en su producción. Los aptámeros son receptores sintéticos de ácidos nucleicos que surgieron hace 30 años como una alternativa prometedora a los anticuerpos, debido a propiedades como su obtención *in vitro*, fabricación reproducible mediante síntesis química y estabilidad térmica y química. Sin embargo, su implantación en entornos clínicos fuera de la academia ha sido lenta y se ha visto frustrada por el uso generalizado de los anticuerpos.

El objetivo de esta tesis doctoral es explorar el uso de aptámeros como herramientas analíticas en diagnóstico clínico, discutiendo su selección, la caracterización de su afinidad de enlace y sus aplicaciones. El trabajo realizado se centra en 2 enfermedades

que constituyen importantes problemas de salud en todo el mundo: el cáncer y la COVID-19.

Utilizando la metodología SELEX, se seleccionaron aptámeros contra un péptido específico de 16 aminoácidos del colágeno XI $\alpha$ 1, un colágeno humano minoritario que se encuentra en la matriz extracelular y que está sobreexpresado en varios carcinomas. Tras realizar un escrutinio bioinformático y una caracterización mediante ensayos de enlace directos con detección electroquímica, el aptámero D1 mostró las mejores características analíticas, con una constante de disociación ( $K_D$ ) de 25 nM. Mediante espectrometría de masas se confirmó que el aptámero D1 captura el colágeno XI $\alpha$ 1 en lisados celulares y, además, fue capaz de detectar este colágeno menor en lisados celulares mediante un ensayo sándwich con un anticuerpo como elemento de captura.

El aptámero D1 se utilizó para desarrollar un ensayo competitivo con detección electroquímica para el fragmento de 16 aminoácidos del colágeno XI $\alpha$ 1, con un intervalo de medida entre 95 y 1830 ng/mL y un límite de detección de 44 ng/mL. El ensayo funcionó en suero diluido 1:2 y permitió la detección de colágeno XI $\alpha$ 1 humano en lisados celulares. Estos resultados se confirmaron mediante aptacitofluorescencia, demostrando la capacidad del aptámero D1 para detectar colágeno XI $\alpha$ 1 en muestras complejas. Este ensayo competitivo podría utilizarse para validar el colágeno XI como biomarcador del cáncer.

La caracterización de la afinidad es esencial para desarrollar aptámeros fiables para la detección de marcadores tumorales y no siempre se aborda a fondo. En este contexto, se ha estudiado la afinidad de aptámeros seleccionados contra los marcadores tumorales NGAL y AFP, empleando ensayos directos heterogéneos con detección electroquímica. Para mejorar la sensibilidad en la detección de estos biomarcadores, se ha evaluado el acoplamiento de dos estrategias de amplificación isotérmica de ADN, la RCA y la TdT, a ensayos basados en estos aptámeros. Ambas amplificaciones mejoraron la sensibilidad y las constantes de enlace aparente de los aptámeros para los dos biomarcadores de cáncer, pero esta mejora está limitada por la verdadera afinidad de enlace de los aptámeros.

Con el objetivo de contribuir al desarrollo de estrategias de diagnóstico de la COVID-19, se ha caracterizado mediante espectroscopia SPR la afinidad de enlace de 10 nuevos aptámeros

seleccionados contra la proteína S del virus SARS-CoV-2. Los 3 mejores aptámeros mostraron valores de  $K_D$  en el rango nanomolar.

La combinación de la selectividad de los aptámeros con la sensibilidad de la detección fotoelectroquímica permite mejorar las estrategias de diagnóstico basadas en aptámeros. En esta línea, se ha caracterizado el comportamiento fotoelectroquímico de dos nuevos colorantes de Ru, P2 y L4, como sensibilizadores de  $TiO_2$ . Con el colorante P2 se obtuvieron mejores resultados, pero se necesitan más estudios para determinar su aplicabilidad en aptaensayos para diagnóstico clínico.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral confirman el potencial de los aptámeros como receptores de afinidad en diagnóstico clínico y la importancia de llevar a cabo una caracterización exhaustiva de su afinidad de enlace para proporcionar herramientas analíticas útiles.

## RESUMEN (en inglés)

Antibodies are the mainstay affinity receptors used for *in vitro* clinical diagnosis, but they may provide unreliable results as a consequence of batch-to-batch variations in their production. Aptamers are synthetic nucleic acid receptors that emerged 30 years ago as a promising alternative to antibodies, due to properties such as *in vitro* selection, reproducible manufacture by chemical synthesis, and thermal and chemical stability. However, their implementation in clinical settings outside academia has been slow and frustrated by the widespread use of antibodies.

The aim of this doctoral thesis is to explore the use of aptamers as analytical tools in clinical diagnosis, discussing their selection, the characterisation of their binding affinity and their applications. The work presented herein is focused on two diseases that constitute major health problems worldwide: cancer and COVID-19.

Using the SELEX methodology, aptamers were selected against a specific 16-aminoacid peptide of collagen XI $\alpha$ 1, a minor human collagen found in the extracellular matrix and overexpressed in several carcinomas. After a bioinformatic screening and characterisation by direct binding assays with electrochemical

detection, the D1 aptamer showed the best analytical performance, with a dissociation constant ( $K_D$ ) of 25 nM. Mass spectrometry experiments confirmed that the D1 aptamer captures collagen XI $\alpha$ 1 in cell lysates. The aptamer was also able to detect this minor collagen in cell lysates in a sandwich assay using an antibody as capture element.

The D1 aptamer was used to develop a competitive assay with electrochemical detection for the 16 aminoacid fragment of collagen XI $\alpha$ 1, with an analytical interval between 95 and 1830 ng/mL and a detection limit of 44 ng/mL. The assay worked in 1:2 diluted serum and allowed the detection of human collagen XI $\alpha$ 1 in cell lysates. These results were confirmed by aptacytofluorescence, demonstrating the ability of the D1 aptamer to detect collagen XI $\alpha$ 1 in complex samples. This competitive assay could be used to validate collagen XI as a cancer biomarker.

Affinity characterisation is an essential step to develop reliable aptamers for tumour marker detection and is not always thoroughly addressed. Within this context, the affinity of previously selected aptamers against the tumour markers NGAL and AFP has been studied by means of heterogeneous direct binding assays with electrochemical detection. Two isothermal DNA amplification strategies, RCA and TdT, were coupled to assays based on these aptamers in order to improve the sensitivity in the detection of the biomarkers. Both DNA amplifications improved the sensitivity and apparent binding constants of the aptamers for both cancer biomarkers, but this improvement is limited by the true binding affinity of the aptamers.

In order to contribute to the development of diagnostic strategies for COVID-19, the binding affinity of 10 new aptamers selected against the S protein of the SARS-CoV-2 virus was characterised by SPR spectroscopy. The 3 best aptamers showed  $K_D$  values in the nanomolar range.

The combination of the selectivity of aptamers with the sensitivity of photoelectrochemical detection allows the improvement of aptamer-based diagnostic strategies. In line with this, the photoelectrochemical performance of two new ruthenium dyes, P2 and L4, as TiO<sub>2</sub> sensitisers has been characterised. The P2 dye produced the best results, but further studies are needed to determine its applicability in aptaassays for clinical diagnostics.

The results obtained in this doctoral thesis confirm the potential of aptamers as affinity receptors in clinical diagnosis, and the importance of carrying out a thorough characterisation of their binding affinity to provide useful analytical tools.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL**



# Índice

Resumen del contenido de la tesis doctoral.....	i
Índice de figuras .....	XV
Índice de tablas .....	XXI
Listado de abreviaturas .....	xxiii
<b>1. Introducción general.....</b>	<b>1</b>
1.1. Receptores de afinidad basados en ácidos nucleicos .....	1
1.2. Características de los aptámeros como herramientas analíticas.....	2
1.3. Obtención de aptámeros: el método SELEX.....	4
1.4. Caracterización de los aptámeros: determinación de $K_D$ .....	7
1.4.1. Modelo de Langmuir.....	8
1.4.2. Modelo de Hill .....	9
1.4.3. Métodos para la medida de $K_D$ .....	10
1.5. Aptámeros en diagnóstico clínico.....	12
1.5.1. Aptámeros y marcadores tumorales .....	13
1.5.2. Selección de aptámeros en medios biológicos .....	14
1.5.3. Aptasensores electroquímicos para marcadores tumorales .....	17
1.5.4. Aptahistoquímica .....	20
1.5.5. ELASA .....	23
1.6. Amplificación isotérmica de aptámeros .....	25
1.6.1. Amplificaciones basadas en el uso de polimerasas.....	26
1.6.1.1. Amplificación de círculo rodante (RCA).....	26
1.6.1.2. Desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) .....	29
1.6.2. Amplificaciones basadas en el uso de nucleasas.....	30
1.6.2.1. Ensayos basados en exonucleasas .....	31
1.6.2.2. Ensayos basados en endonucleasas .....	32



1.6.3. Amplificaciones basadas en el desplazamiento de hebras mediado por el extremo.....	34
1.6.3.1. Reacción de hibridación en cadena (HCR) .....	34
1.6.3.2. Ensamblaje catalítico de horquillas (CHA) .....	36
1.7. Barreras para la utilización de los aptámeros más allá del ámbito académico .....	37
<b>2. Objetivos/ Objectives .....</b>	<b>39</b>
<b>3. Selección y caracterización de nuevos aptámeros para la cadena <math>\alpha 1</math> del colágeno XI, potencial biomarcador de cáncer .....</b>	<b>45</b>
3.1. Introducción .....	45
3.1.1. La matriz extracelular como fuente de biomarcadores .....	45
3.1.2. Los colágenos: principales componentes de la matriz extracelular .....	48
3.1.3. Colágeno XI $\alpha$ 1 y cáncer .....	50
3.1.4. Detección de colágeno XI $\alpha$ 1 en muestras biológicas .....	51
3.2. Materiales y métodos.....	52
3.2.1. SELEX .....	52
3.2.1.1. Interacción .....	53
3.2.1.2. Separación y elución .....	53
3.2.1.3. Amplificación mediante PCR .....	53
3.2.1.4. Acondicionamiento (recuperación de ADN de hebra simple) .....	54
3.2.2. Clonación y secuenciación.....	55
3.2.3. Ensayo de enriquecimiento .....	57
3.2.4. Análisis bioinformático.....	57
3.2.5. Modificación de partículas magnéticas .....	58
3.2.5.1. Modificación de partículas magnéticas tosilactivadas con proteínas.....	58
3.2.5.2. Modificación de partículas magnéticas carboxilactivadas con vimentina.....	58
3.2.5.3. Modificación de partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina con péptido 16mer biotilado .....	59

3.2.5.4. Modificación de partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina con aptámero biotinilado.....	59
3.2.6. Ensayo de Bradford.....	60
3.2.7. Curvas de enlace.....	60
3.2.7.1. Curvas de enlace con partículas magnéticas modificadas con péptido 16mer.....	60
3.2.7.2. Curvas de enlace con partículas magnéticas modificadas con aptámeros biotinilados .....	61
3.2.7.3. Curvas de enlace con partículas magnéticas modificadas con proteínas (BSA, BSA-10/16mer o vimentina) .....	61
3.2.8. Protocolos con células .....	62
3.2.8.1. Cultivos celulares .....	62
3.2.8.2. Preparación de lisados celulares .....	63
3.2.8.3. Captura magnética de colágeno XI en lisados celulares con partículas magnéticas modificadas con aptámero D1 .....	63
3.2.8.4. Análisis de los lisados celulares purificados mediante SDS-PAGE .....	64
3.2.8.5. Análisis de la fracción de los lisados celulares capturada por el aptámero D1 mediante espectrometría de masas .....	64
3.2.8.6. Análisis de la fracción de los lisados celulares capturada por el aptámero D1 mediante ELISA.....	66
3.3. Resultados y discusión .....	68
3.3.1. Selección de aptámeros para el péptido 16mer del colXla1.....	68
3.3.2. Escrutinio inicial y caracterización de los aptámeros.....	74
3.3.3. Identificación del “aptátopo” .....	77
3.3.4. Selectividad .....	78
3.3.5. Evaluación del reconocimiento del péptido en la proteína completa .....	83
3.4. Conclusiones .....	86
<b>4. Aplicaciones bioanalíticas de los aptámeros anti-colágeno Xla1 .....</b>	<b>89</b>
4.1. Introducción .....	89

4.2. Materiales y métodos.....	92
4.2.1. Ensayo competitivo .....	92
4.2.2. Aptacitoquímica.....	93
4.3. Resultados y discusión .....	94
4.3.1. Caracterización de aptámeros biotinilados .....	94
4.3.2. Aptacitofluorescencia .....	96
4.3.3. Ensayo competitivo .....	103
4.3.4. Medidas en muestras complejas.....	105
4.4. Conclusiones .....	106
<b>5. Evaluación de la amplificación isotérmica de aptámeros en la detección electroquímica de marcadores tumorales .....</b>	<b>109</b>
5.1. Introducción .....	109
5.2. Materiales y métodos.....	112
5.2.1. RCA sobre electrodos serigrafiados de oro .....	112
5.2.1.1. Limpieza y acondicionamiento electroquímico de los SPAuE .....	112
5.2.1.2. Formación de una SAM mixta de ADN/ <i>p</i> -ATP sobre SPAuE .....	113
5.2.1.3. RCA y detección electroquímica del aptámero elongado.....	113
5.2.2. Estudio de la amplificación TdT mediante electroforesis en gel	114
5.2.3. Ensayos directos con partículas magnéticas tosilactivadas modificadas con NGAL o AFP.....	115
5.2.3.1. Curvas de enlace sin amplificación de ADN .....	115
5.2.3.2. Curvas de enlace con amplificación RCA .....	116
5.2.3.3. Curvas de enlace con amplificación mediada por TdT	117
5.2.4. Aptaensayos sobre partículas magnéticas para la detección de NGAL.....	118
5.2.4.1. Aptaensayo competitivo sobre partículas magnéticas tosilactivadas modificadas con NGAL .....	118
5.2.4.2. Modificación de partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina con aptámero biotinilado.....	119
5.2.4.3. Aptaensayos sándwich sobre PM-S.....	119

5.2.5. Estudio de la afinidad del aptámero LCN2-2t .....	120
5.2.5.1. Espectroscopia de resonancia de plasmón superficial (SPR) .....	120
5.2.5.2. Termoforesis a microescala (MST) .....	121
5.3. Resultados y discusión .....	121
5.3.1. Detección de NGAL.....	121
5.3.1.1. Optimización de la RCA sobre SPAuE .....	121
5.3.1.2. Aplicación de la RCA a la detección de NGAL .....	124
5.3.1.3. Aptaensayos para la detección de NGAL .....	126
5.3.1.4. Caracterización de la afinidad del aptámero LCN2-2t mediante SPR y MST .....	128
5.3.2. Detección de AFP .....	129
5.3.2.1. Estudio de la afinidad de los aptámeros AFP-S y AFP-L .....	129
5.3.2.2. Optimización de la amplificación TdT.....	131
5.3.2.3. Aplicación de la amplificación TdT a la detección de AFP.....	134
5.3.2.4. Aplicación de la amplificación RCA a la detección de AFP.....	135
5.4. Conclusiones .....	137
<b>6. Caracterización de nuevos aptámeros contra la proteína S del virus SARS-CoV-2.....</b>	<b>139</b>
6.1 Introducción .....	139
6.1.1. COVID-19 y SARS-CoV-2.....	139
6.1.2. Métodos de diagnóstico de COVID-19.....	140
6.1.3. Aptámeros para la detección de virus.....	141
6.1.4. Espectroscopia SPR para medir la afinidad de enlace de los aptámeros.....	142
6.2. Materiales y métodos.....	143
6.2.1. Modificación del disco sensor para SPR.....	143
6.2.2. Estudio del enlace de los aptámeros a la proteína S1.....	146
6.3. Resultados y discusión .....	146

6.3.1. Construcción del sensor .....	146
6.3.2. Ensayos de enlace .....	147
6.3.3. Aplicaciones de los aptámeros en diagnóstico de COVID-19 ..	149
6.4. Conclusiones .....	151
<b>7. Caracterización fotoelectroquímica de nuevos colorantes de Ru (II) como sensibilizadores de electrodos de ITO/TiO<sub>2</sub> y su aplicación a plataformas de diagnóstico basadas en aptámeros.....</b>	<b>153</b>
7.1. Introducción .....	153
7.1.1. Detección fotoelectroquímica .....	153
7.1.2. Aplicaciones fotoelectroquímicas de los nanomateriales basados en TiO <sub>2</sub> .....	154
7.1.3. Complejos de rutenio como sensibilizadores fotoelectroquímicos .....	156
7.2. Materiales y métodos.....	156
7.2.1. Reactivos.....	156
7.2.2. Instrumentos y equipos .....	158
7.2.3. Procedimientos experimentales .....	159
7.2.3.1. Recubrimiento de electrodos ITO con TiO <sub>2</sub> y tinción con sensibilizadores de rutenio .....	159
7.2.3.2. Caracterización fotoelectroquímica de ITO/TiO <sub>2</sub> /colorante.....	160
7.3. Resultados y discusión .....	160
7.3.1. Estudios preliminares con ITO/TiO <sub>2</sub> /N3 .....	160
7.3.2. Caracterización de ITO/TiO <sub>2</sub> /L4 .....	162
7.3.3. Caracterización de ITO/TiO <sub>2</sub> /P2.....	163
7.3.4. Aplicación de colorantes de Ru (II) en aptasensores fotoelectroquímicos para diagnóstico clínico .....	164
7.4. Conclusiones .....	165
<b>8. Conclusiones y perspectivas futuras/ Conclusions and future perspectives.....</b>	<b>167</b>
<b>Anexo A. Reactivos e instrumentación.....</b>	<b>179</b>

A.1. Reactivos .....	179
A.1.1. Aptámeros y otros oligonucleótidos .....	179
A.1.2. Proteínas, conjugados proteicos y péptidos .....	182
A.1.3. Partículas magnéticas .....	183
A.1.4. Kits y reactivos para amplificación, clonación, purificación cuantificación de ácidos nucleicos .....	183
A.1.5. Disoluciones reguladoras comerciales .....	185
A.1.6. Otros reactivos .....	185
A.2. Instrumentos y equipos.....	187
<b>Anexo B. Producción científica .....</b>	<b>189</b>
B.1. Artículos científicos.....	189
B.2. Participación en congresos.....	190
B.2.1. Congresos internacionales.....	190
B.2.2. Congresos nacionales.....	192
<b>Bibliografía .....</b>	<b>193</b>



## Índice de Figuras

1.1. Representación esquemática de la unión de aptámero a su diana. ....	2
1.2. Comparación de las características principales de aptámeros y anticuerpos como reactivos de afinidad. ....	3
1.3. Representación esquemática de algunas de las conformaciones que pueden adoptar los aptámeros. ....	4
1.4. Representación esquemática de un procedimiento SELEX convencional. ....	5
1.5. Curva de enlace simulada para un sistema aptámero-diana con una $K_D$ de 50 nM ajustada al modelo de Langmuir. ....	8
1.6. Curvas de enlace simuladas para interacciones aptámero-diana con una $K_D$ de 50 nM ajustadas al modelo de Hill con diferentes coeficientes de Hill. ....	10
1.7. Representación esquemática del protocolo <i>cell</i> -SELEX utilizado para seleccionar aptámeros contra células de adenocarcinoma de pulmón derivadas de muestras postoperatorias. ....	15
1.8. Representación esquemática de los formatos más utilizados en aptasensores para marcadores tumorales. ....	19
1.9. Comparación de los formatos de ensayo más habituales de (a) inmunohistoquímica (IHC) y (B) aptahistoquímica (AptaHC). ....	21
1.10. Representación esquemática de ensayos ELISA y ELASA con formatos directo, indirecto y sándwich. ....	23
1.11. Representación esquemática de aptaensayos con amplificación RCA. ....	27
1.12. Representación esquemática de un aptasensor electroquímico con amplificación mediada por TdT para la detección de CEA. ....	30



1.13. Representación esquemática de un aptaensayo electroquímico con amplificación mediante Exo I para la detección de mucina 1. ....	32
1.14. Representación esquemática del aptaensayo electroquímico con amplificación EXPAR para la detección de PDGF-BB.....	34
1.15. Representación esquemática de aptaensayos con amplificaciones de desplazamiento de hebra mediado por el extremo.....	35
3.1. Componentes del microentorno tumoral.....	46
3.2. Representación esquemática del colágeno XI (A) y de la cadena $\alpha 1$ (B). .....	51
3.3. Representación esquemática del ensayo de enriquecimiento.....	57
3.4. Representación esquemática del protocolo de curvas de enlace con PM-T-BSA-16mer y aptámero-6FAM. ....	61
3.5. Representación esquemática de la captura magnética del colágeno XI en los lisados celulares con PM-S-D1.....	63
3.6. Representación esquemática de los ensayos ELISA comerciales para la detección de colágeno XI $\alpha$ 1. ....	67
3.7. Representación esquemática del procedimiento SELEX utilizado en este trabajo.....	68
3.8. Ensayo de enriquecimiento .....	69
3.9. Árbol filogenético de las 44 secuencias de la ronda 4 identificadas tras la secuenciación .....	70
3.10. Estructuras secundarias más estables de las 9 secuencias (40mer, eliminando las regiones constantes de los extremos con las que hibridan los cebadores de la PCR) seleccionadas tras el escrutinio bioinformático.....	73
3.11. Voltagrama cíclico de TMB en un electrodo serigrafiado de carbono sobre el que se depositaron previamente PM-S-16mer. ....	75
3.12. Escrutinio de afinidad inicial de los 9 candidatos.....	75

3.13. Curvas de enlace de D1 (A y E), C1 (B y F), G8 (C) y H1 (D) obtenidas mediante ensayos de enlace con dos configuraciones distintas y detección electroquímica .....	76
3.14. Estudio para identificar el “aptátopo” del aptámero D1.....	78
3.15. Estudio de selectividad del aptámero D1 .....	79
3.16. SDS-PAGE de 3 lisados celulares tras la captura con PM-S-aptámero .....	80
3.17. Curva de enlace del aptámero D1 con la vimentina .....	81
3.18. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas mediante MS en el lisado centrifugado de A-204 tras la captura con D1 y con T <sub>40</sub> (control) .....	83
4.1. Representación esquemática del aptaensayo competitivo para colágeno XI $\alpha$ 1.....	92
4.2. Representación esquemática de los ensayos de aptacitoquímica para la visualización de colágeno XI $\alpha$ 1 en cultivos celulares. ....	93
4.3. Curvas de enlace obtenidas con PM-S-16mer y concentraciones crecientes de aptámeros D1 (A), B4 (B), C1 (C) y G8 (D) biotinilados.....	95
4.4. Optimización del protocolo de aptacitoquímica.....	98
4.5. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células A-204 (+colXI $\alpha$ 1) teñidas con disoluciones 1 $\mu$ M de aptámeros D1 (A,A'), B4 (B,B') y C1 (C,C') marcados con 6-FAM.. ....	100
4.6. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células NCI-H661 (+colXI $\alpha$ 1) teñidas con disoluciones 1 $\mu$ M de aptámeros D1 (A,A'), B4 (B,B') y C1 (C,C') marcados con 6-FAM.....	101
4.7. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células HT-29 (-colXI $\alpha$ 1) teñidas con disoluciones 1 $\mu$ M de aptámeros D1 (A,A'), B4 (B,B') y C1 (C,C') marcados con 6-FAM.. ....	102
4.8. Curva de calibrado del aptaensayo competitivo electroquímico para colXI $\alpha$ 1. ....	103
4.9. Estudio de selectividad del ensayo competitivo.....	104

4.10. Comportamiento del ensayo competitivo en suero .....	105
4.11. Detección de colágeno XI en lisados celulares utilizando el ensayo competitivo. ....	106
5.1. Estructuras secundarias y constantes de disociación ( $K_D$ ) de los aptámeros anti-NGAL y anti-AFP utilizados en este trabajo.....	111
5.2. Representación esquemática del protocolo de RCA sobre SPAuE.....	114
5.3. Representación esquemática de la metodología empleada para la obtención de curvas de enlace sin amplificación de ADN sobre PM-T modificadas con NGAL o AFP.....	116
5.4. Representación esquemática de la metodología empleada para la obtención de curvas de enlace con amplificación RCA sobre PM-T modificadas con NGAL o AFP.....	117
5.5. Representación esquemática de la metodología empleada para la obtención de curvas de enlace con amplificación TdT sobre PM-T modificadas con AFP.....	118
5.6. Optimización de la RCA en SPAuE utilizando el aptámero LCN2-4 en una SAM mixta. ....	122
5.7. Curvas de enlace del aptámero LCN2-2 truncado sobre PM-T-NGAL con amplificación RCA (LCN2-2RCA) y sin amplificación de ADN (LCN2-2t-6FAM) .....	125
5.8. Aptaensayos para la detección de NGAL .....	127
5.9. Curvas de enlace obtenidas con PM-T modificadas con AFP y el aptámero corto (AFP-S) biotilado o marcado con fluoresceína y el aptámero largo (AFP-L) marcado con fluoresceína .....	130
5.10. Electroforesis en gel de agarosa de la elongación TdT del aptámero corto. ....	132
5.11. Corrientes registradas en el ensayo electroquímico con diferentes proporciones de biotina-dATP:dATP en ausencia (blanco) y en presencia del aptámero corto 1 $\mu$ M y la correspondiente relación señal/blanco (S/B) para cada condición. ....	133

5.12. Corrientes medidas cronoamperométricamente con y sin amplificación de TdT utilizando sólo dATP o una mezcla de dNTPs a una concentración de 500 $\mu$ M en ausencia (barras con trama) y en presencia (barras blancas) del aptámero largo 1 $\mu$ M y la correspondiente relación señal/blanco (S/B) obtenida en cada condición .....	134
5.13. Curvas de enlace del aptámero AFP-L sobre PM-T-AFP con amplificación TdT (AFP-L-TdT) y sin amplificación de ADN (AFP-L-FITC) .....	135
5.14. Curvas de enlace del aptámero AFP-S sobre PM-T-AFP con amplificación RCA (AFP-S-RCA) y sin amplificación de ADN (AFP-S-FITC). .....	136
6.1. Representación esquemática de la estructura del SARS-CoV-2 y la proteína S. ....	140
6.2. Representación esquemática del sensor SRP utilizado en este trabajo. El sensor consiste en un disco recubierto de oro sobre el que se construye. ....	144
6.3. Sensorgrama obtenido durante la modificación del disco sensor.....	145
6.4. Sensorgrama registrado para la hibridación del aptámero con RP-biotina en el canal 2 (C2) manteniendo el canal 1 (C1) como referencia .....	145
6.5. Curvas de enlace de los aptámeros 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) y 10 (J) .....	147
6.6. Aptasensor impedimétrico para la detección de SARS-CoV-2.....	150
7.1. Mecanismo de generación de fotocorriente (A) anódica y (B) catódica en nanopartículas semiconductoras conectadas a electrodos.. ....	154
7.2. Mecanismo de generación de fotocorriente anódica en nanopartículas de TiO <sub>2</sub> sensibilizadas con un colorante. ....	155
7. 3. Imagen del sistema fotoelectroquímico utilizado en este trabajo. ....	158

7.4. Electrodos de ITO/TiO <sub>2</sub> tratados con colorantes de Ru (II) (A) N3, (B) L4 y (C) P2.....	159
7.5. Fotocorrientes medidas a 0 V en electrodos de ITO recubiertos con dos capas de TiO <sub>2</sub> antes y después del tratamiento con el colorante N3 .....	161
7.6. Fotocorrientes medidas a - 0.3, 0 and 0.3 V en electrodos de ITO/TiO <sub>2</sub> /N3 bajo excitación con una lámpara LED que emite a 434 nm .....	161
7.7. Fotocorrientes medidas a - 0.3, 0 and 0.3 V en electrodos de ITO/TiO <sub>2</sub> /L4 bajo excitación con una lámpara LED que emite a 434 nm. ....	163
7.8. Fotocorrientes medidas a - 0.3, 0 and 0.3 V en electrodos de ITO/TiO <sub>2</sub> /P2 bajo excitación con una lámpara LED que emite a 434 nm. ....	164

## Índice de Tablas

3.1. Condiciones experimentales en las que se efectuaron las rondas del SELEX. ....	55
3.2. Características de las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo.. .....	62
3.3. Características de los kits ELISA comerciales para la detección de colágeno XI $\alpha$ 1.....	66
3.4. Motivos recurrentes analizados en las 44 secuencias de la ronda 4 identificadas tras la secuenciación.....	71
3.5. Secuencias, motivos y energía libre ( $\Delta G$ ) de la estructura secundaria más estable para cada secuencia.....	72
3.6. Comparación de los resultados obtenidos con los kits de Cloud-Clone y Elbasience para la detección de colXI $\alpha$ 1. ....	85
3.7. Comparación del aptámero D1 con el anticuerpo monoclonal del kit de Elbasience. ....	86
4.2. Condiciones evaluadas para la optimización del protocolo de aptacitoquímica. ....	97
5.1. Condiciones detalladas en las que se realizó la optimización de la RCA representada en la Figura 5.6. ....	123
5.2. Optimización de la RCA: parámetros e intervalos estudiados y condiciones experimentales finales.....	124
5.3. Comparación de la $K_D$ aparentes de los aptámeros LCN2-2t, AFP-S y AFP-L con y sin amplificación de ADN (RCA o TdT), y el valor de $K_D$ del trabajo original. ....	136

A.1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el SELEX para colágeno XI $\alpha$ 1 (capítulo 3). N <sub>40</sub> : región de 40 nucleótidos aleatorios. ....	179
A.2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los capítulos 3 y 4. ....	180
A.3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el capítulo 5. En verde y naranja se destacan las regiones de hibridación entre el molde circular de la RCA y los aptámeros. ....	181
A.4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el capítulo 6. N <sub>40</sub> : región de 40 nucleótidos aleatorios. ....	182

## Listado de abreviaturas

<b>10mer</b>	Extremo N-terminal de 10 aminoácidos del péptido 16mer
<b>16mer</b>	Péptido específico de 16 aminoácidos localizado en la región del telopéptido C del colágeno XI $\alpha$ 1
<b>6-FAM</b>	6-carboxifluoresceína
<b>A</b>	Adenina
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ADN-c</b>	ADN complementario
<b>AFP</b>	$\alpha$ -fetoproteína
<b>antiF-POD</b>	Conjugado de fragmento F <sub>ab</sub> antifluoresceína y peroxidasa
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARN-t</b>	ARN transferente
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>C</b>	Citosina
<b>CEA</b>	Antígeno carcinoembrionario
<b>CHA</b>	Ensamblaje catalítico de horquillas
<b>ColXI<math>\alpha</math>1</b>	Cadena $\alpha$ 1 del colágeno XI
<b>COVID-19</b>	Enfermedad por coronavirus de 2019
<b>DAPI</b>	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>dATP</b>	2'-Desoxiadenosin-5'-trifosfato
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleósidos trifosfato
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EDC</b>	Clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	Enzimoimmunoensayo de adsorción



<b>Exo</b>	Exonucleasa
<b>EXPAR</b>	Reacción de amplificación exponencial
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>G</b>	Guanina
<b>HCR</b>	Reacción de hibridación en cadena
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>ITO</b>	Óxido de indio y estaño
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de disociación
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>MH</b>	6-Mercaptohexanol
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa de la matriz
<b>MST</b>	Termoforesis a microescala
<b>MUA</b>	Ácido 11-mercaptoundecanoico
<b>NEasa</b>	Endonucleasa de corte
<b>NGAL</b>	Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida
<b>p-ATP</b>	4-Aminotiofenol
<b>PBS</b>	Tampón salino de fosfato
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDAC</b>	Adenocarcinoma ductal de páncreas
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PEC</b>	Fotoelectroquímica
<b>PM</b>	Partículas magnéticas
<b>PM-C</b>	Partículas magnéticas carboxilactivadas
<b>PM-S</b>	Partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina
<b>PM-T</b>	Partículas magnéticas tosilactivadas
<b>POCT</b>	Pruebas de laboratorio en el punto de cuidado
<b>RCA</b>	Amplificación de círculo rodante

<b>RT-qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción inversa
<b>SAM</b>	Monocapa autoensamblada
<b>SARS-CoV-2</b>	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<b>SELEX</b>	Evolución sistémica de ligando mediante enriquecimiento exponencial
<b>SPAuE</b>	Celda electroquímica serigrafiada de oro
<b>SPCE</b>	Celda electroquímica serigrafiada de carbono
<b>SPR</b>	Resonancia de plasmón superficial
<b>SSPE</b>	Tampón salino de fosfato de sodio-EDTA
<b>strep-POD</b>	Conjugado de estreptavidina y peroxidasa
<b>T</b>	Timina
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAE</b>	Tampón de Tris-acetato-EDTA
<b>TBE</b>	Tampón de Tris-Borato-EDTA
<b>TdT</b>	Desoxinucleotidil transferasa terminal
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta – Visible
<b>VIM</b>	Vimentina
<b>X-gal</b>	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido



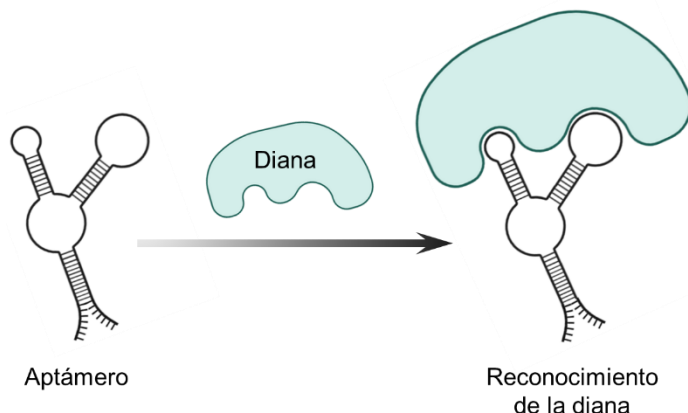
## Introducción general

### 1.1. Receptores de afinidad basados en ácidos nucleicos

Tradicionalmente, se consideraba que los ácidos nucleicos eran exclusivamente portadores de la información genética, ya que almacenan las instrucciones necesarias para el crecimiento, mantenimiento y replicación de los seres vivos. Sin embargo, estas moléculas también pueden plegarse para dar lugar a complejas estructuras tridimensionales (ribozimas) que catalizan reacciones [1], controlan la expresión de los genes [2] y participan en la comunicación de respuestas celulares [3] y en la síntesis de proteínas [4]. Aunque la importancia biológica de ciertas moléculas plegadas de ARN se reconoce desde hace tiempo [5], la selección *in vitro* de ácidos nucleicos con funciones no biológicas sólo se logró cuando fue posible generar grandes poblaciones de oligonucleótidos degenerados mediante síntesis química en fase sólida y amplificar los miembros individuales de estas poblaciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) [6, 7]. Estas tecnologías han sido clave para desarrollar el proceso de selección de moléculas de ácidos nucleicos funcionales que pueden enlazarse a una diana específica y que se conocen como aptámeros.

Los aptámeros (del latín *aptus* “encajar”, y del griego *μέρος* – *méros* – “parte”), son pequeños oligonucleótidos sintéticos de ARN o ADN de hebra simple, típicamente de 20-80 nucleótidos, capaces de plegarse en estructuras tridimensionales únicas que les permiten unirse con gran afinidad a una amplia variedad de dianas incluyendo iones, proteínas, células y virus [8]. El enlace de los aptámeros a sus correspondientes dianas es reversible y tiene lugar mediante un proceso de reconocimiento estructural dirigido por la formación de interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o enlaces hidrofóbicos (**Figura 1.1**). Esta reacción de afinidad es similar a la interacción antígeno anticuerpo, y por ello a los aptámeros se les conoce también con el nombre de “anticuerpos químicos” [9].

## 1. Introducción general




**Figura 1.1. Representación esquemática de la unión de aptámero a su diana.** Creada con BioRender™.

Los aptámeros fueron descritos por primera vez en 1990 por dos grupos de investigación que desarrollaron de forma independiente moléculas de ARN sintéticas funcionales capaces de unirse a colorantes orgánicos [10] y a la ADN polimerasa del bacteriófago T4 [11]. Desde entonces, los aptámeros se han utilizado en multitud de aplicaciones como la cromatografía de afinidad [12], la terapia y diagnóstico clínico [13, 14], y el análisis medioambiental [15] y de alimentos [16–18] .

### 1.2. Características de los aptámeros como herramientas analíticas

Como reactivos de afinidad, los aptámeros se comparan frecuentemente con los anticuerpos, sus homólogos proteicos, ya que, aunque muestran un comportamiento similar, ofrecen una serie de ventajas (**Figura 1.2**). Los aptámeros se obtienen por medio de un proceso *in vitro*, que se describirá en la **Sección 1.3**, evitando el uso de animales que se requiere para la producción de anticuerpos, y, una vez conocida la secuencia del aptámero, se pueden producir a gran escala mediante síntesis química muy reproducible en lugar de a través de un proceso biológico, evitando la contaminación por bacterias o virus que puede suceder durante la obtención de anticuerpos y reduciendo la variabilidad entre lotes que suele afectar a estos reactivos de afinidad proteicos [19]. Se han descrito aptámeros con una elevada afinidad por sus respectivas dianas, con unas constantes de disociación que pueden alcanzar el intervalo pM y, de forma menos frecuente, fM [20, 21], igualando e incluso superando en este sentido a los anticuerpos monoclonales, cuyas  $K_D$  más bajas (mayor afinidad) están en el intervalo pM-nM [22].

## 1.1. Características de los aptámeros como herramientas analíticas

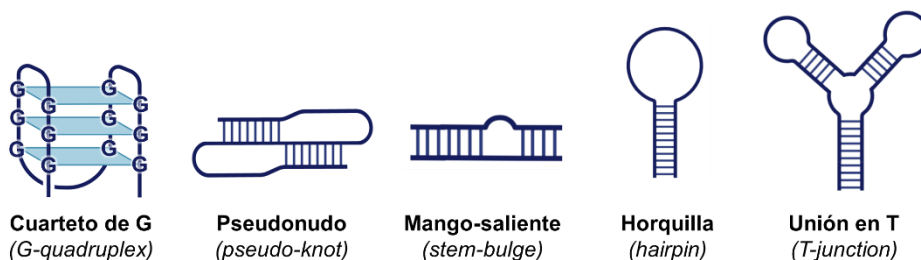
Aptámeros		Anticuerpos	
	ADN o ARN	<b>Naturaleza bioquímica</b>	Proteínas
	pM-nM	<b>Afinidad (<math>K_D</math>)</b>	pM-nM
	Elevada	<b>Especificidad</b>	Elevada
Amplio: Iones, moléculas pequeñas, proteínas, células		<b>Tipos de diana</b>	Restringido: Compuestos inmunogénicos y no tóxicos
	8-25	<b>Tamaño (kDa)</b>	150-175
<i>In vitro</i>		<b>Producción</b>	<i>In vivo</i>
Baja		<b>Variación entre lotes</b>	Elevada
Sencilla		<b>Modificación química</b>	Limitada
Reversible		<b>Desnaturalización</b>	Irreversible
Años en liofilizado		<b>Vida útil</b>	Limitada

**Figura 1.2. Comparación de las características principales de aptámeros y anticuerpos como reactivos de afinidad.**

Los aptámeros también son de menor tamaño que los anticuerpos (8-25 kDa para los aptámeros frente a 150-175 kDa de los anticuerpos), por lo que pueden enlazarse más fácilmente a dianas intracelulares, y menos inmunogénicos [19]. Dado que son ácidos nucleicos, 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 [19, 23]. Como se ha comentado previamente, los aptámeros pueden utilizarse para detectar una amplia variedad de dianas que van desde pequeñas moléculas hasta complejos supramoleculares [19, 24], gracias a la gran diversidad de conformaciones que pueden adoptar (**Figura 1.3**). Además, su especificidad es tan elevada que pueden llegar a discriminar moléculas muy similares, como la teofilina y la cafeína, que sólo se diferencian por un grupo metilo [25, 26].

Los aptámeros son estables química y térmicamente, por lo que se pueden almacenar liofilizados de forma indefinida a temperatura ambiente [27]. Otra característica importante es que son reutilizables, en el sentido de que se pueden desnaturalizar con calor y renaturalizar mediante enfriamiento para emplearlos en sucesivas rondas de enlace y detección de analitos [28–30], mientras que la desnaturalización de los anticuerpos resulta en la pérdida de sus funciones. Además, son fácilmente manipulables con una 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 [31].

## 1. Introducción general



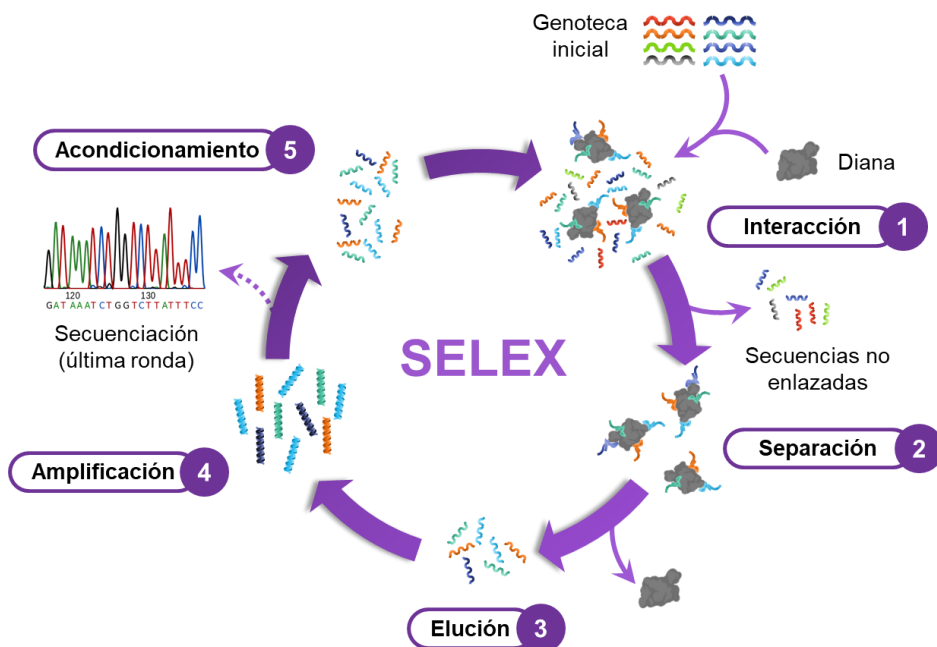
**Figura 1.3. Representación esquemática de algunas de las conformaciones que pueden adoptar los aptámeros.** Creada con BioRender™.

Se ha discutido que los aptámeros de ARN son más adecuados para el enlace debido a que poseen una mayor diversidad conformacional, pero para las aplicaciones analíticas, los aptámeros de ADN son preferibles porque son menos propensos a la degradación por nucleasas (ARNasas y ADNasas), uno de los principales problemas que supone el trabajo con aptámeros. Es importante destacar que una secuencia homóloga de ADN de un aptámero de ARN no retiene capacidad de enlazarse a la misma diana [32, 33]. Con todo, los aptámeros se pueden modificar para aumentar su resistencia a la degradación por nucleasas. Algunas de estas modificaciones implican cambios en el esqueleto de grupos fosfatos de los ácidos nucleicos, como la sustitución del oxígeno no enlazado de la unión fosfodiéster por un átomo de azufre (fosfotiatos) [34] o el empleo de enlaces boranofosfato [35], mientras que otras consisten en la modificación de la pentosa, por ejemplo, la sustitución del grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa por grupos -F, -NH<sub>2</sub>, O-metilo y O-metoximetilo [36].

### 1.3. Obtención de aptámeros: el método SELEX

Los aptámeros se obtienen a través de un método de selección *in vitro* que imita la evolución darwiniana denominado SELEX, acrónimo del inglés *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment* (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial). Bautizado así por Tuerk y Gold [11], el SELEX convencional es un proceso iterativo que consiste en la repetición de un determinado número de ciclos o rondas de selección. Cada ronda de selección consta de 5 etapas: interacción con la diana, separación de las secuencias no enlazadas, elución de las hebras enlazadas, amplificación y acondicionamiento para recuperar secuencias de hebra simple (**Figura 1.4**) [37].

### 1.3. Selección de aptámeros: el método SELEX



**Figura 1.4. Representación esquemática de un procedimiento SELEX convencional.** (1) Interacción de la diana con la genoteca, (2) separación de las secuencias no enlazadas, (3) elución de las secuencias enlazadas, (4) amplificación mediante PCR y (5) acondicionamiento para recuperar moléculas de hebra simple.

El SELEX convencional comienza con una colección aleatoria que contiene  $10^{14} - 10^{15}$  secuencias de ADN o ARN diferentes (genoteca inicial), cada una de las cuales formada por una región central variable (típicamente de 30-60 nucleótidos) y unas regiones cortas y constantes en los extremos, que sirven como sitio de unión de los cebadores para la amplificación mediante PCR. Las secuencias de la genoteca inicial se incuban con la diana (**Figura 1.4., etapa 1**), que puede estar inmovilizada en un soporte sólido o libre, bajo condiciones de temperatura, composición del medio de selección, y concentración de la genoteca y la diana, óptimas para la formación de complejos aptámero-diana [37]. Durante esta etapa de interacción, algunas de las secuencias se unirán a la diana, mientras que otras se enlazarán débilmente o no interaccionarán.

A continuación, se lleva a cabo una etapa de separación en la que las secuencias que no se unieron a la diana se separan de aquellas que sí lo hicieron (**Figura 1.4., etapa 2**). Esta etapa es crítica, ya que la eficiencia de la separación influye en las características de enlace (afinidad y selectividad) de los aptámeros seleccionados. Para la realización de esta etapa de separación se han utilizado diferentes técnicas, incluyendo la filtración a través de membranas de



## 1. Introducción general

nitrocelulosa [11, 38, 39], electroforesis capilar [40, 41], la utilización de óxido de grafeno [42], o la separación magnética [43–46], inmovilizando la diana en partículas magnéticas .

Una vez eliminadas las hebras no enlazadas, se realiza la elución de las hebras que sí interactuaron con la diana a través de la desnaturalización de los complejos aptámero-diana (**Figura 1.4., etapa 3**). Las hebras eluidas se amplifican mediante PCR (en el caso de las secuencias de ADN) o RT-PCR (PCR, previa transcripción inversa, en el caso de ARN) generando ADN de hebra doble (**Figura 1.4., etapa 4**) [47, 48]. Para iniciar un nuevo ciclo de selección, se debe realizar una etapa de acondicionamiento para recuperar moléculas de hebra simple (**Figura 1.4., etapa 5**). Existen varios métodos para ello [49], entre los que se incluyen la PCR asimétrica [50], la desnaturalización en gel de urea-poliacrilamida [43], la digestión con exonucleasa  $\lambda$  [51], y la separación magnética con partículas recubiertas de estreptavidina [44–46].

En los métodos SELEX suelen introducirse etapas de selección negativa, en las que se eliminan las secuencias que se unen al soporte o a marcas que pueda tener la diana, o contraselecciones, para garantizar la especificidad de los aptámeros hacia la diana. Las etapas de contraselección consisten en la incubación de la genoteca con compuestos estructuralmente similares a la diana o posibles interferentes, de forma que aquellas hebras que se unen a ellos son eliminadas del proceso de selección. Esto es especialmente importante cuando se quieren obtener aptámeros para el análisis de moléculas cuya concentración es muy baja en matrices complejas, como lisados celulares, sangre completa u otros líquidos corporales [8].

Normalmente, en un procedimiento SELEX convencional se requieren entre 8 y 12 rondas de selección para que la genoteca inicial se enriquezca en aptámeros funcionales con una afinidad adecuada, por lo que para completarlo se pueden necesitar varias semanas. Por último, los aptámeros potenciales se identifican mediante diferentes métodos de secuenciación [52]. Cada etapa puede realizarse aplicando estrategias diferentes, lo que permite dirigir la selección hacia el dominio o región de interés de la diana de forma mucho más eficaz y sencilla que en el caso de la obtención de anticuerpos. Esta versatilidad ha dado lugar a numerosas variantes del procedimiento convencional que se detallan en [52]. Desde su desarrollo, la obtención de aptámeros para moléculas de interés clínico, tanto terapéutico como diagnóstico, ha sido una de las áreas más exploradas [8].

## 1.4. Caracterización de los aptámeros: determinación de $K_D$

Tras la selección y secuenciación de la colección final, el siguiente paso es la caracterización de la afinidad de los potenciales aptámeros hacia la diana. Esta tarea se puede llevar cabo mediante ensayos de enlace en condiciones de equilibrio, basados en la incubación del aptámero y la diana a una temperatura definida en un medio determinado, generalmente igual al medio de selección, manteniendo constante la concentración de uno de ellos en presencia de concentraciones crecientes del otro. Una vez alcanzado el equilibrio, se determina la concentración de la diana libre, o la concentración del complejo aptámero-diana (diana enlazada). A partir de estos datos es posible obtener una estimación fiable de la constante de afinidad [53].

El enlace de un aptámero (A) con su diana (D) puede expresarse según la ecuación:



en donde AD representa el complejo aptámero-diana, y  $k_{on}$  ( $M^{-1} s^{-1}$ ) y  $k_{off}$  ( $s^{-1}$ ) son las constantes cinéticas de velocidad que gobiernan la formación y disociación del complejo AD, respectivamente. En el equilibrio, las velocidades de formación y de disociación son iguales, y por lo tanto:

$$k_{on}[A][D] = k_{off}[AD] \quad (\text{Ec. 1.2})$$

en donde [A], [D] y [AD] representan las concentraciones en el equilibrio de aptámero libre, diana libre y complejo aptámero-diana, respectivamente. La constante de equilibrio para la formación del complejo AD,  $K_A$  ( $M^{-1}$ ), se define como:

$$K_A = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[AD]}{[A][D]} = \frac{1}{K_D} \quad (\text{Ec. 1.3})$$

en donde  $K_D$  (M) representa la constante de disociación, y es una medida de la tendencia que tiene el complejo aptámero-diana a disociarse. Dado que tiene unidades de concentración, la  $K_D$  suele utilizarse para expresar la afinidad de los aptámeros, de manera que, cuanto mayor es la afinidad de un aptámero por su diana, menor es su  $K_D$ . La **Ecuación 1.3** muestra la relación entre las constantes de equilibrio y las cinéticas, aunque las constantes de equilibrio pueden medirse independientemente, sin necesidad de conocer las constantes cinéticas [53].

## 1. Introducción general

### 1.4.1. Modelo de Langmuir

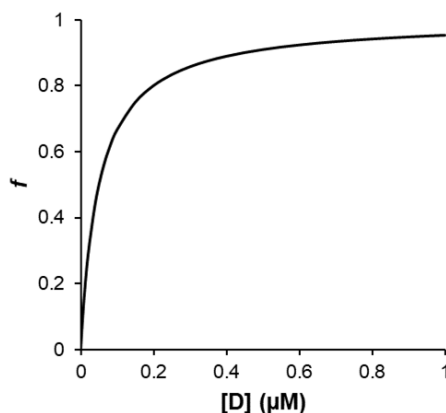
Si la concentración total del aptámero,  $[A]_t$  se fija y se conserva durante el experimento, para una estequiometría 1:1 la constante de afinidad se puede calcular como:

$$K_A = \frac{[AD]}{([A]_t - [AD])[D]} = \frac{1}{K_D} \quad (\text{Ec. 1.4})$$

La **Ecuación 1.4** puede expresarse como:

$$f = \frac{[AD]}{[A]_t} = \frac{[D]}{[D] + K_D} \quad (\text{Ec. 1.5})$$

en donde  $f$  representa la fracción de aptámero enlazado en el equilibrio y puede considerarse como la fracción de aptámero enlazado con relación a la máxima posible, que es la correspondiente al valor de saturación (teóricamente alcanzado cuando todo el aptámero está enlazado). La **Ecuación 1.5** es una expresión de la isoterma de Langmuir, una ecuación general que describe la unión en equilibrio entre una diana y un receptor con una estequiometría 1:1 y que tiene forma de una hipérbola equilátera (**Figura 1.5**) [54]. En esta expresión, la  $K_D$  coincide con la concentración de diana que produce la ocupación de un 50% de los sitios de enlace del aptámero, y su valor se puede estimar mediante un ajuste de regresión no lineal de los datos de los ensayos de enlace.



**Figura 1.5. Curva de enlace simulada para un sistema aptámero-diana con una  $K_D$  de 50 nM ajustada al modelo de Langmuir.**  $f$ : fracción de aptámero enlazado en condiciones de equilibrio;  $D$ : diana.

## 1.4. Caracterización de los aptámeros: determinación de $K_D$

La  $K_D$  también se puede estimar manteniendo fija la concentración de diana con cantidades crecientes de aptámero, utilizando expresiones similares para el cálculo. En la práctica, la elección del elemento cuya concentración se mantiene constante dependerá de la disponibilidad y solubilidad de ambos reactivos y de la adecuación de sus propiedades a la medida experimental.

### 1.4.2. Modelo de Hill

El modelo de Langmuir se basa en la suposición de que la diana es univalente en su interacción con el aptámero. Esto es razonable para sistemas en los que la diana es una molécula pequeña, pero no en los casos de dianas de gran tamaño como células enteras o virus, en los que varios aptámeros se unen simultáneamente a la misma diana [55, 56], o en el caso de aptámeros polivalentes que pueden enlazar múltiples dianas a la vez [57, 58]. En estos sistemas hay que tener en cuenta el fenómeno de la cooperatividad, y sus curvas de enlace se ajustan mejor al modelo de Hill.

Por ejemplo, en el caso de aptámeros que se enlazan a múltiples dianas, se seguiría el siguiente esquema de reacción:



A partir de este esquema, la ecuación de Hill (**Ecuación 1.7**) se puede derivar fácilmente como la relación entre la fracción de aptámero enlazado en el equilibrio,  $f$ , y la cantidad de diana total empleada en el experimento:

$$f = \frac{[AD_n]}{[A] + [AD_n]} = \frac{[D]^n}{K_D + [D]^n} = \frac{[D]^n}{(K_{1/2})^n + [D]^n} \quad (\text{Ec. 1.7})$$

en donde  $n$ , que se denomina coeficiente de Hill, idealmente representa el número de sitios de unión. En la práctica, la aplicación de este modelo suele dar como resultado un coeficiente de Hill no entero [59], que proporciona una estimación mínima del número de sitios de enlace implicados [60], y se describe más adecuadamente como un coeficiente de interacción que refleja la cooperatividad. Este parámetro y  $K_{1/2}$  se obtienen mediante el ajuste de regresión no lineal de los datos de los ensayos de enlace.  $K_{1/2}$  representa la concentración de diana a la que se unen la mitad de los aptámeros, y equivale a la raíz  $n$ -ésima de la constante de disociación (con unidades de  $M^n$ ). El modelo de Hill ha demostrado ser de uso general, transformándose en el modelo de Langmuir en los casos de interacción

## 1. Introducción general

univalente en los que no hay cooperatividad y el valor de  $n$  es igual a 1 (Figura 1.6) [61].

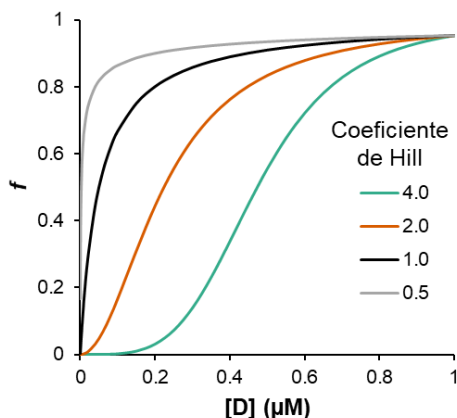


Figura 1.6. Curvas de enlace simuladas para interacciones aptámero-diana con una  $K_D$  de 50 nM ajustadas al modelo de Hill con diferentes coeficientes de Hill.  $f$ : fracción de aptámero enlazado en condiciones de equilibrio;  $D$ : diana.

### 1.4.3. Métodos para la medida de $K_D$

Los métodos disponibles para la evaluación experimental de los ensayos de enlace y medida de las constantes termodinámicas de enlace pueden clasificarse en dos grandes categorías [53]:

1. Métodos basados en la separación de la forma libre y enlazada del elemento (aptámero o diana) que está en exceso.

La viabilidad de estos métodos está condicionada por la fuerza de la interacción: la velocidad de disociación del complejo debe ser lo suficientemente lenta como para no alterar el equilibrio de enlace durante la etapa de separación. Entre ellos se encuentran la diálisis en equilibrio, la cromatografía líquida de alta resolución (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) y la electroforesis.

2. Métodos capaces de medir el complejo molecular directamente, sin una etapa previa de separación.

En este grupo es posible distinguir entre los métodos homogéneos, que permiten monitorizar directamente el enlace del aptámero a la diana en disolución, como la calorimetría de valoración isotérmica (*isothermal titration calorimetry*, ITC), la polarización de la fluorescencia o la

#### 1.4. Caracterización de los aptámeros: determinación de $K_D$

termoforesis a microescala (*microscale thermophoresis*, MST), y los métodos heterogéneos, en los que uno de los elementos está inmovilizado y que proporcionan también información sobre la cinética del enlace, como la espectroscopia de resonancia de plasmón superficial (*surface plasmon resonance*, SPR), y la espectroscopia de impedancia electroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy*, EIS) .

Idealmente, la caracterización de la afinidad de los aptámeros debe realizarse empleando más de una técnica, ya que alguna de las metodologías mencionadas anteriormente requiere de la introducción de una molécula indicadora en el aptámero o la inmovilización del mismo en una superficie, y estas acciones pueden alterar la afinidad del aptámero por la diana y conducir a estimaciones de  $K_D$  dispares, comprometiendo la utilización del receptor en determinadas aplicaciones [62].

Antes de realizar el estudio de afinidad mediante ensayos de enlace, es habitual la realización de un primer escrutinio bioinformático de las secuencias obtenidas tras la secuenciación de la última ronda del SELEX, basado en la búsqueda de homologías de secuencia y motivos recurrentes que permitan agrupar los potenciales aptámeros en clústeres, así como el análisis de sus estructuras secundarias, con el objetivo de evaluar qué secuencias se deben someter al ensayo de afinidad [44–46]. Los criterios que se suelen utilizar para esta selección son la presencia de motivos recurrentes en la estructura, la frecuencia de aparición en la secuenciación, así como la estabilidad de la estructura secundaria, que se puede estimar *in silico* con aplicaciones web libres como Mfold [63]. El análisis de la estructura secundaria puede combinarse con los ensayos de enlace para evaluar la mínima secuencia necesaria para que el aptámero sea funcional, ya que no siempre participan en el enlace todos los nucleótidos de la secuencia aptamérica. La obtención de aptámeros truncados, en los que se recorta la secuencia a la mínima imprescindible sin perder afinidad, es interesante desde el punto de vista económico, ya que, a menor longitud de secuencia, menor es el coste de síntesis del aptámero.

Además, dependiendo de la aplicación final de los aptámeros, puede ser necesario realizar un estudio de selectividad frente a moléculas de estructura similar a la diana o posibles interferentes presentes en el entorno en donde se vaya a utilizar el receptor para garantizar el reconocimiento inequívoco de la diana en condiciones reales. Esto es especialmente importante en aplicaciones que requieren que el aptámero funcione en un medio biológico complejo [8].

## 1. Introducción general

### 1.5. Aptámeros en diagnóstico clínico

Gracias a las propiedades de los aptámeros como herramientas analíticas y su especial adaptabilidad a las plataformas de diagnóstico en el punto de atención (*point-of-care testing*, POCT), con la ciencia de los aptámeros se ha creado un nicho estable en el campo del diagnóstico clínico *in vitro*, con capacidad para mejorar la velocidad y la precisión de los ensayos actualmente en uso.

Las pruebas de diagnóstico *in vitro* se basan en el análisis de marcadores biológicos o biomarcadores, esto es, cualquier característica que se pueda medir objetivamente y que pueda servir como indicador de procesos biológicos normales o patológicos, o de respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas [64]. Estos biomarcadores, que pueden ser de diferente naturaleza bioquímica (proteínas, ácidos nucleicos, hormonas, enzimas) se encuentran en los fluidos corporales, las células o los tejidos del paciente y deben tener un uso clínico potencial para diagnosticar, monitorizar el avance de la enfermedad guiando la terapia molecular o evaluar la respuesta terapéutica [65]. Por ejemplo, el péptido natriurético y la troponina cardíaca se utilizan ampliamente como biomarcadores para el diagnóstico y el pronóstico de la insuficiencia cardíaca y el infarto agudo de miocardio [66]. Otro ejemplo son la glucosa en sangre y la hemoglobina glicosilada (HbA1c), que pueden utilizarse como biomarcadores de diagnóstico para la diabetes tipo 2 [67].

Sin duda, una de las áreas de investigación más activas y multidisciplinarias en la actualidad es el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico temprano del cáncer, debido a que esta enfermedad es la segunda causa de muerte a nivel mundial, por detrás de las enfermedades cardiovasculares, de acuerdo a los datos de la Organización Mundial de la Salud (en 2018 se produjeron 9.6 millones de fallecimientos por cáncer, es decir, 1 de cada 6 muertes) [68]. Bajo la denominación de cáncer se agrupan un gran conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal de células más allá de sus límites habituales, que puede afectar a casi cualquier parte del cuerpo y extenderse a otras zonas u órganos adyacentes [68, 69]. Uno de los principales retos en el manejo de esta enfermedad es que muchos tipos de cáncer no presentan síntomas hasta estados avanzados o son difíciles de diagnosticar en la práctica clínica convencional [69], por lo que se necesitan nuevas estrategias de diagnóstico temprano basadas en el análisis de biomarcadores de cáncer o marcadores tumorales que posean una sensibilidad y especificidad clínicas adecuadas.

## 1.5. Aptámeros en diagnóstico clínico

En las secciones siguientes se describen diferentes aplicaciones de los aptámeros enfocadas principalmente al diagnóstico de cáncer, pero no son las únicas aplicaciones de estos receptores en el campo del diagnóstico clínico. Como se comentará en el **Capítulo 6** de la presente tesis, los aptámeros también se han utilizado ampliamente en el desarrollo de estrategias de detección de infecciones víricas [70, 71], y constituyen una poderosa herramienta para ayudar a combatir enfermedades infecciosas emergentes como la COVID-19

### 1.5.1. Aptámeros y marcadores tumorales

El descubrimiento de marcadores tumorales y su validación clínica dependen de la disponibilidad de receptores altamente selectivos, idealmente específicos y sensibles para el reconocimiento de biomoléculas poco abundantes en matrices complejas como son los fluidos biológicos. Actualmente, los inmunoensayos basados en el uso de anticuerpos son el estándar de oro para la detección rápida y sensible de ese conjunto exclusivo de biomarcadores de cáncer, normalmente (glico)proteínas, que han alcanzado el estado de aprobación para su uso clínico. Entre los marcadores tumorales de diagnóstico se encuentran la proteína nuclear de la matriz 22 (*nuclear matrix protein 22*, NMP-22) y ciertas formas del antígeno prostático específico (*prostate specific antigen*, PSA) mientras que el resto se mantiene como marcadores de post-diagnóstico (pronósticos, predictivos y farmacodinámicos) [72, 73].

En la búsqueda de nuevos biomarcadores más sensibles y específicos, está cobrando importancia la detección de diversas modificaciones postraduccionales (*postranslational modifications*, PTMs) como la glicosilación aberrante en proteínas, que son indicativas de las afecciones malignas. La gran heterogeneidad de esas modificaciones relacionadas con el cáncer obliga a la molécula receptora a un reto aún mayor. A modo de ejemplo, los anticuerpos que reconocen moléculas de glicanos son mucho menos abundantes que los que reconocen péptidos, debido a la inmunogenicidad notablemente mayor de estos últimos [74].

En este escenario, el número de aptámeros seleccionados contra potenciales biomarcadores de cáncer está aumentando tanto por sus aplicaciones terapéuticas como con fines de diagnóstico [75, 76]. Actualmente, existen aptámeros seleccionados contra biomarcadores aprobados por la FDA (*US Food and Drug Administration*), como la AFP [77, 78], el PSA [45, 79, 80], el antígeno carcinoembrionario (*carcinoembryonic antigen*, CEA) [81–84], el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2/neu) [85, 86] o el antígeno carbohidrato 125 (CA125) [87], y potenciales biomarcadores de cáncer como la mucina 1 (MUC1) [88], la enolasa



## 1. Introducción general

específica de las neuronas (*neuron, specific enolase*, NSE) [84], la osteopontina [89], el factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF<sub>165</sub>) [90, 91], el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF) [92, 93], el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) [94], la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, NGAL) [95] y la interleucina-6 (IL-6) [96]. En general, la selección de aptámeros frente a biomarcadores tumorales se realiza en tampones "biológicos", concretamente en solución salina tamponada de fosfato, y luego se prueban en fluidos corporales, principalmente en fracciones de sangre por ser ésta el fluido corporal más utilizado para diagnóstico *in vitro* en los hospitales. La orina [92, 93] y recientemente la saliva [96] se están utilizando lentamente como muestras alternativas, ya que son totalmente no invasivas.

### 1.5.2. Selección de aptámeros en medios biológicos

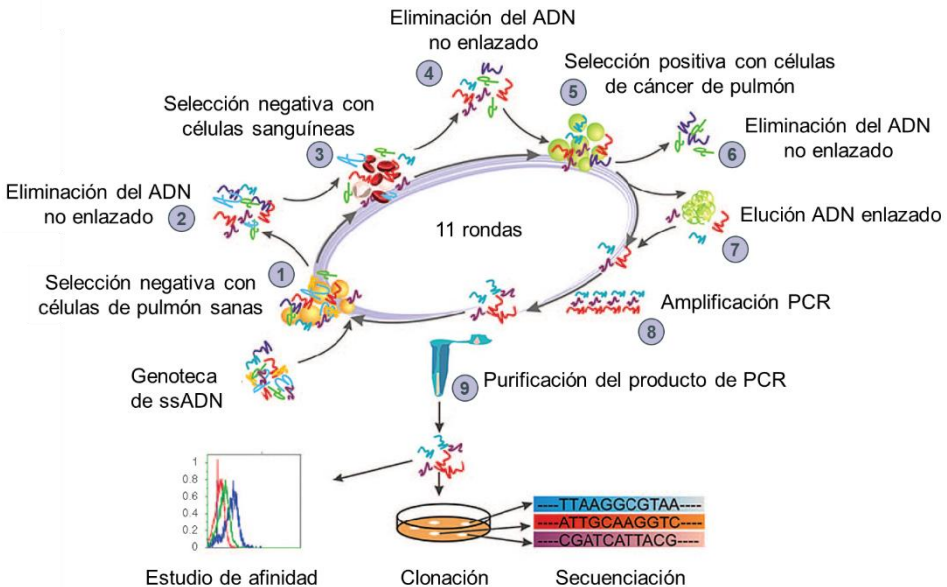
Además de las atractivas ventajas que los aptámeros presentan sobre los anticuerpos, el proceso SELEX se puede realizar en medios biológicos para asegurar el estado nativo de la diana durante la selección y garantizar el funcionamiento exitoso de los aptámeros en el dispositivo de diagnóstico *in vitro*, uno de los problemas más reportados con respecto a los anticuerpos [33].

En los métodos de selección de aptámeros contra marcadores tumorales se suelen utilizar como diana proteínas recombinantes sintetizadas mediante ingeniería genética en sistemas procariotas, ya que las proteínas fabricadas de este modo son fáciles de purificar, pero pueden generar aptámeros que no interactúan con la correspondiente proteína nativa. Esto se atribuye a las PTMs en eucariotas que no tiene lugar en las células procariotas. De hecho, las proteínas nativas no son moléculas únicas, sino que cada una de ellas es un conjunto de proteoformas que surgen de variaciones en los niveles de ADN y ARN, errores de transcripción y traducción, PTMs, exposición a compuestos tóxicos y respuesta a estados patológicos [97]. Por lo tanto, la selección de aptámeros para proteínas no purificadas en medios biológicos, como el suero, los tejidos y las muestras postoperatorias, ha despertado un gran interés [98]. Una ventaja importante de los procedimientos SELEX en medios biológicos es que no requieren conocimientos bioquímicos profundos para seleccionar la diana de antemano, pero deben introducirse pasos de contraselección cuidadosos y más intensos para eliminar aquellas secuencias que nose unan de forma específica. Además, como resultado secundario, estas estrategias son formas indirectas de descubrimiento de nuevos

## 1.5. Aptámeros en diagnóstico clínico

biomarcadores, después de una identificación adecuada que normalmente se realiza mediante técnicas de espectrometría de masas.

El *cell*-SELEX demostró por primera vez la idoneidad de las matrices complejas para la selección de aptámeros [99]. En esta modalidad de SELEX en el que no se conoce de antemano la diana, la genoteca se hace interactuar con las células diana, por ejemplo, de un tipo de cáncer, incorporando rondas de contraselección frente a células sanas. Sin embargo, la expresión proteica en los cultivos de células tumorales puede ser diferente a la de los tejidos tumorales primarios, por lo que los aptámeros generados mediante el *cell*-SELEX clásico podrían no cumplir los requisitos analíticos para ser aplicados en muestras clínicas. Por ello, las muestras postoperatorias son de gran interés como fuente de dianas para la selección de aptámeros contra marcadores tumorales. En esta línea, Zamay y colaboradores han desarrollado aptámeros para células de adenocarcinoma de pulmón derivadas de tejidos postoperatorios, utilizando linfocitos y células pulmonares normales en las contraselecciones, y muestras frescas de diferentes pacientes en ronda para abordar la variabilidad del cáncer (Figura 1.7) [100].



**Figura 1.7. Representación esquemática del protocolo *cell*-SELEX utilizado para seleccionar aptámeros contra células de adenocarcinoma de pulmón derivadas de muestras postoperatorias.** Adaptado de [100].

## 1. Introducción general

Los aptámeros seleccionados después de 11 rondas se unen a varias proteínas candidatas, identificadas tras el SELEX mediante HPLC-MS. En apoyo de esta estrategia, los aptámeros reconocen las dianas en las células tumorales circulantes (CTC) y en las vesículas extracelulares de la sangre periférica de los pacientes con cáncer de pulmón, mientras que sólo se unen débilmente a las células tumorales en cultivo. Uno de los aptámeros se utilizó finalmente para la captura magnética de dianas en muestras de plasma sanguíneo para su posterior cuantificación electroquímica, lo que permitió observar diferencias significativas entre los individuos sanos y los enfermos de cáncer [101].

Otra matriz biológica recientemente utilizada para la selección de aptámeros con fines de diagnóstico es el suero de pacientes diagnosticados de cáncer [102–104]. En todos los casos se utiliza el suero en rondas positivas de selección. El extraordinario problema de la heterogeneidad del cáncer, la baja abundancia de biomarcadores específicos y la discriminación de las enfermedades benignas se aborda mediante contraselecciones frente a suero de individuos sanos. Sin embargo, estas estrategias presentan una serie de deficiencias, ya que, la selección se dirige de forma no selectiva hacia cualquier diferencia entre ambos tipos de suero y no se informa de la degradación del ADN por las nucleasas después de repetidas interacciones en el suero.

De forma similar a las muestras postoperatorias, se han desarrollado aptámeros empleando secciones de tejidos tumorales como diana, en una modalidad que se conoce como *tissue*-SELEX [105–108]. Una ventaja notable de las secciones de tejido es que son más representativas de la morfología del cáncer que las líneas celulares en cultivo, permitiendo así la selección de aptámeros contra diferentes secciones histológicas, incluyendo la matriz extracelular, los componentes de la membrana y las dianas intracelulares [105, 108]. En este contexto, se ha logrado la selección guiada por imagen de aptámeros que se unen a la vasculatura tumoral o a las células tumorales, pero no a las células del estroma, utilizando un rayo láser para cortar la región de interés [106]. Recientemente, se ha desarrollado un sistema microfluídico automático que ha reducido el tiempo de selección a 15 h [107]. Una posible desventaja del *tissue*-SELEX es que el proceso de corte de tejido, inmovilización y tinción con reactivos químicos podría llevar a la desnaturalización de las proteínas diana en el portaobjetos de tejido [98].

Otras rutas alternativas para obtener aptámeros en medios biológicos no purificados incluyen el SELEX *in vivo*, que consiste en la selección de aptámeros capaces de unirse específicamente a tumores en animales vivos [109–113]. Estos métodos se basan en la inyección directa de la genoteca en el animal y la extracción del tejido diana después del enlace, lo que suprime una de las ventajas

más atractivas de estos receptores: la selección sin animales. Estas estrategias también requieren el uso de oligonucleótidos modificados para evitar la degradación por nucleasas y se dirigen principalmente al desarrollo de aptámeros para la administración dirigida de fármacos.

