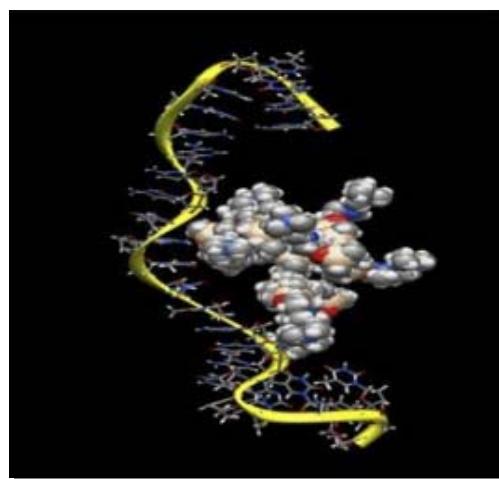


Màster Universitari Ciència i Tecnologia Químiques
Mòdul d'Iniciació a la Recerca

Aptasensores impedimétricos para la detección de trombina



Memòria presentada per
Cristina Ocaña Tejada

Dirigida per
Manel del Valle Zafra

Departament de Química, Facultat de Ciències
Bellaterra, setembre de 2011

Memòria presentada per superar el mòdul d'Iniciació a la Recerca i treball de fi de màster corresponent al Màster Universitari Ciència i Tecnologia Químiques.

Cristina Ocaña Tejada

Llicenciada en Ciències Químiques

Vist i plau

Manel del Valle

Professor titular de Química Analítica

Bellaterra, 01 de setembre del 2011

Agradecimientos

A los que creyeron en mí....familia, amigos, Bea, Rafi, Rubén, Félix, Carol...y especialmente a tí: Dani, muchísimas gracias porque sin vuestro apoyo no hubiera podido seguir adelante.

Muchas gracias a Manel por confiar en mí e introducirme en el difícil mundo de la investigación.

A Mercè i Xavi mil gràcies!!Sense vosaltres haguès sigut impossible introduir-me en aquest món!!

I això no ha fet més que començar!! Us portaré sempre al cor!!

A todos los del laboratorio, Berta, Julio, del GSB y GTS, del Departamento de Analítica, de la Torre, compañeros de máster y a la gente de Erasmus que pasó por el lab, muchas gracias por ayudarme y aconsejarme cuando lo he necesitado.

A TODOS MUCHÍSIMAS GRACIAS

Abstract

En el presente trabajo se ha desarrollado el primer aptasensor (biosensor de aptámero) en nuestro grupo de investigación, Grup de Sensors i Biosensors de la Universidad Autònoma de Barcelona. En concreto se han desarrollado dos aptasensores para la detección de la proteína trombina, uno basado en la inmovilización de aptámeros por adsorción física, y otro basado en la inmovilización de aptámeros por enlace covalente mediante la reacción EDAC-NHS. El aptasensor utiliza la afinidad específica de la cadena de DNA (aptámero) por la proteína con la que interacciona. Los cambios de carga y estéricos del complejo aptámero proteína alteran la capacidad y la resistencia de transferencia interfacial de electrones en la superficie del electrodo. El principio de detección se basa en la detección de cambios de estas propiedades de interfase del electrodo con el marcador redox $[Fe(CN)_6]^{3-}$ / $[Fe(CN)_6]^{4-}$, utilizando mediciones de Espectroscopia Electroquímica de Impedancia. El aptasensor basado en adsorción física del aptámero mostró una respuesta lineal a trombina en el rango de 7.5 a 75 pM y un límite de detección de 5pM, después de optimizar todas las condiciones experimentales. Posteriormente se estudió la especificidad del sistema respecto proteínas potencialmente interferentes presentes en suero sanguíneo, obteniendo cierta interferencia por parte de fibrinógeno e inmunoglobulina G, pero no por parte de albúmina. El sensor demostró ser regenerable mediante la ruptura del complejo formado entre el aptámero y la trombina con una solución de NaCl 2.0 M, aumento de la temperatura y agitación. El segundo aptasensor, basado en enlace covalente del aptámero mostró una respuesta lineal a trombina y límite de detección mejor que el anterior sensor; de 2.5 a 100 pM y 1.5 pM respectivamente. Aunque cabe destacar que este aptasensor está siendo optimizado actualmente.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Sensor químico	1
1.2. Espectroscopia Electroquímica de Impedancia	2
1.3. Biosensores	5
1.4. Biosensores de aptámeros: Aptasensores	5
1.5. Aptámeros	5
1.6. Trombina	7
1.7. Inmovilizaciones empleadas	8
1.7.1. Inmovilización por adsorción física	8
1.7.2. Inmovilización por enlace covalente	8
1.8. Aplicaciones analíticas y tipos de aptasensores	9
2. OBJETIVOS	10
3. EXPERIMENTAL	11
3.1. Material	11
3.1.1. Buffer	11
3.2. Construcción de los electrodos de trabajo	12
3.3. Instrumentación	13
3.4. Procedimientos para la detección de trombina	13
3.4.1. Procedimiento 1-Aptasensor basado en inmovilización por adsorción física del aptámero a la superficie del electrodo	13