### 1.5.3. Aptasensores electroquímicos para marcadores tumorales

Una de las principales aplicaciones de los aptámeros en el campo del diagnóstico clínico es el desarrollo de sensores químicos. Un sensor químico es un dispositivo autónomo capaz de informar sobre la concentración de una o más especies químicas, así como de microorganismos o virus, de una muestra en tiempo real [114]. Están formados generalmente por dos componentes básicos conectados entre sí: un elemento de reconocimiento (bio)químico, normalmente molecular (receptor), que interacciona de forma muy selectiva (idealmente específica) con la molécula diana o analito, y un transductor físico-químico que transforma la energía química puesta en juego en esa interacción en una señal medible [115].

Los biosensores son sensores químicos en los que el receptor es de origen biológico. Pueden clasificarse en función del mecanismo del proceso de reconocimiento en biosensores catalíticos, si se basan en una reacción catalizada por macromoléculas, y biosensores de bioafinidad, si se fundamentan en la unión de dos especies mediante múltiples interacciones no covalentes para formar un agregado molecular llamado complejo [114, 115]. Los biosensores de afinidad en los que se utilizan anticuerpos y aptámeros como elementos de reconocimiento se denominan inmunosensores y aptasensores, respectivamente. Los biosensores también se pueden clasificar según la naturaleza del transductor y el tipo de señal analítica que genera en sensores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos (de masa) y térmicos [114]. Entre todas las alternativas de transducción, la detección electroquímica es especialmente atractiva, ya que presenta ventajas como la utilización de instrumentación sencilla, rápida, de bajo coste, sensible, robusta y de fácil miniaturización [33, 116], y es por ello que ha sido ampliamente utilizada en el desarrollo de biosensores para diagnóstico clínico.

La mayoría de los aptasensores electroquímicos desarrollados para la detección de marcadores tumorales utilizan la química tiol-oro para anclar el aptámero en el transductor. La estabilidad de estas monocapas mixtas autoensambladas (*self-assembled monolayers*, SAM) es inferior a un mes [79, 117], lo que limita su posible comercialización. Las SAMs ternarias triplican la estabilidad al menos en los genosensores [118], pero su uso en aptasensores electroquímicos no está extendido. Los dispositivos que contienen aptámeros en

## 1. Introducción general

papel muestran una estabilidad superior a la de las SAMs mixtas, aunque también dependen de nanopartículas de oro para su inmovilización [84]. Por otro lado, los ensayos basados en partículas magnéticas son atractivos debido a la compatibilidad con la automatización/microfluídica ampliamente utilizada en los laboratorios clínicos.

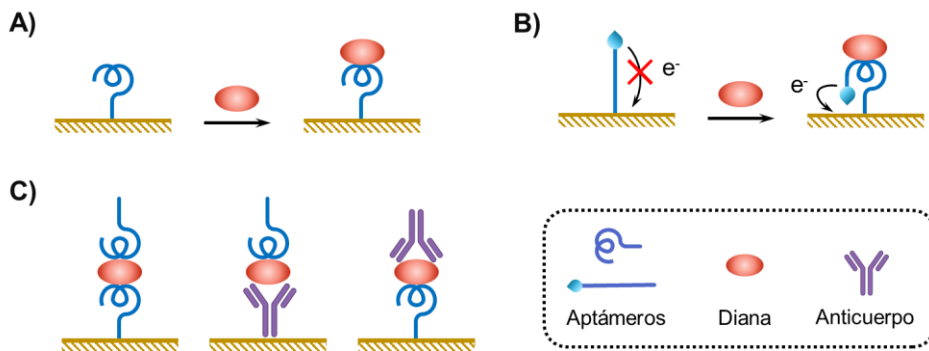
En líneas generales, el formato de ensayo dominante en los aptasensores electroquímicos para marcadores tumorales que se han descrito hasta el momento es la detección directa con un único aptámero (**Figura 1.8A**). Los ensayos directos basados en aptámeros pueden clasificarse en 2 grupos: los que no requieren reactivos marcados o indicadores y los que sí los utilizan. 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 reconocimiento [119]. Estas estrategias requieren el empleo de técnicas muy sensibles capaces de monitorizar cambios físicos mínimos de magnitudes como la conductividad, la masa o el índice de refracción, 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 electroquímicas empleadas en este tipo de formatos son la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) o los transistores de efecto de campo (*field-effect transistors*, FET) [120].

Otras técnicas de detección no electroquímicas en aptasensores directos sin marcas son las medidas de onda acústica con microbalanza de cuarzo (*quartz cristal microbalance*, QCM) o la espectroscopia SPR [119]. Sin embargo, estos principios de transducción pueden resultar inespecíficos.

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 que proporcione la señal analítica, de tal manera que la interacción aptámero-diana module su actividad. El sistema indicador puede ser una molécula electroactiva como el azul de metileno y la modulación de la señal se produce como resultado del evento de reconocimiento. Entre las técnicas más utilizadas para la transducción electroquímica en aptasensores directos para marcadores tumorales se encuentran la voltamperometría diferencial de pulsos (*differential pulse voltammetry*, DPV) y la voltamperometría cíclica (*cyclic voltammetry*, CV) [120].

## 1.5. Aptámeros en diagnóstico clínico

Dependiendo de la técnica de detección, la señal analítica puede aumentar (*signal on*) [78, 81] o disminuir (*signal off*) [77, 79, 89, 90], cuando la concentración de la diana aumenta. Los aptasensores con señales analíticas crecientes son más adecuados porque son menos propensos a obtener falsos resultados positivos cuando la plataforma del sensor se degrada. Cuando la técnica de detección es la impedancia, la unión de la proteína al aptámero anclado a la superficie del transductor suele dar lugar a métodos de señal creciente. La detección de VEGF<sub>165</sub> inmovilizado mediante quimisorción en nanoestructuras de oro es un ejemplo [90, 91].



**Figura 1.8. Representación esquemática de los formatos más utilizados en aptasensores para marcadores tumorales.** (A) Aptasensor directo. (B) Aptasensor directo con estrategia autoindicadora. (C) Aptasensores en formato de sándwich: aptámero-aptámero (izquierda), anticuerpo de captura – aptámero de detección (centro), aptámero de captura – anticuerpo de detección.

Para las aplicaciones POCT, es deseable contar con métodos de detección que no requieran de reactivos adicionales, por lo que la estrategia ideal es el uso de hebras autoindicadoras (*self-reporting*). En estas metodologías se utiliza un aptámero marcado con un indicador redox, y se diseñan de forma que el cambio estructural del aptámero al unirse a la diana provoca el acercamiento o alejamiento de la superficie del electrodo del indicador redox que está unido a uno de los extremos del aptámero (**Figura 1.8B**). El grupo del Profesor Plaxco fue pionero en el desarrollo de este tipo de sensores y los aplicó a la detección de PDGF, pero en suero sin diluir la detectabilidad se vio significativamente reducida [121]. Además, esta estrategia no es de aplicación general porque requiere un gran cambio conformacional, que no siempre experimentan los aptámeros seleccionados bajo presión de afinidad, y no es fácil de acoplar con sistemas de amplificación [122]. No obstante, esta estrategia es útil para la detección en tiempo real de pequeñas moléculas en fluidos corporales [123], donde la débil unión aptámero-diana hace que esta interacción sea reversible.

## 1. Introducción general

El formato en sándwich (**Figura 1.8C**) con dos aptámeros como elementos de captura y detección [45, 92] es escaso a pesar de que el resultado del proceso SELEX es una colección de varios potenciales aptámeros. Sin embargo, éstos deben unirse a sitios diferentes de la diana, lo que implica la realización de estudios de enlace adicionales a menos que existan dos sitios de unión idénticos. El truncamiento del aptámero a la longitud mínima con la mayor afinidad es un trabajo posterior a SELEX que se recomienda encarecidamente para minimizar los eventos de hibridación no deseados entre los dos aptámeros en formatos sándwich y, como se ha comentado previamente, por razones económicas del dispositivo final. Los ensayos mixtos anticuerpo-aptámero evitan el problema de la hibridación, normalmente con el aptámero actuando como receptor de la detección [83]. Con menos frecuencia, los aptámeros actúan como elementos de captura mientras que los anticuerpos son los receptores de detección [94].

En la mayoría de los aptasensores descritos en la literatura para la detección de marcadores tumorales sólo se han analizado muestras que imitan la matriz real, por ejemplo, suero, a las que se les ha añadido la diana de forma artificial (*spike*). Aunque es un primer paso hacia las aplicaciones reales, la accesibilidad a muestras clínicas debería ser obligatoria para sacar conclusiones precisas. La multiplexación es una característica deseable de los biosensores porque cada vez hay más pruebas que señalan que la detección temprana del cáncer requiere de la detección simultánea de paneles de biomarcadores [124]. En este contexto, se han descrito aptasensores duales, pero sólo unos pocos se han probado en muestras clínicas [84, 88].

### 1.5.4. Aptahistoquímica

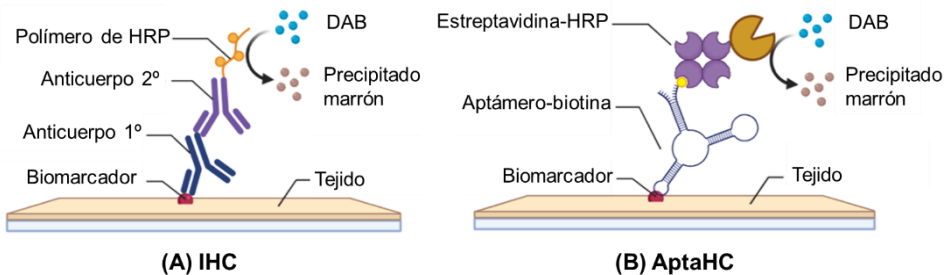
La técnica principal para el diagnóstico de tumores es la patología quirúrgica, un proceso basado en la tinción de secciones tumorales (biopsias) con hematoxilina y eosina (H&E) para proporcionar contraste entre los componentes celulares de forma que el patólogo pueda detectar anomalías morfológicas microscópicas para guiar la estadificación y la clasificación del tumor para un diagnóstico eficaz [125, 126]. Sin embargo, en el caso de los tumores poco o nada diferenciados, estas características morfológicas por sí solas no son adecuadas para un diagnóstico concluyente, por lo que en estos casos se requiere la detección de biomarcadores celulares específicos mediante el uso de la inmunohistoquímica (*immunohistochemistry*, IHC) [125, 127]. La IHC se basa en la premisa de que cada tipo de célula tiene un marcador característico, o epítipo, que puede utilizarse para diagnosticar diferencialmente la célula de origen, complementando así las características morfológicas observadas con la tinción de H&E [128, 129].

## 1.5. Aptámeros en diagnóstico clínico

En el ámbito de la patología clínica, la IHC tiene importancia diagnóstica, pronóstica y terapéutica, lo que puede influir directamente en las estrategias de tratamiento de los pacientes y en la toma de decisiones clínicas [130].

Hay varios aspectos técnicos a tener en cuenta para garantizar que los resultados de IHC son fiables [131, 132]:

1. Las muestras de tejido suelen estar fijadas con formalina y parafinadas (*formalin-fixed paraffin-embedded*, FFPE) ya que de esta forma se pueden preservar sus perfiles estructurales y moleculares durante largos períodos de tiempo.
2. La recuperación antigénica (antigen retrieval) es el proceso más crucial, ya que la fijación con formalina y parafina produce enlaces cruzados entre los péptidos de la muestra que pueden dejar inaccesibles los epítomos de los biomarcadores, de forma que es necesario realizar esta etapa de recuperación de antígenos para destruir estos enlaces cruzados, desenmascarando así los epítomos para su reconocimiento. En el caso de la IHC, el método de recuperación de antígenos suele realizarse mediante calentamiento y/o tratamiento enzimático [133].
3. Optimización de los parámetros de incubación del anticuerpo con las secciones de tejido para garantizar un resultado óptimo.
4. El método de visualización, normalmente basado en el uso de colorantes cromógenos y microscopios de campo brillante.



**Figura 1.9. Comparación de los formatos de ensayo más habituales de (a) inmunohistoquímica (IHC) y (b) aptahistoquímica (AptaHC).** Creada con BioRender™.

Las propiedades de los aptámeros los convierten en rivales de los anticuerpos en las pruebas de histoquímica, en este caso “aptahistoquímica” (AptaHC). La mayoría de los estudios de AptaHC emplean aptámeros modificados con biotina en el extremo 5' o 3' para su posterior marcaje con



## 1. Introducción general

estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (*horse-raddish peroxidase*, HRP), aprovechando la interacción biotina-estreptavidina, que es la interacción no covalente más fuerte de la naturaleza. La adición del sustrato para la HRP, generalmente diaminobencidina (DAB), da lugar a un producto coloreado que permite la visualización en el microscopio (**Figura 1.9.**) [134].

La recuperación antigénica sigue siendo una etapa importante en los experimentos de histoquímica con aptámeros. Uno de los mecanismos propuestos para la recuperación de antígenos es que las proteínas se desnaturalizan a altas temperaturas y permanecen desplegadas tras el enfriamiento [133, 135]. A pesar de esta conformación desplegada, los aptámeros son capaces de reconocer los epítomos incluso en las formas lineales [136], aunque generalmente se cree que se unen a conformaciones tridimensionales de proteínas nativas [137].

El tiempo de incubación con el aptámero, la temperatura y la composición de los medios de interacción son parámetros críticos que deben ser examinados a fondo. Por lo general, el tiempo y medio de incubación en AptaHC es similar al utilizado durante el curso del SELEX. Al igual que en el caso de la IHC, pueden incorporarse en el medio competidores, polianiones o cualquier agente de bloqueo adecuado para minimizar la unión no específica de los aptámeros, por ejemplo, a las proteínas con carga positiva presentes en los núcleos celulares, un problema atribuido a la carga negativa de los aptámeros que se ha descrito ampliamente en la literatura [127, 138, 139].

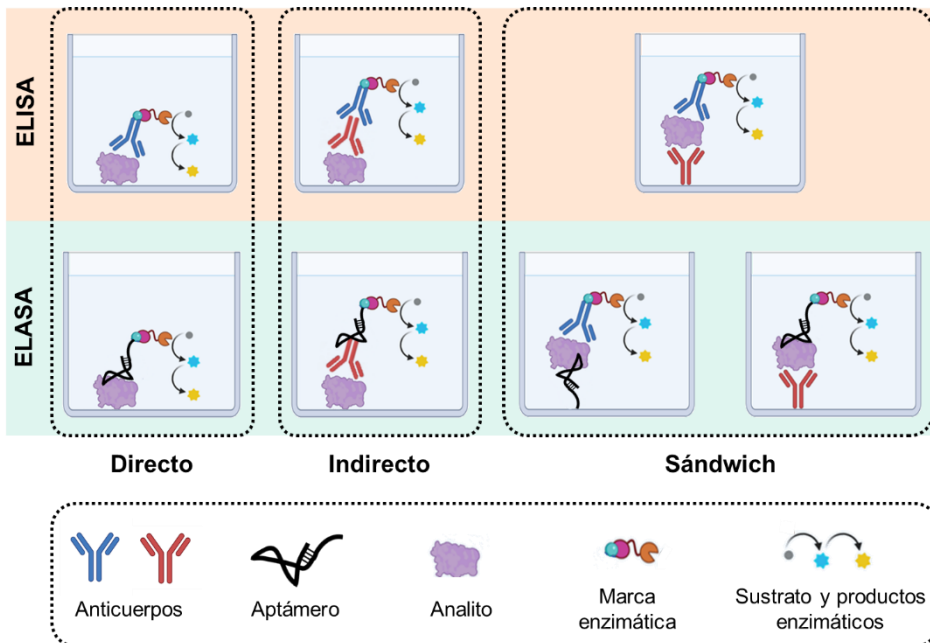
El método de visualización por tinción cromogénica con sustratos coloreados de la HRP como la diaminobencidina (DAB), ampliamente establecido en los laboratorios de anatomía patológica, se ha aplicado también a la AptaHC [140–142]. La aptahistoquímica también se ha realizado con éxito utilizando aptámeros marcados con fluoresceína a los que posteriormente se une un anticuerpo secundario anti-fluoresceína conjugado a HRP para generar la señal [143]. En otros trabajos se ha explorado el uso de aptámeros conjugados con fluoróforos, como los colorantes de cianina (Cy3, Cy5) o los Alexa Fluor® y visualización mediante microscopía de fluorescencia [127, 144, 145].

Los aptámeros también pueden sustituir a los anticuerpos en las técnicas de inmunocitoquímica (*immunocytochemistry*, ICC) o inmunofluorescencia (IF), las cuales consisten en la visualización de biomarcadores intra- o extracelulares en láminas de células procedentes generalmente de cultivos, fijadas en un portaobjetos con un agente químico como paraformaldehído para preservarlas. El protocolo de los experimentos de ICC es similar al de IHC en lo que se refiere a la interacción (tinción) con los anticuerpos, con algunas diferencias en la obtención y procesado de las muestras. Los parámetros a tener en cuenta para

adaptar estas metodologías al uso de aptámeros son equivalentes a los que se han descrito para AptaHC.

### 1.5.5. ELASA

Los enzimoimmunoensayos de adsorción o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) se consideran el estándar de oro para la cuantificación de proteínas en muestras biológicas [146]. Estas metodologías se realizan normalmente en placas de poliestireno de 96 o 384 pocillos, sobre los que inmovilizan las proteínas que se quieren analizar, seguida de la incubación con anticuerpos específicos a esas proteínas y la detección de la señal generada a través de una marca enzimática (generalmente HRP o fosfatasa alcalina) unida directa o indirectamente al anticuerpo específico. Hay varios formatos de ensayo, siendo los más comunes los ensayos directos, indirectos y en sándwich (**Figura 1.10**).



**Figura 1.10. Representación esquemática de ensayos ELISA y ELASA con formatos directo, indirecto y sándwich.** Creada con Biorender™.

## 1. Introducción general

En los ensayos directos e indirectos, el antígeno de interés se inmoviliza en la placa y seguidamente se incuba con un anticuerpo específico. A continuación, el antígeno se detecta directamente (anticuerpo primario marcado) o indirectamente (con un anticuerpo secundario anti-IgG marcado). En el formato sándwich, el analito a medir debe interaccionar con un anticuerpo de captura, previamente inmovilizado en la placa, y un anticuerpo de detección marcado, por lo que se requiere un epítipo diferente para cada anticuerpo en la molécula analito [146].

Los aptámeros se han utilizado en formatos que imitan a este tipo de inmunoensayos y se han acuñado bajo el acrónimo ELASA (*enzyme-linked aptasorbent assay*) o ELONA (*enzyme-linked oligonucleotide assay*). Al igual que con los ELISA, se han descrito múltiples configuraciones de ELASA, incluyendo formatos directos, indirectos y en sándwich (**Figura 1.10**), basados en la utilización exclusiva de aptámeros o combinados con anticuerpos [147].

Un ejemplo de un ELASA para diagnóstico clínico que ha demostrado ser prometedor en muestras derivadas de pacientes está basado en la utilización de un aptámero seleccionado para las proteínas secretadas por *Mycobacterium tuberculosis* [148]. Cuando se probó en muestras de suero de pacientes con tuberculosis pulmonar (TB) activa, pacientes con TB extrapulmonar y donantes sanos, el ELASA mostró una sensibilidad y especificidad del 100% y del 94.1%, respectivamente. La utilidad de este ensayo se ha demostrado además en el análisis de muestras de esputo de pacientes con TB, con una sensibilidad y especificidad reportadas del 91.3% y el 90%, respectivamente [149]. En comparación, los kits ELISA comerciales equivalentes mostraron una sensibilidad y la especificidad máximas del 83.3% y el 98.9%, respectivamente [150].

La mayoría de los ELASAs publicados hasta la fecha son para la detección de agentes infecciosos [70, 151], aunque también hay un ejemplo de ELASA para la detección de dickkopf-1(DKK1), un potencial biomarcador para el diagnóstico temprano del carcinoma hepatocelular [152]. Estos ELASAs también proporcionaron resultados comparables a los métodos ELISA convencionales en muestras de pacientes, demostrando que estos ensayos basados en aptámeros alcanzan una sensibilidad y especificidad comparables, si no superiores, a las metodologías ELISA existentes.

### 1.6. Amplificación isotérmica de aptámeros

El comportamiento dual de los aptámeros, como ácidos nucleicos y ligandos de afinidad, es una característica exclusiva de estos receptores que permite convertir la detección de cualquier analito para el que se haya seleccionado un aptámero en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, una estrategia que se puede utilizar para mejorar la sensibilidad de los ensayos analíticos y sensores basados en estos receptores [31, 153]. En este contexto, los métodos de amplificación isotérmicos, en los que no se requiere el uso de termocicladores, están ganando relevancia frente a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la estrategia mejor establecida para la amplificación de ácidos nucleicos.

La combinación del biorreconocimiento selectivo de los aptámeros con la amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos y las técnicas de detección electroquímicas que, como se comentó previamente, se caracterizan por su simplicidad, rapidez, bajo coste y fácil miniaturización, proporciona nuevas oportunidades para el diagnóstico clínico basado en el análisis biomarcadores, con gran potencial para crear plataformas analíticas útiles en el análisis descentralizado en el punto de cuidado [116, 154].

Las técnicas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que han sido aplicadas a ensayos basados en aptámeros para marcadores de interés clínico pueden clasificarse en tres grupos generales:

1. Estrategias que implican la síntesis de ADN o ARN catalizada por polimerasas, entre las que se incluyen la amplificación en círculo rodante (RCA) y la amplificación mediada por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT).
2. Métodos basados en esquemas de reciclaje de la diana mediados por nucleasas, como las exonucleasas I y III o las endonucleasas de corte (NEasas).
3. Sistemas basados en el desplazamiento de hebras de ADN como la reacción de hibridación en cadena (HCR) o el ensamblaje catalítico de horquillas (CHA).

## 1. Introducción general

### 1.6.1. Amplificaciones basadas en el uso de polimerasas

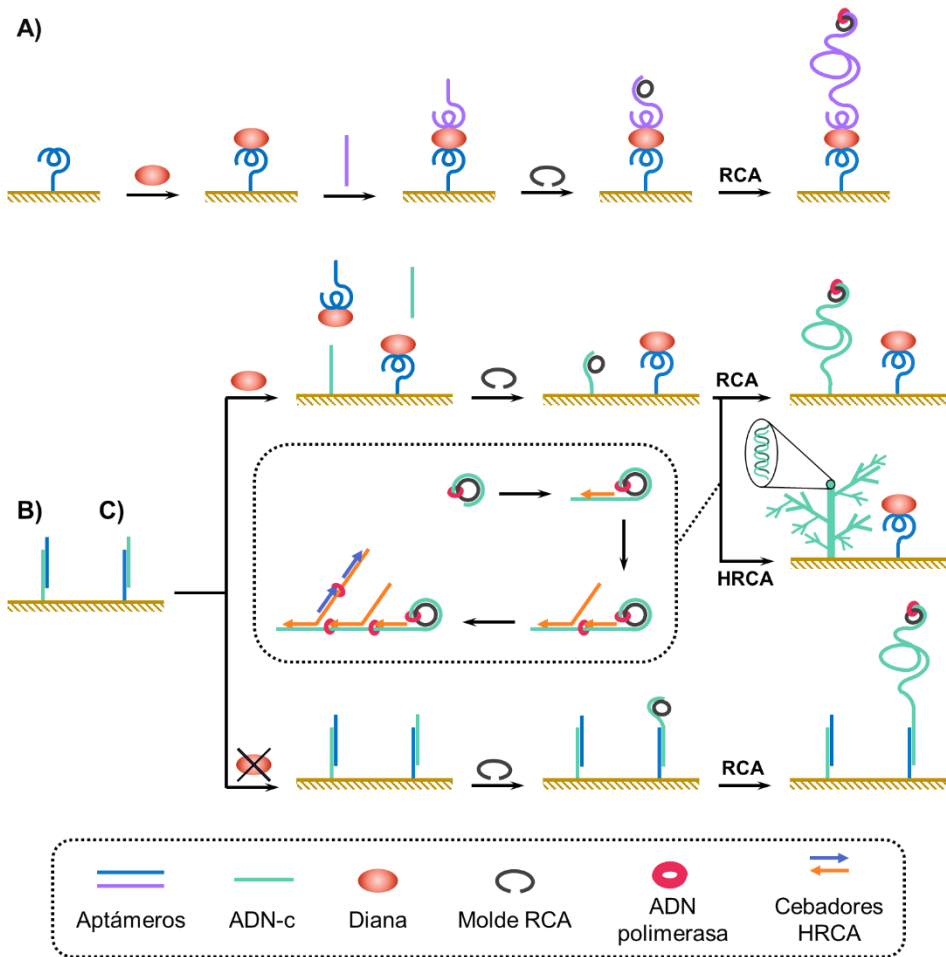
#### 1.6.1.1. Amplificación de círculo rodante (RCA)

El método de amplificación isotérmica mediada por polimerasas más representativo es la amplificación de círculo rodante (*rolling circle amplification*, RCA). Desarrollada a mediados de la década de 1990 [155, 156], esta técnica de amplificación *in vitro* consiste en la replicación de un molde circular de ADN de hebra simple catalizada por ciertas ADN y ARN polimerasas (exo-ADN polimerasas  $\phi 29$ , Bst y Vent para ADN, y la ARN polimerasa T7 para ARN). Estas polimerasas extienden un cebador de ADN o ARN previamente hibridado al molde circular, de forma que se genera una larga molécula de ARN o ADN de una sola hebra que contiene múltiples repeticiones en tándem de la secuencia complementaria al molde circular original [31, 157]. Como molde para la RCA pueden utilizarse tanto sondas circulares de ADN preformadas como sondas lineales que se circularizan *in situ* mediante una reacción de ligación. En este último caso, los círculos de ADN formados *in situ*, que reciben el nombre de *padlocks* o *earrings*, proporcionan al ensayo una mayor especificidad de secuencia, ya que la sonda lineal debe reconocer dos cebadores adyacentes para su circularización y la no correspondencia de bases cerca del lugar de ligación interfiere enormemente en esta reacción [158].

La RCA ha sido integrada con éxito en ensayos basados en aptámeros para diferentes analitos de interés biomédico [157], incluyendo algunos biomarcadores de cáncer. Muchos de estos ensayos se basan en un formato sándwich que implica la inmovilización de anticuerpos o aptámeros en la superficie de un electrodo o pocillo de microplaca para capturar las moléculas diana de las muestras. Posteriormente, se añade un aptámero de detección extendido con una región que actúa como cebador y la RCA se lleva a cabo en presencia de un molde circular de ADN y de las enzimas adecuadas (**Figura 1.11A**). La extensión lineal del aptámero alrededor del molde circular permite la detección sensible del analito a través de la cuantificación de los miles de copias generadas de la secuencia complementaria al molde, como se explicará más adelante [83, 159–161].

La RCA también se ha acoplado a formatos basados en el desplazamiento de hebra inducido por la diana. En estos ensayos, los aptámeros se inmovilizan como un dúplex mediante la hibridación con una secuencia de ADN monocatenario parcialmente complementaria (ADN-c). Son posibles varios formatos [162] y, dependiendo de la hebra que se ancle en la plataforma de ensayo, la formación del complejo aptámero-diana induce la liberación del ADN-c [163] o del aptámero [164, 165]. En cualquier caso, los ADN-c se diseñan para incluir una región que actúa como cebador y que hibrida con el molde de RCA.

## 1.6. Amplificación isotérmica de aptámeros



**Figura 1.11. Representación esquemática de aptaensayos con amplificación RCA.** (A) Formato tipo sándwich. (B) Ensayos de desplazamiento de hebra inducido por la diana en el que una secuencia de ADN parcialmente complementaria (ADN-c) o (C) un aptámero se inmovilizan en la superficie del transductor (panel recuadrado: HRCA).

Dependiendo del elemento inmovilizado, la unión del aptámero a la diana puede conducir a un aumento o disminución de la señal. Cuando el aptámero está inmovilizado, a mayor cantidad de diana que se une al aptámero, mayor cantidad de ADN-c que es desplazada (**Figura 1.11C**), de forma que la RCA no se producirá de forma extensa, dando lugar a un ensayo de señal decreciente [163]. Por el contrario, cuando el ADN-c está inmovilizado, las concentraciones de diana más altas desplazan un mayor número de moléculas de aptámeros hibridados, lo que conduce a un aumento de los eventos de RCA (ensayos de señal creciente) [164, 165]. En este último caso, el ADN-c se diseña de forma que solo es capaz de hibridarse al molde circular cuando no está hibridado con el aptámero (**Figura**

## 1. Introducción general

**1.11B).** Las estrategias basadas en el uso de ADN-c evitan la necesidad de disponer de dos sitios de unión diferentes en la proteína diana, aunque se necesitan dos secuencias de oligonucleótidos diferentes como reactivos. La implementación de ensayos competitivos permitiría el uso de un único aptámero, sin embargo, no se han desarrollado ensayos competitivos acoplados a RCA para la detección de biomarcadores de cáncer hasta ahora.

Aunque la RCA clásica tiene características muy atractivas, como ser un proceso isotérmico y tener un mecanismo de reacción simple, la amplificación se produce sólo linealmente con el tiempo. Para superar este inconveniente y conseguir una amplificación exponencial, se ha desarrollado la RCA hiperramificada (*hyperbranched rolling circle amplification*, HRCA) [166], también conocida como RCA en cascada [167] o amplificación por ramificación (RAM) [168] (**Figura 1.11**). En este método, las secuencias repetitivas que contiene la hebra extendida linealmente alrededor del molde circular sirven simultáneamente como sitio de hibridación para un cebador inverso adicional, que también se extiende. Dado que el desplazamiento de la hebra también tiene lugar, el resultado de la HRCA es un crecimiento exponencial de grandes dúplex de ADN ramificados [168]. La HRCA se ha combinado con aptámeros en sistemas electroquímicos para la detección de trombina y del PDGF-BB, alcanzando límites de detección (LD) tan bajos como 1.2 aM [165] y 1.6 fM [164], respectivamente. mientras que en aptaensayos electroquímicos basados en RCA clásica para la cuantificación de estas dianas, se obtuvieron unos LD de 35 fM (trombina) [161] y 10 fM (PDGF-BB) [159].

Para la transducción electroquímica de las hebras extendidas de RCA, ya sean lineales o hiperramificadas, se han empleado algunos esquemas de detección de ADN bien establecidos, que suelen implicar la utilización de reactivos adicionales y pueden englobarse en dos grupos:

1. Estrategias basadas en el uso de sondas de ADN marcadas, normalmente biotiniladas, que hibridan con las repeticiones múltiples obtenidas tras la RCA [159].
2. Métodos basados en la interacción del ADN con reactivos electroactivos o precursores de compuestos electroactivos [83, 163–165, 169]. Estos incluyen el uso de agentes intercalantes, compuestos que interactúan con las bases nitrogenadas o la reacción de los grupos fosfato del ADN con molibdato para generar la molécula electroactiva. También se ha descrito el ensamblaje de complejos hemina/cuarteto de G [170–172] y la formación de nanopartículas metálicas utilizando el ADN recién sintetizado como molde [160].

## 1.6. Amplificación isotérmica de aptámeros

La RCA ha demostrado ser una herramienta poderosa para la detección sensible de biomarcadores proteicos con relevancia clínica, alcanzando una alta eficacia de amplificación y unos límites de detección extremadamente bajos. Por ejemplo, se han desarrollado metodologías para la detección de marcadores tumorales como el PSA y el CEA en los que la RCA combinada con aptámeros ha permitido alcanzar unos LD de 0.07 aM (0.020 fg/mL) [160] y 0.25 fM (0.05 pg/mL) [83], respectivamente.

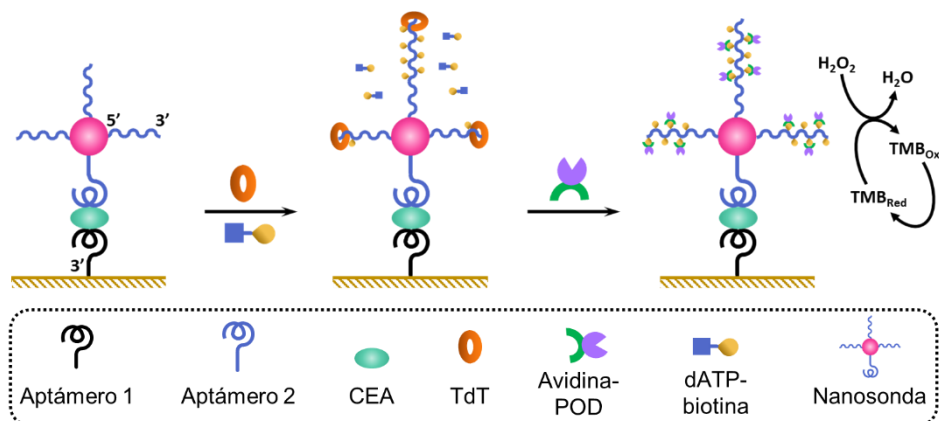
### 1.6.1.2. Desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT)

Otra estrategia de amplificación que implica la síntesis de ácidos nucleicos es la amplificación mediada por la desoxinucleotidil transferasa terminal (*terminal deoxynucleotidyl transferase*, TdT). La TdT es una ADN polimerasa que cataliza la extensión del extremo 3' de una secuencia sin necesidad de utilizar una hebra molde [173]. Además, es capaz de catalizar la incorporación de desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) funcionalizados, lo que facilita la detección del aptámero extendido, ya que se pueden añadir directamente moléculas electroactivas, como el aminofenol y el nitrofenol [174], o marcas como la biotina y la digoxigenina para su posterior unión a un conjugado enzimático. Cabe destacar que la eficiencia de la amplificación mediada por la TdT depende de la velocidad de incorporación de cada dNTP, un parámetro que a su vez está influenciado por las condiciones experimentales (relación dNTP:aptámero, concentración de dNTP y catión divalente presente), la formación de estructuras de cuarteto de G u horquilla durante la extensión y la naturaleza de los dNTP, siendo más eficiente cuando se añaden nucleótidos naturales [174–176].

La amplificación mediada por TdT se ha aplicado a la detección de CEA utilizando un formato tipo sándwich con dos aptámeros diferentes como receptores de captura y detección [177]. En este sensor, el aptámero de captura se inmovilizó en un electrodo de oro mediante un grupo tiol en su extremo 3' para evitar su extensión durante la amplificación TdT y el aptámero de detección se unió a nanopartículas de oro (AuNPs) mediante un grupo tiol en su extremo 5', junto con otras secuencias cortas de ADN, para formar nanosondas. Tras el ensamblaje en sándwich, sólo se alargaron los extremos 3' de los oligonucleótidos anclados en la nanosonda, utilizando para ello dATP modificado con biotina como sustrato para la TdT, seguido de un marcaje enzimático con un conjugado de avidina-peroxidasa y la detección amperométrica de los sustratos enzimáticos (**Figura 1.12**). Esta metodología condujo a un LD tan bajo como 5 fM para CEA.



## 1. Introducción general



**Figura 1.12. Representación esquemática de un aptasensor electroquímico con amplificación mediada por TdT para la detección de CEA.** Adaptado de [177].

La estrategia descrita proporciona dos niveles de amplificación: la extensión mediada por TdT utilizando sólo biotina-dATP y la alta carga de oligonucleótidos cortos inmovilizados en las AuNPs. Dado que se espera que la longitud de la extensión catalizada por TdT con dNTPs marcados sea bastante limitada, no está claro si la amplificación de la señal observada proviene principalmente de las nanopartículas de oro multidecoradas o de la amplificación de ADN. Una comparación con un esquema de detección similar utilizando nanosondas directamente modificadas con oligonucleótidos marcados con biotina, sin usar la TdT, permitiría estimar la contribución de ambas estrategias de amplificación por separado. Además, el hecho de que en la amplificación mediada por TdT no se necesite una hebra molde podría comprometer la selectividad del ensayo, de forma que para la aplicación exitosa de esta amplificación en diagnóstico clínico es necesario un control estricto de la señal de fondo, ya que podría conducir a falsos resultados positivos.

### 1.6.2. Amplificaciones basadas en el uso de nucleasas

Las nucleasas son un grupo de hidrolasas que catalizan la escisión de los ácidos nucleicos. Hay dos tipos de estas enzimas, las exonucleasas y las endonucleasas, que se han utilizado como herramientas de biología molecular para desarrollar aptasayos con esquemas de amplificación de la señal basados en el reciclaje de la diana o analito [31, 178–185].

## 1.6. Amplificación isotérmica de aptámeros

### 1.6.2.1. Ensayos basados en exonucleasas

Las exonucleasas (Exos) catalizan la eliminación escalonada de nucleótidos del ADN monocatenario o bicatenario en los extremos 3' o 5'. En los aptaensayos con amplificación mediada por exonucleasas se han utilizado principalmente tres Exos con actividades catalíticas diferentes: Exo III, RecJ<sub>f</sub> y Exo I [31, 186, 187].

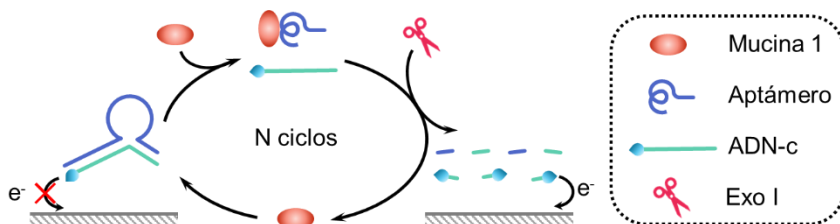
La Exo III elimina los nucleótidos del ADN de doble hebra en dirección 3'→5' sólo cuando el extremo 3' es bicatenario. Por lo tanto, el ADN de hebra simple y el ADN bicatenario con extremos 3' monocatenarios son resistentes a la digestión por la Exo III [31, 186, 187]. Aprovechando esta propiedad, en los métodos de amplificación por la Exo III se pueden utilizar aptámeros que cambian de estructura al unirse a la diana. En estos ensayos, en ausencia de la diana, el aptámero se pliega en una estructura con un extremo 3' monocatenario, evitando la digestión hidrolítica por parte de la Exo III. Tras la unión de la diana, el aptámero sufre un cambio de conformación que conduce la hibridación de su extremo 3', permitiendo así que Exo III hidrolice el aptámero con la consiguiente liberación de la diana [178].

Entre las exonucleasas específicas del ADN de hebra simple, la RecJ<sub>f</sub> es la única exonucleasa conocida que cataliza la eliminación de nucleótidos en dirección 5'→3'. Los métodos de amplificación mediada por este tipo de exonucleasa suelen requerir el uso de secuencias auxiliares parcialmente complementarias al aptámero (ADN-c). Este ADN-c puede inmovilizarse en un electrodo mediante varias estrategias y se hibrida con el aptámero. En presencia del analito, la formación del complejo aptámero-diana debe romper el dúplex aptámero-ADN-c. De este modo, la RecJ<sub>f</sub> puede hidrolizar el aptámero del complejo, y la diana liberada puede desencadenar secuencialmente otra ronda de unión-hidrólisis dando lugar a un esquema de amplificación basado en el reciclaje de la diana [180, 181]. Este esquema general se ha aplicado, entre otros, a la detección de biomarcador de cáncer de mama [181].

La Exo I cataliza la hidrólisis de ADN monocatenario en la dirección 3'→5', por lo que se puede incorporar a aptaensayos en los que la transducción implica el uso de moléculas indicadoras electroactivas unidas al extremo 5' de sondas auxiliares (ADN-c) que deben hidrolizarse para liberar la molécula indicadora y generar la señal electroquímica. Esta estrategia se ha utilizado recientemente en el diseño de un aptaensayo homogéneo para la detección de la mucina 1 [182]. Para mejorar la eficiencia de enlace entre el aptámero y la diana, se utilizó un ADN-c marcado con azul de metileno y complementario al aptámero, de forma que al hibridar con él el aptámero forma una estructura de bucle. En presencia de mucina 1, el aptámero es desplazado del dúplex aptámero-ADN-c

## 1. Introducción general

para formar el complejo aptámero-diana, y la Exo I puede hidrolizar ambas secuencias de ADN monocatenario, logrando así el reciclaje de la diana y la generación de la señal (**Figura 1.13**). La detección explota la difusión mejorada que se produce cuando la molécula indicadora está unida a fragmentos cortos de ADN obtenidos tras la digestión catalizada por la exonucleasa, lo que da lugar a un aumento de la señal electroquímica [182]. Con esta estrategia, que no funciona en ausencia de Exo I, se obtuvo un LD de 0.40 pg/mL de mucina 1 y un intervalo de medida de tres órdenes y medio de magnitud.



**Figura 1.13. Representación esquemática de un aptaensayo electroquímico con amplificación mediante Exo I para la detección de mucina 1.** Adaptado de [182].

### 1.6.2.2. Ensayos basados en endonucleasas

Las endonucleasas, a diferencia de las exonucleasas, catalizan la eliminación de nucleótidos de la parte central de una cadena polinucleotídica, por lo que también se pueden utilizar para diseñar estrategias de amplificación basadas en el reciclaje de la diana [31, 186, 187]. Las endonucleasas de corte (*nicking endonucleases*, NEAsas) son un tipo especial de endonucleasas que pueden reconocer secuencias específicas en el ADN de hebra doble y cortar sólo una hebra en ese sitio, dejando intacta la otra hebra [31, 187]. Por este motivo, en los ensayos asistidos por estas endonucleasas se suelen emplear aptámeros que cambian de estructura y ADN-c. Los ADN-c suelen ser sondas con estructura de horquilla que contienen el sitio de reconocimiento de la NEasa y se vuelven lábiles para la hidrólisis enzimática cuando se hibridan con el aptámero [170]. Este esquema de amplificación apenas se ha utilizado en la detección electroquímica de marcadores de interés clínico y, en general, requiere un diseño cuidadoso de los múltiples oligonucleótidos necesarios, lo que impide su generalización. Las estrategias de amplificación basadas en el uso de endonucleasas y exonucleasas se han combinado con otros métodos de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos como la RCA [170, 172] o la HCR [184, 185] para mejorar la sensibilidad, lo que puede ser indicativo de la baja eficiencia de estas estrategias de amplificación.

Otra estrategia de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que ha ganado relevancia en los últimos años es la reacción de amplificación exponencial

## 1.6. Amplificación isotérmica de aptámeros

(*exponential amplification reaction*, EXPAR), ya que este método tiene una alta eficiencia de amplificación ( $10^6$ - $10^8$ ) y se puede realizar en un intervalo de tiempo muy corto (<30 min). Utilizada por primera vez para la medida de ácidos nucleicos, ya se ha aplicado también a la detección de proteínas e iones [188]. La principal característica de la EXPAR es que se basa en la actuación de dos enzimas, una ADN polimerasa con capacidad de desplazamiento de hebra y una endonucleasa de corte. También se requiere una hebra molde de ADN, una sonda iniciadora (la propia diana en el caso del ARN) y nucleótidos. La hebra molde de la EXPAR está diseñada para contener dos regiones repetidas que son complementarias a la secuencia de iniciación y están separadas por una pequeña región que actúa como sitio de corte para la NEasa. La sonda iniciadora se hibrida con la hebra molde y es elongada por la ADN polimerasa. Después de la extensión, el dúplex formado es escindido por la NEasa generando un hueco, y la ADN polimerasa puede extender el extremo 3' de la hebra escindida desplazando simultáneamente la hebra recién sintetizada. Dado que el ADN molde contiene dos regiones iguales, la hebra de ADN desplazada tiene la misma secuencia que el ADN iniciador y puede hibridarse con otra molécula de molde, iniciando una nueva amplificación, mientras continúa la amplificación del ADN diana a partir del complejo inicial molde-iniciador. Así, en cada ciclo de reacción se producen dos copias del ADN iniciador a partir de una única molécula diana, logrando una amplificación exponencial ( $2^n$ ) [188].

Este método de amplificación isotérmica se ha utilizado en un aptasensor electroquímico para la detección de PDGF-BB basado en la hibridación de proximidad inducida por la diana [189]. Este sistema aprovecha que la proteína diana, que es un homodímero, tiene dos sitios de unión idénticos para los aptámeros. Ambos aptámeros se alargaron con secuencias cortas y complementarias y sólo uno de ellos estaba previamente hibridado con la secuencia iniciadora de la EXPAR. La superficie del transductor se modificó con la hebra molde de la EXPAR hibridada con una secuencia parcialmente complementaria (ADN-c). El evento de reconocimiento en disolución sitúa a los aptámeros lo suficientemente cerca de la proteína como para inducir la hibridación parcial de los aptámeros extendidos, lo que provoca la liberación de la secuencia iniciadora de la EXPAR, que desplaza secuencialmente la hebra molde de la superficie del electrodo para iniciar la reacción de amplificación (**Figura 1.14**). La detección electroquímica se consigue mediante la hibridación del ADN-c que permanece anclado en la superficie del electrodo con sondas de ADN/AuNPs/cuarteto-G/hemina. Con esta estrategia se obtuvo un LD de 52 fM [189], un valor ligeramente superior a los valores obtenidos utilizando otras amplificaciones como RCA [159] o HRCA [164]. Este hecho puede atribuirse a la elevada amplificación de fondo en EXPAR, el principal defecto de esta técnica

## 1. Introducción general

que limita sus aplicaciones prácticas [188] y a la limitada actividad catalítica de las DNAzimas artificiales.

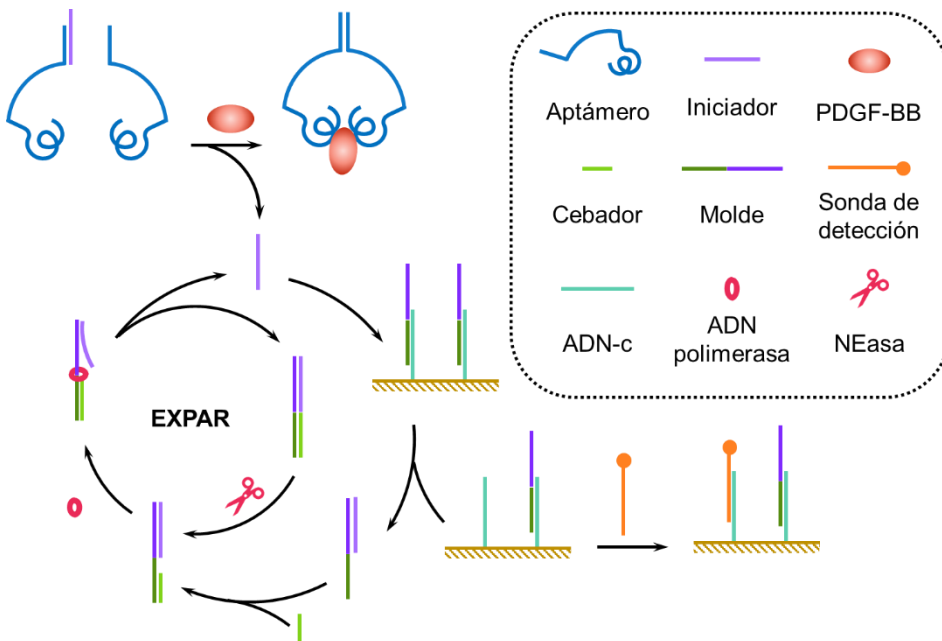


Figura 1.14. Representación esquemática del aptaensayo electroquímico con amplificación EXPAR para la detección de PDGF-BB. Adaptado de [189].

### 1.6.3. Amplificaciones basadas en el desplazamiento de hebras mediado por el extremo

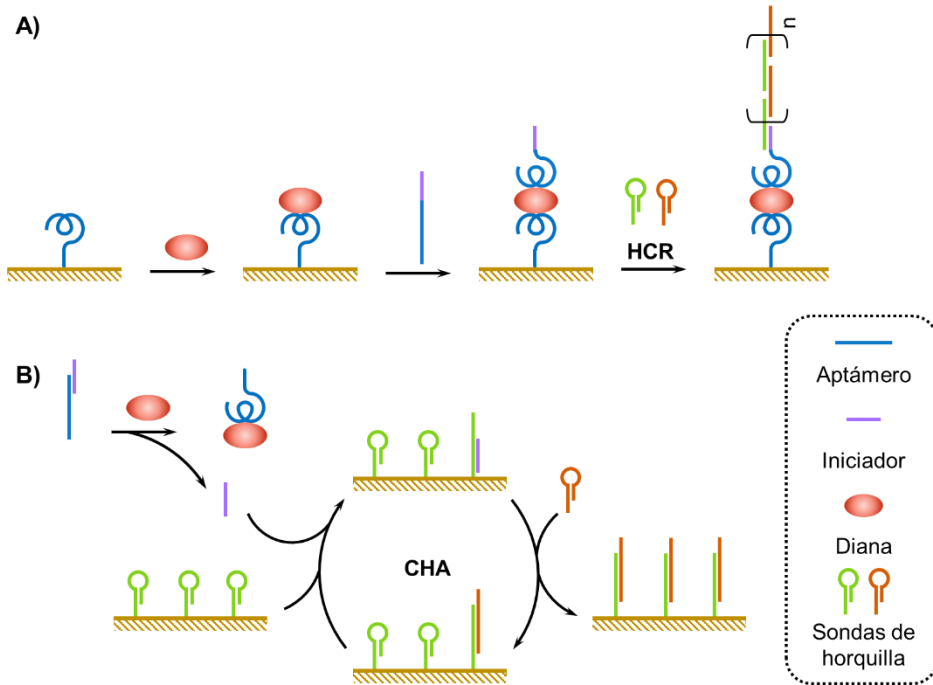
Bajo esta denominación se agrupan varias estrategias que no requieren el uso de enzimas, concebidas inicialmente para la detección de ácidos nucleicos. Se basan en una característica única del ADN como reactivo analítico: su autoensamblaje programado y predecible mediante el emparejamiento de bases Watson-Crick. Las reacciones de desplazamiento de hebras mediadas por el extremo (en inglés *toehold-mediated strand-displacement*) consisten en el desplazamiento de una o más hebras prehibridadas en un dúplex de ADN que contiene en un extremo una región de hebra simple de normalmente 5-8 nucleótidos (*toehold*) en donde se inicia el desplazamiento de la hebra [31, 190].

#### 1.6.3.1. Reacción de hibridación en cadena (HCR)

El método más representativo de desplazamiento de hebra mediado por el extremo es la reacción de hibridación en cadena (*hybridization chain reaction*, HCR). Descrita por primera vez por Dirks y Pierce [191], la HCR consiste en una

## 1.6. Amplificación isotérmica de aptámeros

cascada de eventos de hibridación que da lugar a largos dúplex de ADN. Para ello se requieren dos sondas de ADN con estructura de horquilla que sean estables en disolución hasta que la presencia de una sonda iniciadora desencadena la primera reacción de hibridación (**Figura 1.15A**).



**Figura 1.15. Representación esquemática de aptasayos con amplificaciones de desplazamiento de hebra mediado por el extremo.** (A) Reacción de hibridación en cadena (HCR) acoplada a un aptasensado en formato sándwich. (B) Ensamblaje catalítico de horquillas (CHA) inducido por la diana.

La HCR ha sido ampliamente utilizada en el desarrollo de biosensores para el análisis de moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, proteínas y células, debido a las atractivas características que posee esta estrategia como ser isotérmica y no necesitar enzimas [192, 193]. La secuencia de ADN iniciadora suele formar parte del aptámero [194, 195], aunque también se puede diseñar para que sea complementaria al aptámero y se inmoviliza en la superficie del transductor [184, 185]. Una de las estrategias más explotadas para lograr la transducción electroquímica en las amplificaciones de HCR es la detección basada en el uso de peroxidasa. Para ello, se suelen utilizar sondas de horquilla marcadas con biotina, de modo que los largos dúplex de ADN resultantes contienen múltiples moléculas de biotina a las que puede unirse un conjugado enzimático de avidina-peroxidasa [184, 194, 196, 197]. Una alternativa es el uso de DNAzimas formadas por complejos hemina/cuarteto-G con actividad peroxidasa. Estas estructuras pueden

## 1. Introducción general

generarse diseñando las sondas de horquilla con secuencias ricas en guanina en sus extremos que pueden unirse a la hemina para adquirir su actividad catalítica similar a la peroxidasa [185, 195, 198].

### 1.6.3.2. Ensamblaje catalítico de horquillas (CHA)

Al igual que en la HCR, la amplificación de ensamblaje catalítico de horquillas (*catalytic hairpin assembly*, CHA) también se basa en la utilización de dos sondas con estructura de horquilla (H1 y H2) que son estables en disolución, hasta que una hebra de ADN iniciadora se une a una de las sondas para ser posteriormente desplazada por la otra sonda para formar un dúplex H1-H2 [199, 200]. De esta forma, la secuencia iniciadora liberada puede desencadenar el desplazamiento de otra sonda de horquilla, y se pueden diseñar esquemas de reciclaje similares a los de las amplificaciones mediadas por nucleasas. Se ha concebido como un método sensible de detección en tiempo real de amplificaciones isotérmicas [200], pero también se ha utilizado en aptasensores. Por ejemplo, esta estrategia de amplificación sin enzimas ha sido aplicada recientemente en un aptasensor para PSA [201], basado en la utilización de partículas magnéticas modificadas con un dúplex de aptámero y una hebra de ADN-c. La unión aptámero-PSA indujo la liberación del ADN-c, que fue diseñado para desencadenar la reacción CHA entre dos sondas de horquilla, una de ellas previamente inmovilizada en la superficie del transductor (**Figura 1.15B**). La señal electroquímica se consiguió mediante la hibridación de los dúplex de horquillas formados con sondas de Au/Pt/azul de polimetileno /ADN. Con esta estrategia se obtuvo un límite de detección tan bajo como 2.3 fg/mL.

Como se ha visto en esta sección, la combinación de los aptámeros con estrategias de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos y detección electroquímica posee un gran potencial para crear plataformas analíticas sensibles útiles en el análisis de marcadores de interés biomédico. Sin embargo, la mayoría de estas nuevas estrategias no ha alcanzado todavía su potencial para llegar a la práctica clínica. Las barreras más significativas que hay que superar para ello son las siguientes. Muchas de estas metodologías son difíciles de generalizar, ya que tienen mecanismos complejos y esquemas de reacción que a veces incluyen más de una enzima, lo que aumenta el coste por ensayo. Además, numerosos esquemas de amplificación descritos en la literatura están insuficientemente caracterizados en cuanto a su eficiencia, robustez y utilidad práctica en muestras biológicas, por lo que es necesaria la búsqueda de soluciones más sencillas y eficaces para satisfacer la creciente demanda de sensibilidad y selectividad que se requiere en los análisis biomédicos y clínicos.

### 1.7. Barreras para la utilización de los aptámeros más allá del ámbito académico

A lo largo de este capítulo se han presentado los reactivos de afinidad basados en ácidos nucleicos conocidos como aptámeros, describiendo sus características principales como herramientas analíticas, sus métodos de obtención y la caracterización de su afinidad como biorreceptores. Asimismo, se han comentado varias aplicaciones de estos receptores en el campo del diagnóstico clínico, y la posibilidad de combinar la reacción de afinidad aptámero-diana con estrategias de amplificación de ácidos nucleicos para mejorar los diagnósticos. Sin embargo, la utilización de aptámeros fuera del ámbito académico e I+D es muy limitada, a pesar de las ventajas que presentan frente a los anticuerpos en ciertas aplicaciones y que fueron descritos por primera vez hace más de 30 años. Con todo, es importante señalar que los anticuerpos monoclonales necesitaron casi 40 años de investigación y desarrollo para alcanzar el éxito comercial [14]. Si los aptámeros siguen el mismo camino, aún se necesitarían unos 10 años de estudios preliminares para alcanzar la misma meta que sus homólogos proteicos.

Una importante barrera para la comercialización y adopción de los aptámeros en ensayos clínicos de rutina es la considerable inversión realizada por muchas de las principales empresas farmacéuticas y biotecnológicas en la humanización de anticuerpos monoclonales, junto con el desconocimiento por parte de científicos y facultativos clínicos de estos receptores [14].

A pesar de ello, en la actualidad existen varias empresas especializadas en aptámeros para diagnóstico y terapia, entre las que se incluyen, entre otras, NOXXON Pharma AG (Alemania, 1997), SomaLogic (EE.UU, 1999), NeoVentures (Canadá, 2002), Aptus Biotech (España, 2010) y AptaSci (Corea del Sur, 2011) [202]. Algunas de ellas cuentan con un amplio catálogo de aptámeros para fines de I+D y la mayoría de ellos han sido validados en aplicaciones típicas de diagnóstico, como citometría de flujo, inmunohistoquímica, Western blot y ELASA, aunque ninguno ha llegado aún al mercado para su uso en laboratorios clínicos. Una de las razones podría ser que gran parte de los aptámeros se generan en entornos académicos en los que no hay suficientes recursos para seguir desarrollándolos para adaptar su uso al laboratorio clínico [14]. Sin embargo, este desarrollo no debería ser complejo, ya que los protocolos basados en aptámeros son muy similares o más sencillos que los protocolos de los inmunoensayos, y podrían adaptarse a los equipos ya existentes en los laboratorios clínicos.





# Capítulo 2

## Objetivos

Uno de los pilares del diagnóstico clínico *in vitro* es el uso de receptores especializados que puedan unirse a biomarcadores específicos que informen sobre cambios patológicos. Durante los últimos cuarenta años, los anticuerpos han sido los biorreceptores de referencia para estas aplicaciones, pero pueden conducir a resultados poco fiables por varias razones, como la heterogeneidad entre lotes que puede ocurrir en su producción y la caracterización insuficiente de su afinidad de enlace.

En la búsqueda de mejores ligandos de afinidad, los aptámeros se presentan como una prometedora alternativa a los anticuerpos, debido a las propiedades que poseen estos receptores sintéticos de naturaleza nucleotídica como son su alta afinidad y especificidad, su tamaño relativamente pequeño, su baja inmunogenicidad y su estabilidad química y térmica. Gracias a las características mencionadas y a la adaptabilidad de los aptámeros a dispositivos de análisis *point-of-care* o descentralizados, la investigación de los aptámeros se ha convertido en un nicho estable en el campo del diagnóstico *in vitro* al mejorar la rapidez y la precisión de los diagnósticos. Sin embargo, han pasado más de treinta años desde el descubrimiento de estos receptores sintéticos y su incorporación al ámbito clínico ha sido lenta, obstaculizada principalmente por la enorme inversión realizada por la industria biotecnológica en la generación de anticuerpos.

En este contexto, el objetivo principal de la presente tesis doctoral es explorar el uso de aptámeros como herramientas analíticas en diagnóstico clínico, discutiendo su selección, la caracterización de su afinidad de enlace y sus aplicaciones. En particular, la investigación que se presenta en este trabajo se centra en dos enfermedades, el cáncer y la COVID-19, por el terrible impacto que ejercen sobre el bienestar y la economía a nivel mundial. Este objetivo general puede subdividirse en una serie de objetivos de investigación más específicos, que se resumen en los siguientes puntos:

## 2. Objetivos

### 1. Selección y caracterización de nuevos aptámeros para la cadena $\alpha 1$ del colágeno XI humano.

El colágeno XI $\alpha$ 1 es un potencial marcador tumoral de varios carcinomas, incluido el adenocarcinoma ductal de páncreas, uno de los cánceres con peor pronóstico. Este colágeno se encuentra originalmente en la matriz extracelular, pero puede ser secretado a los fluidos corporales como resultado de la remodelación de la matriz inducida por la progresión del tumor. Hasta la fecha, en la literatura científica sólo se ha informado de un aptámero desarrollado contra un colágeno, ya que las proteínas de esta familia son típicamente poco solubles y presentan secuencias repetitivas, lo que las convierte en objetivos difíciles para la generación de receptores de afinidad.

### 2. Desarrollo de ensayos basados en aptámeros para la detección de colágeno XI $\alpha$ 1 en matrices biológicas.

Los aptámeros anti-colágeno-XI $\alpha$ 1 seleccionados en el punto anterior serán utilizados para desarrollar metodologías analíticas con transducción tanto electroquímica como fluorescente que permitan detectar este marcador tumoral en líneas celulares de cáncer, como prueba de concepto de las potenciales aplicaciones clínicas que tienen los receptores generados.

### 3. Combinación de aptámeros con estrategias de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos para la detección electroquímica mejorada de biomarcadores de cáncer.

Los aptámeros presentan una característica única para un ligando de afinidad: son a la vez receptores de afinidad y ácidos nucleicos. Esta propiedad se explotará para mejorar el funcionamiento de aptámeros generados previamente contra dos potenciales biomarcadores de cáncer, la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos y la  $\alpha$ -fetoproteína. El acoplamiento de aptámeros con técnicas de amplificación isotérmica (amplificación de círculo rodante o amplificación mediada por desoxinucleotidil transferasa terminal) permite convertir el evento de reconocimiento aptámero-diana en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

### 4. Caracterización de nuevos aptámeros contra la proteína *spike* (S) del SARS-CoV-2.

Debido a sus atractivas características, tales como su obtención *in vitro*, su rápida fabricación mediante síntesis química y su estabilidad química y térmica, los aptámeros constituyen una valiosa herramienta en el desarrollo de estrategias de diagnóstico de infecciones virales emergentes, como la

## 2. Objetivos

COVID-19 causada por el SARS-COV-2. En esta línea, se caracterizará la afinidad de enlace de diez nuevos aptámeros que fueron previamente seleccionados contra la proteína S1 del SARS-CoV-2, utilizando la técnica de espectroscopia de resonancia de plasmón superficial (SPR).

### 5. Estudio de colorantes de rutenio (II) como sensibilizadores de ITO/TiO<sub>2</sub>.

La combinación del reconocimiento selectivo de los aptámeros con la detección fotoelectroquímica (PEC), que posee las mismas ventajas que la detección electroquímica convencional (sencillez, rapidez, bajo coste) pero mayor sensibilidad, proporciona nuevas estrategias mejoradas de diagnóstico basado en aptámeros. En este contexto, se explorará el comportamiento fotoelectroquímico de dos nuevos colorantes de rutenio (II) y su aplicación como sensibilizadores de electrodos de ITO/TiO<sub>2</sub>.

## Objectives

The use of specialized receptors that can bind to specific biomarkers accounting for pathological changes is one of the pillars for *in vitro* clinical diagnosis. For the last forty years, protein antibodies have been the gold standard bioreceptors for these applications, but they may render unreliable results for a number of reasons, including batch-to-batch inconsistency in their production and poor binding affinity characterization.

In the search for better targeting ligands, synthetic nucleic acid receptors known as aptamers have emerged as promising alternatives to antibodies, because of the properties they hold such as high affinity and specificity, relatively small size, low immunogenicity, and chemical and thermal stability. By virtue of the aforementioned advantages and the unique adaptability of aptamers to point-of-care platforms, aptamer science has become a stable niche in the field of *in vitro* diagnostics by boosting the quickness and accuracy of diagnoses. However, more than thirty years have passed since the discovery of these synthetic receptors and yet uptake has been slow to progress into the clinical environment, mainly hampered by the huge investment made by the biotechnological industry in antibody generation.

Within this context, the main aim of this doctoral thesis is to explore the use of aptamers as analytical tools in clinical diagnosis, discussing their selection, the characterization of their binding affinity and their foreseen applications. In particular, the research presented in this thesis is focused on two diseases, cancer and COVID-19, because of the ghastly impact they exert on well-being and economy worldwide. This general goal can be subdivided in a number of more specific research objectives, which are summarized in the following points:

## 2. Objectives

### 1. Selection and characterization of novel aptamers for the $\alpha 1$ chain of human collagen XI.

Collagen XI $\alpha$ 1 is a potential tumor marker of several carcinomas including pancreatic ductal adenocarcinoma, one of the cancers with worse prognosis. This collagen is originally found in the extracellular matrix, but it can be secreted to the bodily fluids as a result of matrix remodeling induced by tumor progression. Up to date, only one aptamer raised against a collagen has been reported, as proteins in this family are typically non soluble and display repetitive sequences, which ultimately makes them challenging targets for affinity receptor generation.

### 2. Development of aptamer-based assays for the detection of collagen XI $\alpha$ 1 in biological matrices.

The anti-collagen-XI $\alpha$ 1 aptamers raised in the previous point will be challenged to the detection of this tumor marker in cancer cell lines, developing analytical methodologies with both electrochemical and fluorescent detection, as a proof of concept of the potential that the generated receptors have in the clinical applications.

### 3. Combination of isothermal nucleic acid amplification schemes with aptamers for the enhanced electrochemical detection of cancer biomarkers.

Aptamers display a unique characteristic for an affinity ligand: they are both affinity reagents and nucleic acids. This feature will be exploited to enhance the performance of aptamers previously raised against two potential cancer biomarkers, neutrophil gelatinase-associated lipocalin and  $\alpha$ -fetoprotein. The combination of aptamers with isothermal amplification techniques (rolling circle amplification or terminal deoxynucleotidyl transferase amplification) turns the aptamer-target binding event into a nucleic acid amplification reaction.

### 4. Characterization of novel aptamers for the spike (S) protein of SARS-CoV-2.

Because of their attractive characteristics such as *in vitro* tunable selection, quick chemical synthesis and thermal and chemical stability, aptamers can be valuable assets in the development of diagnostic strategies for emerging viral infections such as COVID-19 caused by SARS-COV-2. In this scenario, ten novel aptamers raised against the S1 protein of SARS-CoV-2 will be

## **2. Objectives**

characterized in terms of their binding affinity using surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy.

## **5. Study of ruthenium (II) dyes as sensitizers of TiO<sub>2</sub>/ITO electrodes.**

The combination of the selective affinity recognition of aptamers with photoelectrochemical (PEC) detection, which has inherently the same advantages of electrochemical detection (simplicity, rapidity, cost-effectiveness) but higher sensitivity, provides new approaches for enhanced aptamer-based diagnosis. Within this context, the photoelectrochemical performance of two novel ruthenium (II) dyes as sensitizers of ITO/TiO<sub>2</sub> electrodes will be explored.

## Selección y caracterización de nuevos aptámeros para la cadena $\alpha 1$ del colágeno XI, potencial biomarcador de cáncer

### 3.1. Introducción

La biopsia líquida, como alternativa a la biopsia de tejido convencional, se está convirtiendo en una potente herramienta para monitorizar la evolución de los tumores casi en tiempo real [203], proporcionando la base para un tratamiento individualizado del cáncer. La adopción de este tipo de estrategias en el manejo de esta enfermedad se centra en el estudio de biomarcadores secretados por las células tumorales en los fluidos corporales. Los biomarcadores actualmente aprobados para diagnóstico mediante biopsia líquida son las células tumorales circulantes y los ácidos nucleicos (ADN y ARN) [203, 204], pero en los tumores sólidos, el microentorno tumoral constituye también una fuente de biomarcadores. Este microentorno tumoral está constituido por células del estroma e inmunitarias, vasos sanguíneos y la matriz extracelular [205].

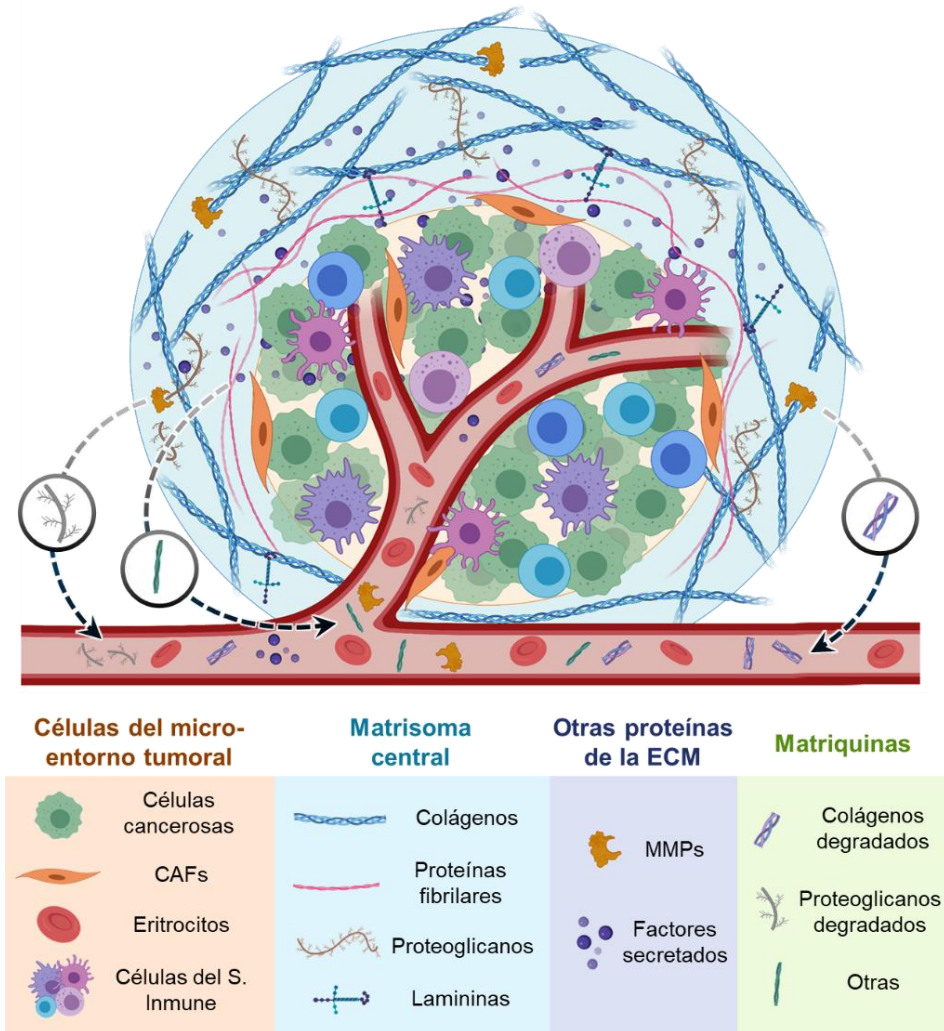
#### 3.1.1. La matriz extracelular como fuente de biomarcadores

Además de las propias células tumorales, hay otros componentes del tumor que pueden actuar como fuente de biomarcadores circulantes. La evolución de las células tumorales depende del establecimiento de un nicho o microentorno favorable, que está constituido por vasos sanguíneos, varios tipos de células como las mesenquimales (fibroblastos, adipocitos), células inmunes o neuronales, y la matriz extracelular (*extracellular matrix*, ECM) circundante (**Figura 3.1**). Esta última es un componente esencial del estroma tumoral que está en continua remodelación gracias a la comunicación bidireccional con las células [206]. Las interacciones entre las células tumorales y la ECM son fundamentales para promover la tumorigénesis y la metástasis e influyen en todas las características del cáncer [207]. Los cambios dinámicos que se producen en la composición de la ECM durante la progresión del tumor implican la liberación de proteínas



### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

solubles de la ECM a la circulación periférica de los pacientes. El potencial de estos componentes para actuar como biomarcadores del cáncer está bastante poco explorado, aunque cada vez hay más evidencias que sugieren que se debería incluir su detección en el diseño de nuevas pruebas de diagnóstico temprano del cáncer [208].



**Figura 3.1. Componentes del microentorno tumoral.** Se destacan los principales componentes de la matriz extracelular (ECM): el matrisoma central, las matriquinas y otras proteínas de la ECM, junto con las células del microentorno tumoral. CAFs: fibroblastos asociados al cáncer; MMPs: metaloproteinasas de la matriz. Creada con BioRender™.

La ECM es un complejo entramado de proteínas que rodea las células del tejido. Este andamio tridimensional no sólo proporciona soporte físico a las células, sino que también facilita la comunicación celular, participando activamente en los procesos de señalización que controlan el comportamiento celular [209]. Está presente en dos formas principales: la membrana basal, sobre la que se asientan las células en estrecha aposición, y la matriz intersticial, que interconecta las células y modula procesos como la diferenciación y la migración celulares, garantizando la integridad estructural de los tejidos.

El desarrollo de los tumores suele conducir a una activación de las células productoras de los componentes de la matriz extracelular, dando lugar a una densificación de la misma acompañada de una organización aberrante con modificaciones post-traduccionales conocida como desmoplasia tumoral, que normalmente es causante de un mal pronóstico ya que constituye una barrera contra la quimioterapia [210]. La desmoplasia está presente en la mayoría de los tumores sólidos, particularmente en el adenocarcinoma ductal de páncreas (*pancreatic ductal carcinoma*, PDAC), que es uno de los tumores con un estroma más rico [211]. La caracterización de la composición de la ECM o "matrisoma" es una tarea ardua porque su estructura central está formada en gran parte por proteínas insolubles, aunque el uso de técnicas proteómicas está permitiendo su estudio exhaustivo, generando un conocimiento en constante expansión sobre su papel e influencia en la progresión del cáncer y la metástasis [212].

El matrisoma puede clasificarse en matrisoma central (*core matrisome*), codificado por unos 300 genes, y proteínas asociadas al matrisoma, una lista de más de 770 moléculas (**Figura 3.1**) [212, 213]. El matrisoma central está constituido por colágenos, la clase más abundante de proteínas de la ECM, junto con proteoglicanos y glicoproteínas. La estructura de estos colágenos se altera notablemente durante la remodelación de la ECM asociada a la tumorigénesis. Los proteoglicanos, cuya expresión es a menudo específica de un tejido, consisten en una proteína central a la que se unen covalentemente una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAG). Algunos proteoglicanos, como el versicán, se acumulan en el estroma tumoral y están asociados a la tumorigénesis [214]. Por último, el grupo más amplio de proteínas del matrisoma central es el grupo de las glicoproteínas, codificadas por unos 200 genes, que incluyen lamininas, fibronectinas, osteopontina, tenascina C y diferentes proteínas asociadas a la elastina, como las fibrilinas, las glicoproteínas asociadas a las microfibrillas (MAGP) y las fibulinas [215]. El núcleo del matrisoma se ensambla en una estructura compleja y mayoritariamente insoluble, pero sufre una amplia gama de cambios continuos, que incluyen su descomposición en fragmentos más pequeños durante la degradación.

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

Además de estos componentes centrales, la ECM actúa como depósito de factores secretados (factores de crecimiento y citoquinas), proteínas relacionadas que comparten características con las proteínas de la ECM o que pueden asociarse a ellas (mucinas, galectinas, etc.) y enzimas que trabajan extracelularmente para modificar y degradar las proteínas de la ECM. La deposición excesiva de componentes estructurales de la ECM en el microentorno tumoral va acompañada de su reorientación y reticulación, catalizada por enzimas como las familias de la lisil oxidasa (LOX) y la transglutaminasa. En consecuencia, el aumento de la actividad de estas enzimas está fuertemente asociado a la progresión del cáncer [216]. Las células tumorales y del estroma también producen proteasas extracelulares como las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y las catepsinas, que están desreguladas en el cáncer. Las MMPs constituyen la mayor familia de proteasas de la ECM, y los niveles elevados de varias MMPs se han correlacionado con el mal pronóstico de ciertos tipos de cáncer [217], como cáncer de mama, de pulmón o urológico, aunque la sobreexpresión de otras MMPs también se ha relacionado con un potencial metastásico reducido [218].

#### 3.1.2. Los colágenos: principales componentes de la matriz extracelular

Tal y como se comentó anteriormente, la clase más abundante de proteínas de la ECM son los colágenos. La superfamilia de colágenos está integrada por 28 tipos, que se dividen en colágenos fibrilares (tipos I, II, III, V, XI y XXIV) y no fibrilares. Este último grupo incluye, entre otros, los colágenos formadores de redes (tipos IV, VIII y X), los colágenos asociados a fibrillas (tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI y XXII) y los colágenos con un dominio transmembrana (tipos XIII, XVII, XXIII y XXV) [215].

Todos los colágenos comparten una estructura central formada por tres cadenas polipeptídicas (denotadas como  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ) que pueden ser iguales (homotrímero) o no (heterotrímero). Los genes que codifican los colágenos se denominan COL $mAn$ , en mayúsculas para los colágenos humanos, donde  $m$  es el tipo de colágeno y  $n$  el número de la cadena  $\alpha$  [219]. Su secuencia aminoacídica se caracteriza por contener péptidos repetitivos ricos en prolina e hidroxiprolina con una glicina cada tres aminoácidos (Gly-X-Y). Las tres cadenas forman una triple hélice dextrógira dispuesta alrededor de un eje central con la glicina en la región central interna mientras que las cadenas laterales voluminosas de otros aminoácidos están orientadas hacia el exterior [220]. Este dominio tipo colágeno constituye la mayor parte de los colágenos fibrilares. Otros colágenos presentan varios dominios de tipo no colágeno (NC) que interrumpen el dominio de triple

hélice puro. Estas regiones NC son más diversas en cuanto a secuencia y estructura y son más susceptibles de ser hidrolizadas. Los dominios NC en los extremos N y C terminal gobiernan el ensamblaje de la triple hélice en todos los colágenos [221].

Los polipéptidos  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  se sintetizan como procolágenos, cuya estructura incluye los propéptidos N y C que flanquean la triple hélice típica del colágeno. En el momento de la maduración, estos propéptidos son eliminados por escisión proteolítica, dejando expuestos los telopéptidos N y C cortos en los extremos de la molécula de colágeno de triple hélice [222]. Una vez plegados por completo, los colágenos fibrilares se secretan en la ECM a través de vesículas y, a continuación, los dominios terminales (propéptidos N y/o C) se escinden enzimáticamente para producir el colágeno maduro, que adquiere la capacidad de ensamblarse en fibrillas a través de la formación de enlaces covalentes tanto dentro de las triple hélices como intercatenarios [223]. Otros tipos de colágeno también son formas procesadas [219].

La reconstrucción constante de la ECM implica no sólo la neosíntesis y los reordenamientos, sino también la degradación de sus componentes, incluida la de los colágenos. La escisión proteolítica genera fragmentos biológicamente activos llamados matriquinas y matricriptinas, cuya función es diferente de la de la molécula madre, y deja expuestos péptidos que anteriormente estaban ocultos en la proteína completa (neopéptidos). Los fragmentos de colágeno pueden tener funciones opuestas en la tumorigénesis. El grupo más estudiado de matriquinas son las derivadas de los colágenos asociados a la membrana basal, principalmente los tipos IV, XV, XVIII y XIX, ya que desempeñan funciones antiangiogénicas y antitumorales [224]. Dado que su expresión se regula durante la invasión tumoral, se están estudiando como posibles fármacos. Endostar, la fracción N-terminal de la endostatina (derivada del colágeno XVIII), ha sido aprobada en China para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) [221].

Por otro lado, los niveles séricos de algunos fragmentos de componentes de la ECM pueden correlacionarse con la actividad e invasividad del tumor y pueden ser útiles para la detección precoz, el diagnóstico y la monitorización de la progresión del cáncer [225]. Las principales limitaciones para adaptar estos potenciales biomarcadores a la práctica clínica son sus bajos niveles de concentración y la falta de reactivos y ensayos adecuados para su detección selectiva y sensible. Esto es especialmente acuciante en componentes poco abundantes como el colágeno XI, un colágeno fibrilar minoritario que presenta bajos niveles de expresión en tejido normal, pero que está desregulado en cánceres

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

con alta prevalencia tales como el cáncer colorrectal y de mama, así como en otros menos comunes pero con muy baja supervivencia como el PDAC [226–229].

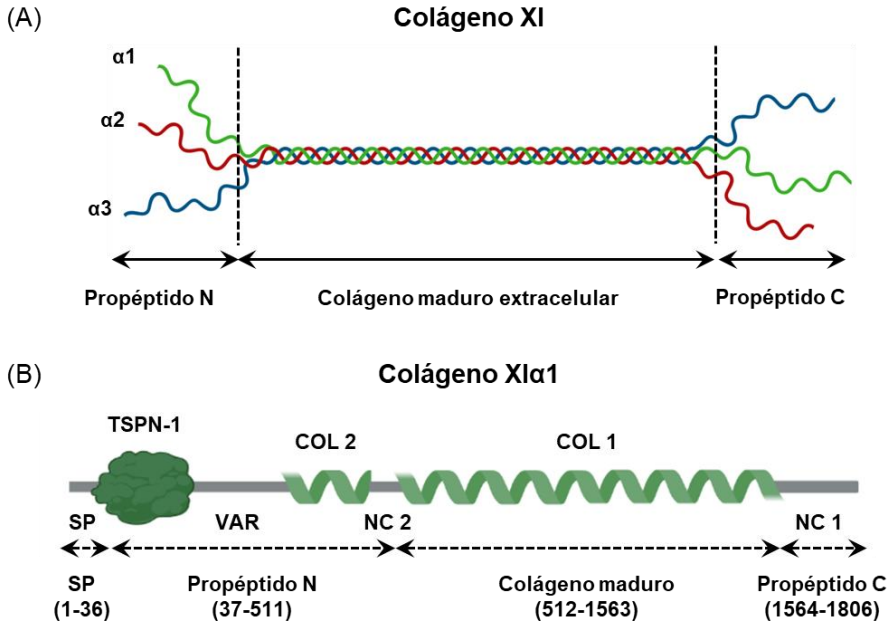
#### 3.1.3. Colágeno XI $\alpha$ 1 y cáncer

El colágeno XI es un colágeno fibrilar minoritario cuya cadena  $\alpha$ 1 posee un elevado grado de homología con la cadena  $\alpha$ 1 del colágeno V, excepto en la región del N-propéptido [230]. Como se comentó anteriormente, cada molécula de colágeno suele estar formada por tres polipéptidos diferentes, denominados  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3, que están codificados por secuencias genéticas específicas (**Figura 3.2**). En el caso del colágeno XI, las cadenas  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 están codificadas por los genes COL11A1 y COL11A2, respectivamente, mientras que la cadena  $\alpha$ 3 es idéntica a la cadena  $\alpha$ 1 del colágeno II, codificada por el gen COL2A1 y principal componente de este segundo tipo de colágeno [231, 232].

La función de los colágenos fibrilares minoritarios de tipo V y XI es actuar como nucleadores, controlando el ensamblaje de las fibrillas de colágeno, de tal manera que quedan mayormente enterrados bajo los colágenos fibrilares mayoritarios I, II y III, en el núcleo de la fibrilla extracelular heterotípica madura [233]. En individuos sanos adultos, el (pro)colágeno XI $\alpha$ 1 está presente en el vítreo ocular, en el oído interno, en el cartílago hialino y en el núcleo pulposo del disco intervertebral [234]. Además, las células madre mesenquimales y los osteoblastos también lo expresan [235, 236].

En condiciones normales, las células epiteliales y los fibroblastos de diversas localizaciones del cuerpo no expresan (pro)colágeno XI $\alpha$ 1. Sin embargo, existen varios factores extracelulares que en condiciones patológicas pueden alterar directa o indirectamente la expresión del gen COL11A1. Entre ellos están el factor de transcripción NF- $\kappa$ B [237, 238], el factor de unión al potenciador linfocitario 1 (Lef1) [239], y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ). Este último estimula la diferenciación de células madre mesenquimales humanas (*human mesenchymal stem cells*, HMSCs) a células similares a los fibroblastos asociados al cáncer (*cancer-associated fibroblasts*, CAFs), responsables de la reacción desmoplástica junto con los componentes de la matriz extracelular que las acompañan, y aumenta su expresión de COL11A1 [240–242]. Asimismo, el TGF- $\beta$  activa la transcripción del gen COL11A1 en los fibroblastos [243]. De este modo, el gen COL11A1 se expresa en tumores humanos de tipo mesenquimal y de tejidos blando como el rhabdomioma, el condrosarcoma, el fibrosarcoma, el osteosarcoma o el sarcoma de Ewing [227], entre otros, y son los CAFs los responsables principales en el tumor de la

producción y secreción de esta proteína, modulando la interacción tumor-estroma y las propiedades mecánicas de la matriz extracelular [229].



**Figura 3.2. Representación esquemática del colágeno XI (A) y de la cadena  $\alpha 1$  (B).** Se indica la longitud de cada región (de acuerdo a la numeración de la secuencia aminoacídica). SP: péptido señal; TSPN-1: dominio N-terminal similar a la trombospondina 1; VAR: región variable; COL: dominio tipo colágeno; NC: dominio tipo no colágeno. Creada con Biorender™.

#### 3.1.4. Detección de colágeno XI $\alpha 1$ en muestras biológicas

Existen kits comerciales basados en el uso de anticuerpos para detectar el colágeno XI $\alpha 1$ , pero generalmente no se proporciona información sobre su selectividad ni sobre el epítipo que participa en el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Entre los receptores disponibles para este colágeno, cabe destacar un anticuerpo monoclonal desarrollado por J.R. de los Toyos y colaboradores [230], que es específico para una región de 15 aminoácidos del propéptido N de la cadena  $\alpha 1$  y que es capaz de teñir de forma distintiva los fibroblastos peritumorales en tejidos de PDAC, pero no en tejido epitelial, vascular o células del estroma [244]. Recientemente, se han obtenido dos anticuerpos monoclonales con especificidad hacia dos neopéptidos originados en el procesamiento enzimático del propéptido N del colágeno XI $\alpha 1$ , para su utilización en la detección en sangre del fragmento

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

generado como potencial biomarcador predictivo de PDAC [245]. Sin embargo, los receptores dirigidos a los propéptidos no son capaces reconocer el colágeno maduro, que es la forma presente en la ECM. La escisión de los propéptidos expone los telopéptidos C y N, para los cuales no existen receptores específicos.

Como alternativa a los anticuerpos, los aptámeros se pueden seleccionar fácilmente contra un epítipo concreto o región dentro de una molécula [46] sin la necesidad de utilizar animales para ello. Como ácidos nucleicos de hebra simple, tienen estabilidad química y térmica y pueden combinarse con estrategias de amplificación de ácidos nucleicos para mejorar la sensibilidad [31]. La selección *in vitro* de aptámeros, llamada SELEX, puede llevarse a cabo en medios biológicos para asegurar un plegamiento adecuado del receptor y evitar la pérdida de afinidad, con etapas de contraselección para minimizar la reactividad cruzada [246].

En este capítulo se describe la selección del primer aptámero para la cadena  $\alpha$ 1 de un colágeno minoritario, el colágeno XI, su caracterización y su aplicación analítica. Como diana aptagénica se utilizó un péptido específico de 16 aminoácidos (16mer) localizado en la región del telopéptido C de dicho colágeno.

## 3.2. Materiales y métodos

Los reactivos e instrumentos utilizados en el desarrollo de este trabajo se recogen en el **Anexo A**. A continuación, se describen los procedimientos experimentales llevados a cabo.

### 3.2.1. SELEX

El SELEX se llevó a cabo utilizando una genoteca de secuencias aleatorias de ADN monocatenario, cuya estructura consiste en una región central con 40 nucleótidos aleatorios y dos regiones constantes en los extremos que actúan como zona de hibridación con los cebadores de la PCR. Las secuencias de la genoteca de ADN y de los cebadores de PCR se indican en la **Tabla A.1**. Como diana, se utilizó un péptido de 16 aminoácidos del colágeno XI $\alpha$ 1 conjugado con BSA a través de una cisteína en el extremo N del péptido (BSA-16mer), y se inmovilizó en partículas magnéticas tosilactivadas (PM-T-BSA-16mer). Cada ronda del procedimiento SELEX comprendía los siguientes pasos:

### 3.2.1.1. Interacción

En la primera ronda de selección, se transfirió 1 nmol de la genoteca de ADN (23.4  $\mu\text{g}$ ) a un tubo de microcentrífuga, se calentó a 98 °C durante 5 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo durante otros 5 minutos. A continuación, se añadieron 17.1  $\mu\text{L}$  de PM-T-BSA-16mer (100 pmol de péptido, para una relación [ADN]/[péptido] de 10) y se completó con PBS 1 $\times$  + BSA 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + ARN-t 2.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta un volumen total de 1 mL. La BSA se añadió al medio de selección para evitar interacciones inespecíficas, mientras que el ARN-t se utilizó como competidor para hacer la selección más estricta. La relación [ADN]/[ARN-t] se mantuvo en un valor de 10 durante todo el proceso. Esta etapa de interacción entre la genoteca de ADN y el péptido se llevó a cabo a 37 °C durante 1 hora con agitación continua (650 rpm).

### 3.2.1.2. Separación y elución

Después de cada etapa de interacción, el tubo se colocó en un imán durante 2 minutos y se retiró el sobrenadante, eliminando así el ADN no enlazado. A continuación, las partículas magnéticas se lavaron dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20. Finalmente, el ADN enlazado se eluyó con 30  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura caliente, incubando el tubo a 95 °C durante 15 min.

### 3.2.1.3. Amplificación mediante PCR

Tras la elución, se recogió el sobrenadante (eluato), que contenía las secuencias de ADN ganadoras, y se amplificó mediante PCR. Cada vial de PCR (50  $\mu\text{L}$ ) contenía 2  $\mu\text{L}$  de eluato, 1  $\mu\text{M}$  de los cebadores directo (sin marcar) y inverso (biotinilado), 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , medio de reacción diluido 1 $\times$  y 2.8 U de ADN polimerasa Immolase™. La mezcla se amplificó con el siguiente protocolo: 95° C durante 10 min; 15 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 57.5 °C, 1 min a 72 °C; y una extensión final a 72 °C durante 10 min. La concentración del producto de PCR generado se determinó utilizando un fluorímetro Qubit™ con el kit Qubit™ dsDNA HS Assay.

Después de cada PCR, se comprobó el tamaño del ADN de doble cadena obtenido (76 pb) mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando un marcador de tamaño de ADN de 20 pares de bases. Para ello, se preparó un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1 $\times$  de pH 8.3 que contenía una dilución 1:10000 de colorante SimplySafe DNA staining dye para poder visualizar el ADN mediante luz UV tras la electroforesis. Una vez preparado el gel, se cargaron 6  $\mu\text{L}$  de



### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

marcador de tamaños de ADN y 8 - 12  $\mu$ L de una mezcla 5:1 de (producto PCR):(tampón de carga 6 $\times$ ) en los pocillos, y la electroforesis se llevó a cabo durante 45 min aplicando una diferencia de potencial de 110 V.

#### 3.2.1.4. Acondicionamiento (recuperación de ADN de hebra simple)

La recuperación del ADN monocatenario, necesaria para iniciar un nuevo ciclo de selección, se llevó a cabo utilizando partículas magnéticas Dynabeads MyOne™ Streptavidin C1 (PM-S). En primer lugar, se calculó la cantidad de partículas necesarias para separar 250 pmol de ADN, teniendo en cuenta la concentración del producto de la PCR, previamente obtenida por fluorimetría (Qubit), y la capacidad de unión de las partículas. Las PM-S calculadas se transfirieron a un vial y se lavaron 3 veces con 500  $\mu$ L de tampón Tris 5 mM (pH 7.4) + 1 M NaCl + 0.01% Tween 20. A continuación, se añadió a las partículas el volumen de producto de PCR que contenía 250 pmol de ADN y se mezcló con el mismo volumen de Tris 10 mM (pH 7.4) + NaCl 2 M. La mezcla se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos, con agitación constante. Posteriormente, las partículas se lavaron 3 veces con 500  $\mu$ L Tris 5 mM (pH 7.4) + 1 M NaCl + 0.01% Tween 20 y se incubaron durante 10 min con 50  $\mu$ L de NaOH 100 mM a 25 °C. De este modo, se pudo desnaturalizar el dúplex de ADN, eluyendo la hebra de interés de las partículas a la disolución, mientras que la hebra complementaria permaneció unida a las partículas. El sobrenadante resultante se recogió y se neutralizó con HCl 1 M, para ser utilizado como una nueva genoteca enriquecida en ADN afín a la diana en la siguiente ronda de selección.

En la segunda ronda de selección y en las siguientes, se utilizaron 250 pmoles de las sucesivas genotecas enriquecidas de ADN en lugar de 1 nmol, y se realizó una contraselección contra BSA. En esta etapa, la genoteca de ADN se incubó primero con partículas magnéticas modificadas con BSA (PM-T-BSA). El sobrenadante obtenido tras esta interacción, que contenía las secuencias que no se unieron a la BSA, se recogió, mientras que las secuencias que se unieron a las PM-T-BSA se descartaron. Este sobrenadante se incubó a continuación con las PM-T-BSA-16mer en las condiciones descritas en la **Tabla 3.1**. De este modo, las secuencias que se unieron al conjugado péptido-BSA de forma inespecífica por la fracción de BSA y no por la región peptídica deseada fueron expulsadas del proceso de selección. La exigencia de la selección se modificó variando el tiempo de incubación, la proporción [ADN]/[péptido] y añadiendo suero fetal bovino (FBS) en el medio de interacción.

**Tabla 3.1. Condiciones experimentales en las que se efectuaron las rondas del SELEX.** Los parámetros que se variaron fueron la proporción de [ADN]/[péptido] y el tiempo de interacción de la genoteca de ADN con PM-T-BSA-16mer. A partir de la segunda ronda se introdujo una etapa de contraselección con PM-T-BSA y en la ronda 5 se añadió FBS en el medio de selección.

Ronda	Contraselección con PM-T-BSA	[ADN]/[péptido]	Tiempo de interacción (min)	FBS (%)
1	-	10	60	-
2	Sí	10	60	-
3	Sí	20	60	-
4	Sí	20	45	-
5	Sí	10	45	5
6	Sí	10	30	-

### 3.2.2. Clonación y secuenciación

El conjunto de secuencias de ADN obtenidas tras la cuarta ronda de selección se amplificó mediante PCR utilizando cebadores no marcados, en las condiciones descritas anteriormente. A continuación, el producto resultante de la PCR se purificó por electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1× (pH 8.5). La electroforesis se llevó a cabo aplicando un potencial de 100 V durante 1 h. Una vez finalizada la separación, la banda correspondiente al producto de la PCR de 76 pares de bases (pb) se recortó del gel con la ayuda de un bisturí y el ADN se extrajo de la agarosa con un filtro Montage™.

El ADN amplificado y purificado se cuantificó en el Qubit (2.56 µg/µL) y se calculó la cantidad necesaria para unirse con 50 ng del vector pCR® 2.1 con una relación molar 1:1 (vector: inserto), según la **Ecuación 3.1**:

$$\text{ng ADN} = \frac{(76 \text{ pb inserto}) \times (50 \text{ ng vector})}{(3900 \text{ pb vector})} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Una vez calculada la cantidad de producto de PCR necesaria (0.97 ng), se preparó la mezcla de ligación con 1.5 µL de producto de PCR (dilución 1:3), 2 µL de tampón de reacción 5×, 2 µL de vector pCR® 2.1 (25 ng/µL), 3.5 µL de ADN

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

ligasa T4 Express Link (5 U) y 3.5  $\mu$ L de agua. La reacción se llevó a cabo durante 15 minutos a TA.

A continuación, se mezclaron 2  $\mu$ L de la disolución de ligación con 50  $\mu$ L de células *E. coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10F y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 30 s y se añadieron 250  $\mu$ L de medio SOC. La mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 1 h con agitación continua (300 rpm). Simultáneamente, se prepararon 2 placas de agar LB esparciendo en cada una 40  $\mu$ L de IPTG 100 mM y X-gal 40 mg/mL. Estos dos reactivos son necesarios para poder aislar las colonias de células que han captado el vector pCR<sup>®</sup> con el ADN de interés insertado. El IPTG induce la transcripción del gen lacZ que codifica la  $\beta$ -galactosidasa, de forma que X-gal pueda ser hidrolizado por la  $\beta$ -galactosidasa en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, un compuesto de color azul. Las células transformantes que han captado plásmidos con el operón lacZ intacto, una vez inducidas por IPTG, expresan activamente  $\beta$ -galactosidasa, que hidroliza X-gal y colorea de azul sus colonias. Las colonias de células transformantes que han captado un plásmido con el operón lac recombinante, en cuyo interior ha sido insertado el ADN de interés, sufren con la inserción la inactivación del gen lacZ y, por tanto, no pueden expresar  $\beta$ -galactosidasa ni degradar X-gal, permaneciendo sus colonias de color blanco.

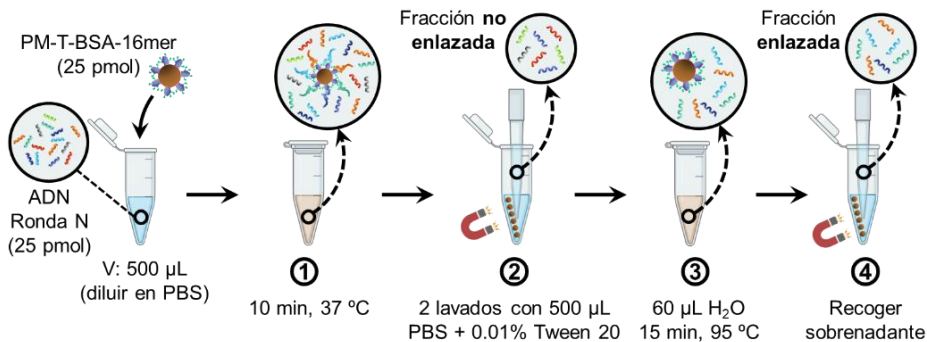
Tras la incubación de las células, se sembraron 150  $\mu$ L de la mezcla resultante en cada placa y se incubaron durante toda la noche a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las colonias blancas (con inserto) y azules (sin inserto) crecidas se aislaron con la ayuda de puntas de micropipeta y se disolvieron en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O en una placa de 96 pocillos. A continuación, se selló la placa y se lisaron las bacterias, calentándolas primero a 99 °C durante 5 minutos, seguido de un paso a 20 °C durante 10 minutos.

Una vez lisadas las bacterias, se amplificó el ADN del plásmido mediante PCR. Cada vial de PCR (20  $\mu$ L) contenía 3  $\mu$ L de molde, 1  $\mu$ M de cebadores M13 directo e inverso, 0.25 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampón de reacción 1 $\times$  y 1.5 U de Taq ADN polimerasa. La mezcla se amplificó con el siguiente protocolo: 95 °C durante 5 min; 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 30 s a 72 °C; y un paso final a 72 °C durante 10 min. Finalmente, el producto de la PCR de cada clon se purificó utilizando un kit ExoSAP-IT<sup>™</sup> (mezcla patentada de exonucleasa I y fosfatasa alcalina de camarones, abreviado como SAP, del inglés *shrimp alkaline phosphatase*; en un tampón de formulación especial que elimina el exceso de cebadores y dNTPs después de la PCR) y se secuenció. Los datos de

secuenciación se procesaron con el software BioEdit, de acceso libre. En total, se analizaron 47 clones.

### 3.2.3. Ensayo de enriquecimiento

La evolución de la afinidad de las secuencias seleccionadas se estudió por medio de un ensayo de enriquecimiento (**Figura 3.3**), que se describe a continuación. En primer lugar, tras calentar durante 5 min a 98 °C y enfriar durante 5 min en hielo, se incubaron 25 pmol de ADN de hebra simple de cada ronda de selección con 25 pmol de péptido (PM-T-BSA-16mer) durante 10 min a 37 °C y agitación constante. Después, con la ayuda de un imán, se recogió el sobrenadante, que contenía las secuencias de ADN no enlazadas, y las partículas magnéticas se lavaron dos veces con 500 µL de PBS 1× + 0.01% de Tween 20. A continuación, se eluyó el ADN enlazado con 30 µL de agua ultrapura, calentando a 95 °C durante 15 minutos. La concentración de ADN en ambas fracciones, enlazada y no enlazada, se midió por espectroscopia de absorción UV-Vis a 260 nm, realizando una calibración externa con la genoteca de ADN inicial.



**Figura 3.3. Representación esquemática del ensayo de enriquecimiento.** (1) Interacción del ADN de cada ronda con PM-T-BSA-16mer; (2) Separación de la fracción no enlazada; (3) Elución del ADN enlazado; (4) Separación de la fracción enlazada.

### 3.2.4. Análisis bioinformático

Las secuencias de ADN identificadas tras la clonación se trataron con los siguientes programas para agruparlas en familias según las similitudes de su estructura y para buscar motivos repetitivos. En primer lugar, se construyó un árbol filogenético mediante alineaciones múltiples de secuencias con el software Clustal OMEGA [247].

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

A continuación, se buscaron motivos recurrentes de ADN en las secuencias mediante el software MEME Suite 5.0.5 [248] con la siguiente configuración:

- *Motif discovery mode*: classic mode
- *Input the primary sequences*: type in sequences (FASTA)
- *Select the site distribution*: zoops (zero or one occurrence per sequence)
- *Select the number of motifs*: 10
- *Minimum width*: 6; *maximum width*: 20
- *Can motifs be on both strands?*: search given strand only

#### 3.2.5. Modificación de partículas magnéticas

##### 3.2.5.1. Modificación de partículas magnéticas tosilactivadas con proteínas

En primer lugar, se transfirió el volumen equivalente a 5 mg de PM-T a un tubo de 1.5 mL y se realizaron dos lavados con 1 mL de tampón de Na-fosfato 0.1 M (pH 7.4). A continuación, tras eliminar el sobrenadante de los lavados, se añadieron 250  $\mu$ L de una disolución preparada en tampón de Na-fosfato 0.1 M que contenía 100  $\mu$ g de proteína (BSA, BSA-16mer o BSA-10mer) y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.2 M y las PM-T se incubaron durante 12-18 h a 37 °C con agitación continua a 1300 rpm. Después de eliminar el sobrenadante, los grupos tosilo que no habían reaccionado se bloquearon incubando las partículas con 1 mL de PBS 1 $\times$  + 0.5% BSA a 37 °C durante 1 h, con agitación. Seguidamente, tras dos lavados con PBS 1 $\times$  + 0.1% de BSA, las PM-T modificadas con proteínas se resuspendieron en esta última disolución que contiene BSA hasta una concentración de 20 mg/mL de partículas y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su uso.

El sobrenadante de la modificación se analizó mediante el ensayo de Bradford, y la cantidad de proteína enlazada con éxito en las PM-T se calculó como la diferencia entre la cantidad de proteína utilizada para la inmovilización (0.4 mg/mL) y la cantidad de proteína medida en el sobrenadante.

##### 3.2.5.2. Modificación de partículas magnéticas carboxilactivadas con vimentina

Se mezclaron 100  $\mu$ L de la suspensión comercial (30 mg/mL) de PM-C con 100  $\mu$ L de NaOH 10 mM y la mezcla se incubó durante 10 min, a 25 °C y 1400 rpm. A continuación, se descartó el sobrenadante y las partículas se trataron de

### 3.2. Materiales y métodos

nuevo con 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 10 mM. Este paso se repitió tres veces más con agua, seguido de una incubación con 200  $\mu\text{L}$  de EDC 400 mM durante 30 min a 25 °C y 1000 rpm. Las PM-C se lavaron posteriormente con 100  $\mu\text{L}$  de agua a 0 °C y 100  $\mu\text{L}$  de MES 50 mM (pH 5.5). Esta etapa de lavado se realizó rápidamente para evitar la hidrólisis de los grupos carboxilo activados. Seguidamente, las partículas se reconstituyeron en 100  $\mu\text{L}$  de una disolución preparada en MES 50 mM (pH 5.5) que contenía 50  $\mu\text{g}$  de vimentina, y la inmovilización de la proteína se realizó durante 1 h a 25 °C y 1300 rpm. Tras eliminar el sobrenadante, las partículas se trataron con 1 mL de etanolamina 50 mM preparada en PBS 1 $\times$  durante 1 h a 25 °C y 1300 rpm. Finalmente, tras tres lavados con PBS 1 $\times$  + 0.1% Tween 20, las partículas modificadas con vimentina (PM-C-VIM) se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  del mismo tampón (concentración final de las partículas: 6 mg/mL) y se almacenaron a 4 °C.

#### 3.2.5.3. Modificación de partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina con péptido 16mer biotinilado

Se transfirieron 50  $\mu\text{L}$  de la disolución comercial (10 mg/mL) de PM-S a un tubo y se lavaron dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20. Tras eliminar el sobrenadante, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de una disolución de péptido 16mer biotinilado 2  $\mu\text{M}$  preparada en PBS 1 $\times$  y se incubaron durante 30 min a 25 °C y 650 rpm. A continuación, las partículas se lavaron con 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20 y se incubaron durante 30 min a TA con 500  $\mu\text{L}$  de biotina 500  $\mu\text{M}$  en PBS 1 $\times$ . Finalmente, tras dos lavados con PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20, las PM-S-16mer se reconstituyeron en 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1 $\times$  (concentración final de partículas: 1 (mg/mL) y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su uso.

#### 3.2.5.4. Modificación de partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina con aptámero biotinilado

De forma similar al procedimiento anterior, se transfirieron 50  $\mu\text{L}$  de la disolución comercial de PM-S a un tubo y se lavaron dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de SSPE 2 $\times$  + 0.01% Tween 20. Después de eliminar el sobrenadante, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de una disolución de aptámero biotinilado 2  $\mu\text{M}$  preparada en SSPE 2 $\times$  y las PM-S se incubaron durante 30 min a 25 °C y 650 rpm. A continuación, las partículas se lavaron con 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20 y se incubaron durante 30 min a TA con 500  $\mu\text{L}$  de una disolución de biotina 500  $\mu\text{M}$  preparada en PBS 1 $\times$ . Tras dos lavados con PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20, las PM-S-aptámero se reconstituyeron en 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1 $\times$  y se calentaron a 65 °C durante 10 min con agitación continua (1300 rpm). Esta etapa se llevó a cabo para desnaturalizar

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

posibles dúplex de aptámeros en la superficie de las partículas que pudieran comprometer la posterior interacción con la diana (por ejemplo, la formación del homodímero D1-D1 tiene una energía libre de -16.6 kcal/mol a 37 °C y 154 mM de NaCl, calculada con el programa DINAMelt [249]). Finalmente, tras eliminar el sobrenadante con la ayuda de un imán, las PM-S-aptámero se reconstituyeron en 500  $\mu$ L de PBS 1 $\times$  (concentración final: 1 mg/mL) y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su uso.

#### 3.2.6. Ensayo de Bradford

La concentración total de proteínas en los lisados celulares y en los sobrenadantes de las modificaciones de las partículas magnéticas se determinó mediante el ensayo de Bradford de la siguiente manera. En primer lugar, se pipetearon por triplicado 50  $\mu$ L de la disolución blanco, patrones de BSA de 0 - 100  $\mu$ g/mL y muestras diluidas en una microplaca de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford diluido 2:7.5 en agua ultrapura y la mezcla se incubó 5 minutos a TA. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas. En el caso de los lisados celulares, la disolución utilizada como blanco, en la preparación de los patrones y la dilución de la muestra fue PBS 1 $\times$ , mientras que, en el caso de los sobrenadantes de las modificaciones de las partículas magnéticas, la disolución utilizada fue Na-fosfato 0.1 M + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.2 M sin dilución adicional de la muestra.

#### 3.2.7. Curvas de enlace

##### 3.2.7.1. Curvas de enlace con partículas magnéticas modificadas con péptido 16mer

En primer lugar, se transfirieron 10  $\mu$ L de partículas magnéticas modificadas con péptido (PM-S-16mer) a un tubo y se mezclaron con diferentes concentraciones de aptámeros marcados con 6FAM (**Tabla A.2**) en 500  $\mu$ L de PBS 1 $\times$ . Después de incubar la mezcla durante 30 minutos a 37 °C y 650 rpm, las partículas se lavaron dos veces con 500  $\mu$ L de PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20 y posteriormente se reconstituyeron en 500  $\mu$ L de conjugado anti-fluoresceína-peroxidasa (antiF-POD) 0.5 U/mL en PBS 1 $\times$  + 0.5% de caseína. El marcaje enzimático se realizó durante 30 min a TA. A continuación, las PM-S-16mer se lavaron de nuevo dos veces con PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20 y una vez con PBS 1 $\times$ , y se reconstituyeron en 15  $\mu$ L de PBS 1 $\times$ . Tras esta etapa, se pipeteó toda la disolución de partículas y se depositó en el electrodo de trabajo de una celda

### 3.2. Materiales y métodos

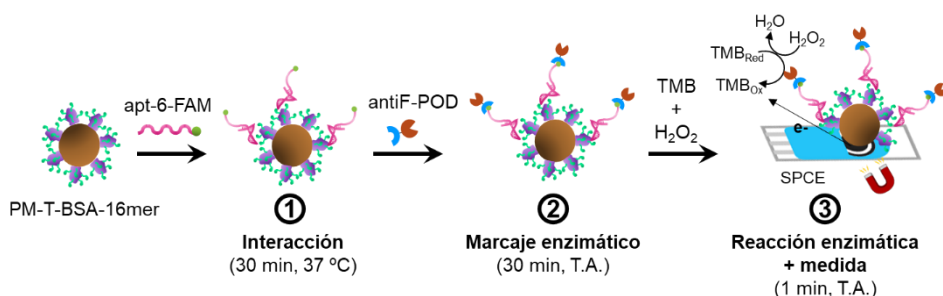
serigrafiada de carbono (SPCE). Las partículas se atraparon magnéticamente en el electrodo con la ayuda de un imán del mismo tamaño que el electrodo de trabajo, previamente colocado debajo de éste. A continuación, se cubrieron los tres electrodos de la SPCE con 40  $\mu\text{L}$  de una mezcla comercial de TMB y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y se incubó la reacción enzimática durante 1 min a TA. La medida cronamperométrica se llevó a cabo inmediatamente después a 0 V y la corriente generada se registró durante 1 min.

#### 3.2.7.2. Curvas de enlace con partículas magnéticas modificadas con aptámeros biotinilados

Para obtener las curvas de enlace con el formato opuesto al anterior, es decir, PM-S modificadas con aptámeros y 16mer biotinilado en disolución, se siguió un protocolo similar, siendo la única diferencia el conjugado de peroxidasa utilizado. En este segundo caso, el marcaje enzimático se realizó con una disolución de conjugado estreptavidina-peroxidasa (strep-POD) de concentración 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  preparada en PBS  $1\times + 0.01\%$  Tween 20.

#### 3.2.7.3. Curvas de enlace con partículas magnéticas modificadas con proteínas (BSA, BSA-10/16mer o vimentina)

Los protocolos para obtener las curvas de enlace con PM-T-BSA-10/16mer, PM-C-VIM y PM-T-BSA (**Figura 3.4.**) fueron idénticos a los de las curvas de enlace con PM-S-16mer en cuanto a etapas y tiempos de incubación. La única diferencia fue la cantidad de partículas modificadas utilizadas con cada proteína, siendo 3  $\mu\text{L}$  para PM-T-BSA-16mer y PM-T-BSA, 5  $\mu\text{L}$  para PM-T-BSA-10mer y 10  $\mu\text{L}$  para PM-C-VIM.



**Figura 3.4. Representación esquemática del protocolo de curvas de enlace con PM-T-BSA-16mer y aptámero-6FAM.** (1) Interacción de PM-T-BSA-16mer con aptámero marcado con 6-FAM; (2) Marcaje enzimático con conjugado antiF-POD; (3) atrapamiento de las partículas en el electrodo, reacción enzimática y medida cronamperométrica.



### 3. SELEX para el colágeno X1 $\alpha$ 1

#### 3.2.8. Protocolos con células

##### 3.2.8.1. Cultivos celulares

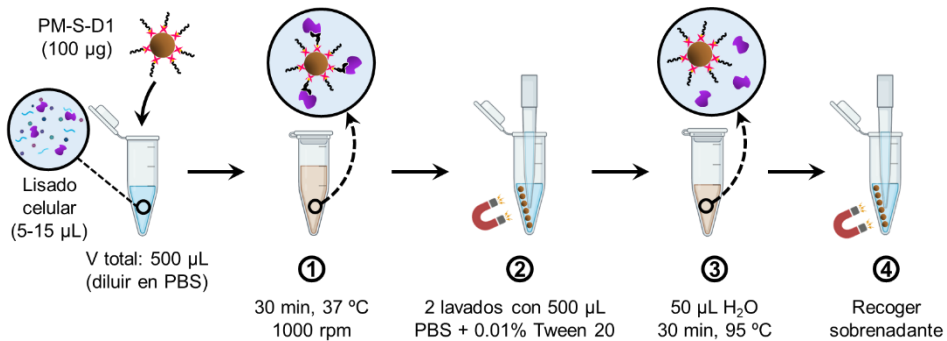
Las líneas celulares A-204, NCI-H661 y HT-29, cuyas características se recogen en la **Tabla 3.2**, se obtuvieron de la ATCC (*American Type Culture Collection*) y se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con piruvato de sodio 1 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 1 $\times$ , 10% de suero fetal bovino y 50  $\mu$ g/mL de ácido L-ascórbico 2-fosfato. Al medio de cultivo se le añadió además 10 ng/mL de factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1) para inducir la expresión de colágeno X1 $\alpha$ 1. El medio se cambió cada 3-4 días y las células se cultivaron durante al menos 15 días a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> antes de su uso en cualquier experimento, para permitir que la expresión de colágeno X1 $\alpha$ 1 alcanzara niveles adecuados.

**Tabla 3.2. Características de las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo.**  
Fuente: American Type Culture Collection (ATCC) [250].

	<b>A-204</b>	<b>NCI-H661</b>	<b>HT-29</b>
<b>Expresión de COL11A1</b>	+	+	-
<b>Organismo</b>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<b>Tejido</b>	Músculo	Pulmón; derivado de sitio metastásico; nódulo linfático	Colon
<b>Morfología</b>	Epitelial	Epitelial	Epitelial
<b>Características de cultivo</b>	Adherente	Adherente	Adherente
<b>Enfermedad</b>	Rabdomiosarcoma	Carcinoma de células grandes de pulmón	Adenocarcinoma colorectal
<b>Edad (años)</b>	1	43	44
<b>Sexo</b>	Mujer	Hombre	Mujer
<b>Etnia</b>	-	Caucásica	Caucásica

## 3.2.8.2. Preparación de lisados celulares

Para la preparación de lisados celulares, primero se sustituyó el medio de cultivo por 4 mL de tripsina - EDTA y se incubó durante 2 min para desprender las células adheridas de las paredes del frasco de cultivo. Posteriormente, se añadieron 4 mL de medio de cultivo al frasco para inactivar la tripsina, y la suspensión celular se recogió en un tubo y se centrifugó durante 10 min a 1200 rpm. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se lavó con PBS y se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las células se lisaron por la ruptura mecánica de sus membranas en las etapas de congelación y descongelación. La concentración total de proteínas en los lisados se determinó por el método de Bradford, tal como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, los lisados se centrifugaron antes de su uso durante 20 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 1500 g.



**Figura 3.5. Representación esquemática de la captura magnética del colágeno XI en los lisados celulares con PM-S-D1.** (1) Interacción del lisado celular con PM-S-D1; (2) Lavados; (3) Elución de proteínas enlazadas; (4) Recogida del sobrenadante y análisis mediante SDS-PAGE, MS o ELISA. Creada con BioRender™.

## 3.2.8.3. Captura magnética de colágeno XI en lisados celulares con partículas magnéticas modificadas con aptámero D1

En primer lugar, se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de PM-S-D1 con 10-15  $\mu\text{L}$  de lisado celular en un tubo y se completó con PBS 1 $\times$  hasta un volumen de 500  $\mu\text{L}$ . Después de incubar la mezcla durante 30 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 650 rpm (**Figura 3.5**, etapa 1), las partículas se lavaron dos veces con PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20 (**Figura 3.5**, etapa 2). A continuación, se realizó la elución de las proteínas capturadas añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de agua calentada a 95  $^{\circ}\text{C}$  e incubando a esta temperatura durante 30 min (**Figura 3.5**, etapa 3). El sobrenadante resultante (extracto purificado) se recogió (**Figura 3.5**, etapa 4) y se analizó posteriormente mediante SDS-PAGE, MS o ELISA. Como controles, se realizó el mismo

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

experimento utilizando PM-S modificadas con una secuencia irrelevante de ADN (T40) y PM-S tratadas con biotina.

#### 3.2.8.4. Análisis de los lisados celulares purificados mediante SDS-PAGE

Se preparó un gel de poliacrilamida en gradiente consistente en un gel de empaquetamiento al 4% y un gel de separación al 10%, utilizando Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), dodecil sulfato de sodio (SDS), bisacrilamida 30-0.08%, N,N,N'-tetrametiletildiamina y persulfato de amonio. Una vez formado el gel en su molde, se colocó en la cubeta y se cubrió con tampón de electroforesis (Tris-HCl 24 mM - glicina 192 mM – 0.1% SDS).

Paralelamente, se mezclaron 50  $\mu$ L de cada muestra con 16  $\mu$ L de tampón de carga 4 $\times$  (Tris-HCl 160 mM, EDTA 4 mM, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.05%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2.4% y SDS 6%) y se calentaron durante 2 min a 95  $^{\circ}$ C para producir la desnaturalización de las proteínas. A continuación, se cargaron 20  $\mu$ L de cada muestra y del marcador de tamaños en los pocillos del gel y se realizó la electroforesis durante 45 min aplicando un voltaje de 200 V.

Tras la separación, el gel se incubó en disolución de tinción (azul brillante de Coomassie R-250 al 0.1% preparada en metanol al 50% y ácido acético al 10%) durante 30 minutos a TA. Una vez teñido, el gel se sumergió en disolución de desteñido (metanol 50% + ácido acético 10%) hasta que se eliminó la tinción de fondo y se pudieron visualizar claramente las bandas.

#### 3.2.8.5. Análisis de la fracción de los lisados celulares capturada por el aptámero D1 mediante espectrometría de masas

El análisis mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de los extractos celulares purificados obtenidos mediante el tratamiento con PM-S-aptámero se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS). En primer lugar, los extractos celulares purificados se sometieron a una digestión triptica siguiendo el protocolo definido por Shevchenko [251] con pequeñas modificaciones: la reducción se realizó con ditioneitol 10 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 y la alquilación con iodoacetamida 55 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM. A continuación, tras llevar a sequedad las muestras en un evaporador al vacío SpeedVac, se añadió tripsina porcina modificada a una concentración final de 20 ng/ $\mu$ L en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  20 mM, y se incubó a 37  $^{\circ}$ C durante 16 h. Los péptidos se extrajeron tres veces incubando durante 20 min en 40  $\mu$ L de acetonitrilo 60% + ácido fórmico 0.5%. Los extractos de péptidos resultantes se juntaron, se concentraron en un SpeedVac y se almacenaron a -20  $^{\circ}$ C.

### 3.2. Materiales y métodos

Los péptidos digeridos se separaron mediante cromatografía de líquidos de fase reversa, utilizando un sistema de cromatografía líquida (Eksigent Technologies nanoLC 400, SCIEX) acoplado a un espectrómetro de masas Triple TOF 6600 (SCIEX) con una fuente de microflujo. La separación cromatográfica se realizó con una columna analítica Chrom XP C18 de  $150 \times 0.30$  mm, con un tamaño de partícula de  $3 \mu\text{m}$  y un tamaño de poro de  $120 \text{ \AA}$  (Eksigent, SCIEX) y una pre-columna YMC-TRIART C18 (YMC Technologies, Teknokroma) con un tamaño de partícula de  $3 \mu\text{m}$  y un tamaño de poro de  $120 \text{ \AA}$ , conectada en línea con la columna analítica. Durante la separación, la bomba de carga suministró una disolución de ácido fórmico al 0.1% en agua con un flujo de  $10 \mu\text{L}/\text{min}$ , mientras que la microbomba proporcionó un flujo de  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  en condiciones de elución en gradiente, utilizando ácido fórmico al 0.1% en agua como fase móvil A y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo como fase móvil B. Los péptidos se separaron utilizando un gradiente de 15 minutos desde el 2% al 90% de la fase móvil B (fase móvil A: 2% acetonitrilo + 0.1% ácido fórmico; fase móvil B: 100% acetonitrilo + 0.1% ácido fórmico). El volumen de inyección utilizado fue de  $4 \mu\text{L}$  ( $4 \mu\text{g}$  de muestra).

La adquisición de datos se llevó a cabo en un sistema Triple TOF 6600 (SCIEX, Foster City, CA) utilizando un flujo de trabajo dependiente de datos. Las condiciones de la fuente y la interfase fueron las siguientes:

- Voltaje de pulverización de iones flotantes (*ionspray voltage floating*, ISVF): 5500 V
- Gas de cortina (*curtain gas*, CUR): 25 V
- Energía de colisión (*collision energy*, CE): 10 V
- Gas de fuente de iones 1 (*ion source gas 1*, GS1): 25 V

El instrumento se controló con el software Analyst TF 1.7.1 (SCIEX). Los criterios de conmutación (*switching criteria*) se establecieron para iones con una relación masa/ carga ( $m/z$ ) superior a 350 e inferior a 1400 con un estado de carga de 2-5, una tolerancia de masa de 250 ppm y un umbral de abundancia de más de 200 cuentas (cps). Los iones buscados anteriores se excluyeron durante 15 s. El instrumento se calibró automáticamente cada 4 horas utilizando como calibrador externo péptidos trópticos de pepcalMix.

Tras el análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), los archivos de datos se procesaron con el software ProteinPilot™ 5.0.1 (SCIEX), que utiliza el algoritmo Paragon™ para la búsqueda en las bases de datos y Progroup™ para la agrupación de datos. Los datos se buscaron utilizando la base de datos

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

Uniprot específica para proteínas humanas. La tasa de falsos positivos (*false discovery rate*) se estableció utilizando un método de regresión no lineal, mostrando sólo aquellos resultados que informaran de una tasa global de falsos positivos del 1% o mejor [252, 253].

#### 3.2.8.6. Análisis de la fracción de los lisados celulares capturada por el aptámero D1 mediante ELISA

Se utilizaron tres kits ELISA diferentes para la detección de colágeno XI $\alpha$ 1 en lisados celulares de las líneas A-204 (+), NCI-H661 (+) y HT-29 (-): CSB-EL005716HU (Cusabio), SEC157Hu (Cloud-Clone) y E-EL-H0784 (Elabscience). Las características analíticas de los 3 kits se muestran en la **Tabla 3.3**.

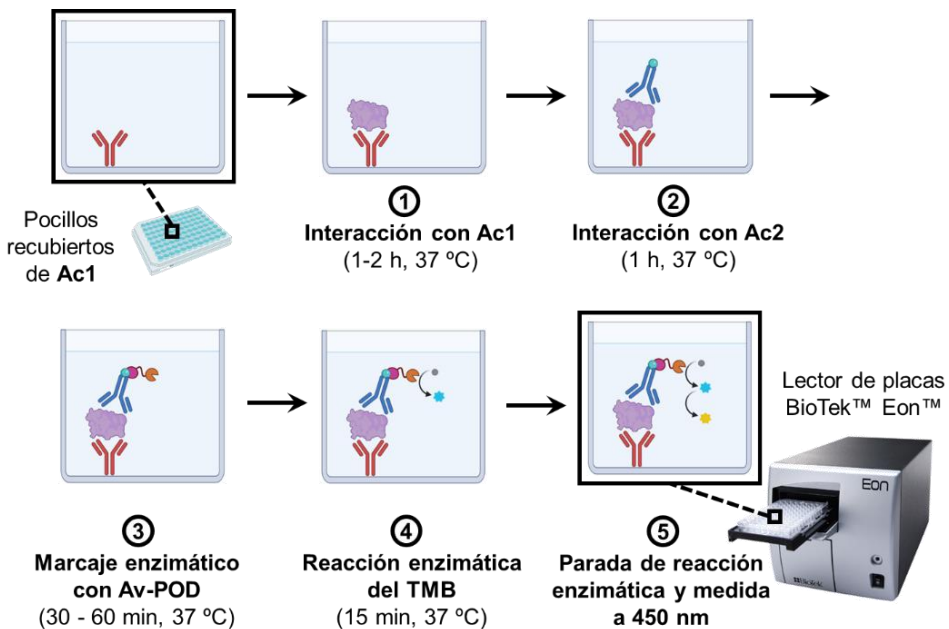
**Tabla 3.3. Características de los kits ELISA comerciales para la detección de colágeno XI $\alpha$ 1.** Se indica para cada kit la casa comercial y el n° de referencia, las características de los anticuerpos y el fragmento de colágeno XI $\alpha$ 1 utilizado como patrón de calibración, así como el límite de detección y el intervalo de medida. Ac.: anticuerpo, LD: límite de detección.

	<b>Cusabio</b>	<b>Cloud-Clone</b>	<b>Elabscience</b>
<b>N° de referencia</b>	CSB-EL005716HU	SEC157Hu	E-EL-H0784
<b>Ac. de captura</b>	Policlonal de cabra	Policlonal	Monoclonal de ratón
<b>Ac. de detección</b>	Policlonal de cabra	Policlonal	Policlonal de conejo
<b>Patrón de calibración</b>	Desconocido	1564 – 1806 aa	738 – 985 aa
<b>LD (pg/mL)</b>	15.6	15	23.44
<b>Intervalo de detección (pg/mL)</b>	62.5 – 4000	39 – 2500	39.06 – 2500

Las muestras, los reactivos y los tampones se prepararon según las instrucciones del fabricante de cada kit. Los tres inmunoensayos se basaban en un formato sándwich que comprendía las siguientes etapas (**Figura 3.6**). En primer lugar, en pocillos independientes modificados con el anticuerpo de detección se añadieron 100  $\mu$ L de blanco, patrones y muestras, y se incubaron a 37 °C durante

### 3.2. Materiales y métodos

2 h (Cusabio), 1 h (Cloud-clone) o 90 min (Elabsience). A continuación, se eliminó el líquido y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de detección biotinilado en todos los pocillos y se incubaron durante 1 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Tras este paso, se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado y, posteriormente, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de conjugado avidina-peroxidasa a cada pocillo y se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 h (Cusabio) o 30 min (Cloud-Clone y Elabsience). A continuación, se lavaron los pocillos cinco veces antes de añadir 90  $\mu\text{L}$  de disolución de sustrato enzimático, que se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante unos 15 min. Por último, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de disolución de parada a cada pocillo y la medición de la densidad óptica de cada pocillo se realizó en un lector de placas a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición del último reactivo.



**Figura 3.6. Representación esquemática de los ensayos ELISA comerciales para la detección de colágeno XI $\alpha$ 1.** (1) Interacción de la muestra con el anticuerpo de captura (Ac1) inmovilizado en los pocillos; (2) interacción con el anticuerpo de detección marcado con biotina (Ac2); (3) unión del conjugado enzimático avidina-peroxidasa (Av-POD); (4) reacción enzimática del sustrato TMB y (5) parada de la reacción enzimática y medida de la densidad óptica a 450 nm.

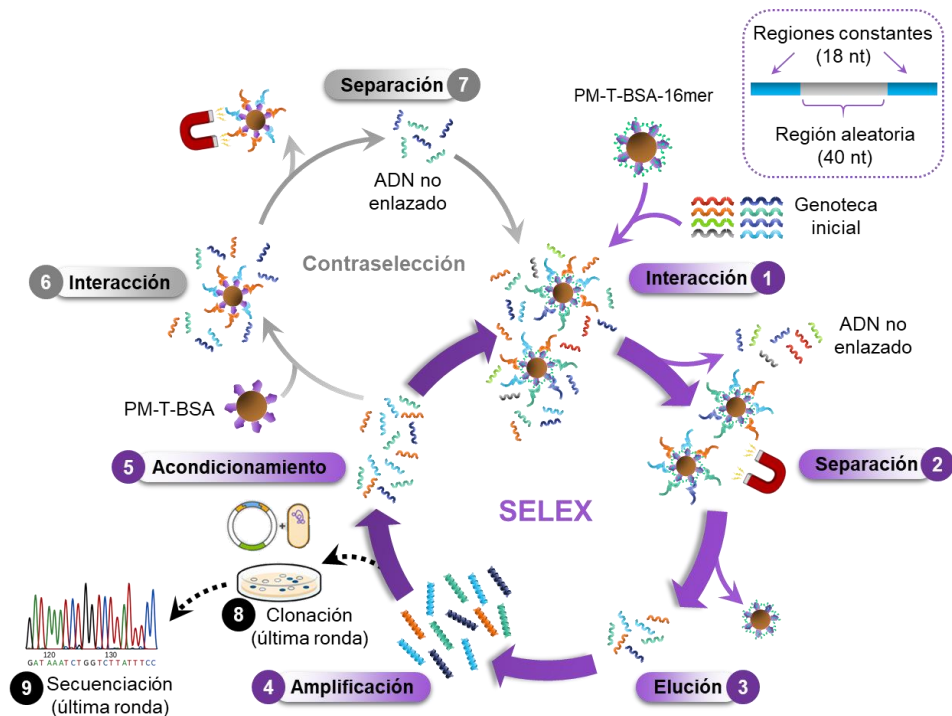
Para comprobar el funcionamiento del aptámero D1 en el ensayo ELISA, se sustituyó el anticuerpo de detección por una disolución 1  $\mu\text{M}$  de aptámero D1 en PBS 1 $\times$  y se incubó durante el mismo tiempo y a la misma temperatura que con el anticuerpo.

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

#### 3.3. Resultados y discusión

##### 3.3.1. Selección de aptámeros para el péptido 16mer del colXI $\alpha$ 1

La región de la cadena  $\alpha$ 1 hacia la que se dirigió la selección de aptámeros es el sitio proteolítico del propéptido C que se espera que sea procesado para generar el colágeno maduro, por analogía con la maduración del colágeno V [254]. Concretamente, se escogió como diana una región de 16 aminoácidos y se conjugó con BSA (BSA-16mer).

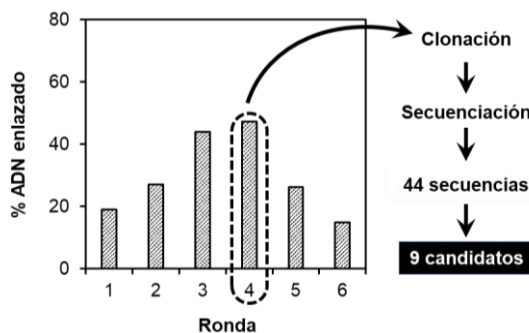


**Figura 3.7. Representación esquemática del procedimiento SELEX utilizado en este trabajo.** (1) Interacción de la genoteca de ADN con PM-T-BSA-16mer; (2) separación del ADN no enlazado; (3) elución del ADN enlazado; (4) amplificación mediante PCR del ADN enlazado; (5) acondicionamiento para recuperar ADN monocatenario; (6) interacción con PM-T-BSA (contraselección); (7) separación del ADN no enlazado en la contraselección; (8) clonación y (9) secuenciación.

El conjugado BSA-16mer se inmovilizó en partículas magnéticas tosilactivadas (PM-T-BSA-16mer), tal y como se describe en la sección 3.2.5.1., para asegurar una exposición adecuada de la diana y facilitar el acceso de la genoteca de ADN. Previamente, se había realizado una prueba en la que se había

### 3.3. Resultados y discusión

utilizado como diana el péptido 16mer biotinilado anclado directamente a partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina, pero con esta estrategia no se observó un enriquecimiento significativo, al menos tras realizar varias rondas de selección. En la primera ronda de selección, las PM-T-BSA-16mer se incubaron con la genoteca de ADN inicial (**Figura 3.7**), y en las sucesivas rondas de selección se fueron variando el tiempo de incubación y la proporción entre el ADN y el péptido para aumentar la exigencia del SELEX (**Tabla 3.1**). En la primera ronda se omitió la etapa de contraselección, pero a partir de la segunda ronda, se añadió una etapa con PM-T-BSA (sin 16mer) para evitar el enriquecimiento en secuencias con afinidad hacia el soporte o la proteína portadora. El sobrenadante de la interacción con PM-T-BSA, que contenía las secuencias que no se unen ni al soporte sólido ni a la BSA, se utilizó inmediatamente para la siguiente selección positiva con PM-T-BSA-16mer. En la ronda 5 se añadió un 5% de FBS al medio de selección para imitar las condiciones fisiológicas. Para evaluar el enriquecimiento en secuencias con afinidad hacia el 16mer, se incubó una muestra de cada ronda con PM-T-BSA-16mer (**Figura 3.3**), y las fracciones enlazadas y no enlazadas se cuantificaron mediante espectroscopia UV/Vis a 260 nm. El porcentaje de la fracción enlazada aumentó hasta la ronda 4 (47%) y luego disminuyó (**Figura 3.8**), lo que indica que las condiciones más estrictas no mejoraron la afinidad. Según nuestra experiencia, los enriquecimientos por encima del 12% [44, 45, 255] pueden considerarse exitosos, por lo que la 4ª ronda se clonó y se secuenció. Se secuenciaron 47 clones, en los cuales se identificaron 44 secuencias, una de las cuales apareció repetida tres veces (B2) y otra dos (C1). Las regiones de los cebadores de las secuencias identificadas se truncaron antes de realizar un análisis *in-silico* para escoger los mejores candidatos. La participación de los cebadores en el enlace es poco frecuente porque las estructuras secundarias fuertes en las que participan las regiones de los cebadores son más difíciles de amplificar por PCR y acaban desapareciendo después de varias rondas [49].



**Figura 3.8. Ensayo de enriquecimiento.** Porcentaje de ADN de cada ronda del SELEX que se enlaza a las PM-T-BSA-16mer, medido por espectroscopia UV/Vis a 260 nm.



### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

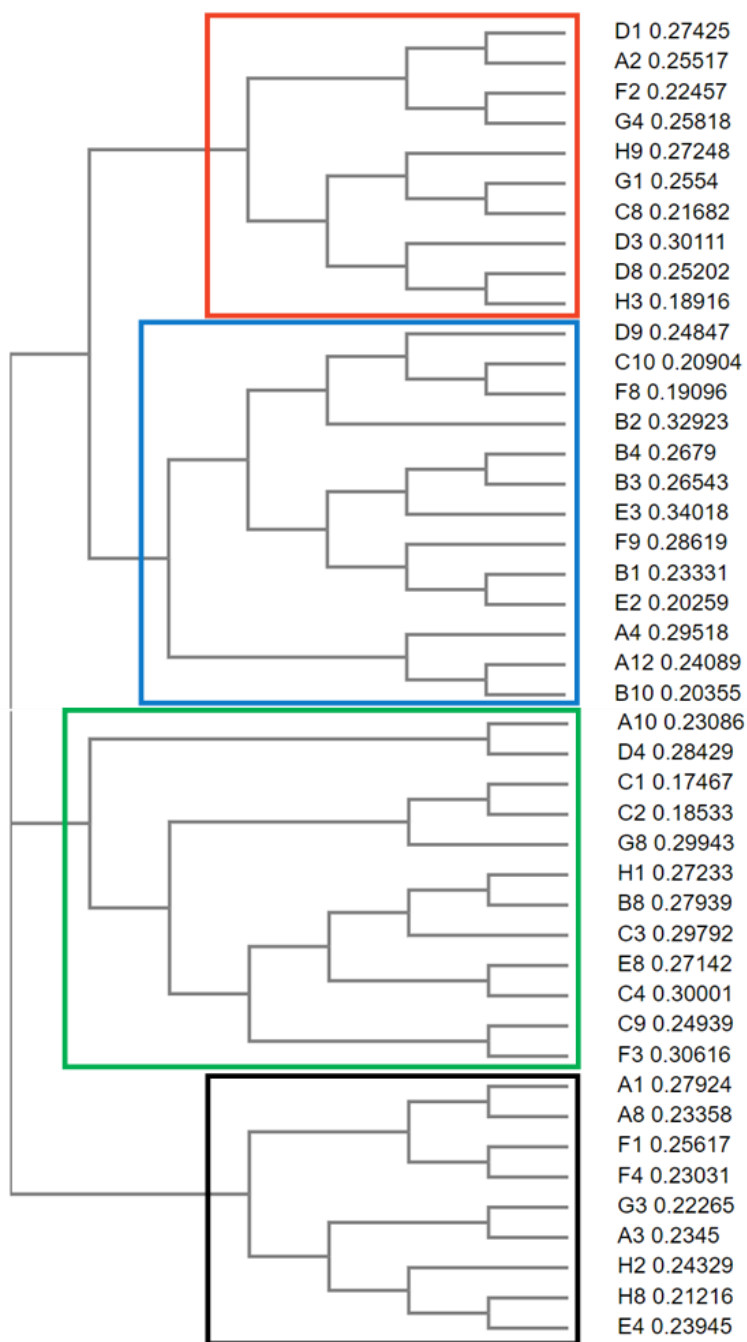










Figura 3.9. Árbol filogenético de las 44 secuencias de la ronda 4 identificadas tras la secuenciación. Construido utilizando el software Clustal OMEGA [247].

### 3.3. Resultados y discusión

**Tabla 3.4. Motivos recurrentes analizados en las 44 secuencias de la ronda 4 identificadas tras la secuenciación.** La primera columna (#) indica el número de repeticiones de cada motivo y la última en que secuencias se encuentran. Para el análisis de motivos recurrentes se utilizó el software MEME Suite [248].

#	Motivos	Secuencias
8		A8, A12, B1, B3, B10, F4, H3, H9
3		C4, D8, E8
6		C3, C9, D1, F3, H3, H8
6		B2*, C1*, C2
2		C10, E3
5		B2*, B3, C10
7		B4, C2, D1, D4, F1, F9, G8
4		B8, C1*, H1

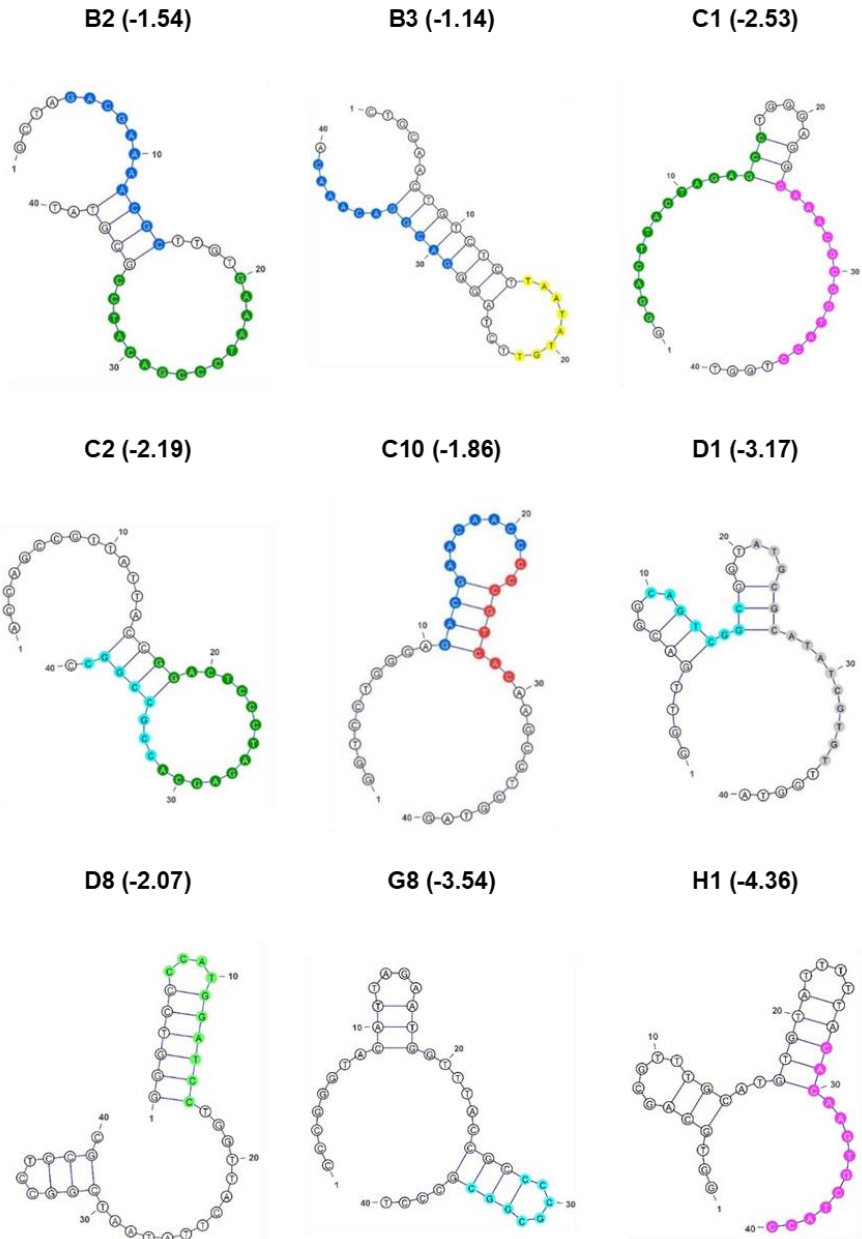
(\*) En la secuenciación, la secuencia B2 se repitió tres veces y C1 dos.

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

**Tabla 3.5. Secuencias, motivos y energía libre ( $\Delta G$ ) de la estructura secundaria más estable para cada secuencia.** Estimación realizada con el software Mfold [63] a 37 °C y [Na<sup>+</sup>]=154 mM. Cada motivo está destacado en las secuencias de acuerdo al código de colores de la **Tabla 3.4**.

Clúster	ID	Secuencia (5' → 3')	$\Delta G$ (kcal/mol)
1	A2	GCGTTGCTGTTGAGATAGACTAGCCTGAGTGGTGGTTGGC	-0.53
	C8	GGGTACTGTGAGATGTTGGCCGATTATGTTATTCTGCTAT	0.64
	D1	GGTTGACGGCAGTCCGGCGGTATGCGCATATCGTGTGGTA	-3.17
	D3	GGGGTCAAGCTCTGATCAATGCCGGGGATGCTACACTGGC	-1.23
	D8	GGGTCCCATGGATCTGGTACTTATAATCGGCCTCCGC	-2.07
	F2	GGGTGTAGGACAGGGTCGTTAGTGGTGTGTTTTGCTGGGG	0.52
	G1	GAGGTTGGTTGTGGGTTGATTGGGCGTTTTTGGGGCGAT	-0.01
	G4	AGGGTGGCTCTCTGGGTAGTGCCTTGCATATGAAGCACG	0.06
	H3	GGGCAATGTGCGAAGGGTGTCTAGTCTAATATATGCGGCC	-0.08
	H9	GTGTGTATATAATCGATTCTTTCTGTATAAATATTAGCT	-0.86
2	A4	AACAAATAAATATTTGTTCAATAGTTTCTGCCTAAGTATG	-2.64
	A12	CAAGTTAACTGTTCCATAGTTAGA TACTATATTAACCAGC	-0.97
	B1	GGCACCATTAATATATCTGGGTGCTATAGATAAACAGAC	-3.29
	B2	GCTAGACGAAAACGGTTGTGAAATCCCGACATCCGCGTAT	-1.54
	B3	CTGCAACTGTCTCTAATATGTTCTAGGACGCGACAAAAC	-1.14
	B4	GACGCAAGAAATTCAGGGCACCTGGAACGACCGCTCGGCT	-4.97
	B10	GAAGAGTTATGTTTGATGTCGTCACTGATACTATATGAAC	0.50
	C10	GGTCTGGGA GACGAACAACC CCGTCAACAGCCTCGTAG	-1.86
	D9	GCTAACATGATTTGTTTTGTTCTCTATATCCTTACT	-1.52
	E2	ATAGCGTCGACAGCTTGTACACTACAAACTGCTCACAGGT	-0.39
E3	GGGTTA CCGTCACTGGAGGCTAAAGAAAAGACGTTCTGT	-0.93	
F8	GGGTACAAAGACAGGAACCCATAATCTAGACCACAAGGCT	-1.40	
F9	CAATGCCATGTT CCGGCGGC AATTTTTTAACATTAGCAG	-1.35	
3	A10	GGTTTACATACAGTCCTAATTGTAGATGGGGACCATGCCT	-2.89
	B8	ATCGTGGTGTGTCATCTCGGTGGG CACCAGTGGTTCGG	-2.24
	C1	GGGACTTACTAGAGCC TGGGAGG CAAACGCGGTACC TGGT	-2.54
	C2	ACCAGCCGTTATTACC GGA CTCCCTAGAGCA CCGCCGGCC	-2.19
	C3	CGCAAGCGGATGTCCCATCGTTAGTCAGTTTGGACTTGG	-1.57
	C4	GGTCTGCATTTCTCATTT CCATGGAACA GTGCTTTGTTG	-0.40
	C9	GCCAGATTTTACATGTCCGTGTCGCGTTAGCCGTTGCATC	-0.73
	D4	GGACGTG GAGTCCGGCGCAATTAATCGTGAGGGGTGTGCC	-0.66
	E8	GG CCATGGAACA TCTATGGGATTGTAGTGTATTGAATGC	-1.65
	F3	TGTAAGCGCCTAGTCTGTGTCCAAATCGAGTCCGCCGA	0.21
G8	CCCGGTACATTAGAATGGTTTACCGC CCGCGGGC GCCCT	-3.54	
H1	GGTGCAGCGTTTGCATGTGATTTTTTA CACAAGTGCTACC	-4.36	
4	A1	CGGGTTGGTGTAGTTAGGTAATTAGACTTCGTTTGGCCG	0.77
	A3	GATATTAATACGCGCTTTGGATGCACTCAGTTTAGTCGCG	-2.20
	A8	GCGTATAT TAAAAATCTGTTTATTATTGTTAGATTTAAGGG	-1.03
	E4	GAGTCCATTCTAAATAGTAGTTATAAAGTCATGATTAGG	0.65
	F1	GGGATTGTAGTTCAAAGATTAGTTTCTCA CACTCCGGCTTC	0.02
	F4	CGTACCAGTGTCAATTCAGT TAAATATCT CCCCCAATGTTCT	0.71
	G3	CGGCAAGAGTGCGATGTCTAAGAGCTCATTATGGGAGGGC	-0.72
	H2	GCAATAGTTCCGGCTCCCATGACATGATTACATTTTACGGT	0.06
H8	GGCATATTGTCGCTCTTATGTCAAAGTCATGTTTTGGGTC	0.10	

### 3.3. Resultados y discusión



**Figura 3.10.** Estructuras secundarias más estables de las 9 secuencias (40mer, eliminando las regiones constantes de los extremos con las que hibridan los cebadores de la PCR) seleccionadas tras el escrutinio bioinformático. Estimación realizada con el servidor web Mfold [63], indicando entre paréntesis la energía libre de cada estructura en kcal mol<sup>-1</sup> a 37 °C y [Na<sup>+</sup>] a 154 mM. Los motivos se destacan en las secuencias según el código de colores descrito en la **Tabla 3.4**.