3.4.2. Procedimiento 2-Aptasensor basado en inmovilización del aptámero por enlace covalente mediante activación electroquímica del electrodo.	14
3.5. Detección EIS	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Δ y Δ_{ratio}	17
4.2. Reproducibilidad de los electrodos	18
4.3. Aptasensor basado en inmovilización por adsorción física	19
4.3.1. Optimización de las concentraciones de aptámero y PEG	19
4.3.2. Detección de trombina	20
4.3.3. Curva de calibrado de la trombina	21
4.3.4. Especificidad del aptasensor	22
4.3.5. Sensibilidad del aptasensor	24
4.3.6. Regeneración del aptasensor	25
4.4. Aptasensor basado en inmovilización por enlace covalente	26
4.4.1. Activación electroquímica	26
4.4.2. Inmovilización por enlace covalente mediante la reacción EDAC-NHS.	27
4.4.3. Detección de trombina	28
4.5. Comparación de las diferentes técnicas de inmovilización	29
5. CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS	

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

φ	Ángulo de desfase
Δ	Diferencia de resistencias R_{ct}
Δ_{ratio}	Señal relativa elaborada para representar los resultados
ω	Frecuencia angular
AC	Corriente Alterna
AptThr	Aptámero de trombina
AptThr-Thr	Complejo de aptámero de trombina-trombina
BSA	Albúmina Sérica Bovina
C	Condensador
DNA	Ácido desoxiribonucléico
E	Potencial
EC_{50}	Efecto de la concentración al 50%
EDAC	clorhidrato de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> -etilcarbodiimida
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy
Fbr	Fibrinógeno
I	Intensidad de corriente
ISFET	Transistor de efecto de campo selectivo a iones
IgG	Inmunoglobulina G
NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	Tampón fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PVC	Policloruro de vinilo
R	Resistencia
R_{ct}	Resistencia de transferencia de carga
RNA	Ácido ribonucleíco
RSD	Desviación estándar relativa

SELEX	Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial
SPR	Resonancia de Plasmones Superficiales
Thr	Trombina
W	Término Warbug
Z	Impedancia
Z_i	Componente imaginaria de la impedancia
Z_r	Componente real de la impedancia

1. Introducción

1.1. Sensor Químico

Un sensor químico es un dispositivo que como resultado de una interacción química con el analito, transforma información química de tipo cualitativa o cuantitativa en una señal medible y útil analíticamente¹. Los sensores químicos se caracterizan por sus dimensiones reducidas, robustez, facilidad de uso y capacidad de suministrar información analítica fiable de manera continua.

Los sensores químicos normalmente están formados por dos componentes básicos interconectados: un sistema de reconocimiento molecular (receptor) y un transductor físico-químico^{2,3}. El receptor es capaz de reconocer selectivamente un determinado analito. Como consecuencia de este reconocimiento se produce una señal primaria de tipo térmica, eléctrica, óptica o másica. El transductor es el responsable de transformar dicha señal en otra de tipo eléctrica. La señal eléctrica producida aporta información analítica sobre la muestra, el proceso o el sistema que se investiga⁴.



Figura 1. Esquema del funcionamiento de un sensor químico.

Los sensores se pueden clasificar, en función de la propiedad física que mida el transductor⁴⁻⁶, en:

- **Sensores ópticos⁷:** sensores basados en fibras ópticas, en resonancia de plasmones superficiales y sensores de onda evanescente.
- **Sensores piezoelectrinos⁶:** sensores basados en onda acústica de volumen o superficial.
- **Sensores electroquímicos y eléctricos⁶:** sensores amperométricos, potenciométricos, impedimétricos, o de efecto de campo (ISFET)².