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

Los 44 aptámeros potenciales se agruparon por familias según la similitud de su secuencia utilizando el programa Clustal OMEGA [247] (**Figura 3.9**). También se analizó la presencia de motivos cortos recurrentes utilizando el software MEME Suite [248], identificándose 8 motivos repetidos en más de una secuencia (**Tablas 3.4 y 3.5**).

En base al número de motivos presentados, cubriendo todos ellos, y la estabilidad termodinámica de la estructura secundaria (estimada con el servidor web mfold [63]), se escogieron nueve secuencias (B2, B3, C1, C2, C10, D1, D8, G8, H1) cuyas estructuras y valores de energía de Gibbs pueden verse en la **Figura 3.10**. Todas ellas contienen dos motivos, excepto D8, que sólo tiene el motivo que siempre aparece solo (el motivo verde claro), y G8 y H1, que se seleccionaron por la estabilidad de su estructura secundaria.

#### 3.3.2. Escrutinio inicial y caracterización de los aptámeros

Para comprobar si los aptámeros seleccionados reconocen el péptido 16mer, se sintetizaron las nueve secuencias seleccionadas con una marca de 6-carboxifluoresceína en el extremo 5', separada de la secuencia principal por un espaciador de 5 timinas (aptámero-6-FAM). Se incubaron 500 nM de cada aptámero con PM-T-BSA-16mer y luego se marcaron con el conjugado enzimático antiF-POD (**Figura 3.4**). La cantidad de aptámero unido a las partículas se determinó por cronoamperometría tras añadir el conjugado antiF-POD y dejarlo reaccionar con el sustrato de tetrametilbencidina (TMB). De este modo, la corriente catódica de TMB medida a 0 V (véase el comportamiento en voltametría cíclica de TMB en la **Figura 3.11**) es proporcional a la concentración de aptámero en la superficie.

Todos los aptámeros mostraron afinidad por la diana, pero la corriente neta generada fue mucho mayor para H1, G8, D1 y C1 (**Figura 3.12**). Estas cuatro secuencias contienen los motivos azul claro [C(C/A)(C/G)(G/T)CGGC] y rosa [CA(C/A)A(A/C)G(T/C)G(C/G)TACC], tanto solos (G8 y H1) como combinados con otros motivos (D1 y C1), lo que sugiere que son importantes para el enlace. Por esta razón, estos cuatro aptámeros se caracterizaron con más detalle.

En primer lugar, se estudió la capacidad de los aptámeros para capturar el péptido en disolución. Para ello, los aptámeros biotinilados se inmovilizaron en PM-S y se incubaron con concentraciones crecientes de 16mer biotinilado. La corriente registrada se utilizó para trazar las curvas de enlace, I frente a la concentración del péptido 16mer, y se ajustaron al modelo de Langmuir, que implica una interacción 1:1, para calcular la constante de disociación ( $K_D$ ) (**Figura**

**3.13A-D).** En esta configuración, D1 mostró la mejor  $K_D$  ( $247 \pm 79$  nM), aproximadamente 6 veces menor que C1 ( $1598 \pm 136$  nM), 7.5 veces menor que H1 ( $1871 \pm 270$  nM) y 8 veces inferior que G8 ( $1975 \pm 190$  nM).

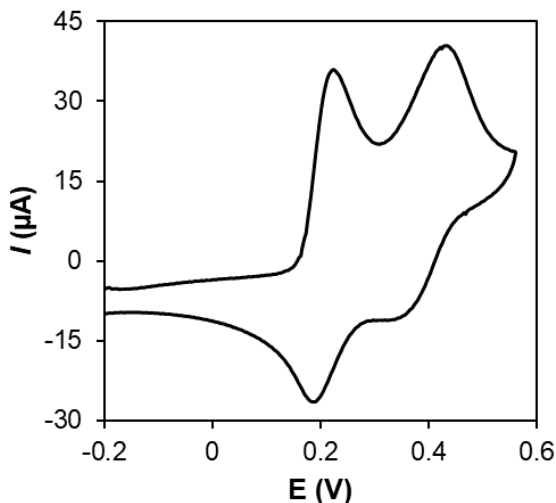


Figura 3.11. Voltagrama cíclico de TMB en un electrodo serigrafiado de carbono sobre el que se depositaron previamente PM-S-16mer.

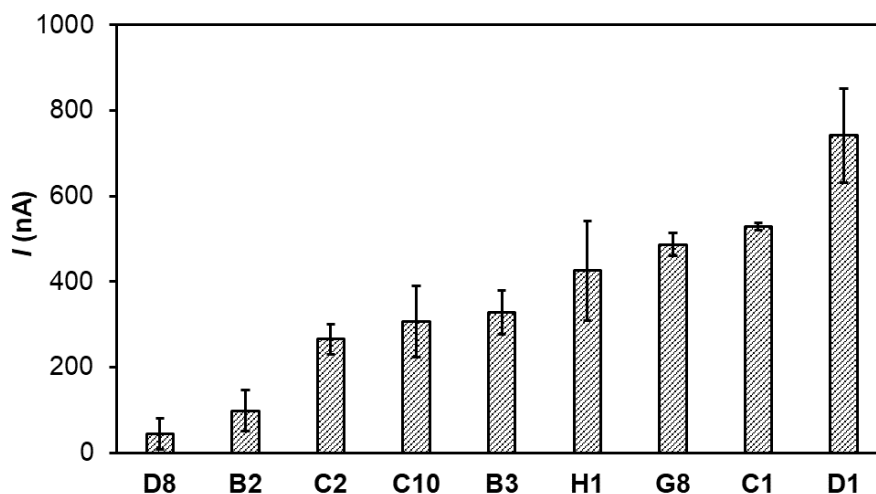
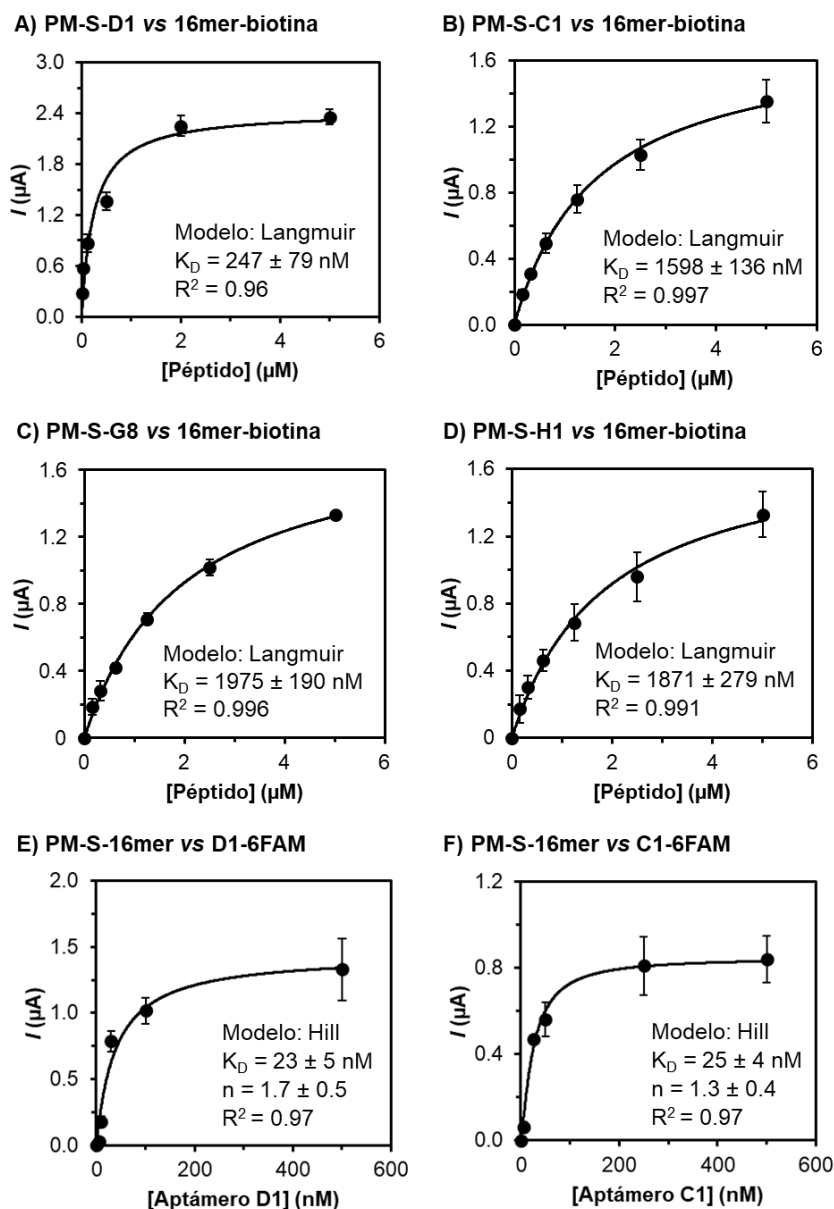


Figura 3.12. Escrutinio de afinidad inicial de los 9 candidatos. Ensayos de enlace directos utilizando PM-T-BSA-16mer ( $20 \mu\text{g}$ ) y  $500$  nM de cada aptámero potencial marcado con 6-FAM. Condiciones de medida descritas en la sección 3.2.7. Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 3$ ).

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1



**Figura 3.13.** Curvas de enlace de D1 (A y E), C1 (B y F), G8 (C) y H1 (D) obtenidas mediante ensayos de enlace con dos configuraciones distintas y detección electroquímica. En A-D se inmovilizó el aptámero biotinilado en PM-S y el péptido 16mer biotinilado se añadió en disolución. En E y F, el péptido 16mer biotinilado se inmovilizó en PM-S y se añadieron concentraciones crecientes del aptámero-6-FAM. Se indica el valor de  $K_D$  calculado mediante ajuste de la curva a los modelos de Hill o Langmuir. Condiciones de medida descritas en la sección 3.2.7. Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 3$ ).

### 3.3. Resultados y discusión

Tanto D1 como C1 se ensayaron en la configuración inversa, es decir, el péptido inmovilizado en partículas magnéticas (PM-S) frente a los aptámeros en disolución. Se construyeron curvas de enlace incubando concentraciones crecientes de cada aptámero marcado con 6-FAM con PM-S modificadas con 16mer biotinilado. Estos sistemas se ajustaron mejor al modelo de Hill, con una cooperatividad ligeramente positiva (coeficiente de Hill:  $n > 1$ ). Los valores de  $K_D$  obtenidos para ambos aptámeros fueron idénticos ( $\sim 25$  nM), lo que supone 1 y 2.5 órdenes de magnitud menos que en la configuración anterior para D1 y C1, respectivamente (**Figura 3.13E y F**).

La mejora de la constante de afinidad podría ser consecuencia de un "efecto de superficie" que facilita el reenlace del aptámero antes de difundir fuera de la partícula debido a la elevada cantidad de péptido inmovilizado en la superficie de las mismas [256]. Como resultado de este fenómeno, la  $K_D$  aparente es menor ya que la constante cinética de disociación es menor. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la menor afinidad en la configuración con el péptido en disolución y los aptámeros inmovilizados, puede deberse tanto al impedimento estérico generado por una excesiva concentración de aptámeros en la superficie de las partículas como a la difícil accesibilidad del péptido a los mismos debido a su cercanía con la superficie [257].

En general, el aptámero D1 resultó ser la secuencia con mejor comportamiento en ambas configuraciones estudiadas, y por ello fue escogido para realizar los siguientes experimentos.

#### 3.3.3. Identificación del "aptátopo"

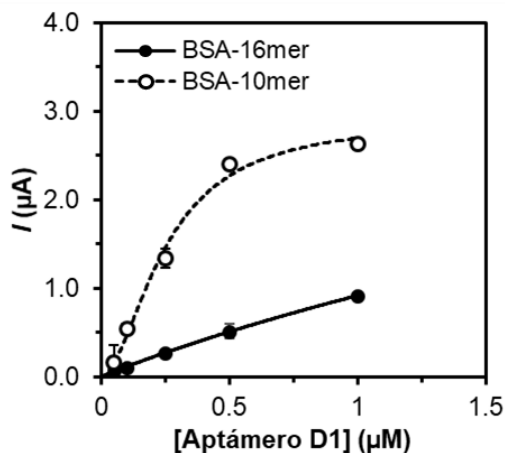
Los epítomos lineales típicos de los anticuerpos suelen comprender menos de 10 aminoácidos [258]. Por esta razón, se estudió la interacción del aptámero D1 con una versión truncada del péptido 16mer sin los seis aminoácidos C-terminales (10mer). El péptido 10mer se conjugó a BSA (BSA-10mer) y se inmovilizó en PM-T tal y como se hizo con BSA-16mer. La curva de enlace se obtuvo utilizando 100  $\mu$ g de PM-T-BSA-10mer y concentraciones crecientes de D1-6-FAM (**Figura 3.14**).

Con este estudio se comprobó que el aptámero se une a ambos péptidos y las corrientes son mucho mayores para el 10mer, lo que indica que el hexámero truncado no es esencial para la interacción. En consecuencia, la constante de disociación es mucho menor para BSA-10mer ( $250 \pm 33$  nM) que para BSA-16mer ( $5.7 \pm 6.4$   $\mu$ M), por lo que el decapeptido es el verdadero "aptátopo". Con el BSA-16mer no se consigue la saturación, lo que hace que la estimación de  $K_D$



### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

sea menos fiable y puede explicar la discrepancia con el valor de  $K_D$  calculado cuando se inmoviliza el péptido biotinilado en PM-S. Curiosamente, la cooperatividad sólo se observó con el 10mer ( $n = 1.8 \pm 0.3$  vs  $n = 0.97 \pm 0.07$ ), lo que también concuerda con las mayores corrientes medidas.



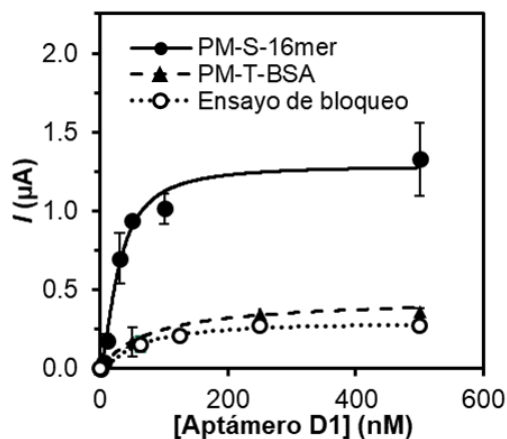
**Figura 3.14. Estudio para identificar el “aptátoto” del aptámero D1.** Curvas de enlace con BSA-10mer (círculo blanco) y BSA-16mer (círculo negro) inmovilizados en PM-T (100 µg) y aptámero D1-6-FAM en disolución. Ambas curvas se ajustaron al modelo de Hill. Condiciones de medida descritas en la sección 3.2.7.

Hasta el momento, sólo hay un aptámero seleccionado contra el telopéptido C de un colágeno, concretamente el colágeno I. En ese caso, como diana se utilizó un fragmento de 26 aminoácidos de la cadena  $\alpha$ 1 de este colágeno mayoritario, y como en el caso del 16mer, el “aptátoto” resultó ser la parte más interna del péptido ya que el octapéptido terminal no se unía a él [259].

#### 3.3.4. Selectividad

La selección de aptámeros no deseado con afinidad por la proteína portadora de la diana (BSA) se minimizó con la introducción de etapas de contraselección a partir de la segunda ronda. El éxito de esta estrategia se verificó incubando el aptámero D1-6-FAM con PM-T-BSA y midiendo electroquímicamente la cantidad de aptámero unido. Las corrientes cronoamperométricas fueron aproximadamente un 72% más pequeñas que las obtenidas al incubar el aptámero con PM-S-16mer (Figura 3.15). La unión específica del aptámero D1 al péptido 16mer en disolución también se confirmó en un ensayo de bloqueo. Para ello, se incubaron PM-S-16mer con concentraciones crecientes del aptámero D1-6-FAM con y sin el péptido en disolución en una concentración de 1 µM

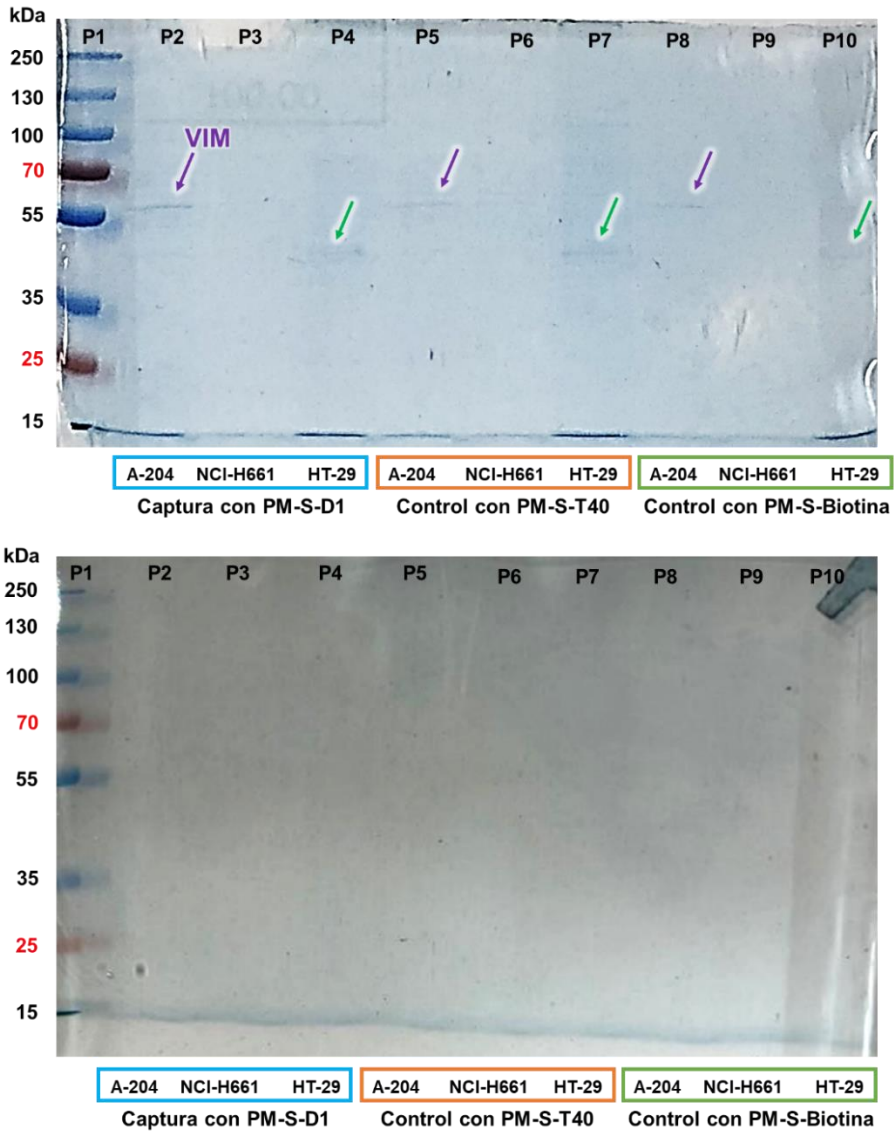
(Figura 3.15). Cuando el péptido está presente en disolución, la corriente medida es aproximadamente un 80% menor que en su ausencia. Esto significa que la formación del complejo aptámero-16mer tiene lugar en disolución y compete efectivamente con la formación del complejo en la superficie de las partículas.



**Figura 3.15. Estudio de selectividad del aptámero D1.** Curvas de enlace con 16mer inmobilizado en PM-S en ausencia (círculos negros) y presencia (círculos blancos) de péptido 16mer 1  $\mu\text{M}$  en disolución (ensayo de bloqueo), y curva de enlace con PM-T-BSA (sin péptido en disolución, triángulos negros). Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 2$ ).

Para investigar el reconocimiento específico del aptámero por el péptido en matrices biológicas, se utilizaron dos líneas celulares positivas a colXI $\alpha$ 1 (A-204 y NCI-H661) y un control negativo (HT-29) (Tabla 3.2). Se realizó un ensayo de captura incubando 80  $\mu\text{g}$  de proteína de cada lisado celular (medido por el método Bradford para la normalizar la cantidad de proteína) con una cantidad fija de PM-S-D1 (Figura 3.5). La fracción enlazada se eluyó y se analizó por SDS-PAGE. En las células A-204 se observó una banda distinta de aproximadamente 55 kDa que no es visible en los otros dos tipos de células (Figura 3.16). Esta banda se aisló y se analizó por LC-MS después de realizar una digestión con tripsina. De este modo, se identificaron 42 proteínas con un nivel de confianza del 99%, siendo la vimentina la proteína identificada con el mayor número de péptidos y cobertura de secuencia (128 péptidos y 77.9% de cobertura).

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

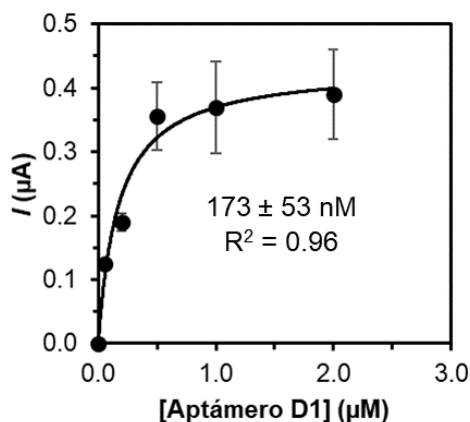


**Figura 3.16. SDS-PAGE de 3 lisados celulares tras la captura con PM-S-aptámero.** El contenido de proteína de cada lisado se normalizó a 80  $\mu$ g y se realizó un experimento sin centrifugar los lisados (panel superior) y con centrifugación (panel inferior) antes de la captura con aptámero D1 (pocillos 2-4); con PM-S-T<sub>40</sub> (pocillos 5-7) y con PM-S-biotina (sin ADN inmovilizado) (pocillos 8-10) y posterior elución en agua caliente. La flecha violeta indica la banda específica observada en A-204 por encima de 55 kDa. La flecha verde muestra una banda específica de la línea celular de control negativo HT-29 que sólo se observa sin centrifugación. En el pocillo 1 se pipeteó el marcador de tamaños de proteínas.

### 3.3. Resultados y discusión

La vimentina es una proteína con un peso molecular de 57 kDa que forma parte de los llamados filamentos intermedios del citoesqueleto. Asimismo, es un marcador de la transición epitelio-mesénquima (EMT) [260]. Dado que la A-204 es una línea celular mesenquimal, se espera que en ella la expresión de vimentina sea mayor que en la línea celular NCI-H661, que es una línea epitelial transformada por el cáncer. Cabe destacar que en varios *cell*-SELEX se ha identificado la vimentina como diana inesperada por LC-MS [100, 261]. En estos SELEX, la selección no se dirige hacia un marcador concreto, sino que la genoteca de secuencias se incuba con las células de interés (de un tumor determinado, por ejemplo) y se hacen contraselecciones contra otras células (sanas y/o de otros tumores). Una vez completado el proceso, se identifica cuáles son los marcadores a los que se enlazan los aptámeros obtenidos.

Tras identificar la vimentina como posible interferencia en la detección del péptido 16mer con el aptámero D1, se estudió la interacción entre dicho aptámero y la vimentina mediante ensayos de enlace con detección electroquímica (**Figura 3.17**). Se observó que, aunque el aptámero D1 se une a la vimentina, la afinidad del aptámero por esta proteína es menor que hacia el 16mer. Para realizar estos ensayos se modificaron PM-C con vimentina y se incubaron con concentraciones crecientes del aptámero D1 marcado con 6-FAM. Aunque la cantidad de vimentina teóricamente inmovilizada en las partículas (21 pmol) es mayor que la de péptido 16mer (8 pmol), las corrientes son mucho menores, lo que indica una menor cantidad de aptámero unido a la superficie. Este resultado concuerda con un  $K_D$  mayor para el complejo D1-vimentina, de  $173 \pm 53$  nM.



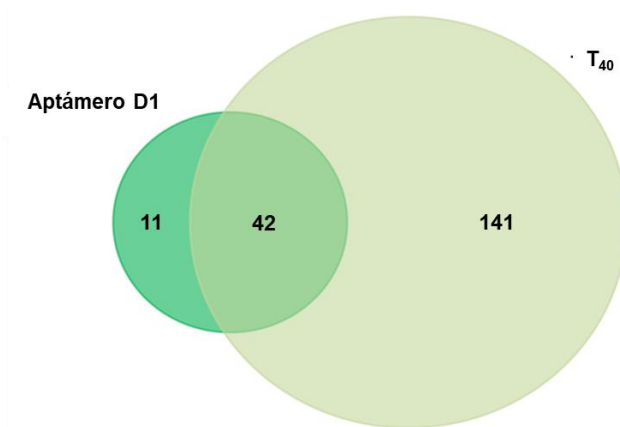
**Figura 3.17. Curva de enlace del aptámero D1 con la vimentina.** La proteína se inmovilizó en PM-C y se añadieron concentraciones crecientes de D1-6-FAM. Se indica el valor de  $K_D$  calculado mediante ajuste de la curva al modelo de Langmuir. Condiciones de medida descritas en la sección 3.2.7. Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 2$ ).

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

Dado que la vimentina está implicada en la transición epitelio-mesénquima, es razonable suponer que la concentración de esta proteína podría ser mayor que la de colágeno XI en el lisado de A-204, lo cual podría desplazar el equilibrio de formación de complejos aptámero-proteína hacia la unión con la vimentina a pesar de que la afinidad D1-vimentina es inferior que D1-16mer. Para intentar eliminar esta interferencia, se centrifugaron los lisados para descartar los restos celulares insolubles del lisado antes de incubar el sobrenadante resultante con el aptámero inmovilizado en las partículas magnéticas. De esta manera, la fracción eluída resultante tras la interacción se analizó por SDS-PAGE y se observó la desaparición de la banda distintiva asociada a la vimentina (Figura 3.15, panel inferior). Esta fracción eluída del lisado de células A-204 tras la captura magnética con PM-S-D1, con centrifugación previa a la interacción, fue analizada por LC-MS como se indicó anteriormente, identificándose en estas condiciones 53 proteínas. Entre ellas, sigue presente la vimentina, pero sólo con 24 péptidos y una cobertura menor (41%), y aparece también el colágeno XI $\alpha$ 1, identificado con un péptido y un nivel de confianza del 99%.

En estos experimentos se realizaron controles utilizando una secuencia de ADN irrelevante (T40) inmovilizada en PM-S en lugar del aptámero y PM-S bloqueadas con biotina. En el lisado de A-204 tratado con PM-S-T40 y PM-S-biotina se observó una banda más débil de aproximadamente 55 kDa, sólo cuando los lisados no fueron centrifugados (**Figura 3.16**). Este resultado sugiere que la presencia de vimentina en la fracción eluída no sólo se debe a cierta reactividad cruzada del aptámero D1, sino también a la unión inespecífica de la vimentina a las PM.

En el análisis mediante LC-MS del lisado centrifugado de A-240 y tras la exposición a PM-S-T<sub>40</sub> se identificaron 183 proteínas. El diagrama de Venn de las proteínas identificadas tras la captura magnética con D1 y T<sub>40</sub> muestra que sólo 11 proteínas aparecen exclusivamente en la muestra tratada con D1, entre ellas el colágeno XI $\alpha$ 1 (**Figura 3.18**). La vimentina, junto con otras 41 proteínas, aparece en ambas muestras. Esta observación indica que la interacción inespecífica con las PM domina la población de proteínas eluídas.



Código UniProt	Nombre
TBA1C_HUMAN	Tubulin alpha-1C chain
K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14
TBB2B_HUMAN	Tubulin beta-2B chain
<b>COBA1_HUMAN</b>	<b>Collagen alpha-1(XI) chain</b>
H2AJ_HUMAN	Histone H2A.J
PA1B2_HUMAN	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha 2
RLA1_HUMAN	60S acidic ribosomal protein P1
FKB10_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10
TRY2_HUMAN	Trypsin-2
K1H1_HUMAN	Keratin, type I cuticular Ha1
TENA_HUMAN	Tenascin

**Figura 3.18. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas mediante MS en el lisado centrifugado de A-204 tras la captura con D1 y con T<sub>40</sub> (control).** En la tabla inferior se indican las 11 proteínas exclusivas identificadas en el lisado tratado con aptámero D1 (tras sustraer aquellas que también aparecen en el lisado tratado con T<sub>40</sub>).

### 3.3.5. Evaluación del reconocimiento del péptido en la proteína completa

Se estudió la capacidad del aptámero D1 para reconocer el péptido dentro de la proteína completa. Como no existe ningún estándar comercial para el colágeno XI $\alpha$ 1, se decidió utilizar los lisados celulares como fuente de colágeno

### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

y kits ELISA comerciales para evaluar el reconocimiento del aptámero (**Tabla 3.3**). Se escogieron tres kits comerciales para la detección de colágeno XI $\alpha$ 1, de las casas comerciales Cusabio, Cloud-Clone y Elabscience, y se examinó el patrón de cada kit para evitar epítomos compartidos con el 16mer que impidiesen la detección simultánea entre el anticuerpo de captura y el aptámero. El kit de Cusabio no informa sobre el fragmento de colágeno utilizado como patrón, mientras que en los kits de Cloud-Clone y Elabscience se utiliza un fragmento del propéptido C (1564-1806) y del colágeno maduro (738-985), respectivamente. En principio, no hay solapamiento, pero el kit de Cloud-Clone no detecta el colágeno maduro al reconocer una región del colágeno que se fragmenta en el proceso de maduración y liberación a la ECM. Para estudiar la reactividad cruzada, los lisados celulares centrifugados se sometieron a los kits ELISA escogidos, con y sin tratamiento previo con PM-S-D1. Los tres kits utilizan un anticuerpo biotinilado para la detección que posteriormente se marca con un conjugado avidina-POD.

El kit de Cusabio se descartó porque se obtuvieron absorbancias muy elevadas en ausencia del anticuerpo secundario, lo que indica que el conjugado enzimático se adsorbe de forma no específica.

Con el kit de Cloud-Clone no se pudo detectar el colágeno XI $\alpha$ 1 en el lisado de A-204, en el cual se espera una elevada expresión de esta proteína en comparación con las otras líneas celulares estudiadas, y sólo fue posible medir una pequeña cantidad de colágeno tras el tratamiento del lisado con PM-S-D1 (**Tabla 3.6**). Sin embargo, la concentración obtenida en el lisado de NCI-H661 (+) fue más alta y disminuye claramente después del tratamiento con el aptámero, lo que sugiere una fuerte reactividad cruzada. En HT-29, negativa a colágeno XI pero con una elevada expresión de colágeno V, se midió una mayor concentración de colXI $\alpha$ 1 que en las otras dos líneas verdaderamente positivas a este marcador, confirmando la sospecha de reactividad cruzada, algo que el propio fabricante declara como posibilidad en el manual del kit: *“Limited by current skills and knowledge, it is impossible for us to complete the cross-reactivity detection between COL11a1 and all the analogues, therefore, cross reaction may still exist”*. Dado que la diana del kit es el propéptido C, estos resultados pueden explicarse si el procolágeno es la forma dominante, y la diana del aptámero (el telopéptido C) está oculta; de modo que, sólo después del procesamiento, el aptátomo quedaría al descubierto y disponible para la captura del aptámero.

Por el contrario, con el kit de Elabscience se midieron mayores concentraciones de colágeno XI $\alpha$ 1 en el lisado de A-204 que en el de NCI-H661 tras el tratamiento del aptámero. Se estima un factor de enriquecimiento de 6 en la línea celular A-204 y de 1.6 en la NCI-H661, lo que se correlacionaría con una

### 3.3. Resultados y discusión

mayor expresión del colágeno maduro. La detección de colágeno XI en la HT-29 incluso después del tratamiento con aptámero también apunta a algún tipo de reactividad cruzada, aunque el anticuerpo de captura sea monoclonal.

**Tabla 3.6. Comparación de los resultados obtenidos con los kits de Cloud-Clone y Elabscience para la detección de colXI $\alpha$ 1.** Concentración de colXI $\alpha$ 1 en los lisados celulares obtenida con y sin tratamiento con PM-S-D1. Las desviaciones estándar se calcularon con dos réplicas (n = 2) tal y como se indica en los kits.

Muestra	CloudClone	Elabscience
	(pg colXI $\alpha$ 1)/(mg proteína)	
A-204 (lisado centrifugado)	< LD	98 $\pm$ 10
A-204 (lisado tratado con PM-S-D1)	12 $\pm$ 2	596 $\pm$ 97
A-204 (lisado tratado con PM-S-D1 sin centrif.)	No testado	307 $\pm$ 29
NCI-H661 (lisado centrifugado)	125 $\pm$ 12	121 $\pm$ 13
NCI-H661 (lisado tratado con PM-S-D1)	9 $\pm$ 1	193 $\pm$ 19
HT-29 (lisado centrifugado)	270 $\pm$ 26	200 $\pm$ 19
HT-29 (lisado tratado con PM-S-D1)	80 $\pm$ 8	180 $\pm$ 17

En vista de los resultados obtenidos, se seleccionó el kit de Elabscience para detectar el colágeno XI $\alpha$ 1 maduro en los lisados en un ensayo tipo sándwich combinando el anticuerpo monoclonal de captura del kit y el aptámero D1 como receptor de detección. Dado que la selección de aptámeros se dirigió hacia un péptido corto, no es posible realizar un ensayo sándwich con dos aptámeros por razones estéricas. Los resultados se compararon con los obtenidos con el inmunoensayo en cuanto a la señal analítica, ya que el estándar del kit no contiene el aptátipo (el telopéptido C) y por ello no se calculó la concentración de colágeno XI $\alpha$ 1 medido (**Tabla 3.7**).

En general, el ensayo con el aptámero proporciona señales analíticas mayores que con el anticuerpo de detección del kit. Cabe destacar que estas señales elevadas no pueden atribuirse a la vimentina, ya que se probó el inmunoensayo con vimentina y no se midió ninguna absorbancia, lo que indica que los anticuerpos no muestran reactividad cruzada con ella. Los experimentos de blanco, sin muestra, utilizando el aptámero D1, proporcionan una señal de  $\sim$  0.1 u.a, por lo que la interacción con la microplaca o con el anticuerpo de captura



### 3. SELEX para el colágeno XI $\alpha$ 1

no es la causa de las altas señales, que se atribuyeron al uso de un conjugado de estreptavidina-POD para marcar el aptámero en lugar del conjugado de avidina empleado para marcar el anticuerpo. La estreptavidina presenta una unión inespecífica más baja debido a su menor punto isoeléctrico, pero contiene un tripéptido que imita el receptor universal RGD de la fibronectina y otras moléculas de adhesión [262]. Esas moléculas están presentes en el lisado celular y pueden unirse inespecíficamente a las PM durante el tratamiento del lisado con el aptámero, y si esto ocurre, la estreptavidina, pero no la avidina, podría unirse a ellas. El fabricante del kit declara que no hay reactividad cruzada entre el colágeno XI $\alpha$ 1 y sus análogos, pero aún puede existir cierta reactividad cruzada.

**Tabla 3.7. Comparación del aptámero D1 con el anticuerpo monoclonal del kit de Elabscience.** Absorbancias obtenidas utilizando tanto el anticuerpo del kit como el aptámero D1 como receptor de detección para los tres lisados celulares centrifugados y tratados con PM-S-D1. Las desviaciones estándar se calcularon con dos réplicas (n = 2) tal y como se indica en el kit.

Muestra	Anticuerpo	Aptámero D1
	Abs (u.a.)	
A-204	0.532 $\pm$ 0.095	0.880 $\pm$ 0.099
NCI-H661	0.353 $\pm$ 0.033	0.482 $\pm$ 0.056
HT-29	0.246 $\pm$ 0.013	0.316 $\pm$ 0.037

Tanto si se utiliza el kit de Elabscience íntegro como si se sustituye el anticuerpo de detección del kit por el aptámero D1, la tendencia de los resultados es similar; las mayores absorbancias se obtuvieron para el lisado A-204, seguido del NCI-H661 y la línea celular negativa HT-29, confirmando que el aptámero D1 es un receptor prometedor para la detección del colágeno XI $\alpha$ 1 en medios biológicos.

### 3.4. Conclusiones

La disponibilidad de receptores selectivos es fundamental para el desarrollo de ensayos sencillos que permitan establecer la utilidad clínica de nuevos biomarcadores de cáncer. Es destacable la falta de receptores para los componentes de la ECM, especialmente para los colágenos, grandes proteínas con una alta homología de secuencia.

### 3.4. Conclusiones

En este trabajo se describe la obtención de aptámeros para la detección de un péptido específico del colágeno minoritario XI $\alpha$ 1 que se supone que queda expuesto tras su maduración y liberación en la ECM. Tras un estudio mediante ensayos electroquímicos directos, el aptámero D1 mostró las mejores características analíticas con una  $K_D \sim 25$  nM. Mediante espectrometría de masas se confirmó que el aptámero captura este colágeno minoritario en lisados celulares, lo que indica que no se degrada ni pierde afinidad en medios complejos. Además, el aptámero D1 fue capaz de detectar el colágeno de los lisados en un ensayo tipo sándwich utilizando un anticuerpo como elemento de captura. Este nuevo receptor podría aplicarse en el diseño de ensayos competitivos basados únicamente en aptámeros para la detección de fragmentos solubles del colágeno XI $\alpha$ 1 en fluidos biológicos.



# Capítulo 4

## Aplicaciones bioanalíticas de los aptámeros anti-colágeno XI $\alpha$ 1

### 4.1. Introducción

En la última década ha crecido el interés por los fragmentos de componentes de la ECM, incluidos los derivados de los colágenos, debido a su potencial como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en el cáncer y otras enfermedades [263, 264]. Los fragmentos de colágeno relativamente grandes, como la endostatina, la tetrastatina, la tumstatina y el dominio NC1 del colágeno XIX, se conocen como matriquinas y presentan una actividad biológica distinta a la de sus proteínas madre intactas [224]. Se han detectado en los fluidos corporales [265–267] y se está evaluando su utilidad clínica [268–270]. Los neoepítosos originados en el procesamiento proteolítico postraduccional de los colágenos carecen de actividad biológica [264], pero pueden ser una fuente de biomarcadores de la degradación/producción de la ECM. La validez clínica de estos biomarcadores emergentes está aún en estudio. Hasta ahora, los neoepítosos del colágeno I, II, III, IV y XI se han evaluado individualmente o combinados como biomarcadores en el cáncer de páncreas [245, 271, 272], de mama [273, 274], de próstata [274], hepatocelular [275] y de pulmón [276].

Los inmunoensayos son el estándar de oro para la detección de fragmentos de las proteínas de la ECM. Las matriquinas relativamente grandes, como la endostatina (20 kDa) del colágeno XVIII $\alpha$ 1 y la tumstatina (28 kDa) del colágeno IV $\alpha$ 3, suelen detectarse mediante ensayos de tipo sándwich. Para el análisis de la primera existen multitud de kits comerciales con límites de detección de hasta 10 pg/mL (por ejemplo EHCOL18A1 de Thermo Fisher Scientific y ab100508 de Abcam, entre otros), mientras que, en el caso de la tumstatina, además de un inmunoensayo tipo sándwich [267] también se ha desarrollado un ensayo competitivo [270]. La tetrastatina es otra matriquina relativamente grande (29 kDa) derivada del colágeno IV $\alpha$ 4 para la cual se ha desarrollado un ensayo competitivo [265].

#### 4. Aplicaciones de aptámeros anti-colágeno XI $\alpha$ 1

Existen muy pocos anticuerpos específicos para la detección de los neoepítosos originados en el procesamiento proteolítico postraduccionaL de los colágenos, ya que no están expuestos en el colágeno intacto. La empresa danesa Nordic Bioscience [277] está muy comprometida con la investigación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y prognosis de varias enfermedades, incluidos los neoepítosos de la ECM. Sus estudios se centran en el desarrollo de inmunoensayos competitivos en los que utilizan sus propios anticuerpos monoclonales para cada neoepítoso, entre los que se incluyen fragmentos del colágeno I maduro generados por su escisión proteolítica mediada por MMP-9, MMP-2 y MMP-13 (C1M), fragmentos de los colágenos III y IV generados por MMP-9 (C3M y C4M, respectivamente) y del propéptido del colágeno III escindido por una N-proteasa (PRO-C3). La selección del neoepítoso se basa en el corte enzimático del colágeno por varias proteasas, la identificación de los fragmentos mediante LC-MS y la selección basada en la especificidad de la secuencia:

- C1M, con la secuencia GSPGKDGVRG, fue seleccionado por contener un sitio de corte para la cathepsina K, la principal proteasa del hueso, lo que garantiza el origen no óseo del neoepítoso. El ELISA competitivo con un LD de 0.83 ng/mL no detecta el colágeno tipo I intacto ni reacciona de forma cruzada con secuencias homólogas de los colágenos tipo V y VII [278].
- C3M, cuya secuencia es KNGETGPQGP, se pudo detectar mediante un ensayo competitivo que presenta un LD de 0.5 ng/mL y no reconoce colágenos intactos de tipo III y II. Además, los fragmentos degradados por la MMP-9 de estos últimos no interfieren en su detección [279].
- C4M (GTPSVDHGFL) se eligió tras confirmar que el anticuerpo monoclonal correspondiente era capaz de distinguir entre el colágeno de longitud completa y el escindido. Para su detección se desarrolló un inmunoensayo con un intervalo de medida de 1.5625 a 100 ng/mL y un LD de 0.61 ng/mL. Además, los fragmentos análogos de los colágenos de tipo I y VI no interfieren en su detección [280].
- PRO-C3 (CPTGPQNYSP) también se determinó en un ensayo competitivo con un intervalo de medida de 0.867 a 60.1 ng/mL y un LD de 0.606 ng/mL [281].

Todos estos neoepítosos se están estudiando como marcadores de supervivencia global en PDAC [272] y en el cáncer de mama metastásico [273] o

en la clasificación según el estadio tumoral de pacientes con cáncer colorrectal [282].

Hasta el momento, sólo se ha descrito un aptámero específico para un fragmento derivado de un colágeno. Se trata de un aptámero que funciona como faro molecular (*molecular beacon*) para la detección del C-telopéptido de 26 aminoácidos del colágeno Ia1 (CTx), asociado a las metástasis óseas [259]. Las estructuras de los dos aptámeros ganadores del SELEX tienen tres bucles, pero sólo uno, el más cercano al extremo 3', mostró un comportamiento FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Förster) cuando se marcó con el fluoróforo TYE-665 y el desactivador de la fluorescencia (*quencher*) Iowa Black RQ en cada extremo. El aptámero truncado final contiene sólo 15 nucleótidos, de los cuales 13 pertenecen a la región del cebador, un hallazgo bastante inusual. Sin embargo, los 15 nucleótidos son necesarios para producir FRET en presencia de concentraciones crecientes de CTx.

La discusión anterior revela que el desarrollo de anticuerpos contra matriquinas derivadas del colágeno es un área de investigación activa y los ensayos competitivos son los más extendidos. Por el contrario, la selección de aptámeros, que no requiere la utilización de animales, está en su mayor parte inexplorada para esta clase de componentes de la ECM. La naturaleza insoluble del colágeno podría desalentar su obtención, pero el creciente conocimiento de las secuencias de matriquinas y el coste asequible de la síntesis química de péptidos cortos podrían impulsar la selección de aptámeros anticolágeno. Su disponibilidad abrirá un amplio abanico de posibilidades analíticas.

En esta línea, en el capítulo anterior de la presente tesis se describe el desarrollo de aptámeros para el telopéptido C de la cadena  $\alpha 1$  del colágeno XI humano (colXI $\alpha 1$ ), un colágeno minoritario cuya expresión se halla desregulada en varios tipos de carcinoma [227, 228]. Estos aptámeros reconocen específicamente un péptido de 16 aminoácidos que se utilizó como diana para la selección. En este capítulo, se evalúan cuatro aptámeros candidatos como receptores del péptido 16mer de colXI $\alpha 1$  anclado en partículas magnéticas y como sondas para la visualización del colágeno XI en líneas celulares. El aptámero con mayor afinidad se utilizó en un ensayo competitivo electroquímico en medios complejos como suero y lisados celulares.

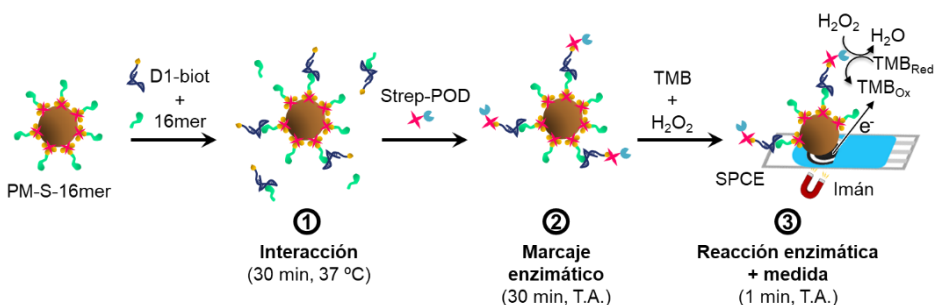
## 4. Aplicaciones de aptámeros anti-colágeno XI $\alpha$ 1

### 4.2. Materiales y métodos

Los reactivos e instrumentos utilizados en el desarrollo de este trabajo se recogen en el **Anexo A**. A continuación, se describen los procedimientos experimentales llevados a cabo. Los protocolos de la modificación de PM-S con péptido 16mer y de las curvas de enlace con PM-S-16mer se describen en las secciones 3.2.5.3 y 3.2.7.1 del capítulo 3, respectivamente. En el caso de las curvas de enlace con aptámeros biotinilados, la etapa de marcaje enzimático se realizó como se describe en la sección 3.2.7.2.

#### 4.2.1. Ensayo competitivo

En primer lugar, se transfirieron 10  $\mu$ L de PM-S-16mer a un tubo y se mezclaron con una cantidad fija (75 nM) de aptámero D1 marcado con biotina y concentraciones crecientes de péptido 16mer, en un volumen de 500  $\mu$ L de PBS 1 $\times$ . La mezcla se incubó durante 30 min a 37  $^{\circ}$ C y 650 rpm (**Figura 4.1**, etapa 1). Las siguientes etapas de lavado, marcaje enzimático con strep-POD (**Figura 4.1**, etapa 2), reacción enzimática de TMB y medición electroquímica por cronoamperometría (**Figura 4.1**, etapa 3), se realizaron como se describe en las secciones 3.2.7.1 y 3.2.7.2 del capítulo 3. En los estudios de selectividad, el 16mer en disolución fue sustituido por diferentes proteínas (BSA, VIM o NGAL) en la primera etapa del ensayo. En los experimentos realizados en medios biológicos, se sustituyó PBS 1 $\times$  como medio de interacción por mezclas 1:2 y 1:5 de suero : PBS 1 $\times$ .

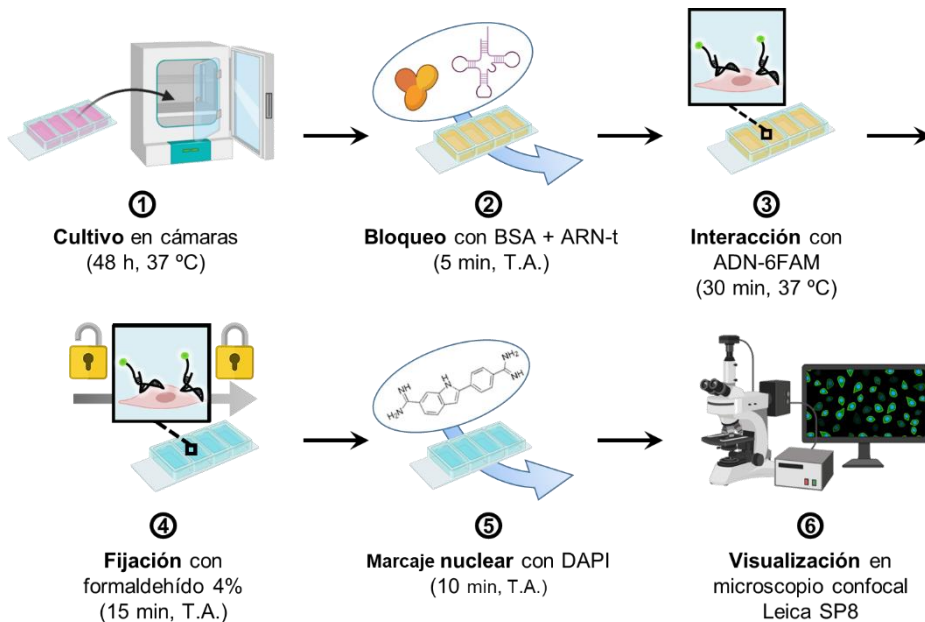


**Figura 4. 1. Representación esquemática del aptaensayo competitivo para colágeno XI $\alpha$ 1.** (1) Incubación del 16mer libre y el 16mer inmovilizado en PM-S para que compitan por una cantidad fija de aptámero D1 biotinilado; (2) marcaje enzimático del aptámero unido al 16mer sobre las PM con el conjugado strep-POD; (3) atrapamiento de las PM en un electrodo serigrafado de carbono, reacción enzimática de TMB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y medida electroquímica por cronoamperometría.

La detección de colágeno XI $\alpha$ 1 en lisados celulares se llevó a cabo sustituyendo el 16mer en disolución por el lisado correspondiente. La preparación de los lisados se describió previamente en la sección 3.2.8.2. Los lisados se centrifugaron antes de su uso durante 20 min a 4 °C y 1500 g para eliminar los restos celulares.

#### 4.2.2. Aptacitoquímica

La capacidad de los aptámeros para unirse al colágeno XI $\alpha$ 1 en líneas celulares que expresan esta proteína se estudió mediante microscopía confocal de fluorescencia, utilizando aptámeros marcados con 6-FAM.



**Figura 4.2. Representación esquemática de los ensayos de aptacitoquímica para la visualización de colágeno XI $\alpha$ 1 en cultivos celulares.** (1) Incubación durante 48 h de las líneas celulares A-204, NCI-H661 y HT-29; (2) bloqueo con BSA y ARN-t para evitar interacciones inespecíficas; (3) incubación a 37 °C con los aptámeros marcados con 6-FAM; (4) Fijación de las células con formaldehído al 4%; (5) tinción nuclear con DAPI; (6) visualización en microscopio confocal Leica SP8.

Para ello, las líneas celulares A-204 (+colXI $\alpha$ 1), NCI-H661 (+colXI $\alpha$ 1) y HT-29 (-colXI $\alpha$ 1) se cultivaron según el protocolo descrito en la sección 3.2.8.1. Las células se sembraron en cámaras de 1.7 cm<sup>2</sup> de Falcon® CultureSlides (4 × 10<sup>4</sup> células) y se incubaron durante 48 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> (**Figura 4.2, etapa**



## 4. Aplicaciones de aptámeros anti-colágeno XI $\alpha$ 1

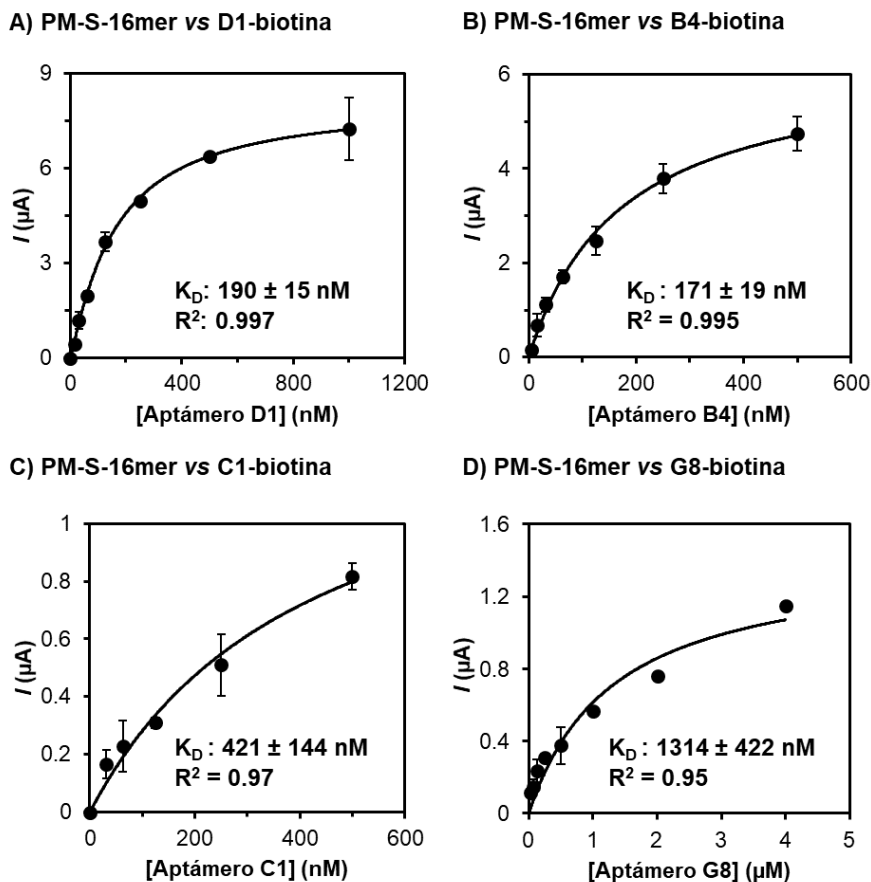
1). Tras eliminar el medio de cultivo, las células se lavaron durante 5 min con PBS 1 $\times$  + 1 mg/mL ARN-t (~ 40  $\mu$ M) + 1 mg/mL de BSA (**Figura 4.2, etapa 2**). Posteriormente, las células se incubaron con una disolución 1  $\mu$ M de aptámero marcado con 6-FAM (D1, B4 o C1) o ADN de control en PBS 1 $\times$  + 0.1 mg/mL de ARN-t (~ 4  $\mu$ M) + 1 mg/mL de BSA a 37 °C durante 30 min (**Figura 4.2, etapa 3**). Tras la incubación, las células se lavaron con PBS 1 $\times$  para eliminar el ADN no unido. A continuación, las células se fijaron con una disolución de formaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos y T.A. (**Figura 4.2, etapa 4**). Tras la fijación, las células se lavaron dos veces con PBS 1 $\times$  y se tiñeron con 0.2  $\mu$ g/mL de DAPI en PBS 1 $\times$ , incubando las células durante 10 minutos a T.A. (**Figura 4.2, etapa 5**). Por último, tras dos lavados con PBS 1 $\times$ , las células se visualizaron en el microscopio confocal con una magnificación de 40X (**Figura 4.2, etapa 6**). Todas las etapas que implican el uso de fluoróforos, así como las lecturas en el microscopio, se realizaron en ausencia de luz para evitar el fotoblanqueo.

### 4.3. Resultados y discusión

#### 4.3.1. Caracterización de aptámeros biotinilados

En el capítulo anterior se describe la selección y caracterización de varios aptámeros con afinidad por el péptido específico 16mer de la cadena  $\alpha$ 1 del colágeno XI humano. Sus características de enlace se estudiaron utilizando aptámeros marcados con 6-FAM en el extremo 5'. Dado que el tipo de marca puede influir en la  $K_D$  aparente [283], se decidió evaluar el efecto de sustituir 6-FAM por biotina. Para ello, se seleccionaron los tres mejores aptámeros en cuanto a características de enlace (D1, C1 y G8) y se añadió uno nuevo, B4, porque es el que tiene la estructura secundaria más estable ( $\Delta G = - 4.97$  kcal/mol). Se siguió el mismo protocolo que cuando se evaluaron los aptámeros marcados con 6-FAM. En primer lugar, se modificaron PM-S con el péptido 16mer biotinilado y, tras bloquear con biotina, se incubaron con concentraciones crecientes de cada aptámero biotinilado. La cantidad de aptámero unido a las partículas se determinó por cronoamperometría tras añadir el conjugado strep-POD y dejarlo reaccionar con el sustrato TMB.

Tal y como se esperaba, la corriente aumentó (en términos absolutos) con la concentración de aptámero. Las curvas de enlace resultantes (I vs. concentración de aptámero) se ajustaron al modelo de Langmuir y los valores de  $K_D$  se estimaron a partir de los ajustes (**Figura 4.3**).



**Figura 4.3.** Curvas de enlace obtenidas con PM-S-16mer y concentraciones crecientes de aptámeros D1 (A), B4 (B), C1 (C) y G8 (D) biotinilados. El aptámero se marcó además con strep-POD y luego se añadió TMB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60 s. La corriente se midió a 0 V durante 60 s por cronoamperometría. El valor de la constante de afinidad ( $K_D$ ) se calculó mediante el ajuste de la curva al modelo de Langmuir. Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 3$ ).

D1 y B4 mostraron los valores de  $K_D$  más bajos (alrededor de 170 nM), prácticamente idénticos dentro del error experimental. Ambos aptámeros comparten un motivo previamente identificado como muy prevalente en el conjunto de aptámeros resultantes de la última ronda de SELEX (motivo azul turquesa, **Tabla 3.5**). D1 tiene un segundo motivo recurrente, pero la similitud de los valores de  $K_D$  parece indicar que el motivo común [(C/G)(A/C)(C/G)(C/G/T)CGGC] podría ser el más importante en la unión. Para C1 y G8 se obtuvieron unas  $K_D$  de 421 nM y 1314 nM, respectivamente: 2.2 veces

## 4. Aplicaciones de aptámeros anti-colágeno XI $\alpha$ 1

y 7.7 veces mayores que la de D1. G8 también contiene una variante del motivo que comparten D1 y B4, pero el nivel de homología es menor, lo que apoya aún más su papel en el enlace a la diana.

Las constantes de enlace son mayores (menor afinidad) que las que se obtuvieron en condiciones idénticas con los aptámeros marcados con 6-FAM, pero las corrientes son mucho mayores. Por ejemplo, para el aptámero D1 a 500 nM, la corriente con el aptámero biotinilado es de 6.38  $\mu$ A mientras que con 6-FAM es de 1.33  $\mu$ A. Este resultado es totalmente inesperado ya que el conjugado de estreptavidina-peroxidasa es multivalente y teóricamente se podría unir a varios aptámeros a la vez, lo que resultaría en una menor cantidad de conjugado enlazada y una disminución de la corriente medida. Este comportamiento también se observó con el resto de aptámeros. Debido a la elevada señal analítica, se decidió utilizar los aptámeros biotinilados para posteriores experimentos electroquímicos.

### 4.3.2. Aptacitofluorescencia

Para confirmar la presencia de colágeno XI en las líneas celulares que sobreexpresan la proteína (A-204 y NCI-H661) se utilizaron los aptámeros D1, C1 y B4 marcados con 6-FAM para teñir las células. En primer lugar, se evaluaron distintas condiciones de tinción del aptámero D1 sobre las líneas celulares A-204 y HT-29, modificando los siguientes parámetros del protocolo de aptacitoquímica que se recogen en la **Tabla 4.2**:

1. Composición de la disolución de bloqueo, duración y temperatura de esta etapa.
2. Composición de la disolución de tinción con aptámero, duración y temperatura de esta etapa.
3. Fijación de las células, antes o después de realizar la tinción con aptámero.

Inicialmente, se optó por fijar las células con formaldehído antes del tratamiento con aptámero. Se realizó una etapa de bloqueo de 1 h a T.A. con FBS y BSA, seguido de la incubación con aptámero 250 nM y el marcaje nuclear con DAPI. En estas condiciones, se observó una fuerte tinción de los núcleos tanto en las células A-204 como en las HT-29 (**Figura 4.4AA'**). Para evitar que los aptámeros se unieran de forma inespecífica a las proteínas con carga positiva presentes en los núcleos, un problema atribuido a la carga negativa de los aptámeros que se ha descrito ampliamente en la literatura [127, 138, 139], se

### 4.3. Resultados y discusión

decidió incorporar BSA y ARN-t como agentes de bloqueo en el medio de interacción. Con una concentración de ARN-t 25 nM y 1 µg/mL de BSA en el medio de interacción no se consiguió evitar la interacción de los aptámeros con los núcleos celulares (**Figura 4.4BB'**). Los resultados mejoraron considerablemente en las células A-204 aumentado cien veces la cantidad de ARN-t, pero en HT-29 no se consiguió eliminar la interacción con los núcleos en estas condiciones (**Figura 4.4CC'**).

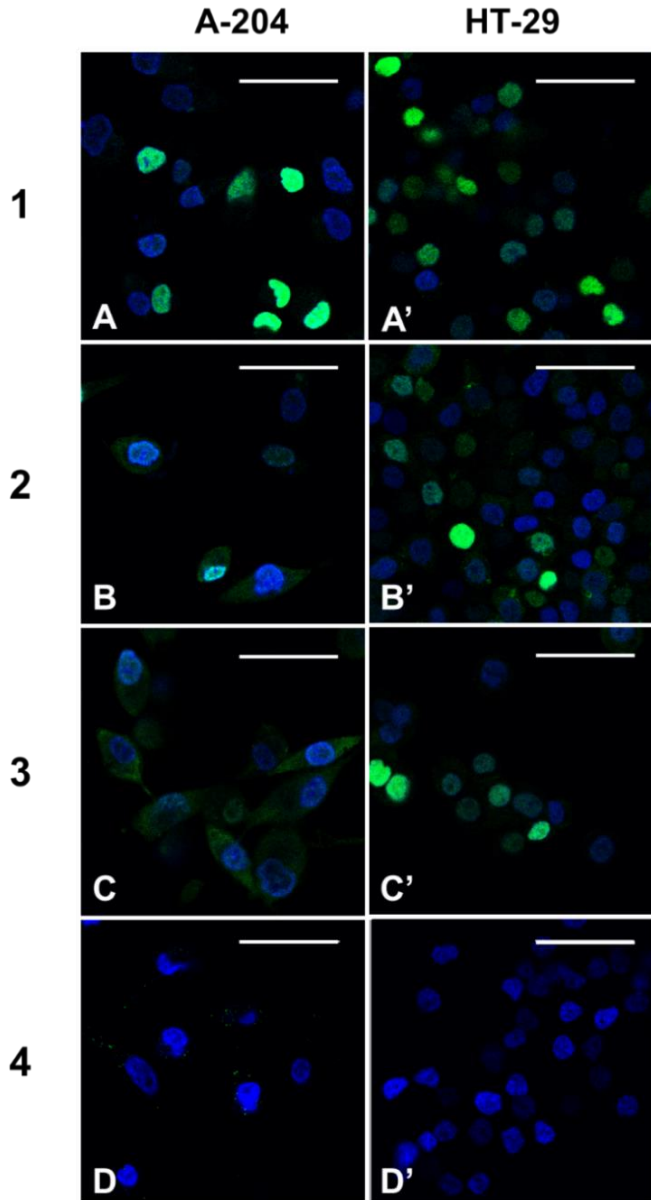
**Tabla 4.1. Condiciones evaluadas para la optimización del protocolo de aptacitoquímica.** La 2ª y 3ª columnas indican la composición del medio, duración (t) y temperatura (T) de las etapas de bloqueo e interacción, mientras que en la 4ª se indica si la fijación de las células se realizó antes o después de la interacción con los aptámeros. La concentración de ARN-t en molaridad se calculó considerando un peso molecular de 25 kDa. En negrita, se destacan los cambios introducidos en cada experimento. Para calcular la concentración de ARN-t en molaridad se consideró un peso molecular de 25 kDa.

Condiciones	Medio de bloqueo (t y T)	Medio de interacción (t y T)	Fijación
1	FBS 10%, BSA 10 mg/mL (1 h, TA)	DNA-6-FAM 250 nM (1 h, TA)	Antes
2	FBS 10% BSA 10 mg/mL (1 h, TA)	DNA-6-FAM 250 nM <b>ARN-t 25 nM</b> <b>BSA 1 µg/mL</b> (1 h, TA)	Antes
3	FBS 10% BSA 10 mg/mL (1 h, TA)	DNA-6-FAM 250 nM <b>ARN-t 2.5 µM</b> BSA 1 µg/mL (1 h, TA)	Antes
4	<b>ARN-t 40 µM</b> <b>BSA 1 mg/mL</b> (5 min, T.A.)	DNA-6-FAM <b>1 µM</b> ARN-t <b>4 µM</b> BSA <b>1 mg/mL</b> <b>(30 min, 37 °C)</b>	Después

Revisando en mayor profundidad la bibliografía, se decidió realizar la etapa de fijación de las células con formaldehído tras la interacción con las células [284], así como disminuir la duración de la etapa de interacción para minimizar la posible internalización de los aptámeros en los núcleos, y ajustar las concentraciones de ARN-t y BSA como se indica en la **Tabla 4.2**. Con estas modificaciones del protocolo de aptacitoquímica, se eliminó totalmente la señal nuclear observada causada por interacción inespecífica de los aptámeros, por lo que se decidió aplicar dichas condiciones en los siguientes experimentos. El

#### 4. Aplicaciones de aptámeros anti-colágeno XI $\alpha$ 1

protocolo completo y optimizado de los experimentos de aptacitoquímica se describe en la sección 4.2.2.



**Figura 4.4. Optimización del protocolo de aptacitoquímica.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células A-204 (+colXI $\alpha$ 1) y HT-29 (-colXI $\alpha$ 1) teñidas con aptámero D1 marcado con 6-FAM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Los números 1-4 se corresponden con las condiciones de tinción de la **Tabla 4.2**. Barra: 50  $\mu$ m.

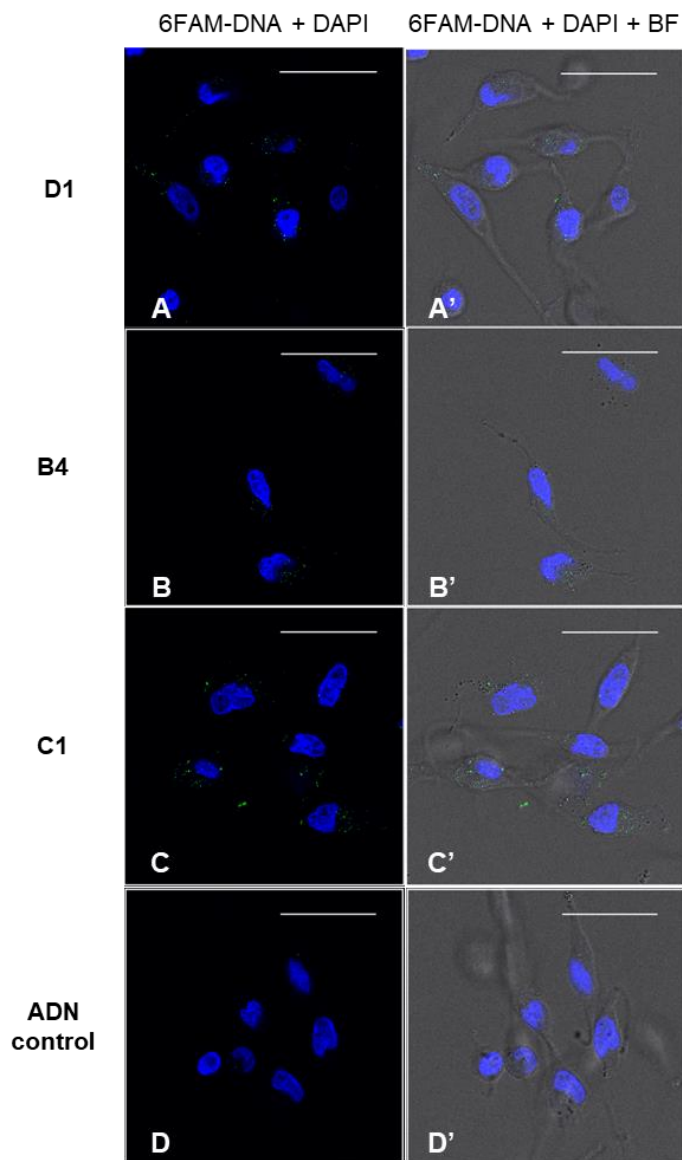
### 4.3. Resultados y discusión

Una vez optimizadas las condiciones de tinción, se estudió la interacción de los aptámeros D1, C1 y B4 marcados con 6-FAM con las líneas celulares que sobreexpresan el colágeno XI (A-204 y NCI-H661). Se realizaron dos controles negativos: tinción con los aptámeros marcados sobre la línea celular HT-29 (negativa a colXI $\alpha$ 1) y tinción con una secuencia de ADN no relacionada marcada con FITC (ADN de control) sobre las líneas positivas al marcador estudiado. Las imágenes de microscopía confocal de las células A-204, NCI-H661 y HT-29 tratadas con los aptámeros D1, B4 y C1 o el ADN de control (1  $\mu$ M) y teñidas con DAPI para la visualización de los núcleos se pueden observar en las **Figuras 4.5** (A-204), **4.6** (NCI-H661) y **4.7** (HT-29). Se utilizó microscopía de campo brillante (*bright field*, BF) para permitir la visualización del citoplasma celular.

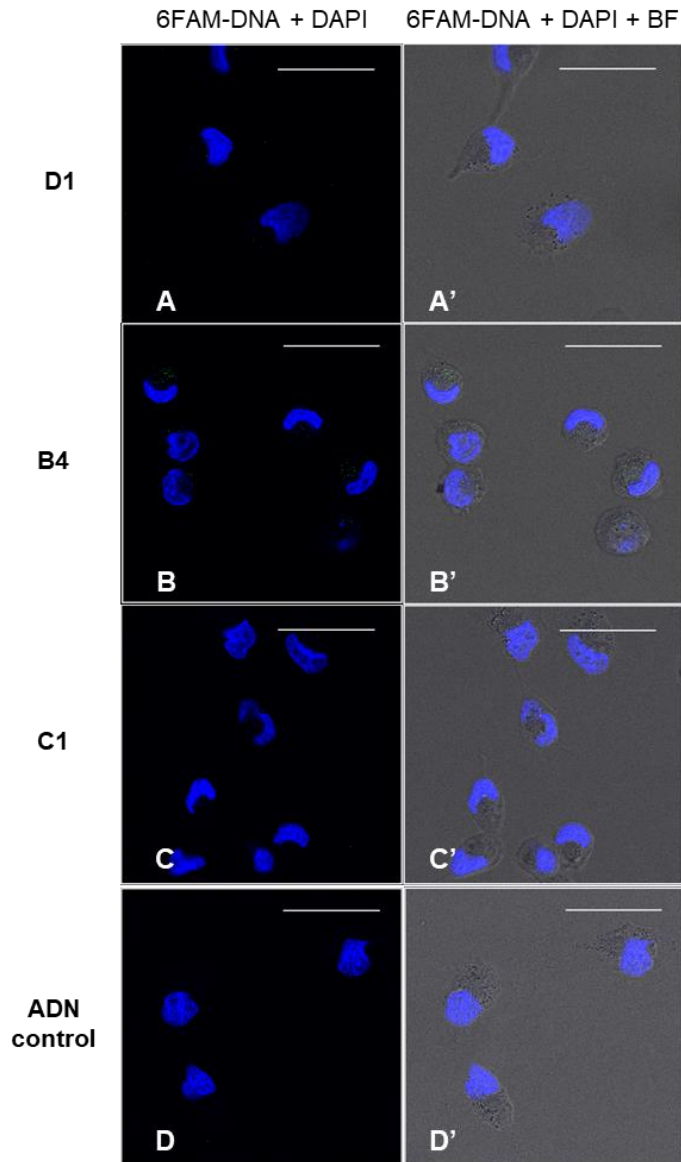
El colágeno XI $\alpha$ 1 maduro debería estar localizado en la matriz extracelular. Sin embargo, todos los aptámeros marcados con 6-FAM produjeron señales fluorescentes citoplasmáticas en las células A-204 (**Figura 4.5AA'**, **4.5BB'** y **4.5CC'** para los aptámeros D1, B4 y C1, respectivamente). La selección de los aptámeros se dirigió a un péptido de 16 aminoácidos localizado en la región del colágeno XI $\alpha$ 1 donde se espera que se escinda enzimáticamente para generar la forma madura, por analogía con la maduración del colágeno V. De este modo, los aptámeros utilizados en este trabajo pueden enlazarse a la forma de procolágeno, lo que explicaría la tinción citoplasmática que se observó. Por otro lado, no se registró ninguna señal en NCI-H661 (**Figura 4.6**), a pesar de que se conoce que esta línea celular, junto con A-204, expresa altas cantidades de colágeno XI cuando se cultiva bajo inducción por el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1.

Este hallazgo podría implicar que, en las condiciones experimentales utilizadas, las células NCI-H661 producen menos colágeno XI que las A-204, lo cual coincide con la cuantificación de la proteína mediante el uso de kits ELISA comerciales que se describe en el capítulo anterior. No se observó ninguna tinción en la línea celular de control HT-29 (**Figura 4.7**) ni en los experimentos en los que se utilizó el ADN de control en lugar de aptámeros (**Figuras 4.5DD'**, **4.6DD'** y **4.7DD'**).

#### 4. Aplicaciones de aptámeros anti-colágeno XI $\alpha$ 1



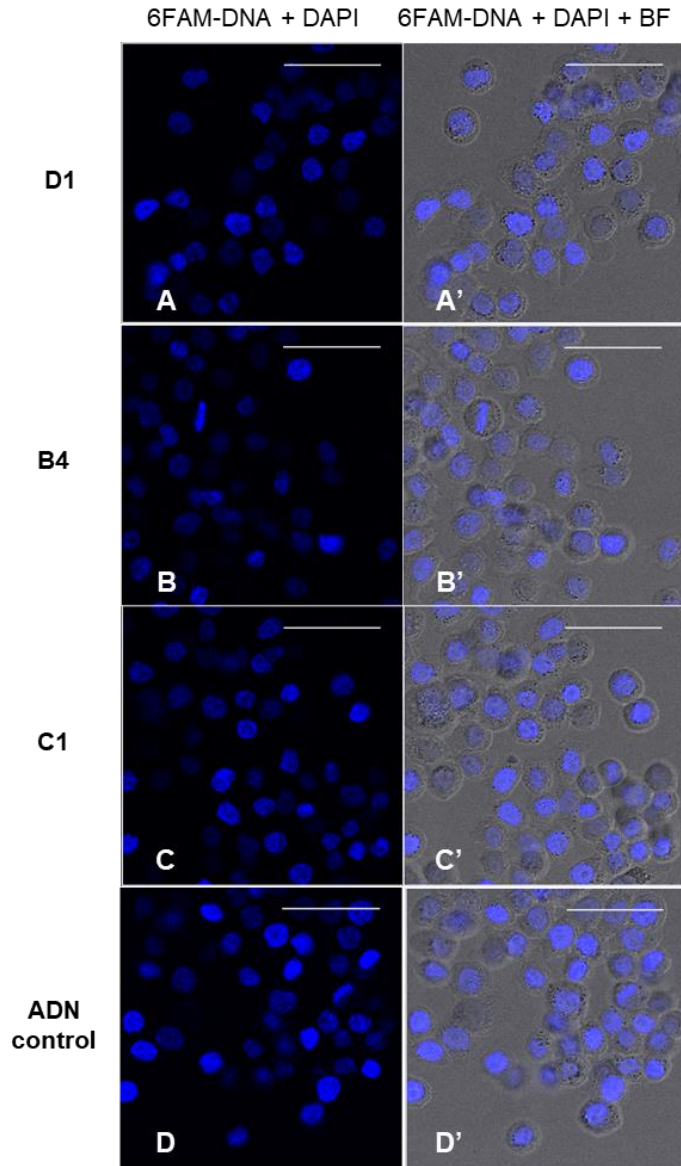
**Figura 4.5. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células A-204 (+colXI $\alpha$ 1) teñidas con disoluciones 1  $\mu$ M de aptámeros D1 (A,A'), B4 (B,B') y C1 (C,C') marcados con 6-FAM. Se realizó un control negativo utilizando un oligonucleótido no relacionado marcado con fluoresceína (D,D'). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y se utilizó microscopía de campo brillante (BF) para ayudar a la visualización de las células. Las figuras A-D muestran señales fluorescentes fusionadas de fluoresceína y DAPI, mientras que las figuras A'-D' muestran las señales fluorescentes fusionadas con una imagen de campo brillante. Barra: 50  $\mu$ m.**



**Figura 4.6. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células NCI-H661 (+col1α1) teñidas con disoluciones 1  $\mu$ M de aptámeros D1 (A,A'), B4 (B,B') y C1 (C,C') marcados con 6-FAM. Se realizó un control negativo utilizando un oligonucleótido no relacionado marcado con fluoresceína (D,D'). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y se utilizó microscopía de campo brillante (BF) para ayudar a la visualización de las células. Las figuras A-D muestran señales fluorescentes fusionadas de fluoresceína y DAPI, mientras que las figuras A'-D' muestran las señales fluorescentes fusionadas con una imagen de campo brillante. Barra: 50  $\mu$ m.**



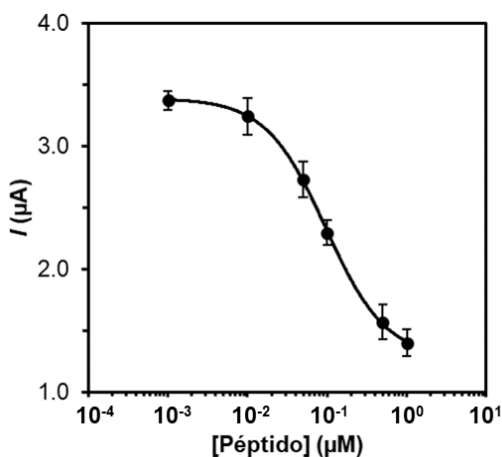
#### 4. Aplicaciones de aptámeros anti-colágeno XI $\alpha$ 1



**Figura 4.7. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células HT-29 (-colXI $\alpha$ 1) teñidas con disoluciones 1  $\mu$ M de aptámeros D1 (A,A'), B4 (B,B') y C1 (C,C') marcados con 6-FAM. Se realizó un control negativo utilizando un oligonucleótido no relacionado marcado con fluoresceína (D,D'). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y se utilizó microscopía de campo brillante (BF) para ayudar a la visualización de las células. Las figuras A-D muestran señales fluorescentes fusionadas de fluoresceína y DAPI, mientras que las figuras A'-D' muestran las señales fluorescentes fusionadas con una imagen de campo brillante. Barra: 50  $\mu$ m.**

### 4.3.3. Ensayo competitivo

Dado que todos los aptámeros de este trabajo se dirigen a un péptido pequeño, la realización de un ensayo en sándwich resulta impracticable debido a la existencia de un único sitio de unión. Por esta razón, se diseñó un ensayo competitivo utilizando PM-S-16mer. Se seleccionó una concentración fija de aptámero D1 marcado con biotina (75 nM) y se incubó con concentraciones crecientes de péptido 16mer en disolución. La concentración del aptámero se fijó en 75 nM porque esta concentración es cercana a la que produce una señal de aproximadamente el 50% de la respuesta máxima según los estudios de enlace. El marcaje enzimático y la medida cronoamperométrica dieron lugar a un ensayo de señal decreciente tal y como se esperaba (**Figura 4.8**).



**Figura 4.8.** Curva de calibrado del aptaensayo competitivo electroquímico para colXla1. El ensayo se realizó en PM-S-16mer utilizando una concentración fija de 75 nM de aptámero D1 y concentraciones crecientes de péptido 16mer en disolución. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).

Cuanto mayor es la cantidad de 16mer en disolución, menor es la cantidad de aptámero libre que puede enlazarse a la diana anclada en las PM-S-16mer. La gráfica de I frente a la concentración de 16mer es una curva sigmoidea que mostró un excelente ajuste ( $R^2 = 0.9995$ ) a la ecuación logística de 4 parámetros (**Ecuación 4.1**).

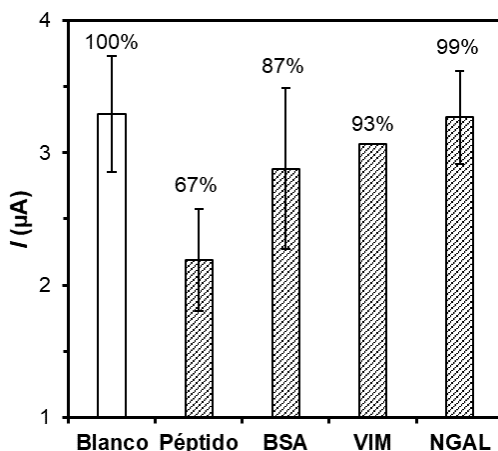
$$I(\mu\text{A}) = (1.28 \pm 0.04) + \frac{[(3.39 \pm 0.01) - (1.28 \pm 0.04)]}{1 + \left(\frac{[16mer](\mu\text{M})}{0.096 \pm 0.005}\right)^{(1.16 \pm 0.07)}} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

#### 4. Aplicaciones de aptámeros anti-colágeno XI $\alpha$ 1

El intervalo útil de medida (52-1000 nM; 95 – 1830 ng/mL) se definió como el intervalo de concentración comprendido entre el 80% y el 20% de la señal máxima (sin diana). Se estimó un límite de detección de 24 nM (44 ng/mL) como el 90% de la señal máxima. La reproducibilidad (n = 3) a 100 nM fue del 5% (RSD).

La selectividad del método se estudió utilizando varias moléculas que podrían ser potenciales interferentes:

- BSA, porque estaba presente como agente de bloqueo de las PM durante la selección de aptámeros.
- Vimentina (VIM), porque los experimentos de espectrometría de masas, junto con ensayos de enlace con detección electroquímica, revelaron que el aptámero D1 es capaz de reconocerla, pero con una afinidad mucho menor.
- Lipocalina 2 o lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), como molécula grande no relacionada.

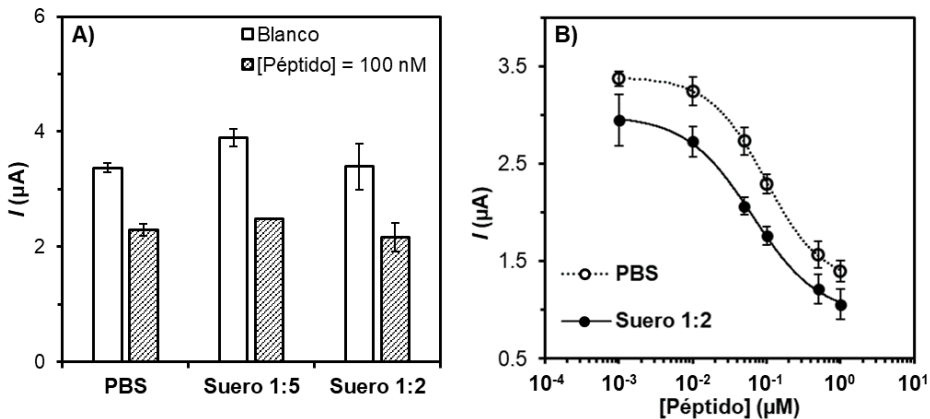


**Figura 4.9. Estudio de selectividad del ensayo competitivo.** Se muestran las corrientes obtenidas en ausencia de diana (blanco) y con 100 nM de BSA, vimentina (VIM), NGAL y 16mer utilizando una concentración fija de 75 nM de aptámero, junto con el porcentaje de la señal máxima. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).

La competencia con estas moléculas a una concentración de 100 nM dio lugar a corrientes superiores al 86% del blanco (corriente más alta) (**Figura 4.9**), lo que indica que el aptámero apenas las reconoce. La corriente para la misma concentración de 16mer fue del 67% de la señal máxima, lo que demuestra que el método es selectivo para el péptido 16mer.

#### 4.3.4. Medidas en muestras complejas

En primer lugar, se estudió el efecto de utilizar suero en lugar de PBS 1× como medio de interacción en el ensayo competitivo. En la **Figura 4.10A** se comparan las corrientes en ausencia y en presencia de 100 nM de 16mer cuando se utiliza PBS y suero diluido 5 y 2 veces con PBS 1×. La corriente en ausencia de péptido fue ligeramente superior cuando se utilizó suero 1:5, mientras que la disminución tras la adición de la 16mer es similar en los tres medios. Este resultado indica que es posible detectar el péptido en medios complejos, por lo que se seleccionó el suero menos diluido (1:2) para repetir el ensayo competitivo. Como se muestra en la **Figura 4.10B**, la curva en suero está bien definida y las corrientes son aproximadamente un 24% más bajas que en PBS, lo que confirma la viabilidad de detectar el péptido en suero sin interferencias importantes.

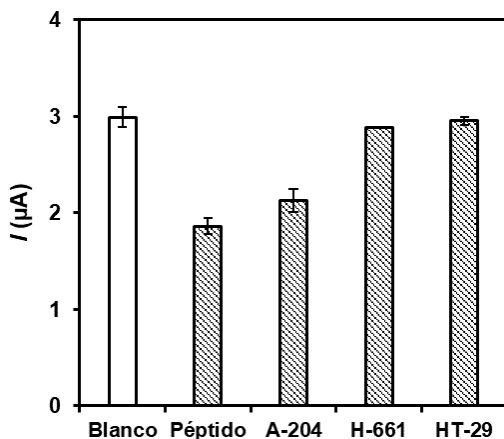


**Figura 4.10. Comportamiento del ensayo competitivo en suero.** (A) Comparación de las corrientes para el blanco (barra blanca) y 100 nM de 16mer (barra rayada) en PBS, suero diluido 1:5 y 1:2. (B) Ensayo competitivo en suero diluido 1:2 con PBS. Se muestran las curvas de calibración obtenidas tanto en PBS 1× (círculos blancos) como en suero diluido 1:2 (círculos negros). Condiciones de medida como en la Figura 4.3. Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 3$ ).

También se detectó el colágeno XI en lisados celulares. Para ello, se cultivaron y lisaron células de las líneas A-204 y NCI-H661 que expresan el colágeno XI humano, y un control negativo, la línea celular HT-29. Los lisados se centrifugaron para eliminar los restos celulares y luego se incubaron con PM-S-16mer en presencia de una concentración de aptámero D1 75 nM. Las corrientes medidas por cronoamperometría se compararon con la del blanco (sin lisado, señal máxima) y con 100 nM de péptido 16mer (**Figura 4.11**). Para A-204 se observa la mayor disminución (29%) con respecto a la señal máxima

#### 4. Aplicaciones de aptámeros anti-colágeno XI $\alpha$ 1

(blanco), lo que indica que, como se esperaba, es la línea celular con mayor concentración de colágeno XI. Por otro lado, tal y como se observó en los experimentos de aptacitoquímica, el contenido de colágeno de las células NCI-H661 es menor que el de las A-204 ya que la corriente medida está por debajo del límite de detección del ensayo competitivo propuesto. La línea celular negativa (HT-29) muestra una señal idéntica a la del blanco. Como en el caso del suero, la matriz de los lisados no produjo interferencias significativas de los medios complejos.



**Figura 4.11. Detección de colágeno XI en lisados celulares utilizando el ensayo competitivo.** Corrientes medidas para el blanco, las líneas celulares A-204, NCI-H661 y HT-29, y el péptido 16mer a concentración de 100 nM. Condiciones de medida como en la Figura 4.3. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).

#### 4.4. Conclusiones

En este capítulo se describe el desarrollo de un ensayo competitivo basado en aptámeros con detección electroquímica. Se probaron dos conjugados enzimáticos y, curiosamente, el conjugado multivalente estreptavidina-peroxidasa produjo mayores corrientes que el monovalente Fab anti-6-FAM-peroxidasa. Utilizando el primero, el aptámero D1 permitió la detección del fragmento 16mer del colágeno XI $\alpha$ 1 con un límite de detección de 44 ng/mL y un intervalo útil de medida de 95 a 1830 ng/mL. El ensayo demostró ser selectivo en presencia de posibles proteínas interferentes como la vimentina, la NGAL y la BSA, y se demostró su utilización en suero humano diluido en 1:2. Asimismo, se llevó a cabo la detección del colágeno XI $\alpha$ 1 en lisados celulares. Las células A-

#### 4.4. Conclusiones

204 que sobreexpresan el colágeno XI mostraron la mayor respuesta, mientras que la línea celular de control negativo no mostró señales distintas del blanco.

Los experimentos de aptacitofluorescencia con aptámeros marcados con 6-FAM correlacionan con los electroquímicos: se observó una débil fluorescencia y ninguna señal electroquímica en las células NCI-H661, cuya expresión de colágeno XI es menor que la de A-204. En conjunto, estos experimentos demuestran la capacidad del aptámero D1 para detectar esta diana en muestras complejas. Este ensayo competitivo podría utilizarse para validar el colágeno XI como biomarcador del cáncer.



## Evaluación de la amplificación isotérmica de aptámeros en la detección electroquímica de marcadores tumorales

### 5.1. Introducción

El diagnóstico temprano de los tumores basado en la detección de biomarcadores de cáncer en los fluidos corporales constituye una estrategia deseable en el manejo de esta enfermedad para aumentar la tasa de supervivencia de los pacientes. El descubrimiento de biomarcadores y su validación clínica dependen de la disponibilidad de receptores muy selectivos, idealmente específicos y sensibles para el reconocimiento de biomoléculas poco abundantes en matrices complejas como son los fluidos biológicos. El análisis de marcadores proteicos está restringido, en su mayor parte, a las grandes instalaciones centralizadas de los laboratorios clínicos que disponen de instrumentos automatizados para realizar los inmunoensayos [285]. Una forma para reducir los gastos sanitarios, cada vez mayores, y descentralizar los análisis es el desarrollo de dispositivos de diagnóstico POCT como el glucómetro, que se utiliza para la monitorización de glucosa en pacientes diabéticos, y cuyo fundamento operativo es un biosensor electroquímico. Para ello, se necesitan reactivos estables, y que se puedan fabricar de forma económica y reproducible. En este contexto, los aptámeros pueden ser más adecuados que los anticuerpos debido a características como su estabilidad química y térmica y la reproducibilidad entre lotes gracias a su fabricación mediante síntesis química, como se ha comentado en el Capítulo 1 de la presente tesis.

Otra ventaja de los aptámeros frente a los anticuerpos es que se pueden combinar fácilmente con métodos de amplificación isotérmica de ADN debido a su naturaleza de ácidos nucleicos [31]. Estas técnicas permiten reducir el límite de detección de los sensores basados en ADN (tanto aptasensores como genosensores) y facilitan la integración completa de todas las etapas del ensayo en una única plataforma analítica, sin necesidad de instrumentación adicional



## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

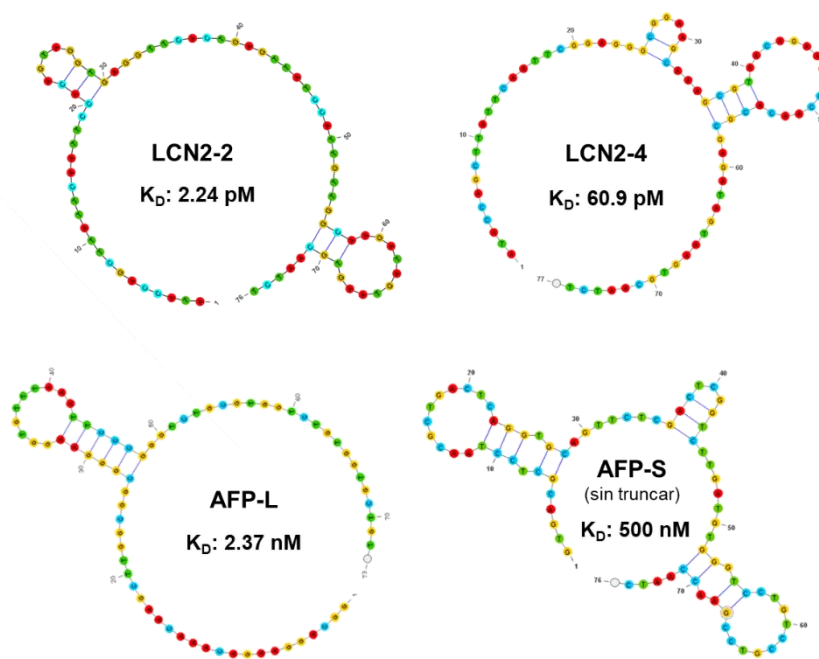
como la que se requiere en las estrategias de amplificación basadas en PCR [286–288]. Entre los métodos isotérmicos de amplificación de ADN desarrollados hasta el momento, la amplificación por círculo rodante (RCA) y la amplificación mediada por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) son de especial interés. La RCA se beneficia de la rapidez y alta fidelidad de la ADN polimerasa  $\phi 29$  para copiar miles de veces la secuencia de un molde de ADN circular previamente hibridado a un cebador, proporcionando así múltiples sitios de unión para la hibridación de sondas de detección [157]. Por otro lado, la TdT es una ADN polimerasa que cataliza la elongación del extremo 3' del ADN de hebra simple sin la necesidad de un molde y que, además, permite la incorporación de nucleótidos marcados en una proporción variable [173, 289]. Mientras que la elongación de un aptámero mediante la TdT se puede realizar directamente, para la RCA es necesario extender el aptámero (a modo de marca) con un cebador específico que permita la hibridación y circularización del molde.

Con el objetivo de evaluar la combinación de los métodos isotérmicos de amplificación de ADN con el reconocimiento específico de los aptámeros para mejorar la sensibilidad en la detección de marcadores tumorales, en este trabajo se escogieron dos aptámeros previamente seleccionados contra lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL o lipocalina-2) y dos aptámeros seleccionados contra la  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), por las siguientes razones:

- La NGAL es una glicoproteína que se ha propuesto como potencial biomarcador para el diagnóstico de adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y carcinoma hepatocelular (HCC) en combinación con otros biomarcadores [95, 290, 291]; estos aptámeros anti-NGAL, llamados LCN2-2 y LCN2-4 en el trabajo original, son uno de los pocos ejemplos de un par de aptámeros seleccionados para la misma diana, a pesar de que el SELEX proporciona docenas de receptores potenciales y además, ambos tienen una constante de disociación pM [95] (**Figura 5.1**). Ambos receptores se utilizaron en un ensayo tipo sándwich con el aptámero LCN2-4 como elemento de captura y el aptámero LCN2-2 como elemento de detección, para el análisis de NGAL en muestras de suero humano con un intervalo de medida de 2.5 a 500 ng/mL y un LD de 0.6 ng/mL [95].
- La AFP es un biomarcador de HCC ampliamente empleado en el ámbito clínico a pesar de sus limitaciones, ya que por sí sola no es suficiente para el diagnóstico, debido a que puede encontrarse en niveles elevados en patologías hepáticas benignas y teratomas o en niveles bajos en HCC pequeños [292, 293]. Para este biomarcador se han seleccionado dos aptámeros anti-AFP de ADN: el primero de 72 nucleótidos de longitud

## 5.1. Introducción

seleccionado mediante un SELEX microfluídico [294], y otro de 75 nucleótidos de longitud seleccionado mediante un SELEX basado en electroforesis capilar [295]. Se ha descrito el empleo de estos aptámeros en aplicaciones de diagnóstico [294, 295], que muestran que ambos se caracterizan por  $K_D$  muy diferentes. Así con el primero de ellos se describieron LD de 6.97 ag/mL [296] y 259 ng/mL [297], mientras que para el segundo se han alcanzado detectabilidades de 0.23 pg/mL [77] y 500 ng/mL [298]. De este segundo aptámero se utiliza una versión truncada denominada AFP-S (*short*), en la que se eliminan las regiones constantes de los extremos, ya que en otros trabajos se comprobó que el aptámero truncado mantiene la afinidad por la AFP [299, 300]. El aptámero de 72 nucleótidos se utiliza completo y se denomina AFP-L (*long*) (**Figura 5.1**).



**Figura 5.1. Estructuras secundarias y constantes de disociación ( $K_D$ ) de los aptámeros anti-NGAL y anti-AFP utilizados en este trabajo. Código de colores: rojo (A), amarillo (G), azul (C) y verde (T).**

La caracterización exhaustiva de la interacción aptámero-diana es el último paso del proceso de selección, pero el más importante, ya que proporciona información muy valiosa sobre la afinidad del receptor (generalmente expresada en términos de la constante de disociación) y la secuencia mínima necesaria para el enlace. Sin embargo, no es una tarea fácil porque la determinación de la  $K_D$

## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

depende en gran medida de la naturaleza y la sensibilidad de la técnica seleccionada, que con frecuencia hace que se sobrestimen las afinidades aparentes. Se han utilizado muchas técnicas diferentes basadas en la evaluación de la reacción de formación del complejo aptámero-diana desde el punto de vista cinético o en el análisis de equilibrio [53]; la mayoría de ellas requieren marcaje y/o inmovilización del aptámero y la diana, lo que puede alterar la afinidad. Las discrepancias superiores a dos órdenes de magnitud para moléculas pequeñas como la tobramicina [301] o proteínas como la trombina [302] aconsejan utilizar más de un método para evaluar la afinidad.

En este capítulo, se ha estudiado la afinidad de los aptámeros seleccionados contra los marcadores tumorales NGAL y AFP mediante ensayos directos heterogéneos con detección electroquímica, inmovilizando los biomarcadores en partículas magnéticas. Además, se ha evaluado el acoplamiento de dos estrategias de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, la RCA y la TdT, a ensayos basados en estos aptámeros para mejorar la sensibilidad en la detección de los biomarcadores tumorales.

### 5.2. Materiales y métodos

Los reactivos e instrumentos utilizados en este capítulo se detallan en el **Anexo A**. La modificación de partículas magnéticas tosilactivadas (PM-T) con NGAL y AFP se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2.5.1, utilizando 60  $\mu\text{g}$  de NAGL y 50  $\mu\text{g}$  de AFP en lugar de 100  $\mu\text{g}$  de proteína. La cantidad de proteína inmovilizada en las partículas se determinó por el método Bradford tal y como se describe en la sección 3.2.6.

#### 5.2.1. RCA sobre electrodos serigrafados de oro

##### 5.2.1.1. Limpieza y acondicionamiento electroquímico de los SPAuE

Antes de su uso, los electrodos serigrafados de oro (SPAuE) se limpiaron con etanol y agua desionizada, y se secaron con una corriente de nitrógeno. A continuación, se llevó a cabo un acondicionamiento electroquímico, cubriendo la celda con 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M y aplicando un potencial de +1.3 V durante 30 s seguido de barridos de potencial entre 0 y +1.3 V, a una velocidad de barrido de 100 mV/s hasta que se registró un voltamperograma cíclico estable. Finalmente, los electrodos se lavaron con agua y se secaron con nitrógeno.

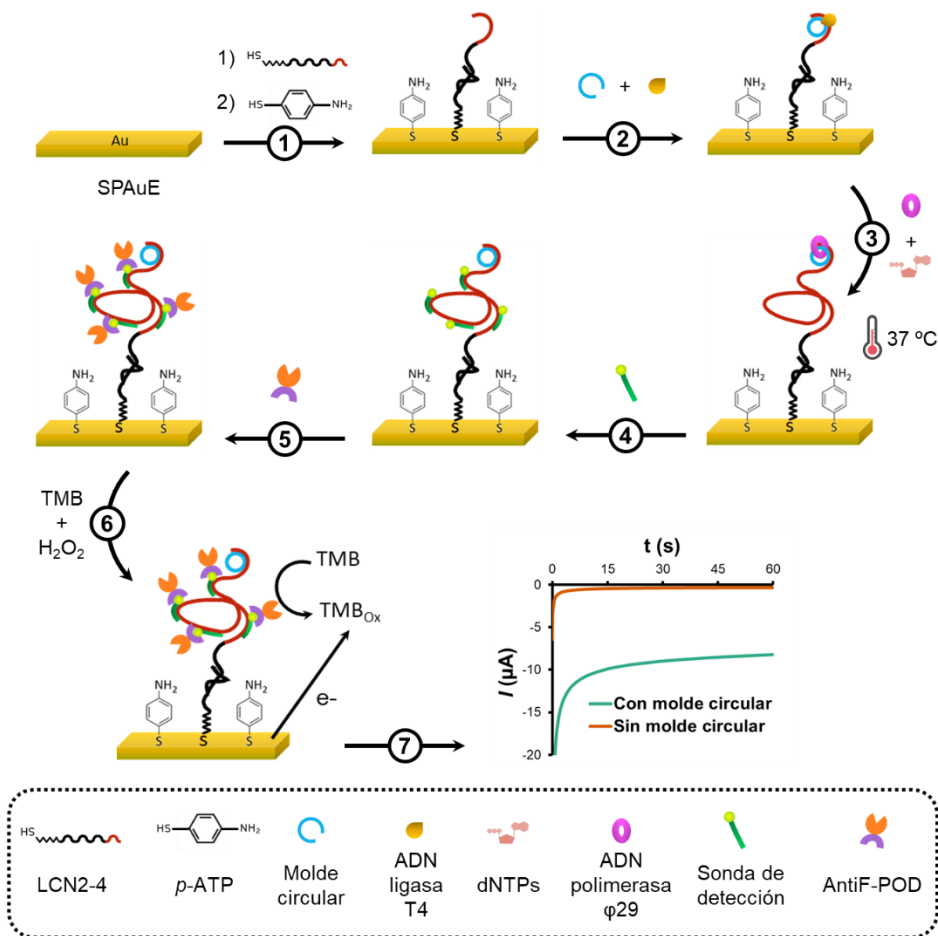
### 5.2.1.2. Formación de una SAM mixta de ADN/*p*-ATP sobre SPAuE

Una vez realizado el acondicionamiento indicado anteriormente, se preparó una monocapa autoensamblada (SAM) mixta de aptámero LCN2-4 y 4-aminotiofenol (*p*-ATP) sobre el electrodo de trabajo. Para ello el electrodo se trató primero con 10  $\mu\text{L}$  de una disolución 1  $\mu\text{M}$  de aptámero tiolado LCN2-4 en PBS 1 $\times$  y se incubó durante toda la noche en una atmósfera saturada de agua a 4  $^{\circ}\text{C}$  (**Figura 5.2**, etapa 1). Después, se lavó con PBS 1 $\times$ , y se cubrió con 10  $\mu\text{L}$  de una disolución 1 mM de *p*-ATP en PBS 1 $\times$ . Tras incubar durante 50 min a TA (paso 2) se realizó un nuevo lavado con PBS 1 $\times$ .

### 5.2.1.3. RCA y detección electroquímica del aptámero elongado

El electrodo de trabajo modificado con la SAM mixta de LCN2-4/*p*-ATP se cubrió con una disolución que contenía molde de la RCA 10 nM y 0.125 Weiss/ $\mu\text{L}$  de ADN ligasa T4 en medio de reacción 1 $\times$  y se incubó a TA durante 30 minutos para permitir la hibridación y circularización del molde (**Figura 5.2**, etapa 2). A continuación, el electrodo se lavó con PBS 1 $\times$  y se cubrió con una disolución de ADN polimerasa  $\phi 29$  0.25 U/ $\mu\text{L}$  y dNTPs 0.5 mM en el medio de reacción 1 $\times$ . La amplificación de círculo rodante se llevó a cabo durante 15 min a 37  $^{\circ}\text{C}$  en una estufa (**Figura 5.2**, etapa 3). Después de un lavado exhaustivo con PBS 1 $\times$ , el electrodo de trabajo se trató con una disolución 100 nM de sonda de detección marcada con 6-FAM preparada en PBS 1 $\times$  y se incubó durante 30 min a TA y protegida de la luz (**Figura 5.2**, etapa 4). A continuación, el electrodo se lavó con PBS 1 $\times$  y se cubrió una disolución de antiF-POD diluido a 0.5 U/mL en PBS 1 $\times$  con 0.5% de caseína como agente de bloqueo (**Figura 5.2**, etapa 5). Esta etapa de marcaje enzimático se llevó a cabo a TA durante 30 min y protegida de la luz. Tras un lavado con PBS 1 $\times$ , la celda se cubrió con 40  $\mu\text{L}$  de la disolución de sustrato TMB durante 30 s e inmediatamente se realizó la cronoamperometría aplicando un potencial de -0.2 V durante 60 s, registrando un valor de corriente cada 0.2 s (**Figura 5.2**, etapa 6). Como señal analítica se tomó el valor absoluto del promedio de los últimos 10 s de medida.

## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros



**Figura 5.2. Representación esquemática del protocolo de RCA sobre SPAuE.** (1) Formación de la SAM mixta ADN/p-ATP, (2) hibridación del molde y ligación, (3) RCA, (4) hibridación de la sonda de detección, (5) marcaje enzimático, (6) reacción enzimática y medida cronoamperométrica, (7) cronoamperogramas obtenidos en presencia (verde) y ausencia (naranja) de molde circular.

### 5.2.2. Estudio de la amplificación TdT mediante electroforesis en gel

La amplificación mediada por TdT se realizó en disolución, incubando 20 µL de la mezcla de reacción (1.5 µM de aptámero AFP-S-TdT, 1.5 U/µL de TdT, 500 µM de dATP y 0 – 50 µM de biotina-dATP) preparada en tampón de reacción 1×, durante 1 h a 37 °C con agitación suave. Después, se añadieron 5 µL de sonda T<sub>40</sub> 10 µM y la mezcla se calentó a 70 °C durante 10 minutos para desnaturalizar la enzima. A continuación, la disolución se enfrió a TA para permitir la

hibridación entre el aptámero extendido con una cola de poli-A y la sonda T<sub>40</sub>, dando lugar a un ADN de doble hebra. Seguidamente, se mezcló un volumen de 5 µL de este producto con 1 µL de tampón de carga 6× y se cargó en un gel de agarosa al 2% (preparado en TBE 1× con colorante SimplySafe DNA satining dye diluido 1:10000 para visualizar posteriormente el ADN mediante luz UV). La electroforesis se realizó durante 45 minutos aplicando una diferencia de potencial de 80 V. Las bandas de ADN se revelaron bajo una lámpara UV, y el tamaño del aptámero alargado se estimó por comparación de su desplazamiento en el gel con el de una escalera de ADN de 20 pares de bases.

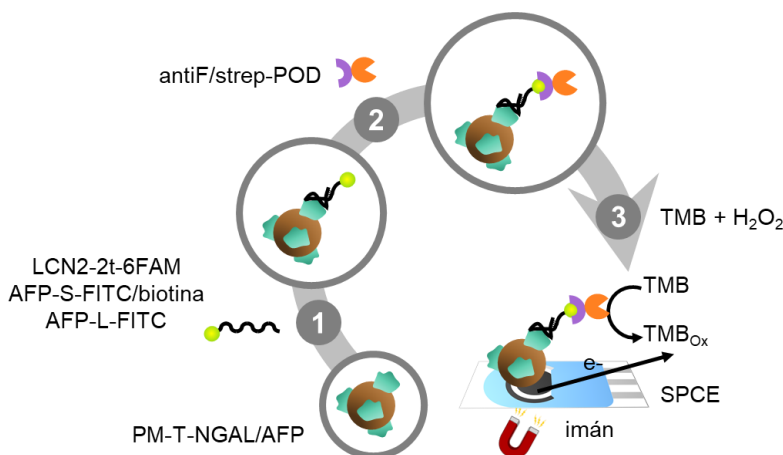
### 5.2.3. Ensayos directos con partículas magnéticas tosilactivadas modificadas con NGAL o AFP

En primer lugar, se reconstituyeron 60 µg de PM-T modificadas con NGAL o AFP en 250 µL de disoluciones con concentraciones crecientes de aptámeros anti-AFP o anti-NGAL preparadas en 1× PBS, y se incubaron durante 30 minutos a 25 °C, con agitación continua a 1300 rpm (**Figuras 5.3-5.5**, etapa 1). A continuación, se descartó el sobrenadante y las PM se lavaron dos veces con PBS 1× + 0.01% Tween 20.

#### 5.2.3.1. Curvas de enlace sin amplificación de ADN

Cuando no se realizaron técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para aumentar la señal, tras la incubación con los aptámeros (AFP-S, AFP-L o LCN2-2t) se llevó a cabo la unión de un conjugado enzimático. Para ello, las PM se resuspendieron en un volumen de 250 µL de conjugado antiF-POD (0.5 U/mL en PBS 1× + 0.5% caseína) o strep-POD (2.5 µg/mL en PBS 1× + 0.01% Tween 20), dependiendo de la marca del aptámero, y se incubaron durante 30 minutos a 25 °C, con agitación continua (**Figura 5.3**, etapa 2). Tras dos lavados con PBS 1× + 0.01% Tween 20 y uno con PBS 1×, las PM se resuspendieron en 30 µL de este último tampón PBS 1×. Para la medida electroquímica, se depositaron 10 µL de PM sobre el electrodo de trabajo del SPCE con un imán de neodimio circular de 4 mm de diámetro colocado previamente debajo. De esta manera, las PM se distribuyeron en la superficie electrodo y se atraparon magnéticamente durante 1 min. Por último, se añadieron 40 µL de una disolución de TMB lista para usar y la reacción enzimática se incubó durante 60 s a TA. La cronoamperometría se realizó inmediatamente después a 0 V durante 60 s (**Figura 5.3**, etapa 3).

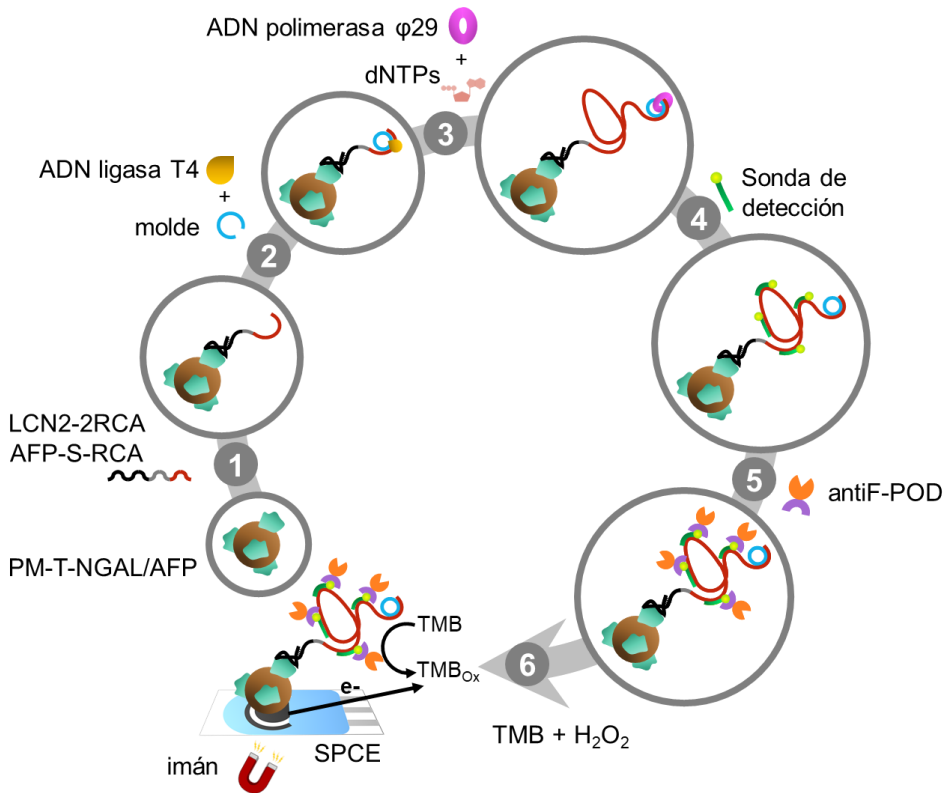
## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros



**Figura 5.3.** Representación esquemática de la metodología empleada para la obtención de curvas de enlace sin amplificación de ADN sobre PM-T modificadas con NGAL o AFP. 1. Enlace del aptámero; 2. Marcaje enzimático con strep-POD o antiF-POD; 3. Atrapamiento magnético de las PM sobre SPCE, adición del sustrato TMB, reacción enzimática y medida cronoamperométrica.

### 5.2.3.2. Curvas de enlace con amplificación RCA

En el caso de la RCA, tras la incubación con aptámeros (AFP-S-RCA o LCN2-2RCA) y los lavados, las PM se resuspendieron en 30  $\mu\text{L}$  de mezcla de ligación, que contenía 0.125 Weiss/ $\mu\text{L}$  de ADN ligasa T4 y molde 10 nM en medio de reacción 1 $\times$ , y se incubaron durante 30 min a 25  $^{\circ}\text{C}$ , bajo agitación continua (**Figura 5.4**, etapa 2). Después de dos lavados con PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20, las PM se resuspendieron en 30  $\mu\text{L}$  de mezcla de RCA, que contenía 0.25 U/ $\mu\text{L}$  de ADN polimerasa  $\phi 29$  y dNTPs 500  $\mu\text{M}$  en medio de reacción 1 $\times$ , y la amplificación se llevó a cabo durante 15 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$ , con agitación (**Figura 5.4**, etapa 3). A continuación, las PM se lavaron 2 veces con PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20 y se incubaron con 250  $\mu\text{L}$  de sonda de detección 100 nM en PBS 1 $\times$  durante 30 min a 25  $^{\circ}\text{C}$  (**Figura 5.4**, etapa 4). El marcaje enzimático con antiF-POD (**Figura 5.4**, etapa 5), la reacción enzimática de TMB y la medida cronoamperométrica (**Figura 5.4**, etapa 6) se realizaron como se indica en la sección 5.2.3.1.



**Figura 5.4. Representación esquemática de la metodología empleada para la obtención de curvas de enlace con amplificación RCA sobre PM-T modificadas con NGAL o AFP.** 1. Enlace del aptámero; 2. Hibridación y ligación del molde; 3. RCA; 4. Hibridación de la sonda de detección marcada con 6-FAM; 5. Marcaje enzimático con antiF-POD; 6. Atrapamiento magnético de las PM sobre SPCE, adición del sustrato TMB, reacción enzimática y medida cronamperométrica.

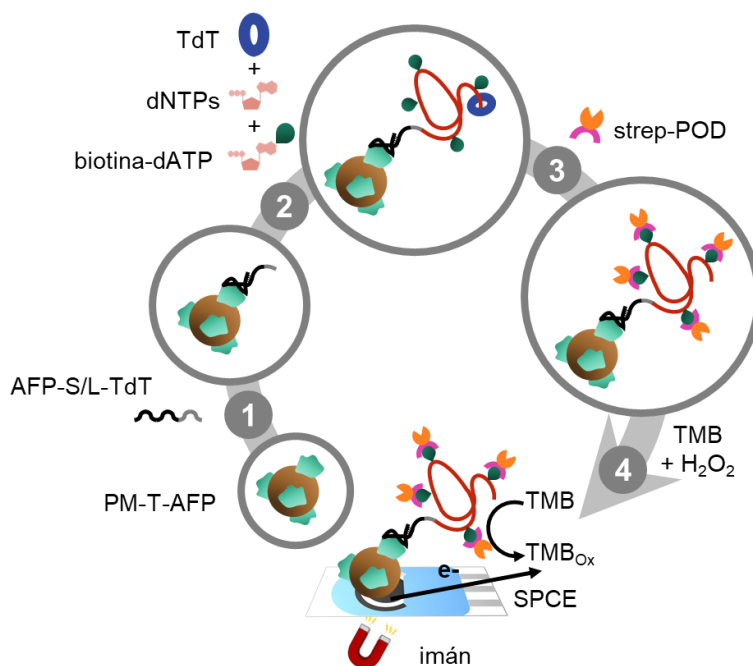
### 5.2.3.3. Curvas de enlace con amplificación mediada por TdT

Cuando se utilizó la amplificación TdT, la etapa siguiente a la incubación con aptámeros anti-AFP (AFP-L-TdT o AFP-S-TdT) fue la reacción de amplificación. Para ello, las PM se resuspendieron en 50  $\mu$ L de mezcla de TdT, que contenía 0.2 U/ $\mu$ L de TdT,  $CoCl_2$  0.25 mM, dNTPs 500  $\mu$ M y biotina-dATP 25  $\mu$ M, preparada en tampón de reacción 1 $\times$ . La amplificación se llevó a cabo durante 1 hora a 37  $^{\circ}$ C, con agitación continua (**Figura 5.5**, etapa 2). A continuación, se descartó el sobrenadante y las PM se lavaron dos veces con PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20. El marcaje enzimático con strep-POD (**Figura 5.5**, etapa



## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

3), la reacción enzimática de TMB y la medida cronoamperométrica (Figura 5.5, etapa 4) se realizaron como se indica en la sección 5.2.3.1.



**Figura 5.5. Representación esquemática de la metodología empleada para la obtención de curvas de enlace con amplificación TdT sobre PM-T modificadas con AFP.** 1. Enlace del aptámero; 2. Amplificación TdT; 3. Marcatez enzimático con strep-POD; 4. Atrapamiento magnético de las PM sobre SPCE, adición del sustrato TMB, reacción enzimática y medida cronoamperométrica.

### 5.2.4. Aptaensayos sobre partículas magnéticas para la detección de NGAL

#### 5.2.4.1. Aptaensayo competitivo sobre partículas magnéticas tosilactivadas modificadas con NGAL

En primer lugar, se resuspendieron 60  $\mu\text{g}$  de partículas magnéticas tosilactivadas modificadas con NGAL (PM-T-NGAL) en 250  $\mu\text{L}$  de una disolución que contenía aptámero 15 pM (LCN2-2RCA o LCN2-2t-6FAM) y concentraciones variables de NGAL y la mezcla se incubó durante 30 min a TA con agitación en la rueda de mezcla. El complejo aptámero-NGAL en disolución se separó del complejo sobre las PM eliminando el sobrenadante. Finalmente, se realizaron dos lavados sucesivos en PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20 y PBS 1 $\times$  antes

de llevar a cabo la RCA o la amplificación de la señal enzimática convencional, seguida de la detección, como se ha indicado anteriormente.

### 5.2.4.2. Modificación de partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina con aptámero biotinilado

El procedimiento que se siguió para modificar las partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina (PM-S) con aptámero biotinilado es similar al descrito en la sección 3.2.5.4. Se transfirieron 25  $\mu\text{L}$  de la disolución comercial de PM-S a un tubo y se lavaron primero con 250  $\mu\text{L}$  de SSPE 2 $\times$  + 0.005% Tween 20 y después con 250  $\mu\text{L}$  de SSPE 2 $\times$ . Tras eliminar el sobrenadante, se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de una disolución de aptámero biotinilado (LCN2-2t o LCN2-4t) 1  $\mu\text{M}$  preparada en SSPE 2 $\times$  y las PM-S se incubaron durante 30 min a 30  $^{\circ}\text{C}$  y 650 rpm. A continuación, las partículas se lavaron dos veces, primero con 250  $\mu\text{L}$  de SSPE 2 $\times$  + 0.005% Tween 20 y después con 250  $\mu\text{L}$  de SSPE 2 $\times$ . Una vez realizados los lavados, las PM se reconstituyeron 250  $\mu\text{L}$  de una disolución de biotina 500  $\mu\text{M}$  preparada en SSPE 2 $\times$  y se incubaron durante 30 min a TA con agitación. Por último, tras dos lavados con SSPE 2 $\times$  + 0.005% Tween 20 y SSPE 2 $\times$ , las PM-S modificadas con aptámero se reconstituyeron en 250  $\mu\text{L}$  de PBS 1 $\times$  y se almacenaron a 4  $^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

### 5.2.4.3. Aptaensayos sándwich sobre PM-S

Se realizaron aptaensayos sándwich con 3 configuraciones diferentes: normal, utilizando LCN2-4t como aptámero de captura y LCN2-2t como aptámero de detección, imitando el formato del trabajo original [95]; invertida, con LCN2-2t como aptámero de captura y LCN2-4t como aptámero de detección; simétrica, con LCN2-t como aptámero de captura de detección.

En primer lugar, se resuspendieron 25  $\mu\text{L}$  de PM-S recubiertas de aptámero de captura biotinilado (LCN2-2t para configuraciones simétrica e invertida o LCN2-4t para configuración normal) en 250  $\mu\text{L}$  de disoluciones de NGAL preparadas en PBS 1 $\times$  + 0.1% BSA, con concentraciones de proteína diana en el intervalo de 0 – 500 ng/mL. La incubación de la proteína se realizó durante 30 minutos a 25  $^{\circ}\text{C}$  bajo agitación constante en el Thermomixer. A continuación, las PM se lavaron dos veces con PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20, se resuspendieron en 250  $\mu\text{L}$  de aptámero de detección 100 nM (LCN2-2t para configuraciones simétrica y normal o LCN2-4t para configuración invertida) en PBS 1 $\times$  y se incubaron durante 30 min a 25  $^{\circ}\text{C}$  en el Thermomixer, con agitación constante. Tras dos lavados con PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20, la etapa de marcaje enzimático

## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

se llevó a cabo resuspendiendo las PM en 250  $\mu\text{L}$  de antiF-POD (0.5 U/mL preparado en PBS 1 $\times$  + 0.5% caseína) o de strep-POD ( $4 \times 10^{-3}$  g/L preparado en SSPE 5 $\times$  + 2% BSA + 0.005% Tween 20, equivalente a 0.5 U/mL de peroxidasa) en función de la marca de aptámero de detección, 6-FAM o biotina. La suspensión resultante se incubó durante 30 minutos a 25 °C con agitación constante. A continuación, las partículas se lavaron dos veces con PBS 1 $\times$  + 0.01% Tween 20 y una vez con PBS 1 $\times$ , y finalmente se reconstituyeron en 25  $\mu\text{L}$  de PBS 1 $\times$ . La reacción enzimática y la medida cronoamperométrica se llevaron a cabo como se ha mencionado anteriormente.

### 5.2.5. Estudio de la afinidad del aptámero LCN2-2t

#### 5.2.5.1. Espectroscopia de resonancia de plasmón superficial (SPR)

En primer lugar, el disco sensor de oro (XanTec Bioanalytics) se limpió por inmersión en disolución de piraña (3  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95%) : 1  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%)) durante 10 minutos, se lavó exhaustivamente con agua y etanol y se secó bajo una corriente de  $\text{N}_2$ . A continuación, el disco se cubrió con una mezcla 250  $\mu\text{M}$  de ácido 11-mercaptoundecanoico y 750  $\mu\text{M}$  de 6-mercaptohexanol en etanol y se incubó toda la noche a 4 °C en una atmósfera saturada de agua, formando así una SAM mixta con grupos carboxílicos. Tras la formación de la SAM, lavar con etanol y secar con  $\text{N}_2$ , el disco se colocó sobre el prisma semicilíndrico del instrumento SPR, previamente recubierto con una capa de aceite de inmersión (Autolab, Methrom, Países Bajos), que posee un índice de refracción constante ( $n_D$  (25 °C) =  $1.518 \pm 0.002$ ) igual al del prisma. Seguidamente, se inyectaron 70  $\mu\text{L}$  de agua tres veces en ambos canales y se equilibró la superficie con medio de modificación (acetato de sodio 10 mM, pH 5.5) hasta obtener una respuesta constante. Una vez hecho esto, se llevó a cabo la activación de los grupos carboxílicos de la SAM mediante 3 inyecciones consecutivas de 10 minutos de 50  $\mu\text{L}$  de una mezcla acuosa de EDC 200 mM y NHS 50 mM. Tras un breve lavado con medio de modificación, se realizó la inmovilización de NGAL inyectando 50  $\mu\text{L}$  de una disolución 50  $\mu\text{g/mL}$  de proteína durante 20 min en medio de modificación. Por último, los grupos carboxílicos sin reaccionar se bloquearon primero con 200  $\mu\text{g/mL}$  de BSA en medio de modificación durante 5 min y luego con etanolamina 1 M en PBS 1 $\times$  durante 15 min.

El disco sensor de Au modificado con NGAL se utilizó para estudiar la afinidad del aptámero LCN2-2t en PBS 1 $\times$  (medio de interacción). Cada experimento de enlace consta de las etapas de adquisición de la línea de base, asociación y disociación como se indica a continuación. Tras obtener una señal

## 5.2. Materiales y métodos

estable mediante la adquisición de varias líneas de base en medio de interacción, en uno de los canales se realizaron inyecciones de 35  $\mu\text{L}$  de disoluciones de concentraciones crecientes de aptámero preparadas en PBS 1 $\times$ , mientras que en el otro canal solo se inyectó medio de interacción, y se registró la fase de asociación durante 10 min. Después de vaciar las cubetas, se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  de PBS 1 $\times$  y se monitorizó la fase de disociación durante 5 min, lo que provocó una disminución del ángulo de resonancia debido a la pérdida del aptámero débilmente unido, hasta que se alcanzó un valor estable. La diferencia entre el ángulo de resonancia, en  $m^\circ$ , antes y después de la etapa de asociación es una medida de la cantidad de aptámero unido específicamente a la NGAL siempre que se reste la señal correspondiente monitorizada en el canal de referencia. Todos los pasos se registraron bajo agitación con agujas para evitar que la cinética de reacción esté controlada por la velocidad del proceso de transferencia de masa.

### 5.2.5.2. Termoforesis a microescala (MST)

Las medidas de MST se llevaron a cabo en la Unidad de Cribado Biomolecular y Tecnologías de Proteínas del Centro de Regulación Genómica (CRG) de Barcelona (España) con un instrumento de MST Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) a un 20% de potencia de led y a un 40% de potencia de MST empleando tubos capilares. En estos experimentos se utilizó una concentración constante de 60 nM del aptámero LCN2-2Rt marcado con 6-FAM y se incubó con concentraciones crecientes de NGAL (hasta 1.2  $\mu\text{M}$ ) en PBS 1 $\times$  + 0.1% BSA o PBS 1 $\times$  + 0.05% de Tween 20 + 0.2% BSA durante 15 minutos.

## 5.3. Resultados y discusión

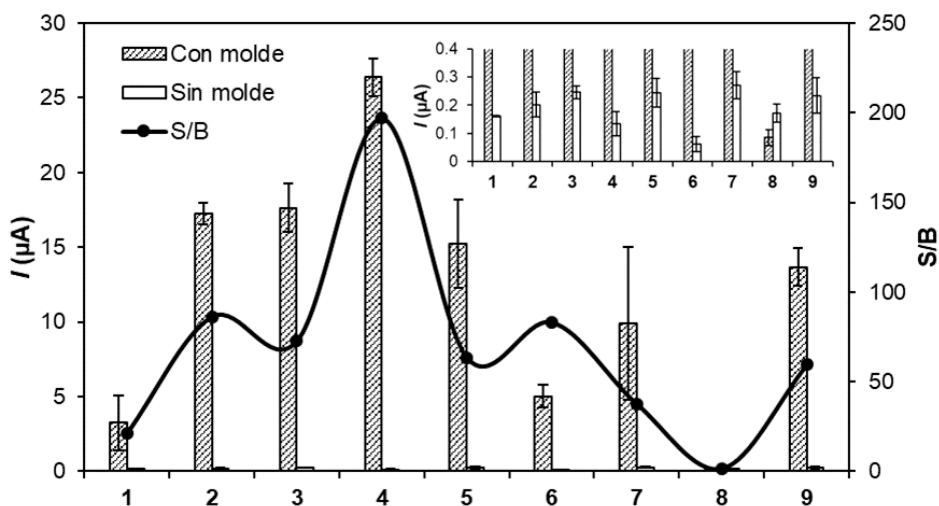
### 5.3.1. Detección de NGAL

#### 5.3.1.1. Optimización de la RCA sobre SPAuE

Las estrategias de amplificación isotérmica pueden emplearse en combinación con aptámeros para mejorar la detectabilidad de las dianas para las cuales se han seleccionado los aptámeros. Con este objetivo, se diseñó y optimizó una metodología de amplificación de círculo rodante (RCA) utilizando el aptámero tiolado LCN2-4, inmovilizado por quimisorción en SPAuE. Además, se diseñó un molde circularizable que hibrida con el extremo 3' de este aptámero, que corresponde con el sitio de unión del cebador que no fue truncado (**Tabla A.3**). La RCA requiere de tres etapas: 1) hibridación del molde con el aptámero;

## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

2) ligación del molde circular (circularización) y 3) amplificación del molde circular y elongación del aptámero. La detección del producto de amplificación se llevó a cabo mediante la hibridación de una sonda de detección de ADN marcada con 6-FAM, complementaria a las múltiples copias generadas del molde circular, seguida del marcaje enzimático con antiF-POD y la medida cronoamperométrica (**Figura 5.6**).



**Figura 5.6. Optimización de la RCA en SPAuE utilizando el aptámero LCN2-4 en una SAM mixta.** Se muestran las corrientes cronoamperométricas en presencia (barra con trama) y ausencia (barra blanca, ampliada en el recuadro) de molde, así como la relación señal/blanco (S/B). Las condiciones detalladas de cada uno de los nueve experimentos se resumen en la **Tabla 5.1**. Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 2$ ).

En los experimentos preliminares se observaron diferencias significativas entre las señales del blanco, al que no se le añadió molde circular,  $160 \pm 3$  nA, y con molde circular 100 nM,  $3.4 \pm 1.8$   $\mu\text{A}$ . Inicialmente, las etapas de hibridación y ligación del molde circular se llevaron a cabo por separado, pero al realizar estas dos reacciones en una sola etapa se obtuvieron mejores resultados,  $17.9 \pm 0.8$   $\mu\text{M}$  con corrientes de blanco de  $202 \pm 44$  nA, por lo que en los experimentos posteriores se decidió juntar ambos pasos acortando el tiempo de ensayo. Las elevadas corrientes registradas sugieren que algunas condiciones experimentales pueden optimizarse para reducir el coste y el tiempo del ensayo, por lo que se investigó la reducción de las concentraciones de ligasa T4, polimerasa  $\phi 29$ , molde y sonda de detección, así como los tiempos de hibridación-ligación, amplificación, hibridación de la sonda de detección e incubación del conjugado enzimático. En la **Figura 5.6** se muestran las corrientes registradas en varias condiciones ensayadas (**Tabla 5.1**) con y sin el molde circular, así como la correspondiente

### 5.3. Resultados y discusión

relación señal/blanco (S/B). Los medios de reacción de la ligasa y la polimerasa contienen ditiotretiol (DTT) en altas concentraciones (10 y 1 mM, respectivamente), el cual puede desplazar los oligonucleótidos quimisorbidos de la superficie, por lo que disminuir la concentración y el tiempo de interacción con estos medios fue beneficioso en términos de la señal analítica específica.

**Tabla 5.1. Condiciones detalladas en las que se realizó la optimización de la RCA representada en la Figura 5.6.** Los cambios se han resaltado en gris para mayor claridad.

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>(2) Hibridación y ligación del molde</b>									
[Molde] ( $\mu\text{M}$ )	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05	0.05	0.01	0.01
[Ligasa] (Weiss/ $\mu\text{L}$ )	1	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
t (min)	60+60	60	60	60	60	60	30	30	30
<b>(3) RCA</b>									
[dNTPs] (mM)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
[Polimerasa] (U/ $\mu\text{L}$ )	1	1	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
t (min)	60	60	60	30	15	15	15	15	15
<b>(4) Hibridación de la sonda de detección</b>									
[Sonda] ( $\mu\text{M}$ )	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
<b>(5) Marcaje enzimático</b>									
[antiF-POD] (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
<b>t total (h)</b>	<b>4.5</b>	<b>3.5</b>	<b>3.5</b>	<b>3</b>	<b>3.75</b>	<b>2.25</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>

Tras estas modificaciones, se obtuvo la mayor relación S/B para las condiciones utilizadas en el experimento 4 (**Tabla 5.1**) como se muestra en la **Figura 5.6**. No obstante, las corrientes seguían siendo elevadas, por lo que se prosiguió con la optimización. El parámetro más influyente en la señal analítica fue la concentración de la sonda de detección, que finalmente se estableció en 100 nM. Las condiciones finales indicadas en la **Tabla 5.2** se seleccionaron en base a un consenso entre la relación S/B, el tiempo de ensayo y el consumo de reactivos. Con las condiciones optimizadas, las etapas de RCA y detección del ADN

## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

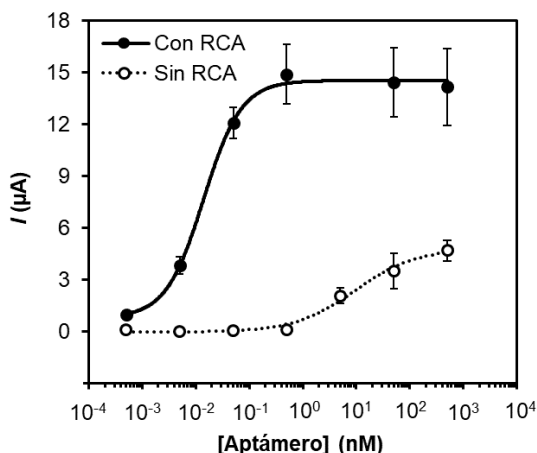
amplificado pueden completarse en 90 min en lugar de las 4.5 h iniciales. Hasta el momento, ningún ensayo basado en RCA ha acortado el paso de amplificación a sólo 15 min. Por ejemplo, en un ensayo en el que la secuencia alargada tiene una fuerte estructura secundaria (cuartetos G) para funcionar como una DNAzima, la duración de la RCA se acortó a 20 min para minimizar las fuertes interacciones intra o intercatenarias que podrían comprometer el funcionamiento de la DNAzima [303], mientras que en la inmuno-RCA se seleccionó un tiempo de 30 minutos como óptimo [304].

**Tabla 5.2. Optimización de la RCA: parámetros e intervalos estudiados y condiciones experimentales finales.**

Parámetro	Intervalo estudiado	Valor escogido
Tiempo hibridación + ligación molde (min)	120 – 30	30
[Molde] (nM)	100 – 10	10
[ADN ligasa T4] (Weiss/ $\mu$ L)	1 – 0.125	0.125
[ADN polimerasa $\phi$ 29] (U/ $\mu$ L)	1 – 0.25	0.25
Tiempo RCA (min)	60 – 15	15
[Sonda de detección] (nM)	500 – 10	100
Tiempo hibridación sonda (min)	60 – 30	30
Tiempo marcaje enzimático (min)	30 – 15	15

### 5.3.1.2. Aplicación de la RCA a la detección de NGAL

La metodología de RCA optimizada se adaptó a la detección de NGAL inmovilizada en partículas magnéticas tosilactivadas (PM-T-NGAL). Para ello se diseñó el aptámero de detección LCN2-2 truncado, en el que se mantuvo la región central de 40 nucleótidos y se eliminaron las regiones constantes de los extremos, alargado en el extremo 3' con el cebador para el molde de la RCA, separado de la secuencia del aptámero con un espaciador de 10 timinas (LCN2-2RCA, **Tabla A.3**) para asegurar que la unión a la proteína no afecta a la hibridación del molde de la RCA (Fig. 1). La curva de enlace obtenida con concentraciones crecientes de aptámero se representa en la **Figura 5.7**.



**Figura 5.7.** Curvas de enlace del aptámero LCN2-2 truncado sobre PM-T-NGAL con amplificación RCA (LCN2-2RCA) y sin amplificación de ADN (LCN2-2t-6FAM). Ambas curvas se ajustaron al modelo logístico de 4 parámetros. Condiciones de medida como en la sección 5.2.3. Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 3$ ).

Para comparar, se realizó también la curva de enlace sin amplificación RCA, utilizando el aptámero de detección truncado marcado con 6-FAM (LCN2-2t). Ambas curvas se ajustaron al modelo logístico de 4 parámetros (**Ecuación 5.1**), en donde A y B son las respuestas a una concentración infinita y 0 de aptámero respectivamente, ambas en  $\mu\text{A}$ ,  $\text{IC}_{50}$  es la concentración en nM de aptámero que produce una señal igual al 50% de la señal máxima y p es la pendiente de Hill, que representa la pendiente en el punto de inflexión de la curva:

$$y = \frac{B - A}{1 + \left(\frac{x}{\text{IC}_{50}}\right)^p} + A \quad (\text{Ec. 5.1})$$

$$I (\mu\text{A}) = \frac{[(0.8 \pm 0.6) - (14.5 \pm 0.3)]}{1 + \left(\frac{[\text{LCN2} - 2\text{RCA}](\text{nM})}{0.014 \pm 0.003}\right)^{(1.2 \pm 0.2)}} + (14.5 \pm 0.3) \quad (\text{Ec. 5.2})$$

$$I (\mu\text{A}) = \frac{[(0.07 \pm 0.05) - (4.8 \pm 0.5)]}{1 + \left(\frac{[\text{LCN2} - 2\text{t}](\text{nM})}{9.6 \pm 4.3}\right)^{(0.8 \pm 0.2)}} + (4.8 \pm 0.5) \quad (\text{Ec. 5.3})$$

En el caso de la curva de enlace con RCA se obtuvo un valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $14 \pm 3$  pM (**Ecuación 5.2**,  $R^2 = 0.994$ ), mientras que para el sistema sin amplificación



## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

de ADN la  $IC_{50}$  fue de  $10 \pm 5$  nM (**Ecuación 5.3**,  $R^2 = 0.98$ ). Estos valores pueden interpretarse como una estimación de la constante de disociación aparente ( $K_D$ ) asumiendo que la corriente es una medida del aptámero enlazado. La  $K_D$  del aptámero LCN2-2 truncado no puede depender de la estrategia empleada, especialmente teniendo en cuenta que la detección se realiza mediante cronoamperometría en ambos estudios. Esto significa que los valores de  $K_D$  obtenidos son una medida de la estabilidad de la arquitectura global del ensayo, es decir, su afinidad funcional. En cualquier caso, los valores estimados son uno y tres órdenes de magnitud más altos que los del trabajo original [95], en los que la  $K_D$  se determinó mediante SPR en una configuración de inmovilización análoga, con la proteína unida covalentemente a la superficie y utilizando el aptámero LCN2-2 completo de 76 nucleótidos.

La selectividad del aptámero LCN2-2 truncado se estudió utilizando PM-T modificadas con BSA o PSA, realizando la amplificación RCA. En estos experimentos se obtuvieron corrientes similares al blanco en todo el intervalo de concentraciones de aptámero ensayado, confirmando el reconocimiento selectivo de NGAL por el aptámero truncado.

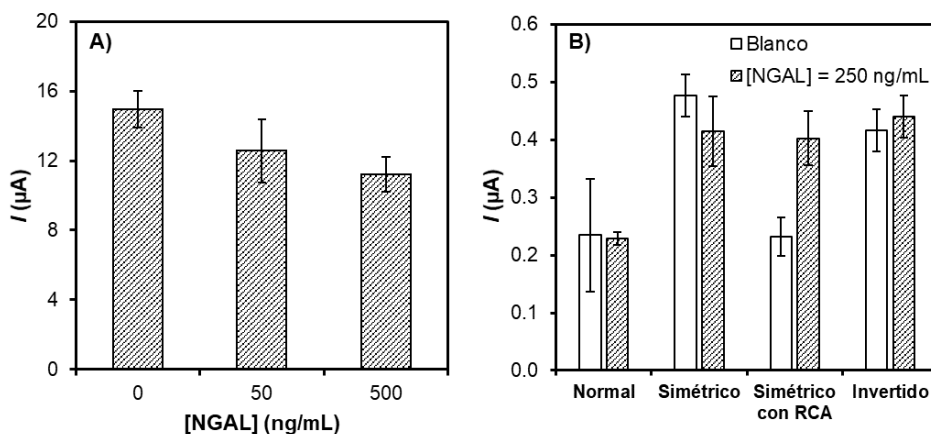
### 5.3.1.3. Aptaensayos para la detección de NGAL

Una vez evaluada la eficacia de la amplificación en ensayos directos, se decidió diseñar un ensayo competitivo utilizando PM-T-NGAL, fijando la concentración de aptámero LCN2-2RCA en la  $IC_{50}$  y probando diferentes concentraciones de NGAL en disolución en el intervalo 50 – 500 nM (**Figura 5.8A**). Con esta metodología, se observó una pequeña disminución de la corriente con el aumento de la concentración de proteína, pero la magnitud del decrecimiento de la señal no permitió el desarrollo del ensayo. La falta de competición no puede atribuirse a la formación de artefactos de la RCA, ya que sin amplificación se observó una tendencia similar.

Como alternativa, se probaron ensayos sándwich en partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina sobre las que se inmovilizaron los aptámeros truncados LCN2-2t o LCN2-4t, marcados con biotina en el extremo 5'. Se probaron distintos formatos de ensayo:

1. Sándwich simétrico, en el que ambos aptámeros son idénticos, utilizando el aptámero LCN2-2t biotilado e inmovilizado sobre PM-S como elemento de captura y el mismo aptámero, marcado con 6-FAM o adaptado a la RCA (LCN2-2RCA), como elemento de detección.

2. Sándwich normal, con el aptámero LCN2-4t biotinilado e inmovilizado sobre PM-S como elemento de captura y LCN2-2t marcado con 6-FAM, como elemento de detección.
3. Sándwich invertido respecto a la configuración del ensayo desarrollado en el trabajo original, con el aptámero LCN2-2t biotinilado e inmovilizado sobre PM-S como elemento de captura y LCN2-4t biotinilado, como elemento de detección.



**Figura 5.8. Aptasensayos para la detección de NGAL.** (A) Ensayo competitivo utilizando PM-T-NGAL en presencia de aptámero LCN2-2RCA 15  $\mu\text{M}$  y concentraciones crecientes de NGAL en disolución. (B) Ensayos sándwich en PM-S con diferentes configuraciones. Se muestran los resultados para una concentración de 0 (blanco) y 250 ng/ml de NGAL. Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 3$ ).

Los aptámeros biotinilados se diseñaron con un espaciador de 10 timinas para asegurar un reconocimiento adecuado de la diana y minimizar el impedimento estérico en la superficie de las PM. Además, se evaluó la capacidad de hibridación entre aptámeros, un problema que puede conducir a altas señales de fondo. Utilizando el programa DINAMelt [249], se estimó una energía libre de hibridación superior a  $-10$  kcal/mol en todas las combinaciones de aptámeros, lo que reduce la posibilidad de grandes corrientes inespecíficas debido a la hibridación entre aptámeros. Los cálculos se realizaron considerando una concentración de NaCl de 154 mM (la de PBS 1 $\times$ ) y una temperatura de 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Los datos representados en la **Figura 5.8B** indican que las corrientes obtenidas con y sin 250 ng/mL de NGAL son prácticamente idénticas en todos los casos en los que no se llevó a cabo la amplificación de RCA. En la configuración simétrica se requieren dos sitios de unión idénticos en la proteína, por lo que su

## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

ausencia puede explicar la baja señal obtenida. Sin embargo, cuando el ensayo se amplificó con RCA, se aprecia una pequeña diferencia que sugiere que esos sitios sí están presentes. El ensayo con configuración de sándwich normal se llevó a cabo con PM modificadas con LCN2-4t en una disolución con una alta concentración salina (1 M de NaCl y 0.5 mM de EDTA en Tris-HCl 5 mM) para aumentar el número de receptores inmovilizados en la superficie, pero no dio mejores resultados, lo que confirma la baja afinidad de ambos aptámeros por la proteína.

### 5.3.1.4. Caracterización de la afinidad del aptámero LCN2-2t mediante SPR y MST

Dado que no fue posible desarrollar un aptaensayo para la detección de NGAL con los aptámeros LCN2-2t y LCN2-4t, se decidió evaluar la afinidad de estos receptores utilizando otras dos técnicas: espectroscopia de resonancia de plasmón superficial (SPR) y termoforesis a microescala (MST). En el primer caso, se empleó un disco sensor de oro sobre el que se preparó una SAM mixta de ácido 11-mercaptoundecanoico/ 6-mercaptohexanol en proporción 1:3, para inmovilizar a continuación la NGAL de forma covalente. El aptámero LCN2-2t se añadió en concentraciones crecientes en disolución y se registró la variación en el ángulo de resonancia como consecuencia del enlace del aptámero a la proteína inmovilizada. En estas condiciones, solo se observó un cambio significativo de la señal a partir de una concentración 1  $\mu\text{M}$  de LCN2-2t, lo que indica que la afinidad de este aptámero es mucho menor de lo esperado. En experimentos similares utilizando el aptámero LCN2-4t no se obtuvo ninguna señal específica, lo que sugiere una afinidad aún menor que la del aptámero LCN2-2t.

Para comprobar si la inmovilización en superficies de Au provoca una disminución de la afinidad del aptámero LCN2-2t, la interacción de este aptámero con la NGAL se estudió mediante termoforesis a microescala (MST), una técnica que permite medir la constante de disociación termodinámica en disolución. La MST se basa en la utilización de una marca fluorescente o la fluorescencia intrínseca de uno de los elementos interactuantes (aptámero o diana) para monitorizar el movimiento de estas moléculas en un gradiente de temperatura, bajo la premisa de que la movilidad termofóretica de las moléculas fluorescentes cambiará al formarse los complejos aptámero-diana [305].

Con MST no se logró obtener una curva de enlace en el intervalo nM, utilizando una concentración fija de aptámero LCN2-2t marcado con fluoresceína y concentraciones crecientes de NGAL hasta 1.2  $\mu\text{M}$  (20 veces la concentración del aptámero). Estos experimentos confirman la baja afinidad del aptámero

LCN2-2 por la diana en disolución y podrían explicar la ausencia de competencia entre la NGAL en disolución y la proteína inmovilizada en PM-T. Se ha descrito que, bajo ciertas condiciones, se puede producir una mejora de la afinidad de enlace en formatos de análisis heterogéneos, con la orientación favorable del aptámero o la avidéz como explicaciones posibles [306, 307]. En el caso del aptámero LCN2-2t, cuando se utiliza una alta concentración local de la proteína como la que se consigue en las PM, se observa claramente el enlace, aunque con concentraciones de aptámero del intervalo nM en lugar de pM. Con concentraciones locales menores como las que hay en disolución no hay enlace aparente, lo que explica la ausencia de competición en el rango de concentración de NGAL ensayado. La baja señal obtenida en el ensayo sándwich simétrico acoplado a la RCA sugiere que para el aptámero LCN2-2t existen dos sitios de unión en la proteína, por lo que no se pueden excluir los efectos de avidéz.

### 5.3.2. Detección de AFP

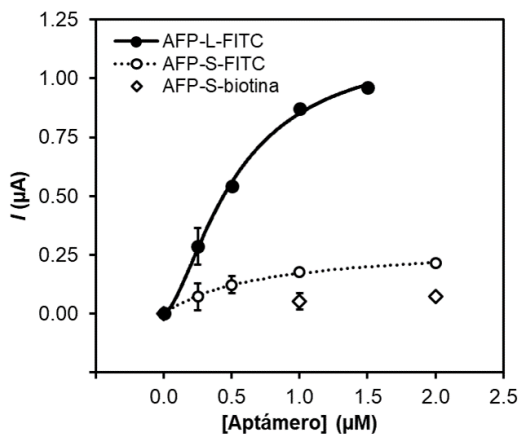
#### 5.3.2.1. Estudio de la afinidad de los aptámeros AFP-S y AFP-L

En primer lugar, se estudió la afinidad del aptámero corto marcado con biotina o fluoresceína en el extremo 5' (AFP-S, **Tabla A.3**) utilizando partículas magnéticas modificadas con AFP y concentraciones crecientes de los aptámeros en el intervalo 0.25 – 2  $\mu$ M. La detección electroquímica del aptámero enlazado a las partículas se realizó a través del marcaje con un conjugado de peroxidasa (strep-POD o antiF-POD), seguido de la adición del sustrato TMB y medida cronamperométrica.

En la **Figura 5.9** se muestran las curvas de enlace correspondientes. Como era de esperar, las corrientes medidas para el aptámero biotinilado marcado con el conjugado strep-POD son más bajas que las que se obtuvieron con el aptámero marcado con FITC y antiF-POD, debido a que el primer conjugado de peroxidasa es multivalente, por lo que se decidió continuar el estudio de caracterización del aptámero largo con la marca de FITC y el conjugado monovalente antiF-POD. Con el aptámero AFP-L se obtuvieron corrientes mucho más altas que con AFP-S en el mismo intervalo de concentración de receptor, lo que indica una mayor afinidad de este aptámero por la proteína inmovilizada en las partículas. Si se ajustan las curvas de enlace obtenidas al modelo de Hill, se obtienen valores de  $K_D$  de  $713 \pm 63$  nM y  $526 \pm 101$  nM, para AFP-S y AFP-L, respectivamente. Curiosamente, el aptámero largo muestra cierta cooperatividad ( $n = 1.6 \pm 0.4$ ) mientras que el corto se ajusta muy bien a una estequiometría 1:1 (modelo de Langmuir). La  $K_D$  estimada para el aptámero AFP-S es muy similar a la de la

## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

secuencia completa, según trabajos anteriores [295]. El aptámero largo, sin embargo, parece ser un receptor mucho más pobre de lo esperado, ya que la  $K_D$  es más de dos órdenes de magnitud superior a la informada en el trabajo original [294].



**Figura 5.9.** Curvas de enlace obtenidas con PM-T modificadas con AFP y el aptámero corto (AFP-S) biotinilado o marcado con fluoresceína y el aptámero largo (AFP-L) marcado con fluoresceína. Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 2$ ).

Es importante tener en cuenta que el modelo de Hill es un modelo de equilibrio en el que se considera que la concentración del aptámero en disolución no varía al formarse el complejo aptámero-diana. Esta condición puede que no se cumpla cuando hay una alta densidad de empaquetamiento de la diana (AFP) o cuando se trabaja con volúmenes bajos de muestra. En estos casos, la señal del enlace, que es una medida de la ocupación de la diana, ya no está relacionada con la concentración de aptámero en disolución, sino con la cantidad relativa de aptámero en disolución y de diana en la superficie. En tales condiciones, el punto medio de la curva de enlace representa la mitad de la concentración efectiva de la diana [308]. Para comprobar si este es el régimen que opera en las condiciones experimentales evaluadas, se estimó que la concentración efectiva de AFP inmovilizada en PM-T en los ensayos directos es 34 nM, un valor que es 20 veces mayor que la  $K_D$  del aptámero AFP-L según el trabajo original, lo que implica que se podría producir el agotamiento de aptámero en disolución debido a la rápida unión a la AFP, resultando teóricamente en una  $K_D$  aparente de 17 nM ( $34/2$ ). Sin embargo, el punto medio de la curva de enlace medida en este trabajo es muy superior a ese valor (**Figura 5.9**), lo que descarta que el sistema opere en régimen de agotamiento de ligando.

### 5.3. Resultados y discusión

En la publicación original, la  $K_D$  del aptámero AFP-L se midió por SPR utilizando una arquitectura inversa en la que el aptámero estaba inmovilizado con una densidad de empaquetamiento desconocida, y la proteína estaba en disolución. En consecuencia, la discrepancia entre el valor de  $K_D$  obtenido en este trabajo y el original podría surgir del acceso limitado del aptámero al sitio de unión de la proteína inmovilizada. Sin embargo, la selección del aptámero se realizó sobre AFP inmovilizada en partículas magnéticas con grupos epoxi, que se unen a aminas primarias y grupos sulfhidrilos, al igual que las PM-T, por lo que la explicación anterior quedaría descartada. En conjunto, todo apunta a que el valor "verdadero" de la  $K_D$  del aptámero AFP-L es más alto que el que se obtuvo en el trabajo inicial.

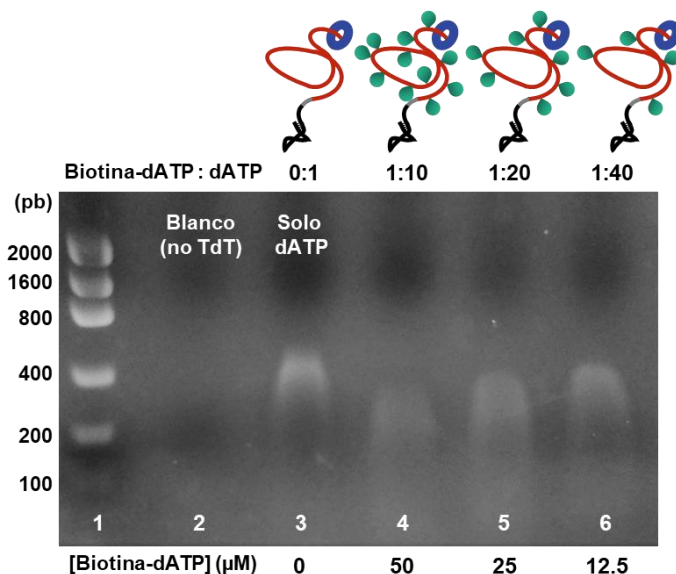
#### 5.3.2.2. Optimización de la amplificación TdT

La amplificación mediada por TdT es, junto con la RCA, una de las estrategias de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que puede combinarse con los aptámeros para aumentar la sensibilidad en la detección de biomarcadores. Como se comentó en el Capítulo 1, la TdT es una ADN polimerasa que extiende cualquier ADN de hebra simple siempre que se disponga de un extremo 3'-OH libre, sin la necesidad de utilizar una hebra molde. Además de los cuatro nucleótidos naturales, puede incorporar una amplia variedad de análogos no naturales, incluyendo nucleótidos biotinilados o con marcas fluorescentes [176]. La velocidad de incorporación depende, entre otros factores, del nucleótido y de la marca [309]. En este trabajo se seleccionó dATP biotinilado (biotina-dATP) como nucleótido marcado para la detección electroquímica del ADN amplificado a través del posterior marcaje enzimático utilizando strep-POD, seguido de la reacción enzimática de TMB y la medida cronoamperométrica. En primer lugar, se estudió el efecto de la relación entre biotina-dATP y dATP para obtener la cola más larga con el número óptimo de marcas de biotina. Para ello, se realizó la amplificación TdT en disolución con distintas proporciones de nucleótido marcado y sin marcar, y los productos de amplificación resultantes se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

En la **Figura 5.10** se muestran los resultados obtenidos con el aptámero AFP-S-TdT. Aunque se observa una cierta distribución de tamaños en los productos de amplificación, consecuencia de la cinética aleatoria de la enzima, su tamaño medio depende de la proporción de biotina-dATP. Cuanto mayor es la relación biotina-dATP : dATP, más cortos son los productos de amplificación, lo que confirma la preferencia de la enzima por el nucleótido natural. Se pueden incorporar unos 600 dATP sin marcar en 60 minutos (**Figura 5.10**, pocillo 3),

## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

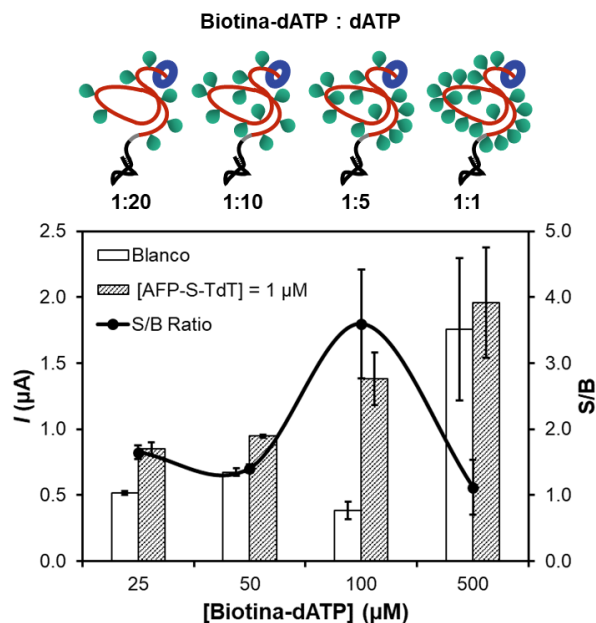
mientras que cuando se utiliza un 10% de nucleótidos biotinilados la longitud del producto de amplificación se reduce a la mitad (**Figura 5.10**, pocillo 4).



**Figura 5.10. Electroforesis en gel de agarosa de la elongación TdT del aptámero corto.** Pocillo 1: marcador de tamaños de ADN (pb: pares de bases). Pocillo 2: blanco de TdT. Pocillos 3-6: productos de elongación de TdT obtenidos con 100% dATP sin marcar (3) y 10% (4), 5% (5) y 2.5% de biotina-dATP (6).

En paralelo, se realizó un estudio con detección electroquímica, en el que la amplificación TdT se llevó a cabo sobre PM-T-AFP tras la interacción con una disolución 1  $\mu\text{M}$  de aptámero AFP-S-TdT. A continuación, se añadió el conjugado strep-POD, seguido de la reacción enzimática y la medida por cronamperometría. El número de dATP biotinilado incorporados en el producto de amplificación determina la cantidad de enzimas que se podrán unir por cada complejo aptámero-AFP y, por tanto, la amplificación de la señal analítica. La corriente aumentó cuando la relación biotina-dATP : dATP se varió entre 1:20 y 1:1 (5 – 50% de biotina-dATP), debido a la mayor concentración de nucleótidos marcados que pueden incorporarse a la hebra elongada (**Figura 5.11**) cuando aumenta la proporción de biotina-dATP. La corriente neta se multiplica por 3 para un aumento de 4 veces en la concentración de biotina-dATP (de 25 a 100  $\mu\text{M}$ ), mientras que disminuye drásticamente cuando la concentración se multiplica por 5 (de 100 a 500  $\mu\text{M}$ ) debido a un fuerte aumento de la corriente del blanco (sin aptámero). La unión inespecífica de la biotina-dATP a las PM podría explicar este aumento de la señal del blanco. Se escogió 1:20 como valor óptimo de la relación biotina-dATP : dATP (5% de los nucleótidos biotinilados), teniendo en cuenta un

consenso entre la longitud del producto de amplificación, que será mayor cuanto mayor sea la proporción de dATP sin marcar, y la cantidad de biotina-dATP necesaria para la detección electroquímica con una reproducibilidad adecuada. Esta relación se utilizó en los experimentos posteriores.



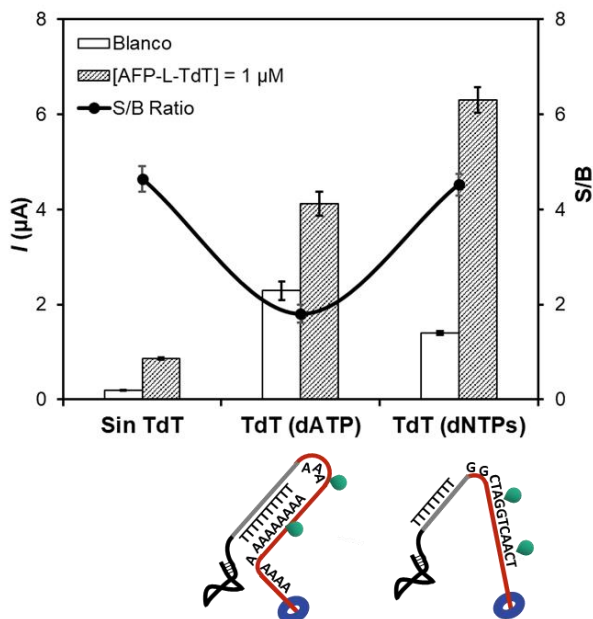
**Figura 5.11.** Corrientes registradas en el ensayo electroquímico con diferentes proporciones de biotina-dATP:dATP en ausencia (blanco) y en presencia del aptámero corto 1 µM y la correspondiente relación señal/blanco (S/B) para cada condición. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 2).

Como la velocidad de elongación depende del nucleótido utilizado, se estudió el efecto de utilizar sólo dATP o una mezcla equimolar de los cuatro nucleótidos (dNTP). La **Figura 5.12** muestra que la corriente aumenta drásticamente cuando se emplea la mezcla de dNTPs, lo que sugiere que la amplificación se ve impedida de algún modo cuando se utiliza sólo dATP como fuente de nucleótidos no marcados. En este experimento se utilizó el aptámero AFP-L-TdT con una cola de 8 timinas en el extremo 3' para evitar el impedimento estérico entre el enlace a la AFP y la elongación de la TdT. Se ha demostrado que la formación de dúplex o cuartetos de G puede detener la elongación de la TdT [175]. En el caso del aptámero AFP-L-TdT, el espaciador de timina y los nucleótidos de adenina pueden hibridarse ralentizando la reacción, como se esquematiza en la **Figura 5.12**. Cabe destacar que en ausencia de TdT, la corriente es mucho menor debido a la presencia de un único sitio de marcaje con la enzima. El poder de amplificación de TdT, en términos de intensidad de corriente, debido



## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

a la incorporación de múltiples enzimas por evento de reconocimiento es de 3.3 y 9 veces para las elongaciones de dATP y dNTP, respectivamente. Por ello, en experimentos posteriores se utilizó la mezcla equimolar de dNTPs como sustrato de la TdT, manteniendo la proporción 1:20 con biotina-dATP.

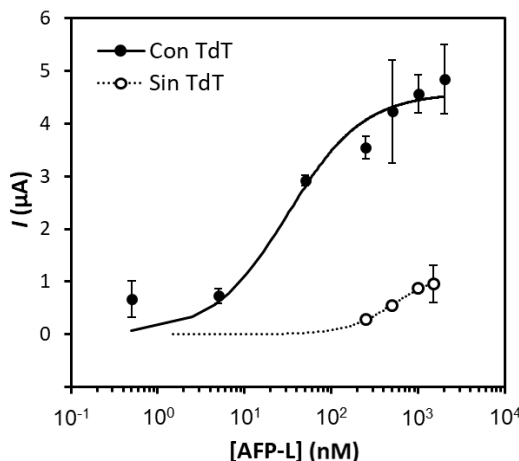


**Figura 5.12.** Corrientes medidas cronoamperométricamente con y sin amplificación de TdT utilizando sólo dATP o una mezcla de dNTPs a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  en ausencia (barras con trama) y en presencia (barras blancas) del aptámero largo 1  $\mu\text{M}$  y la correspondiente relación señal/blanco (S/B) obtenida en cada condición. Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 2$ ).

### 5.3.2.3. Aplicación de la amplificación TdT a la detección de AFP

El protocolo optimizado de amplificación TdT con detección electroquímica se utilizó para obtener la curva de enlace del aptámero AFP-L y comprobar el efecto de la amplificación sobre la afinidad aparente del aptámero. En la **Figura 5.13**, en la que se comparan las curvas de enlace con y sin amplificación de ADN, se observa un importante aumento de la señal analítica (7.8 veces para una concentración 500 nM de aptámero) y un desplazamiento de la curva amplificada por TdT hacia concentraciones menores de aptámero. Esto se refleja en el valor de la  $K_D$  aparente estimado a partir del ajuste de la curva al modelo de Langmuir,  $32 \pm 11$  nM, lo que supone una disminución de 16 veces de la  $K_D$  que se obtuvo para el ensayo sin amplificación TdT. Con todo, este valor

sigue siendo un orden de magnitud superior a la  $K_D$  medida por SPR en el trabajo original.



**Figura 5.13.** Curvas de enlace del aptámero AFP-L sobre PM-T-AFP con amplificación TdT (AFP-L-TdT) y sin amplificación de ADN (AFP-L-FITC). Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 2$ ).

#### 5.3.2.4. Aplicación de la amplificación RCA a la detección de AFP

Al igual que con el aptámero anti-NGAL LCN2-2, el aptámero AFP-S se adaptó al esquema de la RCA para acoplar la metodología de amplificación que se optimizó anteriormente a la detección de AFP, alargando el extremo 3' del aptámero con un cebador complementario al molde circularizable necesario para la RCA. De forma análoga al aptámero LCN2-2RCA, en el aptámero AFP-S-RCA también se añadió un espaciador entre el aptámero y el cebador para asegurar que el enlace a la proteína no interfiere en la hibridación del molde (**Tabla A1.3**). Para este estudio se escogió el aptámero AFP-S y no el AFP-L, que tiene mejor afinidad, porque la extensión del aptámero con el espaciador y el cebador para la RCA hace que la hebra sintética sea demasiado larga. La detección electroquímica del ADN elongado se llevó a cabo de forma idéntica a como se realizó con la NGAL, utilizando una sonda de detección marcada con fluoresceína que hibrida con las múltiples copias generadas del molde circular, seguida de la unión de antiF-POD, reacción enzimática de TMB y medida cronoamperométrica.

## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

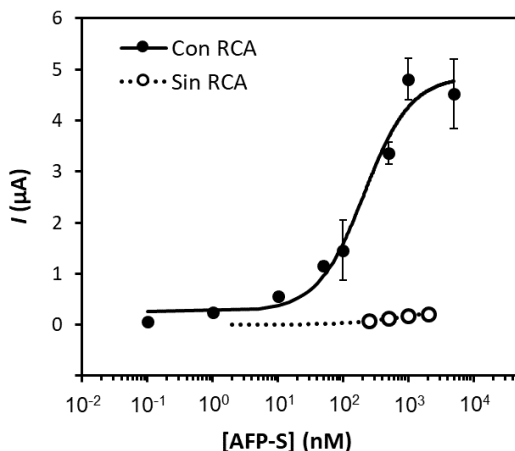


Figura 5.14. Curvas de enlace del aptámero AFP-S sobre PM-T-AFP con amplificación RCA (AFP-S-RCA) y sin amplificación de ADN (AFP-S-FITC). Las barras de error representan la desviación estándar ( $n = 2$ ).

En la **Figura 5.14** se muestran las curvas de enlace del aptámero AFP-S con y sin amplificación de ADN. De nuevo, se observa un gran aumento de la corriente con la amplificación de ADN (24 veces para una concentración 500 nM de aptámero), que se atribuye a incorporación de múltiples conjugados antiF-POD al aptámero alargado. Ajustando los datos obtenidos con RCA a la ecuación de Langmuir, se obtiene una  $K_D$  aparente de  $188 \pm 33$  nM. Si se compara con el aptámero LCN2-2t o incluso el AFP-L, la mejora en la afinidad que se consigue acoplando la RCA al aptámero AFP-S es modesta (alrededor de 4 veces). En la **Tabla 5.3** se resumen las  $K_D$  aparentes de los aptámeros LCN2-2, AFP-L y AFP-S obtenidas en este trabajo con y sin amplificación de ADN, así como la  $K_D$  reportada en la publicación original.

Tabla 5.3. Comparación de la  $K_D$  aparentes de los aptámeros LCN2-2t, AFP-S y AFP-L con y sin amplificación de ADN (RCA o TdT), y el valor de  $K_D$  del trabajo original.

Aptámero	$K_D$ sin amplificación de ADN (nM)	$K_D$ con amplificación de ADN (nM)	$K_D$ en publicación original (nM)	Ref.
LCN2-2t	$10 \pm 5$	$0.014 \pm 0.003$	0.00224	[95]
AFP-L	$526 \pm 101$	$32 \pm 11$	2.37	[294]
AFP-S	$713 \pm 63$	$188 \pm 33$	500	[295]

## 5.4. Conclusiones

La caracterización de la afinidad de nuevos aptámeros hacia sus dianas en condiciones operativas contribuye a ampliar su campo de aplicación. En este trabajo, se ha demostrado que un aptámero anti-NGAL truncado, LCN2-2t, mantiene la afinidad por su diana que mostró su homólogo de 76 nucleótidos utilizado en el trabajo original. Al acoplar el reconocimiento del aptámero con una metodología de amplificación isotérmica de ADN, la RCA, previamente optimizada, se consiguió una amplificación de la señal de tres órdenes de magnitud ( $K_D = 14 \pm 3$  pM) en comparación con la detección enzimática convencional ( $K_D = 10 \pm 5$  nM), un parámetro que no suele aparecer en la literatura. La etapa de elongación del ADN mediante RCA se acortó a sólo 15 minutos y el consumo de enzimas costosas también se redujo al mínimo, obteniendo señales electroquímicas suficientemente sensibles y demostrando que, con una optimización adecuada, el uso de herramientas de biología molecular en biosensores puede ser asequible.

Sin embargo, esta mejora de la sensibilidad no se pudo aplicar al desarrollo de un aptaensayo competitivo con el aptámero LCN2-2t. La caracterización de la afinidad de este aptámero hacia la proteína diana mediante SPR y MST reveló una sobreestimación de su afinidad en trabajos anteriores ( $K_D = 2.24$  pM). Este resultado subraya la importancia de la caracterización de la afinidad de los aptámeros en disolución para ensayos competitivos, una tarea que no suele llevarse a cabo y que puede resultar en un valor significativamente diferente al de la afinidad en superficie, tal y como se ha observado. En estos casos, aunque los beneficios de la amplificación RCA en la afinidad aparente son evidentes en los ensayos directos, no pueden contrarrestar totalmente la baja afinidad en disolución del aptámero LCN2-2t, impidiendo el desarrollo de aptaensayos con este receptor.

Por otro lado, se estudió la afinidad de dos aptámeros previamente seleccionados contra la AFP, biomarcador de cáncer hepatocelular, con constantes de disociación muy diferentes. Utilizando un ensayo heterogéneo directo con detección electroquímica, diferente de las técnicas utilizadas para evaluar la afinidad en los trabajos originales, se estimaron constantes de disociación muy similares para ambos receptores. Sin embargo, son bastante modestas para aplicaciones analíticas. Para intentar mejorar su utilidad, los aptámeros anti-AFP se combinaron con amplificaciones isotérmicas de los ácidos nucleicos. El aptámero AFP-S se adaptó al esquema RCA previamente optimizado con los aptámeros anti-NGAL, y con esta amplificación se obtuvo una  $K_D$  aparente 6 veces menor ( $188 \pm 33$  nM) que la del ensayo sin amplificación ( $713 \pm 63$ ). Ambos valores de  $K_D$  eran cercanos al del trabajo original (500 nM), pero la mejora de la

## 5. Amplificación isotérmica de aptámeros

sensibilidad alcanzada con la amplificación fue mucho más modesta que la que se consiguió con el aptámero anti-NGAL. Por otra parte, el aptámero AFP-L fue amplificado mediante TdT bajo condiciones optimizadas. En este caso, el ensayo con amplificación permitió disminuir la  $K_D$  aparente 16 veces ( $32 \pm 11$  nM) en comparación con el ensayo no amplificado ( $526 \pm 101$  nM). Con todo, estos valores de  $K_D$  aparente están por encima del valor estimado en el trabajo original (2.37 nM), indicando que la afinidad "real" de este aptámero es más débil de lo esperado.

En conjunto, los resultados presentados en este capítulo destacan la necesidad de utilizar varias técnicas para caracterizar completamente la afinidad de los aptámeros, no sólo para validar su utilidad potencial y asegurar su funcionamiento en condiciones operativas, sino también para definir la secuencia mínima necesaria para el enlace y reducir costes. Asimismo, se demostró que las estrategias de amplificación de ADN pueden combinarse con los aptámeros para mejorar la sensibilidad en la detección de las dianas contra las cuales se han seleccionado, pero la magnitud de esta mejora depende de la afinidad real de los receptores.

## Caracterización de nuevos aptámeros contra la proteína S del virus SARS-CoV-2

### 6.1 Introducción

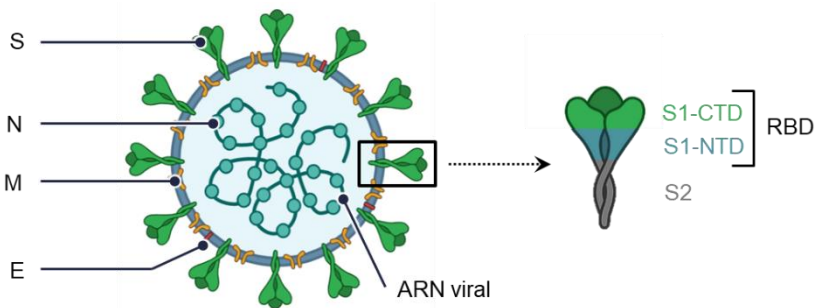
#### 6.1.1. COVID-19 y SARS-CoV-2

La enfermedad por coronavirus de 2019 (*coronavirus disease 2019*, COVID-19) provocada por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) se ha extendido rápidamente por todo el mundo desde su aparición en marzo de 2020, ejerciendo un enorme impacto sobre la salud y las economías mundiales [310]. Hasta marzo de 2022, dos años después del estallido de esta pandemia, se habían notificado 476 millones de casos confirmados de infecciones a la Organización Mundial de la Salud (OMS), de los cuales 6 millones han sido mortales [311]. Para combatir los efectos devastadores del SARS-CoV-2, la comunidad científica ha realizado grandes esfuerzos para desarrollar métodos de diagnóstico y terapia en una carrera contra el tiempo. Las estrategias de diagnóstico dirigidas a controlar la rápida expansión de enfermedades infecciosas emergentes como la COVID-19 deben cumplir varios requisitos, como ser baratas, rápidas, fáciles de manejar, precisas, específicas y sensibles. En este contexto, los aptámeros representan una valiosa alternativa a los anticuerpos – los receptores de afinidad de referencia – en el desarrollo de aplicaciones de diagnóstico de virus debido a sus atractivas características, como su obtención *in vitro*, su fabricación mediante síntesis química en un proceso sencillo, rápido y reproducible y su estabilidad térmica y química [71].

El SARS-CoV-2 pertenece a la familia de los coronavirus (CoV), virus de ARN cuyo nombre proviene de la forma de corona que presentan cuando se observan al microscopio electrónico (*coronam* es el término latino para corona), que se atribuye a la presencia de glicoproteínas espícula en su envoltura. Por tanto,

## 6. Aptámeros contra la proteína S del SARS-CoV-2

los coronavirus están constituidos por un genoma de ARN monocatenario contenido dentro de una envoltura proteico-lipídica esférica de un tamaño de 60-140 nm [312]. Las proteínas estructurales de los coronavirus se denominan S (*spike* o espícula), E (envoltura), M (membrana) y N (nucleocápside) [313] (**Figura 6.1**). La proteína S transmembrana es un trímero con un papel importante en la infección, ya que su dominio de unión a receptores (*receptor-binding domain*, RBD) es el responsable de mediar la entrada viral en las células del huésped a través de la interacción con receptores específicos del huésped, en particular la enzima convertidora de angiotensina 2 (*angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2) unida a la membrana celular. Por esta razón, la proteína S ha sido elegida como diana principal en muchas estrategias terapéuticas y de diagnóstico de COVID-19 [314].



**Figura 6.1. Representación esquemática de la estructura del SARS-CoV-2 y la proteína S.** Se muestra la organización de las proteínas *spike* (S), de la membrana (M) y de la envoltura (E). El ARN viral está asociado a la proteína de la nucleocápside (N). RBD: dominios de unión a receptores; S1-NTD: dominio N-terminal; S1-CTD: dominio C-terminal; S1: extremo amino-terminal; S2: extremo carboxi-terminal. Adaptada de [315]. Creada con BioRender™.

### 6.1.2. Métodos de diagnóstico de COVID-19

Los métodos utilizados actualmente para el diagnóstico *in vitro* de las infecciones víricas pueden clasificarse en dos grupos: métodos directos e indirectos. Los métodos directos se basan en la detección de los componentes del virus, como el genoma viral mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos o los antígenos virales mediante inmunoensayos, así como el aislamiento de los virus mediante cultivo celular, mientras que las metodologías indirectas tienen como objetivo detectar anticuerpos antivirales específicos en muestras serológicas [316].

En el caso de las pruebas de COVID-19, los métodos directos son la principal opción. Por un lado, la detección del genoma viral en hisopos

nasofaríngeos mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR) se considera la técnica de referencia para el diagnóstico de COVID-19, debido a su alta sensibilidad ( $\geq 95\%$ ) y especificidad ( $\geq 99\%$ ), con LDs de  $10^3$  copias genómicas/mL. Sin embargo, la PCR requiere un equipo de laboratorio sofisticado, personal capacitado y largos tiempos de análisis [317, 318]. La detección de ARN viral mediante técnicas de amplificación isotérmica, tales como la LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), han surgido como alternativas a la PCR, ya que es más rápida y no requiere de ciclos térmicos, por lo que podría aplicarse en entornos descentralizados y con recursos limitados. En particular, la LAMP con transcripción inversa puede alcanzar sensibilidades y especificidades del 93% y del 98%, respectivamente, con LDs equivalentes a los de la RT-qPCR [319]. Sin embargo, la mayoría de las técnicas de amplificación isotérmica siguen requiriendo el uso de enzimas y otros reactivos como cebadores, y tienen esquemas de reacción complejos que requieren una evaluación minuciosa y que dificultan potencialmente su aplicabilidad práctica.

Por otro lado, la detección de antígenos virales puede lograrse mediante métodos basados en anticuerpos que son potencialmente más sencillos y rápidos que las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Las principales dianas de estas estrategias de diagnóstico son las proteínas N y S del SARS-CoV-2, ya que se ha demostrado que son los antígenos virales más significativos en las células infectadas del huésped. Los ensayos basados en tiras de inmunocromatografía de flujo lateral con anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 proporcionan un cribado rápido y fiable con resultados en 10-15 minutos, aunque la sensibilidad (80%) y los LD de estos métodos son inferiores a los de la PCR [318, 320]. Los métodos indirectos de análisis del SARS-CoV-2 se basan en inmunoensayos que detectan anticuerpos específicos antivirales (IgM e IgG) en muestras de suero de los pacientes, y se utilizan principalmente para estudios epidemiológicos, ya que los anticuerpos del huésped se generan después de un periodo de tiempo específico tras la infección [314, 317]. Uno de los principales inconvenientes de las estrategias de detección basadas en anticuerpos es el largo y costoso proceso necesario para obtener anticuerpos específicos, el cual a menudo sufre de problemas de reproducibilidad entre lotes.

### 6.1.3. Aptámeros para la detección de virus

En este contexto, una vía preferible para desarrollar estrategias de diagnóstico del COVID-19 es la basada en el uso de aptámeros. Como se ha mencionado anteriormente, estos receptores sintéticos pueden obtenerse en un proceso *in vitro* más rápido que la generación de anticuerpos, proporcionando una



## **6. Aptámeros contra la proteína S del SARS-CoV-2**

alternativa más factible de obtener biorreceptores capaces de hacer frente a la rápida mutación de los virus. Como se comentó en el capítulo 1 de la presente tesis, los aptámeros presentan propiedades notables, ya que se fabrican mediante síntesis química en un proceso reproducible, son estables desde el punto de vista térmico y químico, y se pueden modificar fácilmente para añadir marcas o para evitar su degradación por nucleasas, un problema que puede comprometer el funcionamiento general de los aptámeros en medios biológicos, en particular el de los aptámeros de ARN. Por esta razón, el desarrollo de aptámeros contra virus para el diagnóstico y la terapia es un campo de investigación activo. Se han desarrollado aptámeros para virus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus del ébola (EBOV), la gripe A y el SARS-CoV-2, por mencionar algunos [71, 314].

A pesar de las ventajas mencionadas, los aptámeros aún no han alcanzado todo su potencial en la mejora de las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico antivirales. Algunas razones para ello son la inexistencia de directrices bien establecidas para la obtención de aptámeros que puedan aplicarse a cualquier tipo de diana y la escasa caracterización de muchos aptámeros ya seleccionados que se encuentran en la literatura, lo que dificulta enormemente sus aplicaciones prácticas [71]. La caracterización completa de la afinidad de enlace es, de hecho, de gran importancia porque influye en gran medida en el éxito general de los métodos basados en aptámeros.

### **6.1.4. Espectroscopia SPR para medir la afinidad de enlace de los aptámeros**

Entre las técnicas empleadas para medir la afinidad de los aptámeros hacia sus dianas, la espectroscopia de resonancia de plasmón superficial (SPR) es de especial interés. Esta técnica óptica, sensible a la superficie, sin necesidad de marcas y en tiempo real, permite medir tanto la cinética de la unión como la afinidad entre el aptámero y la diana, y se ha convertido en una técnica consolidada para caracterizar las interacciones biomoleculares debido a su alto rendimiento [321].

Los instrumentos SPR constan de un prisma de alta densidad óptica (alto índice de refracción,  $n$ ) sobre el que se coloca un sensor, acoplado ópticamente al prisma mediante un aceite con el mismo  $n$ . El sensor consiste en una fina capa metálica, normalmente de oro, que está en contacto con un dieléctrico de menor  $n$  que el del prisma, normalmente una disolución acuosa. El aptámero o su diana se inmoviliza en la superficie metálica, mientras que el otro elemento interactuante permanece en el medio acuoso en contacto con el sensor. La interfase metal-

dieléctrico se irradia con luz monocromática polarizada (procedente de un láser) con un ángulo de incidencia variable, siempre superior al ángulo crítico, generando una onda evanescente que interactúa con los plasmones superficiales, transfiriendo la máxima energía cuando se alcanza la condición de resonancia (ángulo SPR). Al producirse el enlace entre el elemento interactuante en disolución y el elemento inmovilizado, el  $n$  de la disolución en contacto con el metal cambia, por lo que las condiciones de resonancia SPR se modifican y esta variación del ángulo de resonancia SPR con el tiempo puede monitorizarse, proporcionando información sobre la interacción biomolecular. Los instrumentos SPR son muy adecuados para determinar constantes de disociación de  $10^{-12}$  a  $10^{-5}$  M [53].

En este capítulo, se utiliza esta técnica para caracterizar diez nuevos aptámeros contra la proteína S1 del SARS-CoV-2, previamente seleccionados en el grupo de investigación del profesor Maxim V. Berezovski de la Universidad de Ottawa (Canadá). Además, se discute la viabilidad de su aplicación en ensayos de diagnóstico de COVID-19 basados en aptámeros.

## 6.2. Materiales y métodos

Los reactivos e instrumentos utilizados en este capítulo se detallan en el **Anexo A**. A continuación, se describen los procedimientos experimentales que se llevaron a cabo.

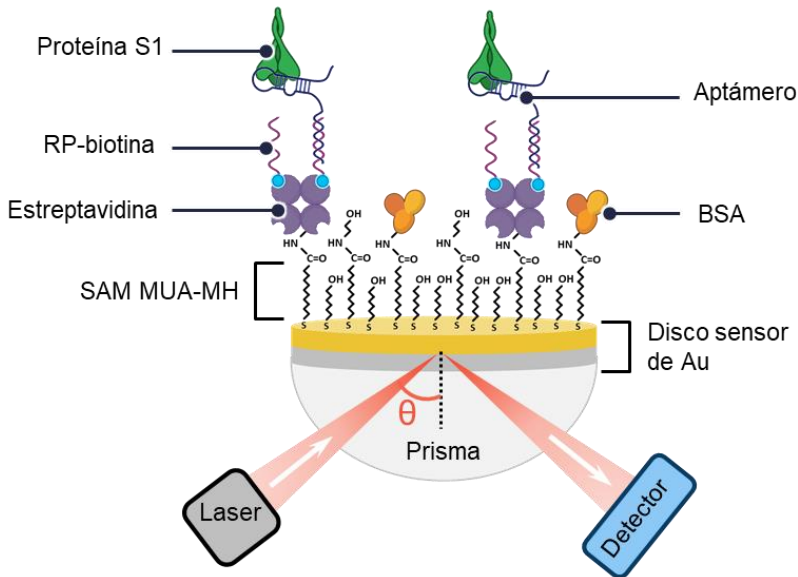
### 6.2.1. Modificación del disco sensor para SPR

La biocapa del sensor está constituida por un aptámero hibridado con un oligonucleótido marcado con biotina (RP-biotina), el cual es complementario al extremo 3' del aptámero (**Tabla A.4**). Esta secuencia corta biotinilada está unida a la estreptavidina, previamente inmovilizada mediante unión covalente en una monocapa autoensamblada (SAM) mixta de ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA)/ 6-mercaptohexanol (MH) construida sobre la lámina de oro del disco sensor (**Figura 6.2**).

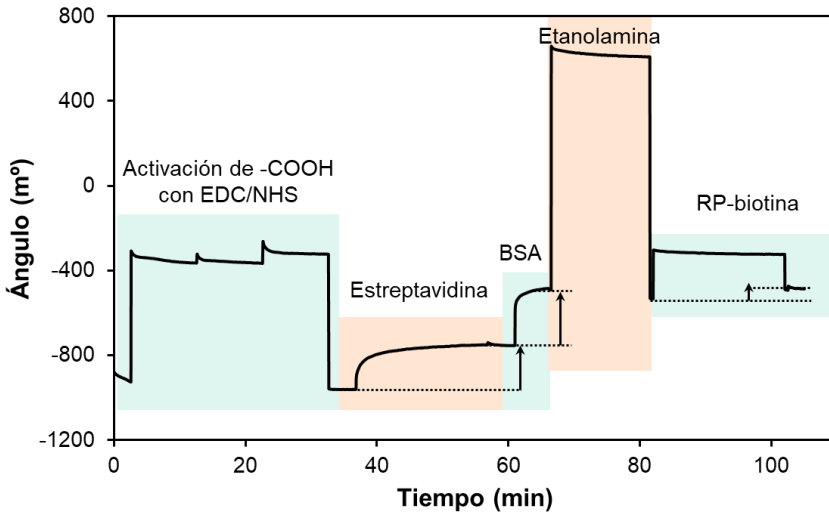
El sensor de Au se modificó como se indicó en la sección 5.2.5.1. Primero se formó una SAM mixta de MUA y MH. Los grupos carboxílicos se activaron con una mezcla de EDC + NHS para inmovilizar estreptavidina a través de sus grupos amino. Finalmente, los grupos carboxílicos no modificados se desactivaron con BSA y con etanolamina (**Figura 6.3**).

## 6. Aptámeros contra la proteína S del SARS-CoV-2

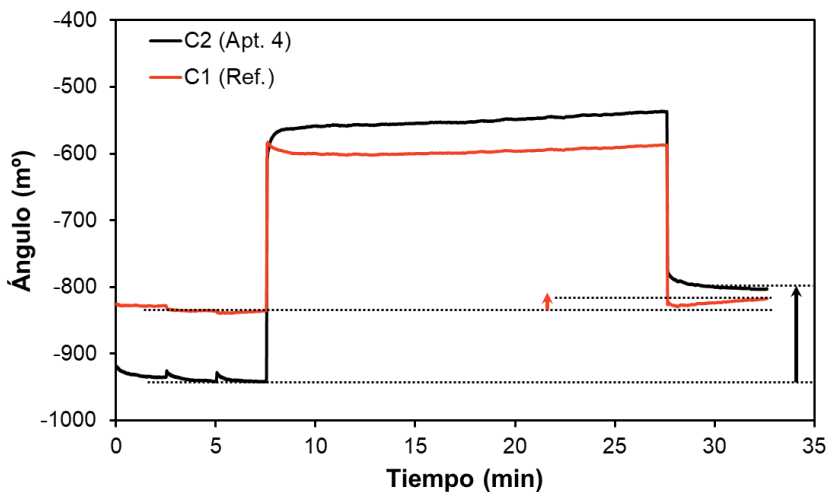
Tras el bloqueo, el sensor se trató con una disolución de 2  $\mu\text{M}$  de sonda biotinilada durante 20 min. Finalmente, tras equilibrar la superficie con el medio de enlace (PBS 1 $\times$  pH 7.4), se llevó a cabo la hibridación del aptámero (2  $\mu\text{M}$  en SSPE 2 $\times$ , pH 7.4) en uno de los canales durante 20 min. El otro canal se mantuvo como referencia y se trató sólo con SSPE 2 $\times$  (**Figura 6.4**). Antes y después de cada etapa, el sensor se lavó brevemente con PBS 1 $\times$ .



**Figura 6.2. Representación esquemática del sensor SRP utilizado en este trabajo.** El sensor consiste en un disco recubierto de oro sobre el que se construye una monocapa autoensamblada de ácido 11-mercaptoundecanoico y 6-mercaptohexanol, seguida de la unión covalente de estreptavidina, el bloqueo con BSA y etanolamina, la inmovilización de una sonda de ADN biotinilada (RP-biotina) y la hibridación de los aptámeros que se unen a la proteína S1 del SARS-CoV-2.  $\theta$ : Ángulo SPR. Creada con BioRender™.



**Figura 6.3. Sensorgrama obtenido durante la modificación del disco sensor.** Se destacan las etapas de activación de los grupos carboxílicos, la inmovilización de la estreptavidina, el bloqueo con BSA y etanolamina, y la unión de RP-biotina mediante la interacción estreptavidina-biotina. Las flechas señalan el cambio en el ángulo SPR registrado después de cada etapa.



**Figura 6.4. Sensorgrama registrado para la hibridación del aptámero con RP-biotina en el canal 2 (C2) manteniendo el canal 1 (C1) como referencia.** Las flechas señalan el cambio en el ángulo SPR registrado tras la hibridación.

## 6. Aptámeros contra la proteína S del SARS-CoV-2

### 6.2.2. Estudio del enlace de los aptámeros a la proteína S1

El disco sensor de oro modificado con aptámero se utilizó para estudiar la afinidad de 10 aptámeros hacia la proteína S1 del SARS-CoV-2 en PBS 1×. Cada experimento de enlace independiente consistió en 3 etapas (línea de base, asociación y disociación), como se describe a continuación. Una vez obtenida una señal estable tras el registro de tres líneas de base en PBS 1×, ambos canales de la cubeta se trataron con disoluciones de proteína S1 de concentraciones en el intervalo 0 – 150  $\mu\text{M}$  preparadas en PBS 1× (35  $\mu\text{L}$ ) y la fase de asociación se registró durante 20 min. Tras denaturar el líquido de la cubeta, se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  de PBS 1× y la fase de disociación se monitorizó durante 5 min, resultando en una disminución del ángulo de resonancia, hasta que se alcanzó una respuesta estable debido a la pérdida de la proteína débilmente enlazada. La diferencia entre el ángulo de resonancia en  $\text{m}^\circ$  antes y después de la etapa de asociación es una medida de la cantidad de proteína S1 unida específicamente a los aptámeros, siempre que se reste la señal correspondiente que se registró en el canal de referencia (sin aptámero). Todas las etapas se realizaron con agitación constante proporcionada por la aguja de inyección para evitar el control de la transferencia de masa en la cinética de la reacción.

## 6.3. Resultados y discusión

### 6.3.1. Construcción del sensor

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización de la afinidad de diez nuevos aptámeros contra la proteína S del SARS-CoV-2 mediante espectroscopia SPR. Para ello, se prepararon monocapas mixtas autoensambladas de MUA y MH 1:3 sobre discos sensores para SPR (**Figura 6.2**) sobre las que se inmovilizó covalentemente estreptavidina hasta un cambio en el ángulo de resonancia de 200-250  $\text{m}^\circ$ , para formar una monocapa estable de proteína (**Figura 6.3**). A continuación, se añadió a la monocapa una sonda biotilada, complementaria al extremo 3' de los aptámeros, para que se uniera a la estreptavidina, y finalmente se ancló el aptámero en uno de los canales mediante la hibridación con esta sonda dando lugar a una respuesta de 50-70  $\text{m}^\circ$  (**Figura 6.4**). El otro canal no se trató con el aptámero para mantenerlo como referencia y no se observó ningún cambio con el medio de enlace (PBS 1×). Se preparó un nuevo sensor para el estudio de afinidad de cada aptámero.

### 6.3.2. Ensayos de enlace

Una vez formado el sensor, los aptámeros inmovilizados se expusieron a concentraciones crecientes de la proteína S1, empezando por 1 nM hasta 150 nM. Con los aptámeros 6 y 8 no se registró ningún cambio de señal en dicho rango de concentraciones (**Figura 6.5F y 6.5H**), mientras que con los aptámeros 5 y 10 sólo se observaron señales a las concentraciones más altas (**Figuras 6.5E y 6.5J**). Para los aptámeros 1, 3 y 9 se obtuvieron los mejores resultados. Las constantes de disociación aparente para estos aptámeros se estimaron ajustando los datos al modelo de Hill, para el aptámero 1, y al modelo de Langmuir, para los aptámeros 3 y 9. El aptámero 1 mostró el mejor comportamiento ( $K_D = 63 \pm 2$  nM) con una respuesta de 200 m° para la mayor concentración de proteína ensayada (**Figura 6.5A**), mientras que en el caso de los aptámeros 3 ( $K_D = 38 \pm 14$  nM) y 9 ( $K_D = 87 \pm 29$  nM) la respuesta registrada para 150 nM de proteína fue 4 veces menor (**Figuras 6.5C y 6.5I**).

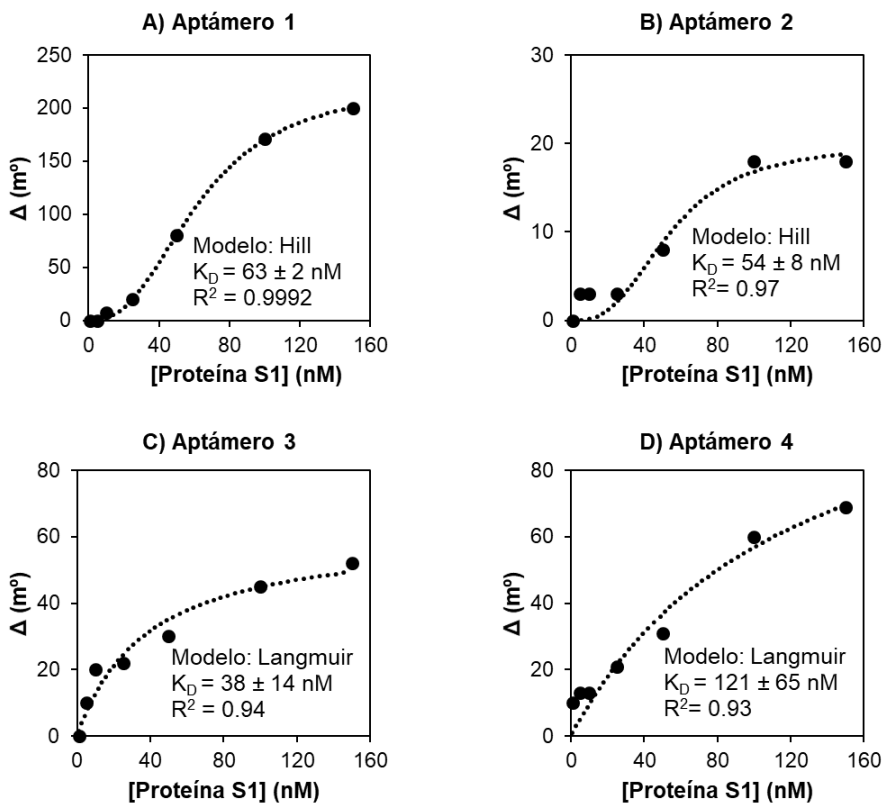


Figura 6.5. Curvas de enlace de los aptámeros 1 (A), 2 (B), 3 (C), y 4 (D).  $\Delta$ : variación en el ángulo SPR.

## 6. Aptámeros contra la proteína S del SARS-CoV-2

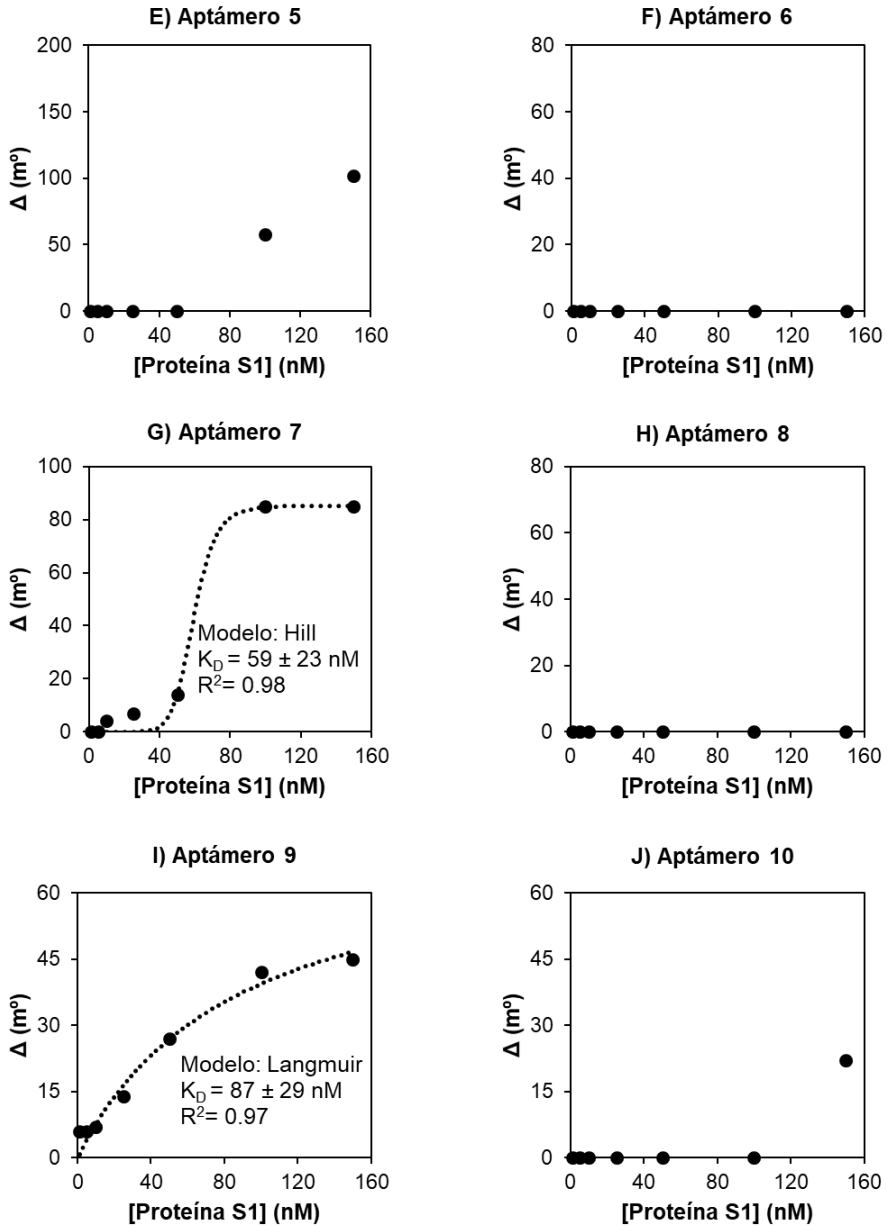


Figura 6.5. (Continuación). Curvas de enlace de los aptámeros 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) y 10 (J).  $\Delta$ : variación en el ángulo SPR.

### 6.3.3. Aplicaciones de los aptámeros en diagnóstico de COVID-19

La pandemia de COVID-19 ha supuesto un enorme reto para los facultativos clínicos, ya que necesitan disponer de pruebas de diagnóstico rápidas y fiables para hacer cribados en la población y limitar la propagación del SARS-CoV-2 y sus terribles consecuencias. Por ello, la comunidad científica ha realizado un gran esfuerzo de investigación para desarrollar métodos tanto de diagnóstico como de terapia para hacer frente a la pandemia. El campo multidisciplinar de la ciencia de los aptámeros también se ha explotado con este fin. La mayoría de los aptámeros desarrollados hasta la fecha para el SARS-CoV-2 se han seleccionado utilizando la proteína S como diana y tienen constantes de afinidad nanomolares y subnanomolares [322–326], aunque la proteína de la nucleocápside (N) también se ha explorado como diana aptagénica [327]. Estos aptámeros se han aplicado en muchos formatos de ensayo, incluyendo ensayos de flujo lateral [323, 327] y aptasensores electroquímicos [326, 328–330] y SPR [331], por mencionar sólo algunos, con límites de detección tan bajos como 0.1 ag/mL [329] y 0.389 fg/mL [23] para las proteínas S y N, respectivamente.

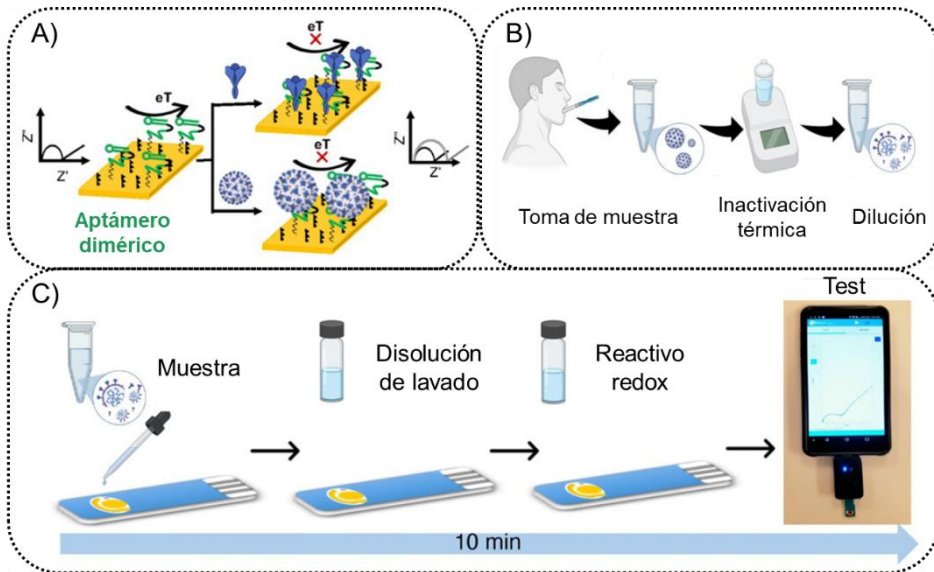
Aunque estas metodologías basadas en aptámeros para la detección del SARS-CoV-2 pueden rivalizar y superar a los métodos actualmente utilizados para el diagnóstico de COVID-19, se requiere un estudio exhaustivo de la afinidad de enlace y la selectividad de los aptámeros para obtener herramientas analíticas útiles, utilizando si es posible más de una técnica para medir la constante de disociación. Además, debe tenerse en cuenta el truncamiento de las secuencias obtenidas para reducir el coste del análisis, así como la validación con una cantidad significativa de muestras clínicas para garantizar el funcionamiento del aptámero en condiciones reales.

Una de las estrategias más interesantes desarrolladas hasta ahora es un aptasensor electroquímico con detección impedimétrica que hace uso de un aptámero dimérico, combinando dos aptámeros previamente seleccionados contra la proteína S [325] que se unen a través de un espaciador de 30 timinas para mejorar su afinidad. Este aptámero dimérico se inmovilizó en electrodos serigrafados de oro y se aplicó a la detección del virus inactivado (tras incubación a 65 °C durante 30 minutos) en muestras de saliva diluidas 1:1, utilizando un potencióstato del tamaño de una memoria USB controlado con un teléfono móvil (**Figura 6.6**). El ensayo se realizó en 10 minutos y se validó con 73 muestras clínicas que habían sido analizadas previamente por RT-qPCR, mostrando una sensibilidad del 80.5% y una especificidad del 100%. Aunque el número de muestras es pequeño, este método cumpliría los requisitos de la FDA de EE.UU.



## 6. Aptámeros contra la proteína S del SARS-CoV-2

en cuanto a sensibilidad (+80%) y especificidad (99%) para las pruebas de antígenos para autodiagnóstico. Además, permitió la detección de las variantes alfa y delta del virus [328].



**Figura 6.6. Aptasensor impedimétrico para la detección de SARS-CoV-2.** A) Representación esquemática del mecanismo del sensor: el aptámero dimérico se inmoviliza en el electrodo de oro y, al unirse la proteína/el virus, se modifican las propiedades de transferencia de electrones del sistema y se registra el cambio resultante en la impedancia. B) Procesamiento de muestras de saliva, que fueron inactivadas por calor (30 min a 65 °C) y diluidas 1:1 en medio de enlace. C) Representación esquemática del flujo de trabajo del ensayo: las muestras procesadas se añaden al electrodo y se incuban a temperatura ambiente (5 minutos), se lavan (1 minuto) y se miden (2 minutos) utilizando un potenciostato portátil. Adaptado de [328].

Los aptámeros caracterizados en este trabajo podrían utilizarse en plataformas analíticas como aptasensor impedimétrico que se ha descrito, aprovechando las ventajas de la detección electroquímica (sensibilidad, facilidad de miniaturización, simplicidad, rapidez, rentabilidad) para desarrollar estrategias útiles de detección del SARS-CoV-2. Sin embargo, se requiere una mayor caracterización de la afinidad de enlace y la selectividad de estos aptámeros antes de su inclusión en sistemas de diagnóstico.

## 6.4. Conclusiones

En este trabajo se ha caracterizado la afinidad de 10 nuevos aptámeros seleccionados contra la proteína S del SARS-CoV-2 mediante espectroscopia SPR. Los aptámeros 1, 3 y 9 mostraron las mejores características analíticas, con valores de  $K_D$  en el intervalo nanomolar (38-87 nM). Estos nuevos receptores podrían utilizarse en el desarrollo de pruebas de diagnóstico económicas, sensibles, selectivas y rápidas para el control del SARS-CoV-2, un virus que sigue amenazando a la población mundial dos años después de su aparición, especialmente en los países en desarrollo con acceso limitado a las vacunas y otras medidas de contención del virus.



## Caracterización fotoelectroquímica de nuevos colorantes de Ru (II) como sensibilizadores de electrodos de ITO/TiO<sub>2</sub> y su aplicación a plataformas de diagnóstico basadas en aptámeros

### 7.1. Introducción

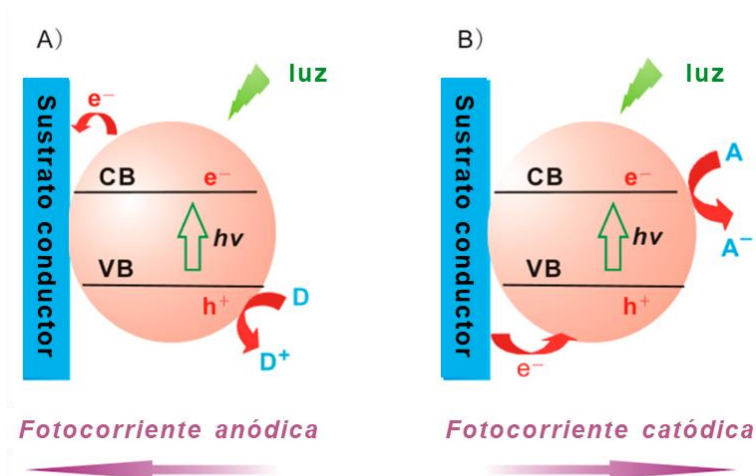
#### 7.1.1. Detección fotoelectroquímica

El diagnóstico clínico basado en la detección de biomarcadores requiere de métodos analíticos capaces de discriminar el o los biomarcadores de interés entre otros componentes interferentes y con una sensibilidad adecuada para lograr la detección de bajas concentraciones de dichos biomarcadores. En este escenario, la combinación del reconocimiento selectivo de los aptámeros con la detección fotoelectroquímica (*photoelectrochemistry*, PEC), que posee las mismas ventajas de la detección electroquímica (simplicidad, rapidez, bajo coste, facilidad de miniaturización) pero una mayor sensibilidad, proporciona nuevas estrategias para mejorar el diagnóstico basado en aptámeros [332]. Esta mayor sensibilidad de la detección PEC se basa en el uso de diferentes formas de energía para la fuente de excitación (luminosa) y la señal detectada (eléctrica), lo que en la práctica conduce a señales de fondo más bajas que la electroquímica convencional [332, 333].

La fotoelectroquímica se centra el estudio de la interacción de la luz con los materiales fotoactivos y la consiguiente conversión de la luz en electricidad e intercambio de energía eléctrica y química. Sobre esta base, la detección PEC se fundamenta en el uso de materiales fotoactivos, generalmente semiconductores orgánicos o inorgánicos, como transductores [334]. En el caso de las nanopartículas semiconductoras inorgánicas, ampliamente utilizadas en este campo, el mecanismo de generación de la fotocorriente es el siguiente. Al ser iluminadas con luz de energía superior a la de la separación de bandas (*bandgap*) del semiconductor, los fotones son absorbidos por las nanopartículas provocan la excitación de electrones

## 7. Caracterización PEC de sensibilizadores de Ru (II)

desde la banda de valencia (VB) ocupada del semiconductor a la banda de conducción (CB) vacía, generando pares electrón-hueco ( $e^-h^+$ ). Si este par  $e^-h^+$  tiene una vida suficientemente larga, se producirá la transferencia de los electrones al electrodo o a un aceptor de electrones en disolución, produciendo una fotocorriente anódica o catódica, respectivamente (**Figura 7.1**). Al mismo tiempo se producirá la neutralización de los huecos originados en el VB con los electrones proporcionados por un dador de electrones en la disolución o por el electrodo [333].

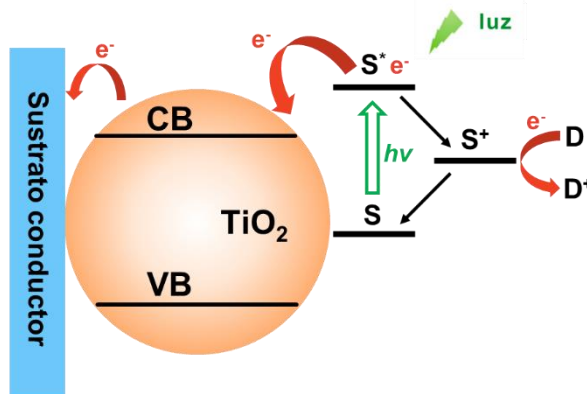


**Figura 7.1. Mecanismo de generación de fotocorriente (A) anódica y (B) catódica en nanopartículas semiconductoras conectadas a electrodos.** CB: banda de conducción, VB: banda de valencia, D: dador de electrones, A: aceptor de electrones,  $e^-$ : electrón,  $h^+$ : agujero. Adaptado de [333].

### 7.1.2. Aplicaciones fotoelectroquímicas de los nanomateriales basados en $TiO_2$

Los materiales semiconductores inorgánicos se fabrican con frecuencia utilizando nanomateriales, como nanopartículas de  $TiO_2$ ,  $SnO_2$  y puntos cuánticos (*quantum dots*, QDs) de CdS y CdSe. Estos nanomateriales suelen depositarse sobre sustratos conductores, como el oro, el  $SnO_2$  dopado con F (FTO) o el óxido de indio y estaño (ITO), para construir el fotoelectrodo [332]. Los nanomateriales de  $TiO_2$  son de especial interés porque poseen propiedades tales como biocompatibilidad, fabricación económica, inocuidad (no son tóxicos), alta adhesión al sustrato, elevada área superficial y propiedades de carga electrónica eficiente, por mencionar algunas, que los hacen adecuados para el desarrollo de biosensores [335, 336]. El  $TiO_2$  se puede encontrar en la naturaleza en tres

estructuras cristalinas conocidas como anatasa (tetragonal), brookita (ortorrómbica) y rutilo (tetragonal) [337], siendo la anatasa la fase cristalina más apreciada por su mayor fotoactividad [338]. Sin embargo, una limitación inherente al  $\text{TiO}_2$  es su amplia separación de banda de 3.2 eV (para la fase anatasa), que requiere la excitación con luz de 387.5 nm o una longitud de onda inferior para mostrar su comportamiento fotoconductor, lo que restringe su aplicabilidad en biosensores [339]. Esta limitación puede superarse mediante la sensibilización del  $\text{TiO}_2$  con 1) QDs semiconductores como CdS [340], QDs de carbono [341] y 2) colorantes adsorbidos por quimisorción o fisorción [342], normalmente complejos metálicos, que pueden mejorar la eficiencia del proceso de excitación y ampliar el rango de longitudes de onda de excitación del  $\text{TiO}_2$ . En el segundo caso, la formación de cargas se puede lograr mediante la excitación de un colorante fotosensibilizador unido a la superficie del semiconductor. Este fenómeno tiene lugar de la siguiente manera. Bajo iluminación con luz visible, la absorción de luz por parte del colorante promociona electrones desde el estado fundamental al estado excitado, seguido de una transferencia de carga al semiconductor. El estado excitado del colorante puede inyectar un electrón o, con menos frecuencia, un hueco en el semiconductor [333] (**Figura 7.2**).



**Figura 7.2. Mecanismo de generación de fotocorriente anódica en nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  sensibilizadas con un colorante.** CB: banda de conducción, VB: banda de valencia, D: dador de electrones,  $D^+$ : dador de electrones oxidado,  $e^-$ : electrón, S: colorante en estado fundamental,  $S^*$ : colorante en estado excitado,  $S^+$ : colorante oxidado.

## 7. Caracterización PEC de sensibilizadores de Ru (II)

### 7.1.3. Complejos de rutenio como sensibilizadores fotoelectroquímicos

Los complejos de metales de transición tienen un notable potencial como fotosensibilizadores debido a sus atractivas propiedades fotofísicas y fotoquímicas [343], su amplio rango de absorción [344], su estabilidad a largo plazo [345] y su adecuado tiempo de vida en estado excitado [346]. La mejora de la absorción y la estabilidad de esta clase de colorantes sensibilizadores es una línea de investigación actualmente activa [347], motivada principalmente por su aplicación en el desarrollo de células solares sensibilizadas con colorantes (*dye-sensitized solar cells*, DSSCs) [345, 346]. Los complejos de rutenio (II) con ligandos polipiridilo son de especial interés en este campo debido a sus atractivas propiedades, como su fuerte absorción en la región visible del espectro, sus estados de separación de carga de larga duración y sus propiedades mejoradas de transferencia de energía [347, 348]. Actualmente, se están explorando nuevos ligandos en estos complejos de rutenio con el fin de mejorar su comportamiento fotoelectroquímico [345, 346].

En este capítulo, se explora el comportamiento fotoelectroquímico de dos nuevos colorantes de rutenio (II) como sensibilizadores de electrodos de ITO/TiO<sub>2</sub>, y se discute la viabilidad de su aplicación en dispositivos de detección basados en aptámeros para diagnóstico clínico.

## 7.2. Materiales y métodos

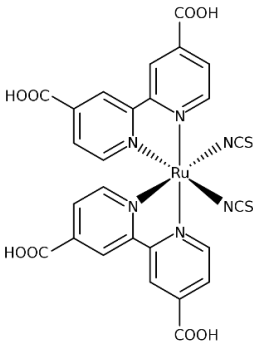
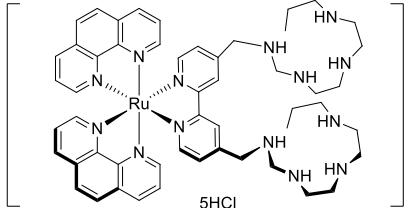
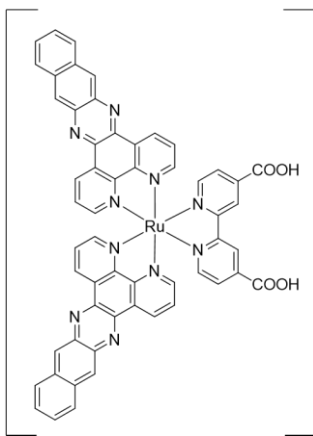
### 7.2.1. Reactivos

Los reactivos ácido ascórbico, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol y cloruro de potasio (KCl) se compraron en Sigma-Aldrich/Merck (Italia). La pasta nanocrystalina de TiO<sub>2</sub> DyeSol DSL-18NR-T utilizada para recubrir los electrodos de ITO se adquirió a Greatcell Solar Materials (Australia). Esta pasta contiene nanopartículas de anatasa altamente dispersas y estables con aglutinantes orgánicos que proporcionan una porosidad versátil adecuada para múltiples sistemas de tintes/electrolitos. Ruthenizer 535, nombre comercial del cis-diisocianato-bis(2,2'-bipiridilo-4,4'-ácido dicarboxílico) rutenio (II), también denominado N3 en la literatura [349, 350], se obtuvo de Solaronix S. A. (Suiza). Los colorantes L4 y P2 fueron sintetizados por el grupo de investigación de la profesora Claudia Giorgi en el Departamento de Química "Ugo Schiff" de la Universidad de Florencia (Italia). Las características de los tres colorantes se

## 7.2. Materiales y métodos

muestran en la **Tabla 7.1**. Todas las disoluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura suministrada por una estación de purificación Milli-Q.

**Tabla 7. 1. Características de los colorantes de rutenio (II) utilizados en este trabajo.**

ID	Estructura	MM (g/mol)	Solubilidad
N3		741.7 *	Etanol
L4		1299.9	H <sub>2</sub> O
P2		1243.5	DMSO

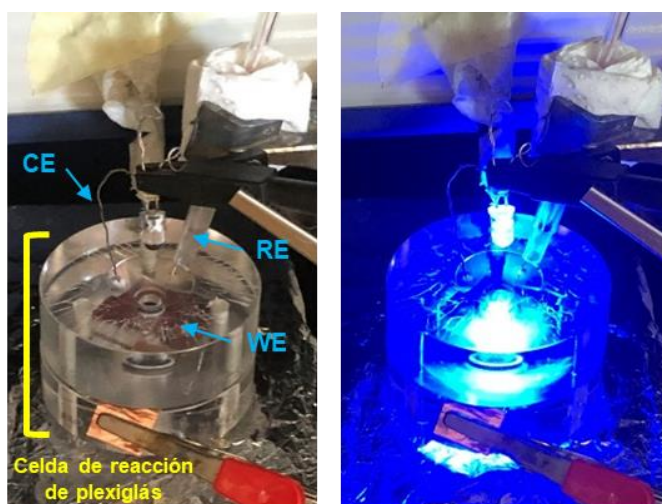
\* Incluye 2 moléculas H<sub>2</sub>O.



## 7. Caracterización PEC de sensibilizadores de Ru (II)

### 7.2.2. Instrumentos y equipos

Las medidas electroquímicas se realizaron en un potenciostato Autolab PGSTAT10 controlado por ordenador con el software NOVA 2.1 (Metrohm). La celda electroquímica utilizada en este trabajo estaba compuesta por tres electrodos: como electrodo de referencia (RE) se empleó Ag/AgCl, como contraelectrodo (CE) un hilo de Pt y como electrodo de trabajo (WE) un sustrato de vidrio revestido con una fina capa conductora de óxido de indio y estaño (ITO, 25 x 25 x 1.1 mm, adquiridos en Sigma-Aldrich/Merck), recubierto con una capa de TiO<sub>2</sub> y modificado con un colorante sensibilizador de Ru (II). El electrodo de trabajo se colocó entre las dos partes de una celda de reacción de plexiglás y se fijó con 3 tornillos. La parte superior de la célula de plexiglás tenía una sección troncocónica con una capacidad de 1 mL y una junta tórica de goma en el centro que sellaba y mantenía constante la superficie del electrodo de trabajo (**Figura 7.3**). Se utilizó una lámpara UV que emitía a 366 nm y una lámpara LED azul que emitía a 434 nm como fuentes de luz para estudiar la respuesta fotoelectroquímica de los electrodos ITO/TiO<sub>2</sub> e ITO/TiO<sub>2</sub>/colorante, respectivamente.

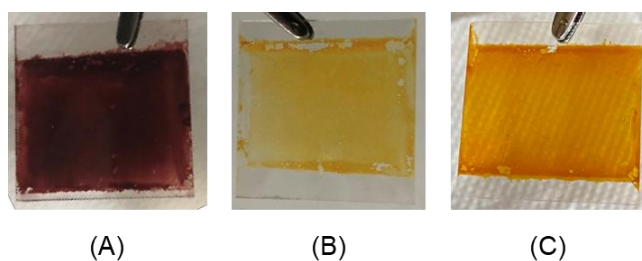


**Figura 7. 3. Imagen del sistema fotoelectroquímico utilizado en este trabajo.** En el panel izquierdo se identifican los electrodos WE, RE y CE, así como la celda de reacción de plexiglás de 2 piezas. En el panel de la derecha, el sistema se ilumina con una luz LED azul que emite a 434 nm suspendida sobre el WE a una distancia fija.

### 7.2.3. Procedimientos experimentales

#### 7.2.3.1. Recubrimiento de electrodos ITO con $\text{TiO}_2$ y tinción con sensibilizadores de rutenio

Los sustratos de ITO se recubrieron dos veces con una pasta nanocristalina de  $\text{TiO}_2$  mediante el llamado método *doctor-blade*. En primer lugar, el electrodo, colocado con la cara conductora hacia arriba, se fijó en la mesa de trabajo aplicando dos tiras paralelas de cinta adhesiva, cubriendo entre 5 a 7 mm de vidrio. A continuación, se depositó una porción de la pasta de  $\text{TiO}_2$  cerca del borde superior del vidrio revestido de ITO entre los dos trozos de cinta adhesiva y, seguidamente, se extendió por la superficie con la ayuda de una varilla de vidrio o una lámina de plástico rígido hasta obtener una capa razonablemente homogénea. Las zonas de los bordes tapadas con la cinta adhesiva se dejaron sin cubrir para colocar una lámina de cobre que actuara como contacto eléctrico. Después de aplicar la pasta de  $\text{TiO}_2$ , los electrodos se sinterizaron en una mufla a  $500\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos para asegurar una adecuada adhesión de la pasta de  $\text{TiO}_2$  al sustrato de ITO. Tras un enfriamiento a temperatura ambiente, se repitieron los pasos de recubrimiento y calentamiento. A continuación, los electrodos de ITO/ $\text{TiO}_2$  se tiñeron con sensibilizadores de rutenio (II) N3, L4 o P2 mediante la inmersión de los electrodos en disoluciones que contenían 0.5 mM de N3 en etanol, 0.5 mM de L4 en agua o 0.5 mM de P2 en una mezcla 4:1 de DMSO:agua. La etapa de tinción se realizó durante la noche en oscuridad para evitar la degradación de los colorantes de Ru (II). En la **Figura 7.4.** se muestran los electrodos tratados con los tres colorantes.



**Figura 7.4.** Electrodos de ITO/ $\text{TiO}_2$  tratados con colorantes de Ru (II) (A) N3, (B) L4 y (C) P2.

## 7. Caracterización PEC de sensibilizadores de Ru (II)

### 7.2.3.2. Caracterización fotoelectroquímica de ITO/TiO<sub>2</sub>/colorante

El electrodo ITO/TiO<sub>2</sub>/colorante se colocó en la celda de reacción de plexiglás y se cubrió con 1 mL de KCl 0.1 M. A continuación, se aplicaron diferentes potenciales en el intervalo -0.3 – +0.3 V (*vs* Ag/AgCl) y se registraron las corrientes resultantes con y sin exposición a luz UV o visible. La lámpara se mantuvo encendida hasta que se alcanzó un valor de corriente estable (1-1.5 min, dependiendo del colorante), y posteriormente se apagó durante el tiempo suficiente para volver al valor de corriente inicial antes de encender de nuevo la lámpara. Durante las medidas, la celda se mantuvo en la oscuridad para evitar la fotodegradación de los colorantes de rutenio.

## 7.3. Resultados y discusión

### 7.3.1. Estudios preliminares con ITO/TiO<sub>2</sub>/N3

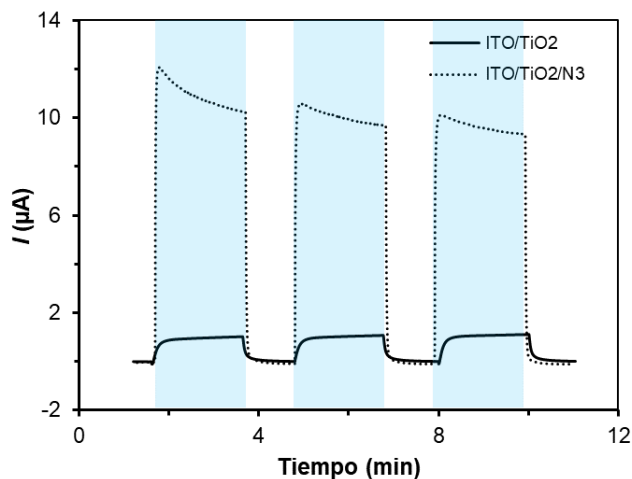
N3 es el colorante estándar utilizado para la sensibilización del TiO<sub>2</sub> en las células solares sensibilizadas por colorante (DSSC) [349, 350]. Por esta razón, se eligió como colorante modelo para este trabajo. El complejo de rutenio N3 contiene dos ligandos bidentados ácido 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxílico y dos grupos isotiocianato monodentados (**Tabla 7.1**). Posee un color púrpura oscuro (**Figura 7.4A**) y máximos de absorción en la región visible del espectro a 396 y 534 nm [349].

En primer lugar, se estudió la respuesta fotoelectroquímica de los electrodos de ITO recubiertos con dos capas de la pasta comercial de TiO<sub>2</sub>, que contiene nanopartículas de anatasa altamente dispersas, para verificar la naturaleza semiconductor de este material. Las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> no conducen la electricidad a menos que se las irradie con luz de energía superior a su separación de bandas (3.2 eV). En ausencia de luz, la cronoamperometría a 0 V en KCl 0.1 M dio lugar a una corriente de fondo casi despreciable de ~ -1 nA. Sin embargo, al iluminar el electrodo con una lámpara UV de 366 nm, se registraron fotocorrientes anódicas de 700 nA (**Figura 7.5**) que demuestran el comportamiento conductor esperado.

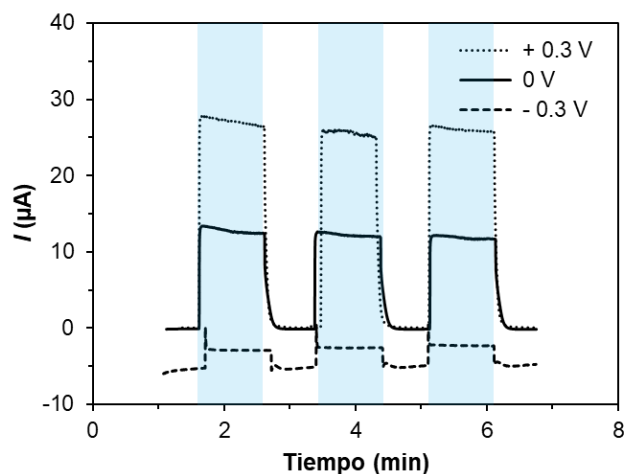
Tras el tratamiento de los electrodos con el colorante N3, se registraron fotocorrientes de 10 μA bajo la exposición a la luz visible, lo que supone una señal 14 veces mayor comparada con las corrientes medidas en ausencia de colorante (**Figura 7.5**). El comportamiento de N3 se caracterizó además midiendo las fotocorrientes a tres potenciales. Se observó que a 0.3 V se

### 7.3. Resultados y discusión

alcanzaron mayores fotocorrientes bajo la exposición a la luz visible ( $25 \mu\text{A}$ ), mientras que con un potencial negativo se produjo una disminución del rendimiento fotoquímico del colorante (**Figura 7.6**). En todos los casos, este colorante se comportó como un fotoánodo, tal y como se esperaba.



**Figura 7.5.** Fotocorrientes medidas a 0 V en electrodos de ITO recubiertos con dos capas de TiO<sub>2</sub> antes y después del tratamiento con el colorante N3. Los períodos de exposición a la luz se destacan en azul. La excitación se realizó con una con lámpara UV que emite a 366 nm para ITO/TiO<sub>2</sub> y una lámpara LED azul para ITO/TiO<sub>2</sub>/N3



**Figura 7.6.** Fotocorrientes medidas a -0.3, 0 and 0.3 V en electrodos de ITO/TiO<sub>2</sub>/N3 bajo excitación con una lámpara LED que emite a 434 nm. Los períodos de exposición a la luz se destacan en azul.

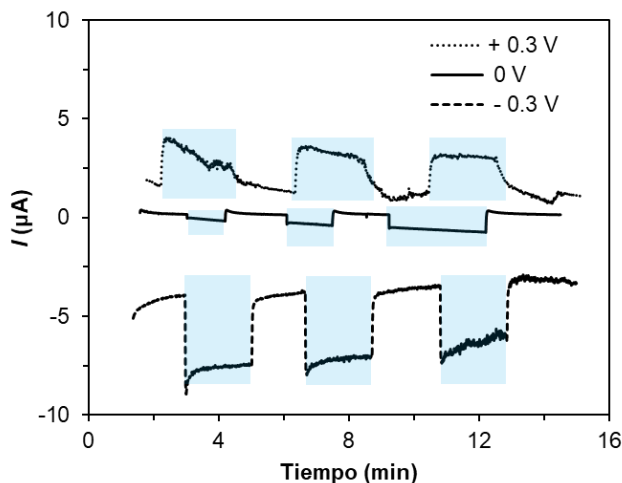
## 7. Caracterización PEC de sensibilizadores de Ru (II)

Se estudió la adición de ácido ascórbico, un conocido dador de electrones, a un nivel de concentración de 0.1 M en la disolución de KCl para mejorar el comportamiento del fotoánodo, pero las corrientes medidas en presencia de este ácido fueron inestables (resultados no mostrados).

### 7.3.2. Caracterización de ITO/TiO<sub>2</sub>/L4

Aunque los complejos de rutenio (II) que contienen ligandos de tiocianato, como el N3, son el estándar de oro entre los numerosos colorantes sensibilizadores que se han explorado hasta ahora, puede producirse la liberación de isotiocianatos monodentados, lo que conduce a una disminución de la estabilidad del complejo, comprometiendo así el comportamiento fotoelectroquímico del colorante [343]. Por esta razón, se están explorando ligandos alternativos. En el caso de L4, el rutenio (II) está complejado con tres ligandos bidentados: dos fenantrolinas y un ligando 4,4'-bis-[metileno(1,3,6,9-tetraacicloundecano)]-2,2'-bipiridina (**Tabla 7.1**). Este colorante soluble en agua tiene un color amarillo intenso (**Figura 7.4B**) y un máximo de absorción a 450 nm.

Los electrodos de ITO se recubrieron con dos capas de TiO<sub>2</sub> y se trataron con L4 siguiendo el protocolo que se describe en la sección de materiales y métodos. Al igual que en el caso anterior, se investigó el comportamiento fotoelectroquímico de ITO/TiO<sub>2</sub>/L4 mediante cronoamperometría a -0,3, 0 y 0.3 V. Las fotocorrientes registradas se muestran en la **Figura 7.7**. A diferencia de N3, L4 mostró un comportamiento fotocatódico. Los mejores resultados se obtuvieron a -0.3 V, dando lugar a fotocorrientes de 6 μA bajo excitación de luz visible. A 0 V, las corrientes medidas fueron bastante bajas (800 nA) en comparación con las registradas a -0.3 V, y a 0.3 V el colorante se comportó como un fotoánodo registrándose fotocorrientes en el intervalo de 1 – 2 μA bajo exposición a la luz. La respuesta obtenida a este último potencial presentaba ruido, que puede atribuirse tanto a la solubilidad del colorante L4 en agua, que podría abandonar la superficie del electrodo en el curso de las mediciones, como a la homogeneidad de la capa de TiO<sub>2</sub>. Los otros dos colorantes son menos propensos a desprenderse de la capa de TiO<sub>2</sub> debido a su modesta solubilidad en medios acuosos.



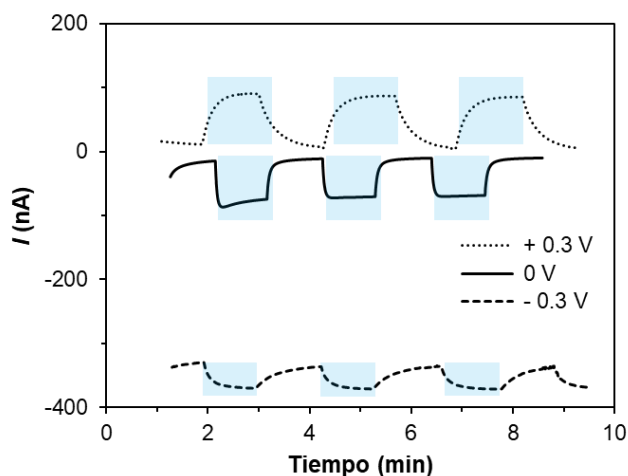
**Figura 7.7.** Fotocorrientes medidas a - 0.3, 0 and 0.3 V en electrodos de ITO/TiO<sub>2</sub>/L4 bajo excitación con una lámpara LED que emite a 434 nm. Los períodos de exposición a la luz se destacan en azul.

### 7.3.3. Caracterización de ITO/TiO<sub>2</sub>/P2

Al igual que L4, el colorante P2 contiene tres ligandos bidentados: un ácido 2,2'-bipiridilo-4,4'-dicarboxílico y dos ligandos benzo[i]dipirido[3,2-a:2',3'-h]quinoxalina. Este colorante es soluble en DMSO y presenta un color anaranjado como se ve en la **Figura 7.3C**, con un máximo de absorción a 440 nm.

El tratamiento del sustrato de vidrio ITO con la pasta de TiO<sub>2</sub> y la posterior tinción con P2 se llevó a cabo como se ha mencionado anteriormente, así como las medidas cronoamperométricas. De forma similar a L4, P2 se comportó como un fotocátodo a  $-0.3$  y  $0\text{ V}$  que fluctuó hacia un funcionamiento fotoanódico a  $0.3\text{ V}$ . Sin embargo, las fotocorrientes registradas fueron mucho menores ( $40$ ,  $70$  y  $80\text{ nA}$  medidos a  $-0.3$ ,  $0$  y  $0.3\text{ V}$ , respectivamente) que las obtenidas con el colorante anterior (**Figura 7.8**). Por esta razón, la viabilidad de utilizar este colorante como sensibilizador del TiO<sub>2</sub> en un aptasensor fotoelectroquímico podría verse comprometida. Con todo, se requiere una mayor caracterización de los colorantes L4 y P2 antes de establecer su utilidad en aplicaciones analítica.

## 7. Caracterización PEC de sensibilizadores de Ru (II)



**Figura 7. 8. Fotocorrientes medidas a - 0.3, 0 and 0.3 V en electrodos de ITO/TiO<sub>2</sub>/P2 bajo excitación con una lámpara LED que emite a 434 nm. Los períodos de exposición a la luz se destacan en azul.**

### 7.3.4. Aplicación de colorantes de Ru (II) en aptasensores fotoelectroquímicos para diagnóstico clínico

La investigación en el desarrollo de estrategias de diagnóstico del cáncer es muy activa debido por la tremenda carga que supone esta enfermedad en el mundo tanto desde el punto de vista económico como social. En este contexto, se han desarrollado varios aptasensores fotoelectroquímicos y ensayos basados en aptámeros para la detección de biomarcadores de cáncer como AFP [351], CEA [352], CA-125 [353], PSA [172, 354], exosomas [355], y células cancerosas MCF-7 [356], entre otros, con límites de detección tan bajos como 4.3 fg/ml para PSA [172, 354] o 3.6 pg/ml para CEA [352].

Muchas de estas estrategias se basan en el uso de semiconductores híbridos obtenidos mediante la combinación de dos o más semiconductores inorgánicos con diferente separación de bandas. Se han descrito formatos de ensayo tanto de señal creciente [351, 352] como decreciente [353]. Con el objetivo de aumentar la sensibilidad, también se ha explorado la combinación de la detección fotoelectroquímica con técnicas isotérmicas de amplificación de ácidos nucleicos, en particular la RCA [22,24]. El hecho de que en muchas de estas metodologías con detección fotoelectroquímica el LD alcanzado sea similar a las estrategias análogas con detección electroquímica convencional sugiere que la mejor sensibilidad inherente a los métodos PEC no es suficiente y su

### 7.3. Resultados y discusión

funcionamiento analítico global se ve afectado por varios factores. Entre los aspectos cruciales que deben tenerse en cuenta en el diseño de un aptasensor fotoelectroquímico están la caracterización del material fotoactivo utilizado como transductor, la inmovilización de los aptámeros o de secuencias auxiliares sobre el transductor (mediante quimisorción, fisisorción, unión covalente o interacción de afinidad), el formato del ensayo (directo, sándwich o competitivo) y la estrategia de generación de la señal (con a sin marca) [357].

Las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  sensibilizadas con colorantes todavía no se han utilizado ampliamente en el desarrollo de plataformas fotoelectroquímicas basadas en aptámeros para el diagnóstico clínico. Sin embargo, estos materiales semiconductores podrían implementarse en dichos sistemas analíticos, teniendo en cuenta que se requiere un diseño cuidadoso y una caracterización exhaustiva para desarrollar aplicaciones útiles en el ámbito clínico.

### 7.4. Conclusiones

Se han caracterizado dos nuevos colorantes de rutenio, P2 y L4, en cuanto a su comportamiento fotoelectroquímico como sensibilizadores de  $\text{TiO}_2$ , mediante cronoamperometría a diferentes potenciales. Con el colorante P2 se registraron las mayores fotocorrientes, lo que sugiere una mejor aplicabilidad en sistemas basados en aptámeros para el diagnóstico clínico. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar su utilidad analítica. Además, su implementación en biosensores basados en aptámeros para el diagnóstico del cáncer requiere una cuidadosa evaluación de las características clave que afectan al rendimiento analítico de estos dispositivos, como la inmovilización del receptor y la estrategia de generación de la señal.





## Conclusiones y perspectivas futuras

### 8.1. Conclusiones

De acuerdo con el trabajo presentado en esta tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha utilizado la tecnología SELEX para desarrollar nuevos aptámeros para la detección de un péptido específico de 16 aminoácidos del colágeno minoritario XI $\alpha$ 1, una proteína que se sobreexpresa en varios cánceres. Se supone que dicho péptido elegido como diana queda expuesto tras la maduración del colágeno y su liberación en la matriz extracelular. Tras 4 rondas de selección, se identificaron 44 aptámeros potenciales. Mediante escrutinio mediante ensayos directos con detección electroquímica se determinó que el aptámero D1 mostraba las mejores características analíticas. La posterior caracterización de su afinidad de enlace permitió estimar una  $K_D \sim 25$  nM. Los estudios de enlace con un péptido más corto revelaron que el "aptátopo" del aptámero D1 es la región de 10 aminoácidos N-terminal. Mediante experimentos de espectrometría de masas se confirmó que D1 captura el colágeno XI $\alpha$ 1 en lisados celulares, lo que indica que el nuevo aptámero no es propenso a la degradación ni a la pérdida de afinidad en medios complejos. Además, D1 permitió la detección de este colágeno menor en lisados celulares utilizando un ensayo tipo sándwich con un anticuerpo como elemento de captura.
2. Se ha desarrollado un ensayo competitivo basado en aptámeros con detección electroquímica para la detección de colágeno XI $\alpha$ 1. Se probaron dos conjugados enzimáticos y, curiosamente, con el conjugado multivalente estreptavidina-peroxidasa se registraron mayores corrientes que con el conjugado monovalente Fab-anti-6-FAM-peroxidasa. Utilizando el primero, el aptámero D1 permitió la detección del fragmento de 16mer del colágeno XI $\alpha$ 1 con un límite de detección de 44 ng/mL y un intervalo analítico de 95 a 1830 ng/mL. El ensayo demostró ser selectivo en presencia

## 8. Conclusiones y perspectivas futuras

de proteínas potencialmente interferentes como la vimentina, NGAL y BSA, así como en suero humano diluido 1:2. El ensayo competitivo basado en aptámeros se utilizó con éxito para la detección del colágeno XI $\alpha$ 1 en lisados de células cancerosas. Con las células A-204 que sobreexpresan colágeno XI se obtuvo la mayor respuesta, mientras que la señal obtenida con la línea celular de control negativo fue igual a la señal del blanco.

3. El aptámero D1, junto con B4 y C1, otros dos aptámeros anticolágeno-XI $\alpha$ 1 que también mostraron un buen funcionamiento en ensayos de enlace directos con detección electroquímica, se marcaron con 6-carboxifluoresceína (6-FAM) y se utilizaron como sondas moleculares para la visualización del colágeno XI $\alpha$ 1 en líneas celulares de cáncer. Estos experimentos de aptafluorescencia correlacionan con los electroquímicos: se observó una débil fluorescencia y ninguna señal electroquímica en las células NCI-H661, cuya expresión de colágeno XI es menor que la de A-204. En conjunto, estos experimentos demuestran la capacidad del aptámero D1 para detectar esta diana en muestras complejas.
4. Se ha demostrado que el aptámero LCN2-2 truncado mantiene la afinidad por su diana, la proteína NGAL, un potencial marcador tumoral para el cáncer de páncreas, como su homólogo largo previamente descrito en la literatura.
5. Las estrategias de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos pueden acoplarse directamente a los aptámeros aprovechando su naturaleza de ácidos nucleicos, lo que abre una vía directa para mejorar la sensibilidad en la detección de biomarcadores basada en aptámeros. Sobre esta base, se ha optimizado un protocolo de amplificación de círculo rodante (RCA) y se ha acoplado al reconocimiento del aptámero truncado anti-NGAL, lo que ha dado como resultado una amplificación de la señal de tres órdenes de magnitud en comparación con la detección enzimática simple convencional, un parámetro que normalmente no se proporciona en la literatura. La etapa de elongación del ADN se acortó a sólo 15 minutos y el consumo de enzimas costosas también se redujo al mínimo, obteniendo señales electroquímicas con suficiente sensibilidad, lo que podría hacer asequible el uso de herramientas de biología molecular en biosensores.
6. La mejora de la sensibilidad observada en los ensayos de enlace directos amplificados por RCA no se pudo trasladar al desarrollo de ensayos competitivos. La caracterización de la afinidad del aptámero hacia la NGAL mediante espectroscopia de resonancia de plasmón superficial (SPR) y termoforesis a microescala (MST) reveló una aparente y significativa

## 8. Conclusiones y perspectivas futuras

sobreestimación de su afinidad en el trabajo original. Este resultado subraya la importancia de conocer la afinidad de los aptámeros en disolución para desarrollar los ensayos competitivos, un parámetro que no suele estimarse y puede ser significativamente diferente de la afinidad en superficie, lo que da lugar a ensayos fallidos. En tales casos, los beneficios de la mejora en la afinidad aparente lograda con la amplificación de RCA son evidentes en los ensayos directos, pero ello no es suficiente cuando la afinidad en disolución es relativamente baja, como es el caso de los aptámeros anti-NGAL según las medidas de MST. En conjunto, los resultados obtenidos aconsejan encarecidamente el uso de varias técnicas para caracterizar completamente los aptámeros, no sólo para validar su utilidad potencial, sino también para encontrar la secuencia mínima funcional.

7. Se ha estudiado la afinidad de dos aptámeros (largo y corto) para la  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), biomarcador del cáncer hepatocelular, con afinidades muy diferentes según los trabajos originales. Utilizando ensayos de enlace heterogéneos directos con detección electroquímica, diferentes de las técnicas utilizadas para evaluar la afinidad en el trabajo original, se estimaron constantes de enlace similares para ambos receptores. Sin embargo, son relativamente modestas para aplicaciones analíticas.
8. Siguiendo una estrategia similar que con los aptámeros anti-NGAL, el reconocimiento de los aptámeros anti-AFP se ha combinado con dos estrategias de amplificación isotérmica de ADN, la amplificación mediada por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y la RCA, produciendo una mejora en la sensibilidad y en la constante de disociación aparente de estos aptámeros. En particular, la mejora de la corriente para el aptámero largo a 500 nM fue de 7.8 veces cuando se utilizó TdT. La RCA mostró una amplificación mucho mayor para el aptámero corto, unas 24 veces para la misma concentración de receptor. Curiosamente, la mejora de la constante de disociación aparente fue mayor con la amplificación TdT, 16 veces frente a las 4 veces para la RCA. Este hecho puede atribuirse a los diferentes aptámeros utilizados con cada amplificación. En conclusión, las estrategias de amplificación de ADN pueden mejorar el funcionamiento de los aptámeros de enlace débil, pero la magnitud de esta mejora depende de la verdadera afinidad del receptor.
9. Se ha caracterizado la afinidad de 10 nuevos aptámeros seleccionados contra la proteína S del SARS-CoV-2 mediante ensayos de enlace en discos sensores recubiertos de oro utilizando espectroscopia SPR. Los aptámeros

## 8. Conclusiones y perspectivas futuras

1, 3 y 9 mostraron las mejores características analíticas, con valores de  $K_D$  en el intervalo nanomolar (38-87 nM).

10. Se ha caracterizado el comportamiento fotoelectroquímico como sensibilizadores de  $TiO_2$  de dos nuevos colorantes de rutenio, P2 y L4, mediante medidas cronoamperométricas a diferentes potenciales. Para el colorante P2 se registraron mayores fotocorrientes, lo que sugiere una mejor aplicabilidad en sistemas basados en aptámeros para el diagnóstico clínico. Sin embargo, se necesitan más estudios para conocer su utilidad analítica.
11. Los resultados generales de la presente tesis destacan el potencial de los aptámeros como receptores específicos en el diagnóstico clínico de enfermedades como el cáncer y la COVID-19, y la importancia de llevar a cabo una caracterización exhaustiva de su afinidad de enlace para proporcionar herramientas analíticas útiles.

### 8.2. Perspectivas futuras

Las investigaciones realizadas en la presente tesis doctoral abren el camino a varias líneas de investigación para abordar en el futuro, entre las que se pueden destacar:

1. La ECM representa una valiosa fuente de marcadores para el diagnóstico del cáncer. A pesar de ello existen muy pocos receptores selectivos para sus componentes. La estrategia seguida en esta tesis para la selección y caracterización de aptámeros anti-colágeno- $XI\alpha 1$  podría aplicarse para seleccionar receptores específicos contra otros potenciales marcadores tumorales. Para ello, es necesaria la colaboración multidisciplinaria entre clínicos, biólogos y químicos analíticos para descifrar la biología del cáncer y desarrollar aptámeros funcionales que puedan aplicarse con éxito en el ámbito clínico.
2. El ensayo competitivo basado en aptámeros para el colágeno  $XI\alpha 1$  que se ha desarrollado en esta tesis podría utilizarse para validar el colágeno XI como biomarcador del cáncer.
3. Las técnicas isotérmicas de amplificación de ácidos nucleicos proporcionan una poderosa herramienta para mejorar las características analíticas de los aptámeros. Los protocolos optimizados de amplificación RCA y TdT que se han desarrollado en esta tesis podrían aplicarse a otros ensayos basados en aptámeros para aumentar la sensibilidad. Además,

estas estrategias de amplificación, combinadas con los aptámeros y la detección electroquímica, son muy adecuadas para la miniaturización y pueden emplearse en la construcción dispositivos de diagnóstico descentralizado.

- 4.** Los nuevos aptámeros anti-SARS-CoV-2 que se han caracterizado en esta tesis podrían utilizarse en el desarrollo de pruebas de diagnóstico económicas, sensibles, selectivas y rápidas para el control de COVID-19.
- 5.** Una mayor caracterización de los colorantes de rutenio (II) P2 y L4 puede permitir su utilización en estrategias de diagnóstico basadas en aptámeros con detección fotoelectroquímica sensible. Sin embargo, se requiere un estudio cuidadoso de las características clave que afectan al funcionamiento de estos métodos, como la inmovilización del receptor y la estrategia de generación de señal.

## Conclusions and future perspectives

### 8.1. Conclusions

According to the work presented in this thesis, the following conclusions can be drawn:

1. We have used the SELEX technology to evolve novel aptamers for the detection of a specific 16-aminoacid peptide of the minor collagen XI $\alpha$ 1, a protein that is overexpressed in several cancers. The 16mer peptide chosen as the target is supposed to be exposed after collagen maturation and released into the extracellular matrix. After 4 rounds of selection, 44 potential aptamers were identified. A screening study by direct electrochemical assays revealed that the D1 aptamer displayed the best analytical performance, and further characterization of its binding affinity allowed us to measure a  $K_D \sim 25$  nM. Binding studies with a shorter version of the 16mer peptide showed that the “aptatope” of D1 is the 10 N-terminal aminoacid region. Mass spectrometry experiments confirmed that D1 captures collagen XI $\alpha$ 1 in cell lysates, indicating that the new aptamer is not prone to degradation or affinity loss in complex media. In addition, D1 was able to detect this minor collagen in cell lysates using a sandwich assay with an antibody as capture element.
2. We have developed an aptamer-based competitive assay with electrochemical detection for the measurement of collagen XI $\alpha$ 1. Two enzyme conjugates were tested and, interestingly, the multivalent streptavidin-peroxidase conjugate showed higher currents than the monovalent Fab anti-6-FAM-peroxidase. Using the former, the D1 aptamer allowed the detection of the 16mer fragment of collagen XI $\alpha$ 1 with a detection limit of 44 ng/mL and a useful analytical interval of 95 to 1830 ng/mL. The assay proved to be selective in the presence of potential interfering proteins such as vimentin, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and bovine serum albumin (BSA), and its

use was demonstrated in 1:2 diluted human serum. The aptamer-based competitive assay was successfully challenged to detect collagen XI $\alpha$ 1 in cancer cell lysates. A-204 cells overexpressing collagen XI showed the highest response, while the negative control cell line showed no signals distinct from the blank.

3. D1, together with B4 and C1, other two anti-collagen-XI $\alpha$ 1 aptamers that also showed a good performance in direct binding assays with electrochemical detection, were labelled with 6-carboxifluorescein (6-FAM) and used as molecular probes for cell imaging of collagen XI $\alpha$ 1 in cancer cell lines. These aptacytofluorescence experiments with 6-FAM-labelled aptamers correlate with the electrochemical ones: weak fluorescence and no electrochemical signal were observed in NCI-H661 cells, whose expression of collagen XI is lower than that of A-204. Taken together, these experiments demonstrate the ability of the D1 aptamer to detect this target in complex samples.
4. We have demonstrated that a truncated aptamer for NGAL, a potential tumor marker for pancreatic cancer, remains as functional as the longer counterpart previously reported in the literature.
5. Isothermal nucleic acid amplification strategies can be directly coupled to aptamers taking advantage of their nucleic acid nature, opening a straightforward way of enhancing the sensitivity of aptamer-based biomarker detection. On this basis, we have optimized a rolling circle amplification (RCA) protocol and we have coupled it to the truncated anti-NGAL aptamer recognition, resulting in a signal amplification of three orders of magnitude when compared to conventional single enzymatic detection, a parameter usually not provided in the literature. The DNA elongation step was shortened to only 15 min and consumption of expensive enzymes was also reduced to a minimum obtaining electrochemical signals with sufficient sensitivity, which could make affordable the use of molecular biology tools in biosensors.
6. The sensitivity improvement observed in RCA amplified direct binding assays was not reflected in the analytical performance of competitive assays. Characterization of the aptamer affinity towards NGAL by surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy and microscale thermophoresis (MST) revealed an apparent and significant overestimation of its affinity in original work. This result emphasizes the importance of the solution-phase affinity in competitive assays, which is not commonly estimated and can be significantly different from the surface-confined one accounting for flawed assays. In such cases, the benefits from the



## 8. Conclusiones y perspectivas futuras

improved functional affinity achieved by RCA amplification are apparent in direct assays but cannot be fully counterbalanced when the solution-phase affinity is rather poor as the case for anti-NGAL aptamers according to MST measurements. Taken together our results strongly advise to use several techniques to fully characterize aptamers not only to validate their potential usefulness but also to find the minimal sequence needed.

7. We have studied the affinity of two aptamers (long and short) for  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), biomarker of hepatocellular cancer, previously reported to have very different affinities. Using heterogeneous direct binding assays with electrochemical readout, different from the techniques used to evaluate the affinity in the original work, similar binding constants were estimated for both receptors. However, they are rather poor for analytical applications.
8. Following a similar approach as with the anti-NGAL aptamers, we have coupled two isothermal DNA amplification strategies, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and RCA, to anti-AFP aptamers recognition, yielding an enhancement in the sensitivity and in the apparent dissociation constant of these aptamers. In particular, the current improvement for the long aptamer at 500 nM was 7.8-fold when TdT was used. RCA showed much higher amplification for the short aptamer, about 24-fold at the same receptor concentration. Interestingly, the improvement in the apparent dissociation constant was higher with TdT amplification, 16-fold versus the 4-fold for RCA. We attribute this fact to the different aptamers used with each amplification. In conclusion, DNA amplification strategies can enhance the performance of weak binding aptamers, but their magnitude depends on the true affinity.
9. We have characterized the binding affinity of 10 novel aptamers selected against the spike protein of SARS-CoV-2 by means of binding assays on gold-coated sensor disks using SPR spectroscopy. Aptamers 1, 3 and 9 showed the best performance, with  $K_D$  values in the nanomolar range (38-87 nM).
10. We have characterized two novel ruthenium dyes, P2 and L4, in terms of their photoelectrochemical performance as  $TiO_2$  sensitizers, by means of chronoamperometric measurements at different potentials. Higher photocurrents were registered for P2 dye, suggesting a better applicability in aptamer-based systems for clinical diagnosis. However, further studies are required to unravel their full analytical utility.

11. The overall results of this thesis remark the potential of aptamers as specific receptors in clinical diagnosis of diseases such as cancer and COVID-19, and the importance of carrying out a thorough characterization of their binding affinity to provide useful analytical tools.

## 8.2. Future perspectives

The investigations carried out in this doctoral thesis pave the way for several research lines to be addressed in the future. I would like to highlight the following ones:

1. The lack of selective receptors for the components of the extracellular matrix is outstanding, even though its role in cancer progression is becoming increasingly clear. As such, ECM represents a valuable source for disease markers. The approach followed in this thesis for the selection and characterization of anti-collagen-XI $\alpha$ 1 aptamers could be applied to raise specific receptors for other potential tumor markers. To this aim, multidisciplinary collaboration among clinicians, biologists and analytical chemists is required to decipher cancer biology and produce functional aptamers that can be successfully implemented in clinical settings.
2. The aptamer-based competitive assay for collagen XI $\alpha$ 1 that we report in this thesis could be used to validate collagen XI as a cancer biomarker.
3. Isothermal nucleic acid amplification techniques provide a powerful tool for enhancing the analytical performance of aptamers. The optimized protocols of RCA and TdT amplifications that have been developed in this thesis could be applied to other aptamer-based assays to boost sensitivity. In addition, these amplification strategies, combined with aptamers and electrochemical detection, are very suitable for miniaturization and can potentially yield advanced decentralized diagnostic devices.
4. The novel anti-SARS-CoV-2 aptamers that have been characterized in this thesis could be used in the development of cost-effective, sensitive, selective and rapid diagnostic tests for the control of COVID-19.
5. Further characterization of P2 and L4 ruthenium (II) sensitizers may enable their use in aptamer-based diagnostic strategies with sensitive photoelectrochemical detection. However, careful evaluation of key features that affect the analytical performance of these methods such as

## **8. Conclusiones y perspectivas futuras**

the receptor immobilization and the signaling generation strategy is required.

# Anexos



# Anexo A

## Reactivos e instrumentación

### A.1. Reactivos

A continuación, se detallan los reactivos utilizados en los capítulos 3, 4, 5 y 6 de la presente tesis doctoral con sus respectivos fabricantes/distribuidores. Los reactivos marcados con (\*) son de grado de biología molecular.

#### A.1.1. Aptámeros y otros oligonucleótidos

La genoteca inicial de secuencias aleatorias de ADN de hebra simple utilizada para el SELEX se obtuvo purificada mediante PAGE de Integrated DNA Technologies (IDT), mientras que el resto de oligonucleótidos se obtuvieron purificados por HPLC de Metabion. Todas las disoluciones de ADN y ARN se alicuotaron y diluyeron con agua ultrapura hasta alcanzar las concentraciones adecuadas y se almacenaron a -20 °C. El agua se purificó con un sistema Milli-Q equipado con un filtro Biopak Polisher para la eliminación de ARNasas y ADNasas (Merck/ MilliporeSigma). El ácido ribonucleico transferente (ARN-t) de *S. Cerevisiae* se compró en Merck/Sigma-Aldrich.

**Tabla A.1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el SELEX para colágeno XI $\alpha$ 1 (capítulo 3).** N<sub>40</sub>: región de 40 nucleótidos aleatorios.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
<b>Genoteca</b>	ATA CCA GCT TAT TCA ATT – N <sub>40</sub> – ACA ATC GTA ATC AGT TAG
<b>Cebador directo</b>	ATA CCA GCT TAT TCA ATT
<b>Cebador inverso</b>	(Biotina – )CTA ACT GAT TAC GAT TGT

## A. Reactivos e instrumentación

**Tabla A.2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los capítulos 3 y 4.** Los aptámeros marcados con 6-FAM y biotina se obtuvieron con un espaciador de 5 timinas (en cursiva) para no comprometer el reconocimiento de la diana debido al impedimento estérico.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
<b>B2</b>	6-FAM – <i>TTT TTG</i> CTA GAC GAA AAC GCT TGT GAA ATC CCG ACA TCC GCG TAT
<b>B3</b>	6-FAM – <i>TTT TTC</i> TGC AAC TGT CTC TTA ATA TGT TCT AGG GAC GGA CAA ACA
<b>B4</b>	6-FAM/ Biotina – <i>TTT TTG</i> ACG CAA GAA ATT CAG GGC ACC TGG AAC GAC GCG TCG GCT
<b>C1</b>	6-FAM/ Biotina – <i>TTT TTG</i> GGA CTT ACT AGA GCC TGG GAG GCA AAC GCG GTA CCT GGT
<b>C2</b>	6-FAM – <i>TTT TTA</i> CCA GCC GTT ATT ACC GGA CTC CCT AGA GCA CCG CCG GCC
<b>C10</b>	6-FAM – <i>TTT TTG</i> GTC CTG GGA GAC GAA CAA CCC CCG TCA CAA GCC TCG TAG
<b>D1</b>	6-FAM/ Biotina – <i>TTT TTG</i> GTT GAC GGC AGT CGG CGG TAT GCG CAT ATC GTG TTG GTA
<b>D8</b>	6-FAM – <i>TTT TTG</i> GGT GTA GGA CAG GGT CGT TAG TGG TGT GTT TTG CTG GGG
<b>G8</b>	6-FAM/ Biotina – <i>TTT TTC</i> CCG GGT ACA TTA GAA TGG TTT ACC GCC CCG CGG CGC CCT
<b>H1</b>	6-FAM – <i>TTT TTG</i> GTG CAG CGT TTG CAT GTG TAT TTT TAC ACA AGT GCT ACC
<b>T<sub>40</sub></b>	Biotina – TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T
<b>ADN control (aptacitoquímica)</b>	FITC – TCT TCA CAA TAA AGT GCA AGA TAG CTG GGC AAT GGC AAA GGA TGT TAA AGG

**Tabla A.3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el capítulo 5.** En verde y naranja se destacan las regiones de hibridación entre el molde circular de la RCA y los aptámeros. En gris se destaca la región del molde de la RCA que coincide en secuencia con la sonda de detección, diseñada para hibridar con el producto de la amplificación. Algunas secuencias se sintetizaron con espaciadores de timina, indicados en cursiva.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
<b>AFP-L</b>	FITC – GGC AGG AAG ACA AAC AAG CTT GGC GGC GGG AAG GTG TTT AAA TTC CCG GGT CTG CGT GGT CTG TGG TGC TGT
<b>AFP-L-TdT</b>	GGC AGG AAG ACA AAC AAG CTT GGC GGC GGG AAG GTG TTT AAA TTC CCG GGT CTG CGT GGT CTG TGG TGC TGT <i>TTT TTT</i>
<b>AFP-S</b>	FITC/ Biotina – TCA GGT GCA GTT CTC GAC TCG GTC TTG ATG TGG GT
<b>AFP-S-TdT</b>	<i>TTT TTT TTT</i> TTC AGG TGC AGT TCT CGA CTC GGT CTT GAT GTG GG
<b>AFP-S-RCA</b>	TCA GGT GCA GTT CTC GAC TCG GTC TTG ATG TGG GTT <i>TTT TTT TTT</i> AGA TAG TAA GTG CAA TCT
<b>LCN2-4</b>	HS – ATA CCA GCT TAT TCA ATT CGG AGG GCG GAA GCA AAG CGT AAC AGA AAG CCA ACA CGC GAG ATA GTA AGT GCA ATC T
<b>LCN2-4t</b>	Biotina – <i>TTT TTT TTT</i> TCG GAG GGC GGA AGC AAA GCG TAA CAG AAA GCC AAC ACG CG
<b>LCN2-2t</b>	6-FAM/ Biotina – CCA CAG TAG GTG AGG TTC ACT GAG TTA TCC ATT GTT GGC A
<b>LCN2-2RCA</b>	CCA CAG TAG GTG AGG TTC ACT GAG TTA TCC ATT GTT GGC <i>ATT TTT TTT TTA</i> GAT AGT AAG TGC AAT CT
<b>Molde de la RCA</b>	p- <i>TTA CTA TCT TAA CAA CAT GAA GAT TGT</i> AGG TCA GAA CTC ACC TGT TAG AAA CTG TGA AGA TCG CTT AGA TTG CAC
<b>Sonda de detección</b>	6-FAM – AAC AAC ATG AAG ATT GTA



## A. Reactivos e instrumentación

El aptámero tiolado LCN2-4 se suministró comercialmente como disulfuro. Para reducir los enlaces S-S y obtener los grupos terminales SH, el aptámero se trató con ditioneitol (DTT) 100  $\mu$ M durante 16 h a temperatura ambiente. El ADN-SH obtenido se purificó utilizando una columna Sephadex G25 (NAP-10, GE Healthcare). Tras la elución con agua Milli-Q, la concentración del oligonucleótido tiolado se midió espectrofotométricamente a 260 nm y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

**Tabla A.4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el capítulo 6.** N<sub>40</sub>: región de 40 nucleótidos aleatorios.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
Aptámeros 1-10	CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG – N <sub>40</sub> – GCA TAG GTA GTC CAG AAG CC
RP-biotina	Biotina – GGC TTC TGG ACT ACC TAT GC

### A.1.2. Proteínas, conjugados proteicos y péptidos

- Albúmina de suero bovino (BSA) (Merck/Sigma-Aldrich) \*
- Conjugado de estreptavidina-peroxidasa (strep-POD) (Thermo Fisher Scientific)
- Conjugado de fragmento-F<sub>ab</sub>-anti-fluoresceína-peroxidasa (antiF-POD) (Roche Diagnostics)
- Conjugados de BSA y péptidos de 10 y 16 aminoácidos del colágeno XI $\alpha$ 1 (BSA-10mer y BSA-16mer, respectivamente) (ABYNTEK Biopharma S.L.)
- Disolución de caseína al 1% en PBS (Thermo Fisher Scientific)
- Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) recombinante humana expresada en células HEK (Ref. ab167728, Abcam)
- Péptido 16mer del colágeno XI $\alpha$ 1 marcado con biotina en el extremo N terminal (Biomedal)
- Péptido 16mer del colágeno XI $\alpha$ 1 sin marcar (ABYNTEK Biopharma S.L.)
- Proteína S1 del SARS-CoV-2 expresada en células HEK293 (Ref. S1N-C52H4, suministrada por AcroBiosystems y distribuida por Thermo Fisher Scientific)

- Vimentina (VIM) recombinante humana producida en *E. coli* (Ref. PRO-309, ProSpec)
- $\alpha$ -Fetoproteína (AFP) humana purificada a partir de suero de cordón umbilical humano (ref. pro-406, ProSpec)

### A.1.3. Partículas magnéticas

Todas las partículas magnéticas utilizadas eran Dynabeads<sup>®</sup> de la casa comercial Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific.

- Partículas magnéticas con estreptavidina Dynabeads<sup>®</sup> MyOne<sup>™</sup> Streptavidin C1 (PM-S) de 1  $\mu$ m de diámetro (10 mg/mL)
- Partículas magnéticas con grupos carboxilo Dynabeads<sup>®</sup> M-270 Carboxylic Acid (PM-C) de 2.8  $\mu$ m de diámetro (30 mg/mL)
- Partículas magnéticas con grupos tosilo Dynabeads<sup>®</sup> M-280 Tosylactivated (PM-T) de 2.8  $\mu$ m de diámetro (30 mg/mL)

### A.1.4. Kits y reactivos para amplificación, clonación, purificación cuantificación de ácidos nucleicos

- Cebadores M13 directo e inverso (Thermo Fisher Scientific) para la amplificación mediante PCR de ADN clonado con TA Cloning<sup>®</sup> Kit
- Disolución 100 mM de la sal sódica de 2'-desoxiadenosin-5'-trifosfato (dATP) (Thermo Fisher Scientific)
- Disolución 100 mM de una mezcla equimolar de los 4 desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) (Bioline)
- Kit de ADN ligasa T4 (5 Weiss/ $\mu$ L, disuelta en Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), KCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 0.1 mM y 50% (v/v) glicerol) con su medio de reacción concentrado 10 $\times$  (Tris-HCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, DTT 100 mM, ATP 5 mM) (Thermo Fisher Scientific)
- Kit de ADN polimerasa Immolase<sup>™</sup>, que incluye ADN polimerasa Immolase<sup>™</sup>, medio de reacción de ADN polimerasa Immolase<sup>™</sup> concentrado 10 $\times$  y disolución de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Bioline)

## A. Reactivos e instrumentación

- Kit de ADN polimerasa *Taq*, incluyendo ADN polimeras *Taq*, medio de reacción de ADN polimerasa *Taq* concentrado 10× y disolución de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Biotools) para la amplificación mediante PCR del ADN clonado con TA Cloning® Kit
- Kit de ADN polimerasa φ29 (10 U/μL, disuelta en Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, KCl 100 mM, 0.5% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (v/v) Tween 20 y 50% (v/v) glicerol) con su medio de reacción 10× (acetato de Tris 330 mM (pH 7.9 a 37 °C), acetato de Mg 100 mM, acetato de K 660 mM, 1% (v/v) Tween 20, DTT 10 mM) (Thermo Fisher Scientific)
- Kit de clonación TA Cloning® Kit, que incluye el vector pCR® 2.1, la enzima ADN ligasa T4 Express Link™, el medio de reacción concentrado 5× para la ADN ligasa T4 Express Link™, medio de reacción para la PCR concentrado 10×, disolución 50 mM de dNTPs, molde de ADN de control, agua esterilizada y cebadores para PCR del ADN de control (Thermo Fisher Scientific)
- Kit de desoxinucleotidil transferasa terminal (20 U/μL, disuelta en fosfato de K 50 mM (pH 7.3), NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 1.43 mM, 0.1% (v/v) Triton R X-100, y 50% (v/v) glycerol) con su medio de reacción 10× (acetato de Na 500 mM, acetato de Tris 200 mM, acetato de Mg 100 mM) y CoCl<sub>2</sub> 2.5 mM (New England Biolabs)
- Kit de *E. coli* químicamente competentes One Shot™ TOP10F', que incluye *E. coli* One Shot™ TOP10F', medio S.O.C. (2% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 2.5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, 20 mM de glucosa) y ADN de control pUC19 (Thermo Fisher Scientific)
- Kit de ensayo de alta sensibilidad para ADN de hebra doble Qubit™ dsDNA High Sensitivity (HS) (Thermo Fisher Scientific)
- Kit de extracción de ADN en gel DNA Montage™ Gel Extraction Kit (Merck-Millipore)
- Reactivo de purificación de productos de PCR ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific)
- Sal de N<sup>6</sup>-(6-amino)hexil-2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato-biotina (biotina-dATP) trietilamonio (Jena Bioscience GmbH)

### A.1.5. Disoluciones reguladoras comerciales

- Tampón de clorhidrato de tris(hidroximetil)-aminometano 1 M de pH 7.4 (Tris-HCl) (Merck/Sigma-Aldrich)\*
- Tampón de Tris-acetato-EDTA (TAE) concentrado 20× de pH 8.3; su composición es 40 mM de acetato de Tris y 1 mM de EDTA cuando se diluye 20 veces (Thermo Fisher Scientific)\*
- Tampón de Tris-Borato-EDTA (TBE) concentrado 5× de pH 8.3; su composición es 89 mM de borato, 89 mM de Tris y 2 mM de EDTA cuando se diluye 5 veces (PanReac - AppliChem)\*
- Tampón salino de fosfato concentrado 10×, pH 7.4 (PBS 10×); su composición es 10 mM de fosfato y 154 mM de NaCl cuando se diluye 10 veces (Merck/Sigma-Aldrich)\*
- Tampón salino de fosfato de sodio-EDTA concentrado 20×, pH 7.4 (SSPE 20×); su composición es 20 mM de fosfato, 298 mM de NaCl y 2 mM de EDTA cuando se diluye diez veces (Merck/Sigma-Aldrich)\*

### A.1.6. Otros reactivos

- 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) en un formato lista para utilizar en ensayos tipo ELISA que incluye H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck/Sigma-Aldrich)
- 4-Aminofenol (*p*-ATP) (Merck/Sigma-Aldrich)
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) (Thermo Fisher Scientific)
- 6-mercaptohexanol (MH) (Merck/Sigma-Aldrich)
- Acetato de sodio (Merck/Sigma-Aldrich)
- Ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) (Merck/Sigma-Aldrich)
- Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) monohidratado (Merck/Sigma-Aldrich)
- Ácido acético glacial (Merck/Sigma-Aldrich)
- Ácido sulfúrico 95-98% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (J.T. Baker)

## A. Reactivos e instrumentación

- Biotina (Merck/Sigma-Aldrich)
- Cloruro de sodio (NaCl) (Merck/Sigma-Aldrich)\*
- Colorante para visualización de ácidos nucleicos en electroforesis en gel ADN SimplySafe DNA staining dye (EURx)
- Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Merck/ Sigma-Aldrich)
- Dihidrógenofosfato de sodio dihidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck/ Sigma-Aldrich)
- Disolución 1 M de hidróxido de sodio (NaOH) (Merck/Sigma-Aldrich)
- Disolución tamponada de formaldehído al 4% (pH 7) (VWR)
- Etilendiaminotetraacetato de sodio dihidratado ( $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck/Sigma-Aldrich)\*
- Clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (Merck /Sigma-Aldrich)
- Hidrogenofosfato de sodio,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck/Sigma-Aldrich)\*
- Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Thermo Fisher Scientific)
- Marcador de tamaños para electroforesis en gel de ADN de 20 pares de bases DNA Ladder dye plus (Takara Bio Inc.)
- N-hidroxisuccinimida (NHS) (Merck/Sigma-Aldrich)
- Peróxido de hidrógeno 30% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Merck/Sigma-Aldrich)
- Reactivo de Bradford concentrado 5 $\times$  (SERVA Electrophoresis)
- Suero humano (Merck/Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (70%) (Thermo Fisher Scientific)

## A.2. Instrumentos y equipos

Se utilizaron celdas electroquímicas serigrafiadas de carbono (SPCE, modelo DRP-110) y oro (SPAuE, modelo DRP-220BT) con electrodos de trabajo de 4 mm fabricadas por Metrohm-DropSens. Los electrodos se limpiaron con etanol y agua ultrapura y se secaron bajo una corriente de nitrógeno antes de su uso. Las medidas electroquímicas se realizaron en un potenciostato  $\mu$ -Autolab tipo II controlado por ordenador con el software NOVA 2.1. (Metrohm Autolab), utilizando un conector específico (DRP-DSC, Metrohm-DropSens) que actuó como interfase entre el SPCE y el potenciostato. Todos los potenciales están referidos al electrodo de pseudoreferencia serigrafiado de Ag (Ag-SPC).

Para las separaciones magnéticas y lavados se utilizó un imán DynaMag™-2 (Thermo Fisher Scientific). Las etapas de incubación a temperatura controlada se realizaron en un ThermoMixer® Comfort (Eppendorf), mientras que las incubaciones a temperatura ambiente se llevaron a cabo en una rueda de mezcla de 12 tubos Dynabeads™ MX (Thermo Fisher Scientific).

Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Veriti de 96 pocillos (Applied Biosystems), mientras que la concentración de ADN de los amplicones de PCR se calculó a partir de las medidas realizadas con un fluorímetro Qubit™ 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Las medidas de absorbancia del ensayo de enriquecimiento se realizaron con un espectrofotómetro UV/Vis GENESYS™ 10S (Thermo Fisher Scientific), mientras que las de los ensayos ELISA y Bradford se llevaron a cabo en un lector de placas BioTek™ Eon™ (Thermo Fisher Scientific). Para los experimentos de secuenciación se utilizó un analizador genético Hitachi 3130xl (Applied Biosystem).

Los experimentos de aptacitofluorescencia se realizaron en un microscopio láser confocal TCS SP8X (Leica, Alemania) provisto de un objetivo de inmersión en aceite PLA APO 40X/ 1.30 y controlado por ordenador con el software LAS X (versión 1.0.0.12269). El cultivo y la tinción de las células se llevaron a cabo en placas de cultivo Falcon® de 4 cámaras, suministradas por VWR.

Las medidas de SPR se llevaron a cabo en un instrumento ESPRIT de cubeta de doble canal (EcoChemie) operado en modo automático, utilizando el automuestreador para dispensar y mezclar las disoluciones, y controlado por ordenador mediante el software de adquisición de datos ESPRIT versión 4.4. Todos los experimentos SPR se realizaron a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C controlada con un termostato HaakeD1 (Alemania).



# Anexo B

## Producción científica

El trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral ha dado lugar a 7 publicaciones en revistas científicas internacionales revisadas por pares y ha sido presentado en 11 congresos científicos internacionales y nacionales.

### B.1. Artículos científicos

- R. Lorenzo-Gómez, A. Casero-Álvarez, R. Miranda-Castro, M. García-Ocaña, J. R. de-los-Toyos, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón. A competitive assay for the detection of a 16-mer peptide from  $\alpha 1$  chain of human collagen XI. *Talanta* **240**, 123196 (2022).  
Corresponde al **capítulo 4**.
- R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, J. R. de-los-Toyos, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón. Aptamers targeting a tumor-associated extracellular matrix component: The human collagen XI $\alpha$ 1. *Anal. Chim. Acta* **1189**, 339206 (2022).  
Corresponde al **capítulo 3**.
- R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón. Bioanalytical methods for circulating extracellular matrix-related proteins: new opportunities in cancer diagnosis. *Anal. Bioanal. Chem.* **414**, 147-165 (2022).  
Corresponde a una parte de los **capítulos 3 y 4**.



## B. Producción científica

- R. Lorenzo-Gómez, D. González-Robles, R. Miranda-Castro, J. R. de-los-Toyos, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón. On the electrochemical detection of alpha-fetoprotein using aptamers: DNA isothermal amplification strategies to improve the performance of weak aptamers. *Biosensors* **10** (5), 46 (2020).  
Corresponde a una parte del **capítulo 5**.
- A. Díaz-Fernández, R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón. Electrochemical aptasensors for cancer diagnosis in biological fluids – A review. *Anal. Chim. Acta* **1124**, 1-19 (2020).  
Corresponde a una parte del **capítulo 1**.
- R. Lorenzo-Gómez, N. Fernández-Alonso, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón. Unravelling the lipocalin 2 interaction with aptamers: may rolling circle amplification improve their functional affinity? *Talanta* **197**, 406-412 (2019).  
Corresponde a una parte del **capítulo 5**.
- R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón. Electrochemical aptamer-based assays coupled to isothermal nucleic acid amplification techniques: New tools for cancer diagnosis. *Curr. Opin. Electrochem.* **14**, 32-43 (2019).  
Corresponde a una parte del **capítulo 1**.

## B.2. Participación en congresos

### B.2.1. Congresos internacionales

- **3<sup>rd</sup> International Conference on Analytical and Bioanalytical Methods** (18-20 de octubre de 2021, online).  
*Contribución oral: Directed selection of aptamers for more specific cancer diagnosis* (N. de-los-Santos-Álvarez, R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, M. J. Lobo-Castañón).

## B.2. Participación en congresos

- **72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry** (29 de agosto – 3 de septiembre de 2021, online).  
*Contribución oral: Aptamers against cancer biomarkers: selection and integration into electrochemical sensors* (M. J. Lobo-Castañón, R. Lorenzo-Gómez, A. Díaz-Fernández, P. Gómez-Meijide, S. Tellado-Arbesú, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez).
- **1<sup>st</sup> International Electronic Conference on Biosensors – IECB 2020** (2-17 de noviembre de 2020, online).  
*Contribución oral: Improving the Analytical Performance of Weak Aptamers: DNA Isothermal Amplification Approaches* (R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos Álvarez, M. J. Lobo-Castañón).  
Publicada como **artículo de conferencia** en *Proceedings* **60 (1)**, 26 (2020).
- **71<sup>st</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry** (30 de agosto – 4 de septiembre de 2020, online).  
*Póster 1: TdT vs RCA: DNA isothermal amplifications to improve the analytical performance of aptamers* (R. Lorenzo-Gómez, D. González-Robles, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos Álvarez, M. J. Lobo-Castañón).  
*Póster 2: Electrochemical characterization of aptamers against a potential biomarker of pancreatic ductal adenocarcinoma* (N. de-los-Santos Álvarez, R. Lorenzo-Gómez, M. García-Ocaña, C. Barneo-Caragol, R. Miranda-Castro, J.R. de-los-Toyos, M. J. Lobo-Castañón).
- **6<sup>th</sup> European Chemical Biology Symposium - 6<sup>th</sup> ECBS/LS-EuChemS** (3-5 de abril de 2019, Madrid - España).  
*Póster: Isothermal amplification of aptamers for the sensitive detection of cancer biomarkers* (R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón).
- **2<sup>nd</sup> European Biosensor Symposium - EBS 2019** (18-21 de febrero de 2019, Florencia – Italia).  
*Conferencia magistral: Aptamer-based electrochemical sensors for the analysis of tumor markers.* (A. Díaz-Fernández, R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón).

## B. Producción científica

- **39<sup>th</sup> Meeting of the Electrochemistry Group of the Spanish Royal Society of Chemistry and 3rd E3 Mediterranean Symposium: Electrochemistry for Environment and Energy** (2-5 de julio de 2018, Madrid – España).  
*Conferencia magistral: Isothermal aptamer elongation for sensitive tumor biomarker detection* (N. de-los-Santos-Álvarez, R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, M. J. Lobo-Castañón).
- **17<sup>th</sup> International Conference on Electroanalysis - ESEAC 2018** (3-7 de junio de 2018, Rodas – Grecia).  
*Contribución oral: Rolling circle amplified electrochemical aptasensors for cancer biomarker detection* (N. de-los-Santos-Álvarez, R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, M. J. Lobo-Castañón).
- **II Workshop on Electrochemical devices & II Workshop Electrobionet** (9-10 de noviembre de 2017, Mieres - España).  
*Contribución oral: Novel strategies for cancer biomarker detection in blood* (R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón).

### B.2.2. Congresos nacionales

- **1<sup>er</sup> Congreso Virtual de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas** (11-12 de marzo de 2021, online).  
*Contribución oral: Nuevos receptores moleculares para diagnóstico y terapia del adenocarcinoma ductal de páncreas* (R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, M. García-Ocaña, J.R. de-los-Toyos, L. Barneo, N. de-los-Santos Álvarez, M. J. Lobo-Castañón).

Abstract publicado en *British Journal of Surgery*:

R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, M. García-Ocaña, J.R. de-los-Toyos, L. Barneo, N. de-los-Santos Álvarez, M. J. Lobo-Castañón. New molecular receptors for diagnosis and therapy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Brit. J. Surg.* **108**, Supplement\_3, znab160. 012 (2021).

- **VII Jornadas Doctorales y I Congreso de Investigación de la Universidad de Oviedo** (4-5 de julio de 2018, Mieres).  
*Póster: Amplificación isotérmica de ADN aplicada a la detección de marcadores tumorales empleando aptámeros* (R. Lorenzo-Gómez).

## Bibliografía

1. J. A. Doudna, T. R. Cech, The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature*. **418**, 222–228 (2002).
2. N. Sonenberg, A. G. Hinnebusch, Regulation of translation initiation in eukaryotes: Mechanisms and biological targets. *Cell*. **136**, 731–745 (2009).
3. A. Zovoilis, C. Cifuentes-Rojas, H.-P. Chu, A. J. Hernandez, J. T. Lee, Destabilization of B2 RNA by EZH2 activates the stress response. *Cell*. **167**, 1788-1802.e13 (2016).
4. P. B. Moore, T. A. Steitz, The involvement of RNA in ribosome function. *Nature*. **418**, 229–235 (2002).
5. B. Onoa, I. Tinoco, RNA folding and unfolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 374–379 (2004).
6. M. H. Caruthers, Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science*. **230**, 281–285 (1985).
7. R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**, 487–491 (1988).
8. M. R. Dunn, R. M. Jimenez, J. C. Chaput, Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat. Rev. Chem.* **1**, 0076 (2017).
9. H. Sun, X. Zhu, P. Y. Lu, R. R. Rosato, W. Tan, Y. Zu, Oligonucleotide aptamers: New tools for targeted cancer therapy. *Mol. Ther. - Nucleic Acids*. **3** (2014).
10. A. D. Ellington, J. W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. **346**, 818–822 (1990).

## Bibliografía

11. C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. **249**, 505–510 (1990).
12. G. Perret, E. Boschetti, Aptamer-based affinity chromatography for protein extraction and purification, in *Aptamers in Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol 174*, K. Urmann, J.-G. Walter, Eds. (Springer International Publishing, Cham, 2020), pp. 93–139.
13. H. Kaur, J. G. Bruno, A. Kumar, T. K. Sharma, Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines. *Theranostics*. **8**, 4016–4032 (2018).
14. J. Bruno, Predicting the uncertain future of aptamer-based diagnostics and therapeutics. *Molecules*. **20**, 6866–6887 (2015).
15. E. M. McConnell, J. Nguyen, Y. Li, Aptamer-based biosensors for environmental monitoring. *Front. Chem.* **8**, 434 (2020).
16. X. Liu, X. Zhang, Aptamer-based technology for food analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **175**, 603–624 (2015).
17. S. Amaya-González, N. De-los-Santos-Álvarez, A. J. Miranda-Ordieres, M. J. Lobo-Castañón, Aptamer-based analysis: A promising alternative for food safety control. *Sensors*. **13(12)**, 16292–16311 (2013).
18. R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, Chapter 6 - Aptamers as synthetic receptors for food quality and safety control, in *Comprehensive Analytical Chemistry, vol 74, Biosensors for sustainable food - New opportunities and technical challenges*, V. Scognamiglio, G. Rea, F. Arduini, G. Palleschi, Eds. (Elsevier, 2016), pp. 155–191.
19. S. D. Jayasena, Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* **45**, 1628–1650 (1999).
20. M. Famulok, Bringing picomolar protein detection into proximity. *Nat. Biotechnol.* **20**, 448–449 (2002).
21. S. C. B. Gopinath, P. K. R. Kumar, Aptamers that bind to the hemagglutinin of the recent pandemic influenza virus H1N1 and efficiently inhibit agglutination. *Acta Biomater.* **9**, 8932–8941 (2013).

22. J. P. Landry, Y. Ke, G.-L. Yu, X. D. Zhu, Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform. *J. Immunol. Methods.* **417**, 86–96 (2015).
23. E. Luzi, M. Minunni, S. Tombelli, M. Mascini, New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding. *TrAC Trends Anal. Chem.* **22**, 810–818 (2003).
24. T. Nguyen, J. P. Hilton, Q. Lin, Emerging applications of aptamers to micro- and nanoscale biosensing. *Microfluid. Nanofluidics.* **6**, 347 (2009).
25. M. Sassanfar, J. W. Szostak, An RNA motif that binds ATP. *Nature.* **364**, 550–553 (1993).
26. Jenison Robert D., Gill Stanley C., Pardi Arthur, Polisky Barry, High-Resolution Molecular Discrimination by RNA. *Science.* **263**, 1425–1429 (1994).
27. S. G. L. Quaak, J. B. A. G. Haanen, J. H. Beijnen, B. Nuijen, Naked plasmid DNA formulation: Effect of different disaccharides on stability after lyophilisation. *AAPS PharmSciTech.* **11**, 344–350 (2010).
28. J.-H. Park, J.-Y. Byun, H. Mun, W.-B. Shim, Y.-B. Shin, T. Li, M.-G. Kim, A regeneratable, label-free, localized surface plasmon resonance (LSPR) aptasensor for the detection of ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.* **59**, 321–327 (2014).
29. T. Shen, Q. Yue, X. Jiang, L. Wang, S. Xu, H. Li, X. Gu, S. Zhang, J. Liu, A reusable and sensitive biosensor for total mercury in canned fish based on fluorescence polarization. *Talanta.* **117**, 81–86 (2013).
30. S. Xu, X. Zhang, W. Liu, Y. Sun, H. Zhang, Reusable light-emitting-diode induced chemiluminescence aptasensor for highly sensitive and selective detection of riboflavin. *Biosens. Bioelectron.* **43**, 160–164 (2013).
31. F. Li, H. Zhang, Z. Wang, A. M. Newbigging, M. S. Reid, X.-F. Li, X. C. Le, Aptamers facilitating amplified detection of biomolecules. *Anal. Chem.* **87**, 274–292 (2015).
32. I. Álvarez-Martos, E. E. Ferapontova, A DNA sequence obtained by replacement of the dopamine RNA aptamer bases is not an aptamer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **489**, 381–385 (2017).

## Bibliografía

33. E. J. Cho, J.-W. Lee, A. D. Ellington, Applications of aptamers as sensors. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2**, 241–264 (2009).
34. D. J. King, S. E. Bassett, X. Li, S. A. Fennewald, N. K. Herzog, B. A. Luxon, R. Shope, D. G. Gorenstein, Combinatorial Selection and Binding of Phosphorothioate Aptamers Targeting Human NF- $\kappa$ B RelA(p65) and p50. *Biochemistry.* **41**, 9696–9706 (2002).
35. B. R. Shaw, M. Dobrikov, X. Wang, J. Wan, K. He, J.-L. Lin, P. Li, V. Rait, Z. A. Sergueeva, D. Sergueev, Reading, writing, and modulating genetic information with boranophosphate mimics of nucleotides, DNA, and RNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1002**, 12–29 (2003).
36. A. D. Keefe, S. T. Cload, SELEX with modified nucleotides. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 448–456 (2008).
37. M. Darmostuk, S. Rimpelova, H. Gbelcova, T. Ruml, Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1141–1161 (2015).
38. Tuerk C, MacDougal S, Gold L, RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 6988–6992 (1992).
39. M. F. Kubik, A. W. Stephens, D. Schneider, R. A. Marlar, D. Tasset, High-affinity RNA ligands to human  $\alpha$ -thrombin. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2619–2626 (1994).
40. S. D. Mendonsa, M. T. Bowser, In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 20–21 (2004).
41. S. D. Mendonsa, M. T. Bowser, In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9382–9383 (2005).
42. J.-W. Park, R. Tatavarty, D. W. Kim, H.-T. Jung, M. B. Gu, Immobilization-free screening of aptamers assisted by graphene oxide. *Chem. Commun.* **48**, 2071–2073 (2012).
43. R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal. Bioanal. Chem.* **383**, 83–91 (2005).

44. R. Svirgelj, N. Dossi, R. Toniolo, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, Selection of anti-gluten DNA aptamers in a deep eutectic solvent. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 12850–12854 (2018).
45. A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, E. Fernández-Rodríguez, M. J. Lobo-Castañón, Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer. *Biosens. Bioelectron.* **128**, 83–90 (2019).
46. A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. Díaz, D. Suárez, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, Aptamers targeting protein-specific glycosylation in tumor biomarkers: general selection, characterization and structural modeling. *Chem. Sci.* **11**, 9402–9413 (2020).
47. S. C. B. Gopinath, Methods developed for SELEX. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 171–182 (2007).
48. J. Qu, S. Yu, Y. Zheng, Y. Zheng, H. Yang, J. Zhang, Aptamer and its applications in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 683–695 (2017).
49. T. Wang, C. Chen, L. M. Larcher, R. A. Barrero, R. N. Veedu, Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. *Biotechnol. Adv.* **37**, 28–50 (2019).
50. T. S. Yeoh, A. Anna, T.-H. Tang, M. Citartan, Development of an optimization pipeline of asymmetric PCR towards the generation of DNA aptamers: a guide for beginners. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 31 (2022).
51. M. Avci-Adali, A. Paul, N. Wilhelm, G. Ziemer, H. P. Wendel, Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation. *Molecules.* **15**, 1–11 (2010).
52. T. K. Sharma, J. G. Bruno, A. Dhiman, ABCs of DNA aptamer and related assay development. *Biotechnol. Adv.* **35**, 275–301 (2017).
53. R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, Characterization of aptamer-ligand complexes, in *Aptamers for analytical applications: Affinity acquisition and method design*, Y. Dong, Ed. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany, 2018), pp. 127–172.



## Bibliografía

54. E. C. Hulme, M. A. Trevethick, Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 1219–1237 (2010).
55. Y. Pu, Z. Zhu, H. Liu, J. Zhang, J. Liu, W. Tan, Using aptamers to visualize and capture cancer cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3225–3233 (2010).
56. Z. Tang, P. Parekh, P. Turner, R. W. Moyer, W. Tan, Generating aptamers for recognition of virus-infected cells. *Clin. Chem.* **55**, 813–822 (2009).
57. P. R. Mallikaratchy, A. Ruggiero, J. R. Gardner, V. Kuryavyi, W. F. Maguire, M. L. Heaney, M. R. McDevitt, D. J. Patel, D. A. Scheinberg, A multivalent DNA aptamer specific for the B-cell receptor on human lymphoma and leukemia. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2458–2469 (2011).
58. D. Musumeci, D. Montesarchio, Polyvalent nucleic acid aptamers and modulation of their activity: a focus on the thrombin binding aptamer. *Pharmacol. Ther.* **136**, 202–215 (2012).
59. H. Prinz, Hill coefficients, dose–response curves and allosteric mechanisms. *J. Chem. Biol.* **3**, 37–44 (2010).
60. J. N. Weiss, The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* **11**, 835–841 (1997).
61. Y. Xia, S. Gan, Q. Xu, X. Qiu, P. Gao, S. Huang, A three-way junction aptasensor for lysozyme detection. *Biosens. Bioelectron.* **39**, 250–254 (2013).
62. E. Daems, G. Moro, R. Campos, K. De Wael, Mapping the gaps in chemical analysis for the characterisation of aptamer-target interactions. *TrAC Trends Anal. Chem.* **142**, 116311 (2021).
63. M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415 (2003).
64. J. K. Aronson, R. E. Ferner, *Curr. Protoc. Pharmacol.*, in press, doi:10.1002/cpph.19.
65. R. M. Califf, Biomarker definitions and their applications. *Exp. Biol. Med.* **243**, 213–221 (2018).

66. M. N. Lyngbakken, P. L. Myhre, H. Røsjø, T. Omland, Novel biomarkers of cardiovascular disease: Applications in clinical practice. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **56**, 33–60 (2019).
67. S. I. Sherwani, H. A. Khan, A. Ekhzaimy, A. Masood, M. K. Sakharkar, Significance of HbA1c test in diagnosis and prognosis of diabetic patients. *Biomark. Insights.* **11**, 95–104 (2016).
68. Página web oficial de la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO), último acceso: 06/05/2022, (disponible en <https://www.who.int>).
69. Página web oficial del Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EE. UU. (*National Cancer Institute at the National Institutes of Health*), último acceso 07/05/2022, (disponible en <https://www.cancer.gov>).
70. X. Zou, J. Wu, J. Gu, L. Shen, L. Mao, Application of aptamers in virus detection and antiviral therapy. *Front. Microbiol.* **10**, 1462 (2019).
71. E. Sánchez-Báscones, F. Parra, M. J. Lobo-Castañón, Aptamers against viruses: Selection strategies and bioanalytical applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* **143**, 116349 (2021).
72. A. K. Füzéry, J. Levin, M. M. Chan, D. W. Chan, Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clin. Proteomics.* **10**, 13 (2013).
73. A. Mordente, E. Meucci, G. E. Martorana, A. Silvestrini, Cancer biomarkers discovery and validation: State of the art, problems and future perspectives, in *Advances in cancer biomarkers: From biochemistry to clinic for a critical revision*, R. Scatena, Ed. (Springer Netherlands, Dordrecht, 2015), pp. 9–26.
74. U. Kuzmanov, H. Kosanam, E. P. Diamandis, The sweet and sour of serological glycoprotein tumor biomarker quantification. *BMC Med.* **11**, 31 (2013).
75. L. Zhang, S. Wan, Y. Jiang, Y. Wang, T. Fu, Q. Liu, Z. Cao, L. Qiu, W. Tan, Molecular elucidation of disease biomarkers at the interface of chemistry and biology. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 2532–2540 (2017).

## Bibliografía

76. D. Xiang, S. Shigdar, G. Qiao, T. Wang, A. Z. Kouzani, S.-F. Zhou, L. Kong, Y. Li, C. Pu, W. Duan, Nucleic acid aptamer-guided cancer therapeutics and diagnostics: The next generation of cancer medicine. *Theranostics*. **5**, 23–42 (2015).
77. M. Heiat, M. Negahdary, Sensitive diagnosis of alpha-fetoprotein by a label free nanoaptasensor designed by modified Au electrode with spindle-shaped gold nanostructure. *Microchem. J.* **148**, 456–466 (2019).
78. M. Cui, Y. Wang, M. Jiao, S. Jayachandran, Y. Wu, X. Fan, X. Luo, Mixed self-assembled aptamer and newly designed zwitterionic peptide as antifouling biosensing interface for electrochemical detection of alpha-fetoprotein. *ACS Sens.* **2**, 490–494 (2017).
79. A. Rahi, N. Sattarahmady, H. Heli, Label-free electrochemical aptasensing of the human prostate-specific antigen using gold nanospears. *Talanta*. **156–157**, 218–224 (2016).
80. B. Wei, K. Mao, N. Liu, M. Zhang, Z. Yang, Graphene nanocomposites modified electrochemical aptamer sensor for rapid and highly sensitive detection of prostate specific antigen. *Biosens. Bioelectron.* **121**, 41–46 (2018).
81. G. Paniagua, A. Villalonga, M. Eguílaz, B. Vegas, C. Parrado, G. Rivas, P. Díez, R. Villalonga, Amperometric aptasensor for carcinoembryonic antigen based on the use of bifunctionalized Janus nanoparticles as biorecognition-signaling element. *Anal. Chim. Acta.* **1061**, 84–91 (2019).
82. Z. Liu, S. Lei, L. Zou, G. Li, L. Xu, B. Ye, A label-free and double recognition–amplification novel strategy for sensitive and accurate carcinoembryonic antigen assay. *Biosens. Bioelectron.* **131**, 113–118 (2019).
83. W. Jiang, L. Liu, L. Zhang, Q. Guo, Y. Cui, M. Yang, Sensitive immunosensing of the carcinoembryonic antigen utilizing aptamer-based in-situ formation of a redox-active heteropolyacid and rolling circle amplification. *Microchim. Acta.* **184**, 4757–4763 (2017).
84. Y. Wang, J. Luo, J. Liu, S. Sun, Y. Xiong, Y. Ma, S. Yan, Y. Yang, H. Yin, X. Cai, Label-free microfluidic paper-based electrochemical aptasensor for ultrasensitive and simultaneous multiplexed detection of cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* **136**, 84–90 (2019).

85. K. Malecka, D. Pankratov, E. E. Ferapontova, Femtomolar electroanalysis of a breast cancer biomarker HER-2/neu protein in human serum by the cellulase-linked sandwich assay on magnetic beads. *Anal. Chim. Acta.* **1077**, 140–149 (2019).
86. C. Shen, K. Zeng, J. Luo, X. Li, M. Yang, A. Rasooly, Self-assembled DNA generated electric current biosensor for HER2 analysis. *Anal. Chem.* **89**, 10264–10269 (2017).
87. S. Mansouri Majd, A. Salimi, Ultrasensitive flexible FET-type aptasensor for CA 125 cancer marker detection based on carboxylated multiwalled carbon nanotubes immobilized onto reduced graphene oxide film. *Anal. Chim. Acta.* **1000**, 273–282 (2018).
88. C. Ma, H. Liu, L. Zhang, H. Li, M. Yan, X. Song, J. Yu, Multiplexed aptasensor for simultaneous detection of carcinoembryonic antigen and mucin-1 based on metal ion electrochemical labels and  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  electronic wires. *Biosens. Bioelectron.* **99**, 8–13 (2018).
89. S. G. Meirinho, L. G. Dias, A. M. Peres, L. R. Rodrigues, Electrochemical aptasensor for human osteopontin detection using a DNA aptamer selected by SELEX. *Anal. Chim. Acta.* **987**, 25–37 (2017).
90. M. Shamsipur, L. Farzin, M. Amouzadeh Tabrizi, F. Molaabasi, Highly sensitive label free electrochemical detection of VEGF165 tumor marker based on “signal off” and “signal on” strategies using an anti-VEGF165 aptamer immobilized BSA-gold nanoclusters/ionic liquid/glassy carbon electrode. *Biosens. Bioelectron.* **74**, 369–375 (2015).
91. M. Amouzadeh Tabrizi, M. Shamsipur, L. Farzin, A high sensitive electrochemical aptasensor for the determination of VEGF165 in serum of lung cancer patient. *Biosens. Bioelectron.* **74**, 764–769 (2015).
92. J.-J. Zhang, J.-T. Cao, G.-F. Shi, K.-J. Huang, Y.-M. Liu, S.-W. Ren, A luminol electrochemiluminescence aptasensor based on glucose oxidase modified gold nanoparticles for measurement of platelet-derived growth factor BB. *Talanta.* **132**, 65–71 (2015).
93. X. Liu, H.-L. Shuai, K.-J. Huang, A label-free electrochemical aptasensor based on leaf-like vanadium disulfide-Au nanoparticles for the sensitive and selective detection of platelet-derived growth factor BB. *Anal. Methods.* **7**, 8277–8284 (2015).

## Bibliografía

94. H. Ilkhani, M. Sarparast, A. Noori, S. Zahra Bathaie, M. F. Mousavi, Electrochemical aptamer/antibody based sandwich immunosensor for the detection of EGFR, a cancer biomarker, using gold nanoparticles as a signaling probe. *Biosens. Bioelectron.* **74**, 491–497 (2015).
95. K.-A. Lee, J.-Y. Ahn, S.-H. Lee, S. Singh Sekhon, D.-G. Kim, J. Min, Y.-H. Kim, Aptamer-based sandwich assay and its clinical outlooks for detecting lipocalin-2 in hepatocellular carcinoma (HCC). *Sci. Rep.* **5**, 10897 (2015).
96. Z. Hao, Y. Pan, W. Shao, Q. Lin, X. Zhao, Graphene-based fully integrated portable nanosensing system for on-line detection of cytokine biomarkers in saliva. *Biosens. Bioelectron.* **134**, 16–23 (2019).
97. R. Aebersold, J. N. Agar, I. J. Amster, M. S. Baker, C. R. Bertozzi, E. S. Boja, C. E. Costello, B. F. Cravatt, C. Fenselau, B. A. Garcia, Y. Ge, J. Gunawardena, R. C. Hendrickson, P. J. Hergenrother, C. G. Huber, A. R. Ivanov, O. N. Jensen, M. C. Jewett, N. L. Kelleher, L. L. Kiessling, N. J. Krogan, M. R. Larsen, J. A. Loo, R. R. Ogorzalek Loo, E. Lundberg, M. J. MacCoss, P. Mallick, V. K. Mootha, M. Mrksich, T. W. Muir, S. M. Patrie, J. J. Pesavento, S. J. Pitteri, H. Rodriguez, A. Saghatelian, W. Sandoval, H. Schlüter, S. Sechi, S. A. Slavoff, L. M. Smith, M. P. Snyder, P. M. Thomas, M. Uhlén, J. E. Van Eyk, M. Vidal, D. R. Walt, F. M. White, E. R. Williams, T. Wohlschläger, V. H. Wysocki, N. A. Yates, N. L. Young, B. Zhang, How many human proteoforms are there? *Nat. Chem. Biol.* **14**, 206–214 (2018).
98. S. Goto, K. Tsukakoshi, K. Ikebukuro, Development of aptamers against unpurified proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 2706–2716 (2017).
99. Z. Tang, D. Shangguan, K. Wang, H. Shi, K. Sefah, P. Mallikratchy, H. W. Chen, Y. Li, W. Tan, Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells. *Anal. Chem.* **79**, 4900–4907 (2007).
100. G. S. Zamay, O. S. Kolovskaya, T. N. Zamay, Y. E. Glazyrin, A. V. Krat, O. Zubkova, E. Spivak, M. Wehbe, A. Gargaun, D. Muharemagic, M. Komarova, V. Grigorieva, A. Savchenko, A. A. Modestov, M. V. Berezovski, A. S. Zamay, Aptamers selected to postoperative lung adenocarcinoma detect circulating tumor cells in human blood. *Mol. Ther.* **23**, 1486–1496 (2015).
101. G. S. Zamay, T. N. Zamay, V. A. Kolovskii, A. V. Shabanov, Y. E. Glazyrin, D. V. Veprintsev, A. V. Krat, S. S. Zamay, O. S. Kolovskaya, A. Gargaun, A. E. Sokolov, A. A. Modestov, I. P. Artyukhov, N. V.

- Chesnokov, M. M. Petrova, M. V. Berezovski, A. S. Zamay, Electrochemical aptasensor for lung cancer-related protein detection in crude blood plasma samples. *Sci. Rep.* **6**, 34350 (2016).
102. Y. Zheng, Y. Zhao, Y. Di, C. Xiu, L. He, S. Liao, D. Li, B. Huang, DNA aptamers from whole-serum SELEX as new diagnostic agents against gastric cancer. *RSC Adv.* **9**, 950–957 (2019).
103. K. Li, L. Qi, L. Gao, M. Shi, J. Li, Z. Liu, L. Zhao, Selection and preliminary application of a single stranded DNA aptamer targeting colorectal cancer serum. *RSC Adv.* **9**, 38867–38876 (2019).
104. T. Wang, W.-X. Chen, G.-F. Xu, B. Zhang, S.-Q. Wei, J. Hu, K.-H. Zhang, A universal strategy designed for selecting bench-to bedside aptamers to serum and validated in hepatocellular carcinoma diagnosis. *Microchem. J.* **150**, 104152 (2019).
105. S. Li, H. Xu, H. Ding, Y. Huang, X. Cao, G. Yang, J. Li, Z. Xie, Y. Meng, X. Li, Q. Zhao, B. Shen, N. Shao, Identification of an aptamer targeting hnRNP A1 by tissue slide-based SELEX. *J. Pathol.* **218**, 327–336 (2009).
106. H. Wang, X. Li, D. E. Volk, G. L.-R. Lokesh, M.-A. Elizondo-Riojas, L. Li, A. M. Nick, A. K. Sood, K. P. Rosenblatt, D. G. Gorenstein, Morph-X-Select: Morphology-based tissue aptamer selection for ovarian cancer biomarker discovery. *BioTechniques.* **61** (2016), doi:10.2144/000114473.
107. W.-T. Liu, W.-B. Lee, Y.-C. Tsai, Y.-J. Chuang, K.-F. Hsu, G.-B. Lee, An automated microfluidic system for selection of aptamer probes against ovarian cancer tissues. *Biomicrofluidics.* **13**, 014114 (2019).
108. W. Zhong, Y. Pu, W. Tan, J. Liu, J. Liao, B. Liu, K. Chen, B. Yu, Y. Hu, Y. Deng, J. Zhang, H. Liu, Identification and Application of an Aptamer Targeting Papillary Thyroid Carcinoma Using Tissue-SELEX. *Anal. Chem.* **91**, 8289–8297 (2019).
109. J. Mi, Y. Liu, Z. N. Rabbani, Z. Yang, J. H. Urban, B. A. Sullenger, B. M. Clary, In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 22–24 (2010).
110. J. Mi, P. Ray, J. Liu, C.-T. Kuan, J. Xu, D. Hsu, B. A. Sullenger, R. R. White, B. M. Clary, In Vivo Selection Against Human Colorectal Cancer

## Bibliografía

- Xenografts Identifies an Aptamer That Targets RNA Helicase Protein DHX9. *Mol. Ther. - Nucleic Acids*. **5**, e315 (2016).
111. L. Chen, W. He, H. Jiang, L. Wu, W. Xiong, B. Li, Z. Zhou, Y. Qian, In vivo SELEX of bone targeting aptamer in prostate cancer bone metastasis model. *Int. J. Nanomedicine*. **Volume 14**, 149–159 (2018).
112. H. Wang, Y. Zhang, H. Yang, M. Qin, X. Ding, R. Liu, Y. Jiang, In Vivo SELEX of an Inhibitory NSCLC-Specific RNA Aptamer from PEGylated RNA Library. *Mol. Ther. - Nucleic Acids*. **10**, 187–198 (2018).
113. L. Civit, I. Theodorou, F. Frey, H. Weber, A. Lingnau, C. Gröber, M. Blank, C. Dambrune, J. Stunden, M. Beyer, J. Schultze, E. Latz, F. Ducongé, M. H. G. Kubbutat, G. Mayer, Targeting hormone refractory prostate cancer by in vivo selected DNA libraries in an orthotopic xenograft mouse model. *Sci. Rep.* **9**, 4976 (2019).
114. F.-G. Banica, *Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications* (Wiley, United Kingdom, 2012).
115. D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 121–131 (2001).
116. S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, Current trends and challenges in bioelectrochemistry for non-invasive and early diagnosis. *Curr. Opin. Electrochem.* **12**, 81–91 (2018).
117. F. Kuralay, S. Campuzano, J. Wang, Greatly extended storage stability of electrochemical DNA biosensors using ternary thiolated self-assembled monolayers. *Talanta*. **99**, 155–160 (2012).
118. S. Campuzano, F. Kuralay, M. J. Lobo-Castañón, M. Bartošík, K. Vyavahare, E. Paleček, D. A. Haake, J. Wang, Ternary monolayers as DNA recognition interfaces for direct and sensitive electrochemical detection in untreated clinical samples. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 3577–3583 (2011).
119. N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Aptamers as recognition elements for label-free analytical devices. *TrAC Trends Anal. Chem.* **27**, 437–446 (2008).

120. S. Forouzanfar, F. Alam, N. Pala, C. Wang, Review—A review of electrochemical aptasensors for label-free cancer diagnosis. *J. Electrochem. Soc.* **167**, 067511 (2020).
121. R. Y. Lai, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, Aptamer-based electrochemical detection of picomolar platelet-derived growth factor directly in blood serum. *Anal. Chem.* **79**, 229–233 (2007).
122. L. R. Schoukroun-Barnes, F. C. Macazo, B. Gutierrez, J. Lottermoser, J. Liu, R. J. White, Reagentless, structure-switching, electrochemical aptamer-based sensors. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **9**, 163–181 (2016).
123. M. A. Pellitero, A. Shaver, N. Arroyo-Currás, Critical review—Approaches for the electrochemical interrogation of DNA-based sensors: A critical review. *J. Electrochem. Soc.* **167**, 037529 (2019).
124. J. D. Cohen, L. Li, Y. Wang, C. Thoburn, L. Danilova, Javed A. A., Wong F., Mattox A., Hruban R. H., Wolfgang C L., Goggins M. G., Dal Molin M., Wang T.-L., Roden R., Klein A. P., Ptak J., Dobbyn L., Schaefer J., Silliman N., Popoli M., Vogelstein J. T., Browne J. D., Schoen R. E., Brand R. E., Tie J., Gibbs P., Wong H.-L., Mansfield A. S., Jen J., Hanash S. M., Falconi M., Allen P. J., Zhou S., Bettegowda C., Diaz L. A., Tomasetti C., Kinzler K. W., Vogelstein B., Lennon A. M., Papadopoulos N., Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. **359**, 926–930 (2018).
125. J. Rodriguez-Canales, F. C. Eberle, E. S. Jaffe, M. R. Emmert-Buck, Why is it crucial to reintegrate pathology into cancer research? *BioEssays*. **33**, 490–498 (2011).
126. S. Jaffer, I. J. Bleiweiss, Beyond hematoxylin and eosin - The role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Invest.* **22**, 445–465 (2004).
127. S. Gupta, D. Thirstrup, T. C. Jarvis, D. J. Schneider, S. K. Wilcox, J. Carter, C. Zhang, A. Gelinas, A. Weiss, N. Janjic, G. S. Baird, Rapid histochemistry using slow off-rate modified aptamers with anionic competition. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **19** (3), 273–278 (2011).
128. E. D. Hsi, A practical approach for evaluating new antibodies in the clinical immunohistochemistry laboratory. *J. Histotechnol.* **24**, 275–281 (2001).



## Bibliografía

129. H. A. Idikio, Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **3**, 169–176 (2009).
130. J. Bordeaux, A. W. Welsh, S. Agarwal, E. Killiam, M. T. Baquero, J. A. Hanna, V. K. Anagnostou, D. L. Rimm, Antibody validation. *BioTechniques.* **48**, 197–209 (2010).
131. T. Y.-M. Leong, K. Cooper, A. S.-Y. Leong, Immunohistology—Past, present, and future. *Adv. Anat. Pathol.* **17** (6), 404–418 (2010).
132. F. Lin, Z. Chen, Standardization of diagnostic immunohistochemistry: Literature review and Geisinger experience. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **138**, 1564–1577 (2014).
133. S.-R. Shi, R. J. Cote, C. R. Taylor, Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 931–937 (2001).
134. B. A. Bukari, M. Citartan, E. S. Ch'ng, M. P. Bilibana, T. Rozhdestvensky, T.-H. Tang, Aptahistochemistry in diagnostic pathology: technical scrutiny and feasibility. *Histochem. Cell Biol.* **147**, 545–553 (2017).
135. V. K. Rait, T. J. O'Leary, J. T. Mason, Modeling formalin fixation and antigen retrieval with bovine pancreatic ribonuclease A: I—Structural and functional alterations. *Lab. Invest.* **84**, 292–299 (2004).
136. Z. Balogh, G. Lautner, V. Bardóczy, B. Komorowska, Robert. E. Gyurcsanyi, T. Meszáros, Selection and versatile application of virus-specific aptamers. *FASEB J.* **24**, 4187–4195 (2010).
137. J. J. Walker, E. N. Brody, L. Gold, Slow Off-Rate Modified Aptamer Arrays for Biomarker Discovery and Diagnostic Applications, in *Microarrays in Diagnostics and Biomarker Development: Current and Future Applications*, B. Jordan, Ed. (Springer Berlin Heidelberg, 2012), pp. 113–131.
138. Z. Zhao, L. Xu, X. Shi, W. Tan, X. Fang, D. Shangguan, Recognition of subtype non-small cell lung cancer by DNA aptamers selected from living cells. *The Analyst.* **134**, 1808 (2009).

139. M. Bauer, J. Macdonald, J. Henri, W. Duan, S. Shigdar, The application of aptamers for immunohistochemistry. *Nucleic Acid Ther.* **26**, 120–126 (2016).
140. R. Ahirwar, S. K. Vellarikkal, A. Sett, S. Sivasubbu, V. Scaria, U. Bora, B. B. Borthakur, A. C. Katakai, J. D. Sharma, P. Nahar, Aptamer-assisted detection of the altered expression of estrogen receptor alpha in human breast cancer. *PLOS ONE*. **11**, e0153001 (2016).
141. R. Ahirwar, S. Nahar, S. Aggarwal, S. Ramachandran, S. Maiti, P. Nahar, In silico selection of an aptamer to estrogen receptor alpha using computational docking employing estrogen response elements as aptamer-alike molecules. *Sci. Rep.* **6**, 21285 (2016).
142. Z. Zeng, P. Zhang, N. Zhao, A. M. Sheehan, C.-H. Tung, C.-C. Chang, Y. Zu, Using oligonucleotide aptamer probes for immunostaining of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Mod. Pathol.* **23**, 1553–1558 (2010).
143. S. Shigdar, C. Qian, L. Lv, C. Pu, Y. Li, L. Li, M. Marappan, J. Lin, L. Wang, W. Duan, The use of sensitive chemical antibodies for diagnosis: Detection of low levels of EpCAM in breast cancer. *PLOS ONE*. **8**, e57613 (2013).
144. Z. Liu, Y. Lu, Y. Pu, J. Liu, B. Liu, B. Yu, K. Chen, T. Fu, C. J. Yang, H. Liu, W. Tan, Using aptamers to elucidate esophageal cancer clinical samples. *Sci. Rep.* **5**, 18516 (2015).
145. Y. Pu, Z. Liu, Y. Lu, P. Yuan, J. Liu, B. Yu, G. Wang, C. J. Yang, H. Liu, W. Tan, Using DNA aptamer probe for immunostaining of cancer frozen tissues. *Anal. Chem.* **87**, 1919–1924 (2015).
146. S. K. Vashist, J. H. T. Luong, Chapter 5 - Enzyme-linked immunoassays, in *Handbook of Immunoassay Technologies*, S. K. Vashist, J. H. T. Luong, Eds. (Academic Press, Elsevier, 2018), pp. 97–127.
147. S. Y. Toh, M. Citartan, S. C. B. Gopinath, T.-H. Tang, Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosens. Bioelectron.* **64**, 392–403 (2015).
148. X.-L. Tang, Y.-X. Zhou, S.-M. Wu, Q. Pan, B. Xia, X.-L. Zhang, CFP10 and ESAT6 aptamers as effective mycobacterial antigen diagnostic reagents. *J. Infect.* **69**, 569–580 (2014).

## Bibliografía

149. M. Sypabekova, A. Bekmurzayeva, R. Wang, Y. Li, C. Nogues, D. Kanayeva, Selection, characterization, and application of DNA aptamers for detection of Mycobacterium tuberculosis secreted protein MPT64. *Tuberculosis*. **104**, 70–78 (2017).
150. Anderson Brian L., Welch Ryan J., Litwin Christine M., Assessment of three commercially available serologic assays for detection of antibodies to mycobacterium tuberculosis and identification of active tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1644–1649 (2008).
151. Q. Pan, F. Luo, M. Liu, X.-L. Zhang, Oligonucleotide aptamers: promising and powerful diagnostic and therapeutic tools for infectious diseases. *J. Infect.* **77**, 83–98 (2018).
152. Y. Zhou, W. Li, Y. Tseng, J. Zhang, J. Liu, Developing slow-off dickkopf-1 aptamers for early-diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Talanta*. **194**, 422–429 (2019).
153. A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 537–550 (2010).
154. J. L. Hammond, N. Formisano, P. Estrela, S. Carrara, J. Tkac, Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays Biochem.* **60**, 69–80 (2016).
155. A. Fire, S. Q. Xu, Rolling replication of short DNA circles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 4641–4645 (1995).
156. D. Liu, S. L. Daubendiek, M. A. Zillman, K. Ryan, E. T. Kool, Rolling circle DNA synthesis: Small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1587–1594 (1996).
157. C. Feng, X. Mao, Y. Yang, X. Zhu, Y. Yin, G. Li, Rolling circle amplification in electrochemical biosensor with biomedical applications. *J. Electroanal. Chem.* **781**, 223–232 (2016).
158. V. V. Demidov, Rolling-circle amplification (RCA), in *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, J. Fuchs, M. Podda, Eds. (CRC Press, Boca Ratón, 2005), pp. 1175–1179.
159. L. Zhou, L.-J. Ou, X. Chu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, Aptamer-based rolling circle amplification: A platform for electrochemical detection of protein. *Anal. Chem.* **79**, 7492–7500 (2007).

160. Y. Zhu, H. Wang, L. Wang, J. Zhu, W. Jiang, Cascade signal amplification based on copper nanoparticle-reported rolling circle amplification for ultrasensitive electrochemical detection of the prostate cancer biomarker. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **8**, 2573–2581 (2016).
161. T. Fan, Y. Du, Y. Yao, J. Wu, S. Meng, J. Luo, X. Zhang, D. Yang, C. Wang, Y. Qian, F. Gao, Rolling circle amplification triggered poly adenine-gold nanoparticles production for label-free electrochemical detection of thrombin. *Sens. Actuators B Chem.* **266**, 9–18 (2018).
162. R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Structured nucleic acid probes for electrochemical devices. *Electroanalysis*. **21**, 2077–2090 (2009).
163. C.-Y. Lee, H.-T. Fan, Y.-Z. Hsieh, Disposable aptasensor combining functional magnetic nanoparticles with rolling circle amplification for the detection of prostate-specific antigen. *Sens. Actuators B Chem.* **255**, 341–347 (2018).
164. Q. Wang, H. Zheng, X. Gao, Z. Lin, G. Chen, A label-free ultrasensitive electrochemical aptameric recognition system for protein assay based on hyperbranched rolling circle amplification. *Chem. Commun.* **49**, 11418 (2013).
165. G. Jin, C. Wang, L. Yang, X. Li, L. Guo, B. Qiu, Z. Lin, G. Chen, Hyperbranched rolling circle amplification based electrochemiluminescence aptasensor for ultrasensitive detection of thrombin. *Biosens. Bioelectron.* **63**, 166–171 (2015).
166. P. M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas, D. C. Ward, Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat. Genet.* **19**, 225–232 (1998).
167. D. C. Thomas, G. A. Nardone, S. K. Randall, Amplification of padlock probes for DNA diagnostics by cascade rolling circle amplification or the polymerase chain reaction. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **123**, 1170–1176 (1999).
168. D. Y. Zhang, M. Brandwein, T. Hsuih, H. B. Li, Ramification amplification: A novel isothermal DNA amplification method. *Mol. Diagn.* **6**, 141–150 (2001).

## Bibliografía

169. Z.-S. Wu, H. Zhou, S. Zhang, G. Shen, R. Yu, Electrochemical aptameric recognition system for a sensitive protein assay based on specific target binding-induced rolling circle amplification. *Anal. Chem.* **82**, 2282–2289 (2010).
170. S.-K. Li, A.-Y. Chen, Y.-Q. Chai, R. Yuan, Y. Zhuo, Electrochemiluminescence aptasensor based on cascading amplification of nicking endonuclease-assisted target recycling and rolling circle amplifications for mucin 1 detection. *Electrochimica Acta.* **212**, 767–774 (2016).
171. D. Sun, J. Lu, Z. Luo, L. Zhang, P. Liu, Z. Chen, Competitive electrochemical platform for ultrasensitive cytosensing of liver cancer cells by using nanotetrahedra structure with rolling circle amplification. *Biosens. Bioelectron.* **120**, 8–14 (2018).
172. K. Zhang, S. Lv, M. Lu, D. Tang, Photoelectrochemical biosensing of disease marker on p-type Cu-doped Zn<sub>0.3</sub>Cd<sub>0.7</sub>S based on RCA and exonuclease III amplification. *Biosens. Bioelectron.* **117**, 590–596 (2018).
173. E. A. Motea, A. J. Berdis, Terminal deoxynucleotidyl transferase: The story of a misguided DNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics.* **1804**, 1151–1166 (2010).
174. P. Horáková, H. Macíčková-Cahová, H. Pivoňková, J. Špaček, L. Havran, M. Hocek, M. Fojta, Tail-labelling of DNA probes using modified deoxynucleotide triphosphates and terminal deoxynucleotidyl transferase. Application in electrochemical DNA hybridization and protein-DNA binding assays. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 1366–1371 (2011).
175. M. Hermanová, P. Havranová-Vidláková, A. Ondráčková, S. S. Kumar, R. Bowater, M. Fojta, Label-free voltammetric detection of products of terminal deoxynucleotidyl transferase tailing reaction. *Electroanalysis.* **31**, 246–255 (2019).
176. J. D. Fowler, Z. Suo, Biochemical, structural, and physiological characterization of terminal deoxynucleotidyl transferase. *Chem. Rev.* **106**, 2092–2110 (2006).
177. P. Wang, Y. Wan, S. Deng, S. Yang, Y. Su, C. Fan, A. Aldalbahi, X. Zuo, Aptamer-initiated on-particle template-independent enzymatic polymerization (aptamer-OTEP) for electrochemical analysis of tumor biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* **86**, 536–541 (2016).

178. S. Liu, Y. Wang, C. Zhang, Y. Lin, F. Li, Homogeneous electrochemical aptamer-based ATP assay with signal amplification by exonuclease III assisted target recycling. *Chem. Commun.* **49**, 2335 (2013).
179. K.-J. Huang, H.-L. Shuai, J.-Z. Zhang, Ultrasensitive sensing platform for platelet-derived growth factor BB detection based on layered molybdenum selenide–graphene composites and Exonuclease III assisted signal amplification. *Biosens. Bioelectron.* **77**, 69–75 (2016).
180. H. Yi, W. Xu, Y. Yuan, Y. Wu, Y. Chai, R. Yuan, A sensitive electrochemical aptasensor for thrombin detection based on exonuclease-catalyzed target recycling and enzyme-catalysis. *Biosens. Bioelectron.* **47**, 368–372 (2013).
181. S. Yang, M. You, F. Zhang, Q. Wang, P. He, A sensitive electrochemical aptasensing platform based on exonuclease recycling amplification and host-guest recognition for detection of breast cancer biomarker HER2. *Sens. Actuators B Chem.* **258**, 796–802 (2018).
182. C. Lin, H. Zheng, Y. Huang, Z. Chen, F. Luo, J. Wang, L. Guo, B. Qiu, Z. Lin, H. Yang, Homogeneous electrochemical aptasensor for mucin 1 detection based on exonuclease I-assisted target recycling amplification strategy. *Biosens. Bioelectron.* **117**, 474–479 (2018).
183. P. Miao, Y. Jiang, Y. Wang, J. Yin, Y. Tang, An electrochemical approach capable of prostate specific antigen assay in human serum based on exonuclease-aided target recycling amplification. *Sens. Actuators B Chem.* **257**, 1021–1026 (2018).
184. L. Bai, Y. Chai, R. Yuan, Y. Yuan, S. Xie, L. Jiang, Amperometric aptasensor for thrombin detection using enzyme-mediated direct electrochemistry and DNA-based signal amplification strategy. *Biosens. Bioelectron.* **50**, 325–330 (2013).
185. L. Jiang, J. Peng, R. Yuan, Y. Chai, Y. Yuan, L. Bai, Y. Wang, An aptasensing platform for simultaneous detection of multiple analytes based on the amplification of exonuclease-catalyzed target recycling and DNA concatemers. *Analyst.* **138**, 4818–4822 (2013).
186. P. Miao, Y. Tang, B. Wang, J. Yin, L. Ning, Signal amplification by enzymatic tools for nucleic acids. *TrAC Trends Anal. Chem.* **67**, 1–15 (2015).

## Bibliografía

187. M. Yan, W. Bai, C. Zhu, Y. Huang, J. Yan, A. Chen, Design of nuclease-based target recycling signal amplification in aptasensors. *Biosens. Bioelectron.* **77**, 613–623 (2016).
188. M. S. Reid, X. C. Le, H. Zhang, Exponential isothermal amplification of nucleic acids and assays for proteins, cells, small molecules, and enzyme activities: An EXPAR example. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 11856–11866 (2018).
189. Y. Yu, G. Su, H. Zhu, Q. Zhu, Y. Chen, B. Xu, Y. Li, W. Zhang, Proximity hybridization-mediated isothermal exponential amplification for ultrasensitive electrochemical protein detection. *Int. J. Nanomedicine.* **12**, 5903–5914 (2017).
190. D. Y. Zhang, G. Seelig, Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions. *Nat. Chem.* **3**, 103–113 (2011).
191. R. M. Dirks, N. A. Pierce, Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 15275–15278 (2004).
192. D. Yang, Y. Tang, P. Miao, Hybridization chain reaction directed DNA superstructures assembly for biosensing applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* **94**, 1–13 (2017).
193. S. Bi, S. Yue, S. Zhang, Hybridization chain reaction: a versatile molecular tool for biosensing, bioimaging, and biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4281–4298 (2017).
194. W. Song, X. Xie, W. Sun, N. Zhang, C. Li, Ultrasensitive electrochemical detection for thrombin using hybridization chain reaction with enzyme-amplification. *Anal. Chim. Acta.* **860**, 77–82 (2015).
195. D. Chen, D. Sun, Z. Wang, W. Qin, L. Chen, L. Zhou, Y. Zhang, A DNA nanostructured aptasensor for the sensitive electrochemical detection of HepG2 cells based on multibranch hybridization chain reaction amplification strategy. *Biosens. Bioelectron.* **117**, 416–421 (2018).
196. G. Zhou, M. Lin, P. Song, X. Chen, J. Chao, L. Wang, Q. Huang, W. Huang, C. Fan, X. Zuo, Multivalent capture and detection of cancer cells with DNA nanostructured biosensors and multibranch hybridization chain reaction amplification. *Anal. Chem.* **86**, 7843–7848 (2014).

197. Y.-X. Chen, K.-J. Huang, L.-L. He, Y.-H. Wang, Tetrahedral DNA probe coupling with hybridization chain reaction for competitive thrombin aptasensor. *Biosens. Bioelectron.* **100**, 274–281 (2018).
198. L. Ge, W. Wang, T. Hou, F. Li, A versatile immobilization-free photoelectrochemical biosensor for ultrasensitive detection of cancer biomarker based on enzyme-free cascaded quadratic amplification strategy. *Biosens. Bioelectron.* **77**, 220–226 (2016).
199. P. Yin, H. M. T. Choi, C. R. Calvert, N. A. Pierce, Programming biomolecular self-assembly pathways. *Nature.* **451**, 318–322 (2008).
200. Y. S. Jiang, B. Li, J. N. Milligan, S. Bhadra, A. D. Ellington, Real-time detection of isothermal amplification reactions with thermostable catalytic hairpin assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 7430–7433 (2013).
201. J. Zhao, Z. Ma, Ultrasensitive detection of prostate specific antigen by electrochemical aptasensor using enzyme-free recycling amplification via target-induced catalytic hairpin assembly. *Biosens. Bioelectron.* **102**, 316–320 (2018).
202. J. Zhou, J. Rossi, Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 181–202 (2017).
203. G. Rossi, M. Ignatiadis, Promises and pitfalls of using liquid biopsy for precision medicine. *Cancer Res.* **79**, 2798–2804 (2019).
204. J. Wu, S. Hu, L. Zhang, J. Xin, C. Sun, L. Wang, K. Ding, B. Wang, Tumor circulome in the liquid biopsies for cancer diagnosis and prognosis. *Theranostics.* **10**, 4544–4556 (2020).
205. E. Henke, R. Nandigama, S. Ergün, Extracellular matrix in the tumor microenvironment and its impact on cancer therapy. *Front. Mol. Biosci.* **6**, 160 (2020).
206. J. Winkler, A. Abisoye-Ogunniyan, K. J. Metcalf, Z. Werb, Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat. Commun.* **11**, 5120 (2020).
207. M. W. Pickup, J. K. Mouw, V. M. Weaver, The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* **15**, 1243–1253 (2014).



## Bibliografía

208. M. Giussani, E. Landoni, G. Merlino, F. Turdo, S. Veneroni, B. Paolini, V. Cappelletti, R. Miceli, R. Orlandi, T. Triulzi, E. Tagliabue, Extracellular matrix proteins as diagnostic markers of breast carcinoma. *J. Cell. Physiol.* **233**, 6280–6290 (2018).
209. J. K. Mouw, G. Ou, V. M. Weaver, Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 771–785 (2014).
210. M. Sund, R. Kalluri, Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 177–183 (2009).
211. M. A. Shields, S. Dangi-Garimella, A. J. Redig, H. G. Munshi, Biochemical role of the collagen-rich tumour microenvironment in pancreatic cancer progression. *Biochem. J.* **441**, 541–552 (2012).
212. A. Naba, K. R. Clauser, H. Ding, C. A. Whittaker, S. A. Carr, R. O. Hynes, The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. *Matrix Biol.* **49**, 10–24 (2016).
213. A. Naba, K. R. Clauser, S. Hoersch, H. Liu, S. A. Carr, R. O. Hynes, *Mol. Cell. Proteomics*, in press, doi:10.1074/mcp.M111.014647.
214. J. Wei, M. Hu, K. Huang, S. Lin, H. Du, Roles of proteoglycans and glycosaminoglycans in cancer development and progression. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5983 (2020).
215. A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, N. K. Karamanos, Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 4–27 (2016).
216. H. E. Barker, T. R. Cox, J. T. Erler, The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **12**, 540–552 (2012).
217. E. Hadler-Olsen, J.-O. Winberg, L. Uhlin-Hansen, Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumor Biol.* **34**, 2041–2051 (2013).
218. C. López-Otín, L. M. Matrisian, Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer.* **7**, 800–808 (2007).
219. H. P. Bächinger, K. Mizuno, J. A. Vranka, S. P. Boudko, Collagen formation and structure, in *Comprehensive Natural Products II – Chemistry and Biology* (Oxford, 2010), vol. 5, pp. 469–530.

## Bibliografía

220. K. Gelse, Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 1531–1546 (2003).
221. S. Ricard-Blum, The collagen family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004978–a004978 (2011).
222. D. Fan, A. Takawale, J. Lee, Z. Kassiri, Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair.* **5**, 15 (2012).
223. E. G. Canty, K. E. Kadler, Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* **118**, 1341–1353 (2005).
224. J. C. Monboisse, J. B. Oudart, L. Ramont, S. Brassart-Pasco, F. X. Maquart, Matrikines from basement membrane collagens: a new anti-cancer strategy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1840**, 2589–2598 (2014).
225. S. Brassart-Pasco, S. Brézillon, B. Brassart, L. Ramont, J.-B. Oudart, J. C. Monboisse, Tumor microenvironment: extracellular matrix alterations influence tumor progression. *Front. Oncol.* **10**, 397 (2020).
226. C. García-Pravia, J. A. Galván, N. Gutiérrez-Corral, L. Solar-García, E. García-Pérez, M. García-Ocaña, J. Del Amo-Iribarren, P. Menéndez-Rodríguez, J. García-García, J. R. de los Toyos, L. Simón-Buela, L. Barneo, Overexpression of COL11A1 by cancer-associated fibroblasts: clinical relevance of a stromal marker in pancreatic cancer. *PLoS ONE.* **8**, e78327 (2013).
227. F. Vázquez-Villa, M. García-Ocaña, J. A. Galván, J. García-Martínez, C. García-Pravia, P. Menéndez-Rodríguez, C. G. Rey, L. Barneo-Serra, J. R. de los Toyos, COL11A1/(pro)collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal cells and carcinoma progression. *Tumor Biol.* **36**, 2213–2222 (2015).
228. Z. Raglow, S. M. Thomas, Tumor matrix protein collagen XI $\alpha$ 1 in cancer. *Cancer Lett.* **357**, 448–453 (2015).
229. S. Nallanthighal, J. P. Heiserman, D.-J. Cheon, Collagen type XI alpha 1 (COL11A1): a novel biomarker and a key player in cancer. *Cancers.* **13**, 935 (2021).
230. M. García-Ocaña, F. Vázquez, C. García-Pravia, N. Fuentes-Martínez, P. Menéndez-Rodríguez, F. Fresno-Forcelledo, L. Barneo-Serra, J. D. Amo-

## Bibliografía

- Iribarren, L. Simón-Buela, J. R. de los Toyos, Characterization of a novel mouse monoclonal antibody, clone 1E8.33, highly specific for human procollagen 11A1, a tumor-associated stromal component. *Int. J. Oncol.*, 8 (2012).
231. N. P. Morris, H. P. Bächinger, Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (1 alpha, 2 alpha, 3 alpha) retaining non-triple-helical domains. *J. Biol. Chem.* **262**, 11345–11350 (1987).
232. D. A. Sirko-Osadsa, M. A. Murray, J. A. Scott, M. A. Lavery, M. L. Warman, N. H. Robin, Stickler syndrome without eye involvement is caused by mutations in COL11A2, the gene encoding the  $\alpha 2$ (XI) chain of type XI collagen. *J. Pediatr.* **132**, 4 (1998).
233. K. E. Kadler, A. Hill, E. G. Canty-Laird, Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 495–501 (2008).
234. GeneCards® The Human Gene Database, último acceso: 21/12/2021, (disponible en <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL11A1>). Último acceso: 21/12/2021).
235. K.-H. Wang, A.-P. Kao, S. Singh, S.-L. Yu, L.-P. Kao, Z. Yun Tsai, S.-D. Lin, S. S.-L. Li, Comparative expression profiles of mRNAs and microRNAs among human mesenchymal stem cells derived from breast, face, and abdominal adipose tissues. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **26**, 113–122 (2010).
236. E. Grundberg, H. Brändström, K. C. L. Lam, S. Gurd, B. Ge, E. Harmsen, A. Kindmark, Ö. Ljunggren, H. Mallmin, O. Nilsson, T. Pastinen, Systematic assessment of the human osteoblast transcriptome in resting and induced primary cells. *Physiol. Genomics.* **33**, 301–311 (2008).
237. N. Matsuo, W. Yu-Hua, H. Sumiyoshi, K. Sakata-Takatani, H. Nagato, K. Sakai, M. Sakurai, H. Yoshioka, The transcription factor CCAAT-binding factor CBF/NF-Y regulates the proximal promoter activity in the human  $\alpha 1$ (XI) collagen gene (COL11A1). *J. Biol. Chem.* **278**, 32763–32770 (2003).
238. M. Hida, R. Hamanaka, O. Okamoto, K. Yamashita, T. Sasaki, H. Yoshioka, N. Matsuo, Nuclear factor Y (NF-Y) regulates the proximal promoter activity of the mouse collagen  $\alpha 1$ (XI) gene (Col11a1) in chondrocytes. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* **50**, 358–366 (2014).

239. R. Kahler, S. Yingst, L. Hoepfner, E. Jensen, D. Krawczak, J. Oxford, J. Westendorf, Collagen 11a1 is indirectly activated by lymphocyte enhancer-binding factor 1 (Lef1) and negatively regulates osteoblast maturation. *Matrix Biol.* **27**, 330–338 (2008).
240. M. Emura, A. Ochiai, M. Horino, W. Arndt, K. Kamino, S. Hirohashi, Development of myofibroblasts from human bone marrow mesenchymal stem cells cocultured with human colon carcinoma cells and TGF beta 1. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **38**, 77–80 (2000).
241. A. E. Karnoub, A. B. Dash, A. P. Vo, A. Sullivan, M. W. Brooks, G. W. Bell, A. L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo, R. A. Weinberg, Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. **449**, 557–563 (2007).
242. P. J. Mishra, P. J. Mishra, R. Humeniuk, D. J. Medina, G. Alexe, J. P. Mesirov, S. Ganesan, J. W. Glod, D. Banerjee, Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* **68**, 4331–4339 (2008).
243. H. Gardner, D. Strehlow, L. Bradley, R. Widom, R. Farina, A. de Fougères, J. Peyman, V. Kotliansky, J. H. Korn, Global expression analysis of the fibroblast transcriptional response to TGFbeta. *Clin. Exp. Rheumatol.* **22**, S47-57 (2004).
244. J. A. Galván, J. García-Martínez, F. Vázquez-Villa, M. García-Ocaña, C. García-Pravia, P. Menéndez-Rodríguez, C. González-del Rey, L. Barneo-Serra, J. R. de los Toyos, Validation of COL11A1/procollagen 11A1 expression in TGF-β1-activated immortalised human mesenchymal cells and in stromal cells of human colon adenocarcinoma. *BMC Cancer*. **14**, 867 (2014).
245. N. I. Nissen, S. Kehlet, A. Z. Johansen, I. M. Chen, M. Karsdal, J. S. Johansen, H. M. H. Diab, L. N. Jørgensen, S. Sun, T. Manon-Jensen, Y. He, L. Langholm, N. Willumsen, Noninvasive prognostic biomarker potential of quantifying the propeptides of type XI collagen alpha-1 chain (PRO-C11) in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*. **149**, 228–238 (2021).
246. L. Wu, Y. Wang, X. Xu, Y. Liu, B. Lin, M. Zhang, J. Zhang, S. Wan, C. Yang, W. Tan, Aptamer-based detection of circulating targets for precision medicine. *Chem. Rev.* **121**, 12035–12105 (2021).

## Bibliografía

247. F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, D. G. Higgins, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539 (2011).
248. T. L. Bailey, J. Johnson, C. E. Grant, W. S. Noble, The MEME Suite. *Nucleic Acids Res.* **43**, W39–W49 (2015).
249. N. R. Markham, M. Zuker, DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.* **33**, W577–W581 (2005).
250. American Type Culture Collection (ATCC), The Global Bioresource Center, último acceso: 04/04/2022, (disponible en <https://www.atcc.org/>).
251. A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850–858 (1996).
252. I. V. Shilov, S. L. Seymour, A. A. Patel, A. Loboda, W. H. Tang, S. P. Keating, C. L. Hunter, L. M. Nuwaysir, D. A. Schaeffer, The Paragon algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol. Cell. Proteomics.* **6**, 1638–1655 (2007).
253. W. H. Tang, I. V. Shilov, S. L. Seymour, Nonlinear fitting method for determining local false discovery rates from decoy database searches. *J. Proteome Res.* **7**, 3661–3667 (2008).
254. E. Kessler, A. Fichard, H. Chanut-Delalande, M. Brusel, F. Ruggiero, Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) mediates C-terminal processing of procollagen V homotrimer. *J. Biol. Chem.* **276**, 27051–27057 (2001).
255. S. Amaya-González, N. de-los-Santos-Álvarez, A. J. Miranda-Ordieres, M. J. Lobo-Castañón, Aptamer binding to celiac disease-triggering hydrophobic proteins: a sensitive gluten detection approach. *Anal. Chem.* **86**, 2733–2739 (2014).
256. Y. Wu, R. D. Tilley, J. J. Gooding, Challenges and solutions in developing ultrasensitive biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 1162–1170 (2019).
257. C. Daniel, Y. Roupioz, D. Gasparutto, T. Livache, A. Buhot, Solution-phase vs surface-phase aptamer-protein affinity from a label-free kinetic biosensor. *PLoS ONE.* **8**, e75419 (2013).

## Bibliografía

258. L. Berglund, J. Andrade, J. Odeberg, M. Uhlén, The epitope space of the human proteome. *Protein Sci.* **17**, 606–613 (2008).
259. J. G. Bruno, M. P. Carrillo, T. Phillips, D. Hanson, J. A. Bohmann, DNA aptamer beacon assay for C-telopeptide and handheld fluorometer to monitor bone resorption. *J. Fluoresc.* **21**, 2021–2033 (2011).
260. D. Frescas, C. M. Roux, S. Aygun-Sunar, A. S. Gleiberman, P. Krasnov, O. V. Kurnasov, E. Strom, L. P. Virtuoso, M. Wrobel, A. L. Osterman, M. P. Antoch, V. Mett, O. B. Chernova, A. V. Gudkov, Senescent cells expose and secrete an oxidized form of membrane-bound vimentin as revealed by a natural polyreactive antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E1668–E1677 (2017).
261. S. Yoon, B. Armstrong, N. Habib, J. J. Rossi, Blind SELEX approach identifies RNA aptamers that regulate EMT and inhibit metastasis. *Mol. Cancer Res.* **15**, 811–820 (2017).
262. R. Alon, E. A. Bayer, M. Wilchek, Streptavidin contains an RYD sequence which mimics the RGD receptor domain of fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 1236–1241 (1990).
263. N. I. Nissen, M. Karsdal, N. Willumsen, Collagens and cancer-associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to cancer biology. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 115 (2019).
264. S. Ricard-Blum, S. D. Vallet, Fragments generated upon extracellular matrix remodeling: Biological regulators and potential drugs. *Matrix Biol.* **75–76**, 170–189 (2019).
265. A. Dupont-Deshorgue, J. B. Oudart, B. Brassart, G. Deslee, J. M. Perotin, M. D. Diebold, J. C. Monboisse, L. Ramont, S. Brassart-Pasco, A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of tetrastatin in body fluids and tumor extracts. *Anal. Biochem.* **482**, 16–21 (2015).
266. J. B. Oudart, S. Brassart-Pasco, E. Luczka, A. Dupont-Deshorgue, G. Bellon, S. P. Boudko, H. P. Bächinger, J. C. Monboisse, F. X. Maquart, L. Ramont, Analytical methods for measuring collagen XIX in human cell cultures, tissue extracts, and biological fluids. *Anal. Biochem.* **437**, 111–117 (2013).

## Bibliografía

267. Y.-Q. Luo, Li-Juan Yao, L. Zhao, A. Sun, H. Dong, J.-P. Du, S.-Z. Wu, W. Hu, Development of an ELISA for quantification of tumstatin in serum samples and tissue extracts of patients with lung carcinoma. *Clin. Chim. Acta.* **411**, 510–515 (2010).
268. Z.-H. Wang, Z.-T. Zhu, X.-Y. Xiao, J. Sun, Correlation of serum levels of endostatin with tumor stage in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *BioMed Res. Int.* **2015**, 1–12 (2015).
269. T. Szarvas, V. László, F. vom Dorp, H. Reis, A. Szendrői, I. Romics, D. Tilki, H. Rübber, S. Ergün, Serum endostatin levels correlate with enhanced extracellular matrix degradation and poor patients' prognosis in bladder cancer. *Int. J. Cancer.* **130**, 2922–2929 (2012).
270. S. H. Nielsen, N. Willumsen, S. Brix, S. Sun, T. Manon-Jensen, M. Karsdal, F. Genovese, Tumstatin, a matrikine derived from collagen type IV $\alpha$ 3, is elevated in serum from patients with non-small cell lung cancer. *Transl. Oncol.* **11**, 528–534 (2018).
271. N. Willumsen, C. L. Bager, D. J. Leeming, V. Smith, M. A. Karsdal, D. Dornan, A.-C. Bay-Jensen, Extracellular matrix specific protein fingerprints measured in serum can separate pancreatic cancer patients from healthy controls. *BMC Cancer.* **13**, 554 (2013).
272. N. Willumsen, S. M. Ali, K. Leitzel, J. J. Drabick, N. Yee, H. V. Polimera, V. Nagabhairu, L. Krecko, A. Ali, A. Maddukuri, P. Moku, A. Ali, J. Poulouse, H. Menon, N. Pancholy, L. Costa, M. A. Karsdal, A. Lipton, Collagen fragments quantified in serum as measures of desmoplasia associate with survival outcome in patients with advanced pancreatic cancer. *Sci. Rep.* **9**, 19761 (2019).
273. A. Lipton, K. Leitzel, S. M. Ali, H. V. Polimera, V. Nagabhairu, E. Marks, A. E. Richardson, L. Krecko, A. Ali, W. Koestler, F. J. Esteva, D. J. Leeming, M. A. Karsdal, N. Willumsen, High turnover of extracellular matrix reflected by specific protein fragments measured in serum is associated with poor outcomes in two metastatic breast cancer cohorts: ECM turnover and outcome in MBC. *Int. J. Cancer.* **143**, 3027–3034 (2018).
274. D. J. Leeming, M. Koizumi, P. Qvist, V. Barkholt, C. Zhang, K. Henriksen, I. Byrjalsen, M. A. Karsdal, Serum N-terminal propeptide of collagen type I is associated with the number of bone metastases in breast and prostate

- cancer and correlates to other bone related markers. *Biomark. Cancer.* **3**, 15–23 (2011).
275. C. Jensen, S. Holm Nielsen, M. Eslam, F. Genovese, M. J. Nielsen, R. Vongsuvan, R. Uchila, D. van der Poorten, J. George, M. A. Karsdal, D. J. Leeming, N. Willumsen, Cross-linked multimeric pro-peptides of type III collagen (PC3X) in hepatocellular carcinoma – A biomarker that provides additional prognostic value in AFP positive patients. *J. Hepatocell. Carcinoma.* **7**, 301–313 (2020).
276. N. Willumsen, C. L. Bager, D. J. Leeming, V. Smith, C. Christiansen, M. A. Karsdal, D. Dornan, A. Bay-Jensen, Serum biomarkers reflecting specific tumor tissue remodeling processes are valuable diagnostic tools for lung cancer. *Cancer Med.* **3**, 1136–1145 (2014).
277. Página web de Nordic Bioscience, último acceso 16/04/2022, (disponible en <https://www.nordicbioscience.com/>).
278. D. J. Leeming, Y. He, S. S. Veidal, Q. H. T. Nguyen, D. Larsen, M. Koizumi, T. Segovia-Silvestre, C. Zhang, Q. Zheng, S. Sun, Y. Cao, V. Barkholt, P. Hägglund, A. C. Bay-Jensen, P. Qvist, M. A. Karsdal, A novel marker for assessment of liver matrix remodeling: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detecting a MMP generated type I collagen neo-epitope (C1M). *Biomarkers.* **16**, 616–628 (2011).
279. N. Barascuk, S. S. Veidal, L. Larsen, D. V. Larsen, M. R. Larsen, J. Wang, Q. Zheng, R. Xing, Y. Cao, L. M. Rasmussen, M. A. Karsdal, A novel assay for extracellular matrix remodeling associated with liver fibrosis: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for a MMP-9 proteolytically revealed neo-epitope of type III collagen. *Clin. Biochem.* **43**, 899–904 (2010).
280. S. S. Veidal, M. A. Karsdal, A. Nawrocki, M. R. Larsen, Y. Dai, Q. Zheng, P. Hägglund, B. Vainer, H. Skjøt-Arkil, D. J. Leeming, Assessment of proteolytic degradation of the basement membrane: a fragment of type IV collagen as a biochemical marker for liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* **4**, 22 (2011).
281. M. J. Nielsen, A. F. Nedergaard, S. Sun, S. S. Veidal, L. Larsen, Q. Zheng, C. Suetta, K. Henriksen, C. Christiansen, M. A. Karsdal, D. J. Leeming, The neo-epitope specific PRO-C3 ELISA measures true formation of type III collagen associated with liver and muscle parameters, 13.



## Bibliografía

282. S. N. Kehlet, R. Sanz-Pamplona, S. Brix, D. J. Leeming, M. A. Karsdal, V. Moreno, Excessive collagen turnover products are released during colorectal cancer progression and elevated in serum from metastatic colorectal cancer patients. *Sci. Rep.* **6**, 30599 (2016).
283. E. González-Fernández, N. de-los-Santos-Álvarez, A. J. Miranda-Ordieres, M. J. Lobo-Castañón, Monovalent labeling system improves the sensitivity of aptamer-based inhibition assays for small molecule detection. *Sens. Actuators B Chem.* **182**, 668–674 (2013).
284. S. Aptekar, M. Arora, C. L. Lawrence, R. W. Lea, K. Ashton, T. Dawson, J. E. Alder, L. Shaw, Selective targeting to glioma with nucleic acid aptamers. *PLOS ONE*. **10**, e0134957 (2015).
285. Y. Yue, S. Zhang, Z. Xu, X. Chen, Q. Wang, Commutability of reference materials for  $\alpha$ -fetoprotein in human serum. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **141**, 1421–1427 (2017).
286. S. Barreda-García, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A. J. Miranda-Ordieres, M. J. Lobo-Castañón, Solid-phase helicase dependent amplification and electrochemical detection of Salmonella on highly stable oligonucleotide-modified ITO electrodes. *Chem. Commun.* **53**, 9721–9724 (2017).
287. S. Barreda-García, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A. J. Miranda-Ordieres, M. J. Lobo-Castañón, Helicase-dependent isothermal amplification: a novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**, 679–693 (2018).
288. R. Sánchez-Salcedo, R. Miranda-Castro, N. de los Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, On-gold recombinase polymerase primer elongation for electrochemical detection of bacterial genome: Mechanism insights and influencing factors. *ChemElectroChem.* **6**, 793–800 (2019).
289. A. Anne, C. Bonnaudat, C. Demaille, K. Wang, Enzymatic redox 3'-end-labeling of DNA oligonucleotide monolayers on gold surfaces using terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated single base extension. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2734–2735 (2007).
290. N. Moniaux, S. Chakraborty, M. Yalniz, J. Gonzalez, V. K. Shostrom, J. Standop, S. M. Lele, M. Ouellette, P. M. Pour, A. R. Sasson, R. E. Brand, M. A. Hollingsworth, M. Jain, S. K. Batra, Early diagnosis of pancreatic

- cancer: neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Br. J. Cancer*. **98**, 1540–1547 (2008).
291. Z. Tong, A. B. Kunnumakkara, H. Wang, Y. Matsuo, P. Diagaradjane, K. B. Harikumar, V. Ramachandran, B. Sung, A. Chakraborty, R. S. Bresalier, C. Logsdon, B. B. Aggarwal, S. Krishnan, S. Guha, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A novel suppressor of invasion and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Res*. **68**, 6100–6108 (2008).
292. P. R. Galle, F. Foerster, M. Kudo, S. L. Chan, J. M. Llovet, S. Qin, W. R. Schelman, S. Chintharlapalli, P. B. Abada, M. Sherman, A. X. Zhu, Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. **39**, 2214–2229 (2019).
293. W. Wang, C. Wei, Advances in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Genes Dis*. **7**, 308–319 (2020).
294. C.-J. Huang, H.-I. Lin, S.-C. Shiesh, G.-B. Lee, An integrated microfluidic system for rapid screening of alpha-fetoprotein-specific aptamers. *Biosens. Bioelectron*. **35**, 50–55 (2012).
295. L. Dong, Q. Tan, W. Ye, D. Liu, H. Chen, H. Hu, D. Wen, Y. Liu, Y. Cao, J. Kang, J. Fan, W. Guo, W. Wu, Screening and identifying a novel ssDNA aptamer against alpha-fetoprotein using CE-SELEX. *Sci. Rep*. **5**, 15552 (2015).
296. X. Wu, P. Fu, W. Ma, L. Xu, H. Kuang, C. Xu, SERS-active silver nanoparticle trimers for sub-attomolar detection of alpha fetoprotein. *RSC Adv*. **5**, 73395–73398 (2015).
297. R. Gui, W. He, H. Jin, J. Sun, Y. Wang, DNA assembly of carbon dots and 5-fluorouracil used for room-temperature phosphorescence turn-on sensing of AFP and AFP-triggered simultaneous release of dual-drug. *Sens. Actuators B Chem*. **255**, 1623–1630 (2018).
298. G. Li, S. Li, Z. Wang, Y. Xue, C. Dong, J. Zeng, Y. Huang, J. Liang, Z. Zhou, Label-free electrochemical aptasensor for detection of alpha-fetoprotein based on AFP-aptamer and thionin/reduced graphene oxide/gold nanoparticles. *Anal. Biochem*. **547**, 37–44 (2018).
299. H. Zhao, S. Bian, Y. Yang, X. Wu, Chiroplasmonic assemblies of gold nanoparticles as a novel method for sensitive detection of alpha-fetoprotein. *Microchim. Acta*. **184**, 1855–1862 (2017).

## Bibliografía

300. T. Gao, J. Zhi, C. Mu, S. Gu, J. Xiao, J. Yang, Z. Wang, Y. Xiang, One-step detection for two serological biomarker species to improve the diagnostic accuracy of hepatocellular carcinoma. *Talanta*. **178**, 89–93 (2018).
301. J. Fuchs, J.-B. Fiche, A. Buhot, R. Calemczuk, T. Livache, Salt concentration effects on equilibrium melting curves from DNA microarrays. *Biophys. J.* **99**, 1886–1895 (2010).
302. C. Daniel, F. Mélaïne, Y. Roupioz, T. Livache, A. Buhot, Real time monitoring of thrombin interactions with its aptamers: Insights into the sandwich complex formation. *Sel. Pap. World Congr. Biosens.* **40**, 186–192 (2013).
303. L. Tang, Y. Liu, M. M. Ali, D. K. Kang, W. Zhao, J. Li, Colorimetric and ultrasensitive bioassay based on a dual-amplification system using aptamer and DNAzyme. *Anal. Chem.* **84**, 4711–4717 (2012).
304. B. Schweitzer, S. Wiltshire, J. Lambert, S. O'Malley, K. Kukanskis, Z. Zhu, S. F. Kingsmore, P. M. Lizardi, D. C. Ward, Immunoassays with rolling circle DNA amplification: A versatile platform for ultrasensitive antigen detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 10113–10119 (2000).
305. P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, S. Duhr, D. Braun, Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 2238–2241 (2010).
306. R. Stoltenburg, T. Schubert, B. Strehlitz, In vitro selection and interaction studies of a DNA aptamer targeting protein A. *PLOS ONE*. **10**, e0134403 (2015).
307. R. A. Potyrailo, R. C. Conrad, A. D. Ellington, G. M. Hieftje, Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors. *Anal. Chem.* **70**, 3419–3425 (1998).
308. B. Esteban Fernández de Ávila, H. M. Watkins, J. M. Pingarrón, K. W. Plaxco, G. Palleschi, F. Ricci, Determinants of the detection limit and specificity of surface-based biosensors. *Anal. Chem.* **85**, 6593–6597 (2013).
309. M. A. Jensen, R. W. Davis, Template-independent enzymatic oligonucleotide synthesis (TiEOS): Its history, prospects, and challenges. *Biochemistry*. **57**, 1821–1832 (2018).

310. D. M. Cutler, L. H. Summers, The COVID-19 pandemic and the \$16 trillion virus. *JAMA*. **324**, 1495 (2020).
311. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, accessed on 27/03/2022, (disponible en <https://covid19.who.int/>).
312. M. Cascella, M. Rajnik, A. Aleem, S. C. Dulebohn, R. Di Napoli, Features, evaluation, and treatment of Coronavirus (COVID-19) [Updated 2022 Feb 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, (disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>).
313. A. R. Fehr, S. Perlman, Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis, in *Coronaviruses: Methods and Protocols*, H. J. Maier, E. Bickerton, P. Britton, Eds. (Springer New York, 2015), pp. 1–23.
314. T. Wandtke, E. Wędrowska, M. Szczur, G. Przybylski, M. Libura, P. Kopiński, Aptamers—Diagnostic and therapeutic solution in SARS-CoV-2. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1412 (2022).
315. Z. Mahmood, H. Alrefai, H. F. Hetta, H. A. Kader, N. Munawar, S. Abdul Rahman, S. Elshaer, G. E.-S. Batiha, K. Muhammad, Investigating virological, immunological, and pathological avenues to identify potential targets for developing COVID-19 treatment and prevention strategies. *Vaccines*. **8**, 443 (2020).
316. W. I. Lipkin, S. J. Anthony, Virus hunting. *Virology*. **479–480**, 194–199 (2015).
317. X. Wu, Q. Chen, J. Li, Z. Liu, Diagnostic techniques for COVID-19: A mini-review. *J. Virol. Methods*. **301**, 114437 (2022).
318. J. F. Huggett, J. Moran-Gilad, J. E. Lee, COVID-19 new diagnostics development: novel detection methods for SARS-CoV-2 infection and considerations for their translation to routine use. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **27**, 155–162 (2021).
319. H. Kitajima, Y. Tamura, H. Yoshida, H. Kinoshita, H. Katsuta, C. Matsui, A. Matsushita, T. Arai, S. Hashimoto, A. Iuchi, T. Hirashima, H. Morishita, H. Matsuoka, T. Tanaka, T. Nagai, Clinical COVID-19 diagnostic methods: Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) and quantitative RT-PCR (qRT-PCR). *J. Clin. Virol.* **139**, 104813 (2021).

## Bibliografía

320. B. Gharizadeh, J. Yue, M. Yu, Y. Liu, M. Zhou, D. Lu, J. Zhang, Navigating the pandemic response life cycle: Molecular diagnostics and immunoassays in the context of COVID-19 management. *IEEE Rev. Biomed. Eng.* **14**, 30–47 (2021).
321. E. Wijaya, C. Lenaerts, S. Maricot, J. Hastanin, S. Habraken, J.-P. Vilcot, R. Boukherroub, S. Szunerits, Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **15**, 208–224 (2011).
322. Y. Song, J. Song, X. Wei, M. Huang, M. Sun, L. Zhu, B. Lin, H. Shen, Z. Zhu, C. Yang, Discovery of aptamers targeting the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Anal. Chem.* **92**, 9895–9900 (2020).
323. N. Kacherovsky, L. F. Yang, H. V. Dang, E. L. Cheng, I. I. Cardle, A. C. Walls, M. McCallum, D. L. Sellers, F. DiMaio, S. J. Salipante, D. Corti, D. Veessler, S. H. Pun, Discovery and characterization of spike N-terminal domain-binding aptamers for rapid SARS-CoV-2 detection. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 21211–21215 (2021).
324. G. Yang, Z. Li, I. Mohammed, L. Zhao, W. Wei, H. Xiao, W. Guo, Y. Zhao, F. Qu, Y. Huang, Identification of SARS-CoV-2-against aptamer with high neutralization activity by blocking the RBD domain of spike protein 1. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 227 (2021).
325. J. Li, Z. Zhang, J. Gu, H. D. Stacey, J. C. Ang, A. Capretta, C. D. M. Filipe, K. L. Mossman, C. Balion, B. J. Salena, D. Yamamura, L. Soleymani, M. S. Miller, J. D. Brennan, Y. Li, Diverse high-affinity DNA aptamers for wild-type and B.1.1.7 SARS-CoV-2 spike proteins from a pre-structured DNA library. *Nucleic Acids Res.* **49**, 7267–7279 (2021).
326. M. A. Martínez-Roque, P. A. Franco-Urquijo, V. M. García-Velásquez, M. Choukeife, G. Mayer, S. R. Molina-Ramírez, G. Figueroa-Miranda, D. Mayer, L. M. Alvarez-Salas, DNA aptamer selection for SARS-CoV-2 spike glycoprotein detection, *Anal. Biochem.*, in press.
327. L. Zhang, X. Fang, X. Liu, H. Ou, H. Zhang, J. Wang, Q. Li, H. Cheng, W. Zhang, Z. Luo, Discovery of sandwich type COVID-19 nucleocapsid protein DNA aptamers. *Chem. Commun.* **56**, 10235–10238 (2020).

## Bibliografía

328. Z. Zhang, R. Pandey, J. Li, J. Gu, D. White, H. D. Stacey, J. C. Ang, C. Steinberg, A. Capretta, C. D. M. Filipe, K. Mossman, C. Balion, M. S. Miller, B. J. Salena, D. Yamamura, L. Soleymani, J. D. Brennan, Y. Li, High-affinity dimeric aptamers enable the rapid electrochemical detection of Wild-Type and B.1.1.7 SARS-CoV-2 in unprocessed saliva. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 24266–24274 (2021).
329. J. A. Zakashansky, A. H. Imamura, D. F. Salgado, H. C. Romero Mercieca, R. F. L. Aguas, A. M. Lao, J. Pariser, N. Arroyo-Currás, M. Khine, Detection of the SARS-CoV-2 spike protein in saliva with Shrinky-Dink<sup>®</sup> electrodes. *Anal. Methods.* **13**, 874–883 (2021).
330. S. Ramanathan, S. C. B. Gopinath, Z. H. Ismail, M. K. Md Arshad, P. Poopalan, Aptasensing nucleocapsid protein on nanodiamond assembled gold interdigitated electrodes for impedimetric SARS-CoV-2 infectious disease assessment. *Biosens. Bioelectron.* **197**, 113735 (2022).
331. T. Lewis, E. Giroux, M. Jovic, S. Martic-Milne, Localized surface plasmon resonance aptasensor for selective detection of SARS-CoV-2 S1 protein. *The Analyst.* **146**, 7207–7217 (2021).
332. A. Ravalli, D. Voccia, I. Palchetti, G. Marrazza, Electrochemical, electrochemiluminescence, and photoelectrochemical aptamer-based nanostructured sensors for biomarker analysis. *Biosensors.* **6**, 39 (2016).
333. W.-W. Zhao, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, Photoelectrochemical DNA biosensors. *Chem. Rev.* **114**, 7421–7441 (2014).
334. J. Shu, D. Tang, Recent advances in photoelectrochemical sensing: From engineered photoactive materials to sensing devices and detection modes. *Anal. Chem.* **92**, 363–377 (2020).
335. J. Bai, B. Zhou, Titanium dioxide nanomaterials for sensor applications. *Chem. Rev.* **114**, 10131–10176 (2014).
336. L. Bertel, D. A. Miranda, J. M. García-Martín, Nanostructured titanium dioxide surfaces for electrochemical biosensing. *Sensors.* **21**, 6167 (2021).
337. A. L. Linsebigler, G. Lu, J. T. Yates, Photocatalysis on TiO<sub>2</sub> surfaces: Principles, mechanisms, and selected results. *Chem. Rev.* **95**, 735–758 (1995).

## Bibliografía

338. K. Tanaka, M. F. V. Capule, T. Hisanaga, Effect of crystallinity of TiO<sub>2</sub> on its photocatalytic action. *Chem. Phys. Lett.* **187**, 73–76 (1991).
339. T. Ohno, M. Akiyoshi, T. Umebayashi, K. Asai, T. Mitsui, M. Matsumura, Preparation of S-doped TiO<sub>2</sub> photocatalysts and their photocatalytic activities under visible light. *Appl. Catal. Gen.* **265**, 115–121 (2004).
340. H. Wang, G. Wang, Y. Ling, M. Lepert, C. Wang, J. Z. Zhang, Y. Li, Photoelectrochemical study of oxygen deficient TiO<sub>2</sub> nanowire arrays with CdS quantum dot sensitization. *Nanoscale.* **4**, 1463–1466 (2012).
341. W. Cheng, J. Pan, J. Yang, Z. Zheng, F. Lu, Y. Chen, W. Gao, A photoelectrochemical aptasensor for thrombin based on the use of carbon quantum dot-sensitized TiO<sub>2</sub> and visible-light photoelectrochemical activity. *Microchim. Acta.* **185**, 263 (2018).
342. A. H. Cheshme Khavar, G. Moussavi, K. Yaghmaeian, A. R. Mahjoub, N. Khedri, M. Dusek, T. Vaclavu, M. Hosseini, A new Ru (II) polypyridyl complex as an efficient photosensitizer for enhancing the visible-light-driven photocatalytic activity of a TiO<sub>2</sub>/reduced graphene oxide nanocomposite for the degradation of atrazine: DFT and mechanism insights. *RSC Adv.* **10**, 22500–22514 (2020).
343. R. K. Chitumalla, K. S. V. Gupta, C. Malapaka, R. Fallahpour, A. Islam, L. Han, B. Kotamarthi, S. P. Singh, Thiocyanate-free cyclometalated ruthenium(II) sensitizers for DSSC: A combined experimental and theoretical investigation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 2630 (2014).
344. A. Mahmood, Triphenylamine based dyes for dye sensitized solar cells: A review. *Sol. Energy.* **123**, 127–144 (2016).
345. Ç. Şahin, A. Apostolopoulou, E. Stathatos, New bipyridine ruthenium dye complexes with amide based ancillary ligands as sensitizers in semitransparent quasi-solid-state dye sensitized solar cells. *Inorganica Chim. Acta.* **478**, 130–138 (2018).
346. K. Katsumata, H. Matsui, T. Yamaguchi, N. Tanabe, 6-(2-Quinoliny)-2,2'-bipyridine ruthenium complexes for near-infrared sensitization in dye-sensitized solar cells. *Inorganica Chim. Acta.* **463**, 118–125 (2017).
347. G. Li, P. G. Bomben, K. C. D. Robson, S. I. Gorelsky, C. P. Berlinguette, M. Shatruk, Ru complexes of thienyl-functionalized dipyrins as NCS-free

- sensitizers for the dye-sensitized solar cell. *Chem Commun.* **48**, 8790–8792 (2012).
348. A. Hagfeldt, G. Boschloo, L. Sun, L. Kloo, H. Pettersson, Dye-sensitized solar cells. *Chem. Rev.* **110**, 6595–6663 (2010).
349. M. K. Nazeeruddin, A. Kay, I. Rodicio, R. Humphry-Baker, E. Mueller, P. Liska, N. Vlachopoulos, M. Grätzel, Conversion of light to electricity by cis-X<sub>2</sub>bis(2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylate)ruthenium(II) charge-transfer sensitizers (X = Cl-, Br-, I-, CN-, and SCN-) on nanocrystalline titanium dioxide electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6382–6390 (1993).
350. M. K. Nazeeruddin, P. Péchy, T. Renouard, S. M. Zakeeruddin, R. Humphry-Baker, P. Comte, P. Liska, L. Cevey, E. Costa, V. Shklover, L. Spiccia, G. B. Deacon, C. A. Bignozzi, M. Grätzel, Engineering of efficient panchromatic sensitizers for nanocrystalline TiO<sub>2</sub>-based solar cells. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 1613–1624 (2001).
351. D. Hu, H. Cui, X. Wang, F. Luo, B. Qiu, W. Cai, H. Huang, J. Wang, Z. Lin, Highly sensitive and selective photoelectrochemical aptasensors for cancer biomarkers based on MoS<sub>2</sub>/Au/GaN photoelectrodes. *Anal. Chem.* **93**, 7341–7347 (2021).
352. Z. Qiu, J. Shu, D. Tang, Near-infrared-to-ultraviolet light-mediated photoelectrochemical aptasensing platform for cancer biomarker based on core-shell NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@TiO<sub>2</sub> upconversion microrods. *Anal. Chem.* **90**, 1021–1028 (2018).
353. D. Hu, H. Liang, X. Wang, F. Luo, B. Qiu, Z. Lin, J. Wang, Highly sensitive and selective photoelectrochemical aptasensor for cancer biomarker CA125 based on AuNPs/GaN schottky junction. *Anal. Chem.* **92**, 10114–10120 (2020).
354. R. Xu, Y. Du, H. Ma, D. Wu, X. Ren, X. Sun, Q. Wei, H. Ju, Photoelectrochemical aptasensor based on La<sub>2</sub>Ti<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/Sb<sub>2</sub>S<sub>3</sub> and V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> for effectively signal change strategy for cancer marker detection. *Biosens. Bioelectron.* **192**, 113528 (2021).
355. Y. Pei, Y. Ge, X. Zhang, Y. Li, Cathodic photoelectrochemical aptasensor based on NiO/BiOI/Au NP composite sensitized with CdSe for determination of exosomes. *Microchim. Acta.* **188**, 51 (2021).



## Bibliografía

356. K. Wang, R. Zhang, N. Sun, X. Li, J. Wang, Y. Cao, R. Pei, Near-Infrared light-driven photoelectrochemical aptasensor based on the upconversion nanoparticles and TiO<sub>2</sub>/CdTe heterostructure for detection of cancer cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **8**, 25834–25839 (2016).
357. W.-W. Zhao, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, Photoelectrochemical aptasensing. *TrAC Trends Anal. Chem.* **82**, 307–315 (2016).