En el próximo apartado, se desarrollará al detalle la técnica utilizada en este trabajo para realizar las mediciones analíticas.

1.2. Espectroscopia Electroquímica de Impedancia

La Espectroscopia Electroquímica de Impedancia, conocida como EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy), es una técnica relativamente moderna que apareció en la década de los 70. El término impedancia debe su nombre a Olivier Heaviside, quien en el 1886 adaptó los números complejos al estudio de los circuitos eléctricos.

Este método consiste en la medida de la impedancia que presenta un sistema electroquímico a diferentes frecuencias. La impedancia eléctrica mide la oposición de un circuito o de un componente eléctrico al paso de una corriente eléctrica sinusoidal alterna^{8,9}.

La impedancia electroquímica se obtiene al aplicar un potencial AC a la celda electroquímica bajo estudio y medir la corriente a través de la celda. La señal aplicada es de tipo coseinodal. Así por ejemplo, se puede aplicar sobre el sistema una señal de potencial alterno¹⁰:

$$E = E_0 \cos(\omega \cdot t)$$

Donde E es el potencial aplicado a tiempo t, E₀ es la amplitud de la señal, ω = 2πf es la frecuencia angular, y f es la frecuencia expresada en Hertz (Hz).

Variando la frecuencia, ω, de esta señal de potencial, E₀, de cero a infinito, se obtiene la respuesta del sistema, esta vez en intensidad de corriente, I. La respuesta en régimen permanente de un sistema lineal a una señal de excitación de tipo coseinodal, en otra señal coseinodal de la misma frecuencia que la primera, pero que difiere en los valores de su amplitud y ángulo de fase¹⁰.

$$I = I_0 \cos(\omega \cdot t - \varphi)$$

A partir de las mediciones de desfase φ y de la amplitud de la respuesta, Z₀, es posible obtener la impedancia de transferencia electroquímica del material estudiado:

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \cos(\omega \cdot t)}{I_0 \cos(\omega \cdot t - \varphi)} = Z_0 \frac{\cos(\omega \cdot t)}{\cos(\omega \cdot t - \varphi)}$$

Según la expresión de Euler:

$$\exp(j \cdot \varphi) = \cos \varphi + j \sin \varphi$$

Es posible expresar la impedancia en aritmética compleja. El potencial y la señal de corriente son descritos como:

$$E(t) = E_o \cdot \exp(j\omega \cdot t) \quad \text{y} \quad I(t) = I_o \cdot \exp(j\omega \cdot t - j\varphi)$$

La impedancia entonces, se representa como un número complejo:

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = Z_o \exp(j\varphi) = Z_o(\cos \varphi + j \sin \varphi) = Z_r + jZ_i$$

Entre las diferentes representaciones gráficas de los datos impedimétricos, la más común es la representación del diagrama de Nyquist, en la que la parte imaginaria de la impedancia $-Z_i$, se representa frente a la parte real Z_r . En esta gráfica cada punto corresponde a una frecuencia diferente. Los resultados también pueden ser interpretados mediante diagramas de Bode, en los cuales el logaritmo de la magnitud de la impedancia ($\log|Z|$) y el desfase (φ) se grafican respecto al logaritmo de la frecuencia ($\log\omega$).

La figura 2 muestra un diagrama de Nyquist teórico, donde el vector de impedancia de módulo Z_0 forma con el eje x un ángulo que corresponde al ángulo de desfase φ . Los datos de baja frecuencia están representados en la parte derecha del diagrama, mientras que los datos de alta frecuencia están en la izquierda.

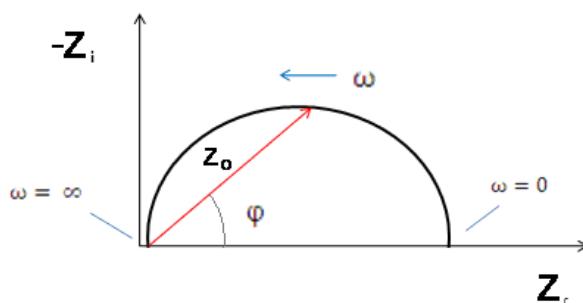


Figura 2. Diagrama de Nyquist teórico.

La interpretación de los espectros de impedancia se basa en la correlación entre los datos obtenidos y circuitos eléctricos, formados con elementos eléctricos básicos como resistencias, condensadores, inductores,...combinados entre ellos.

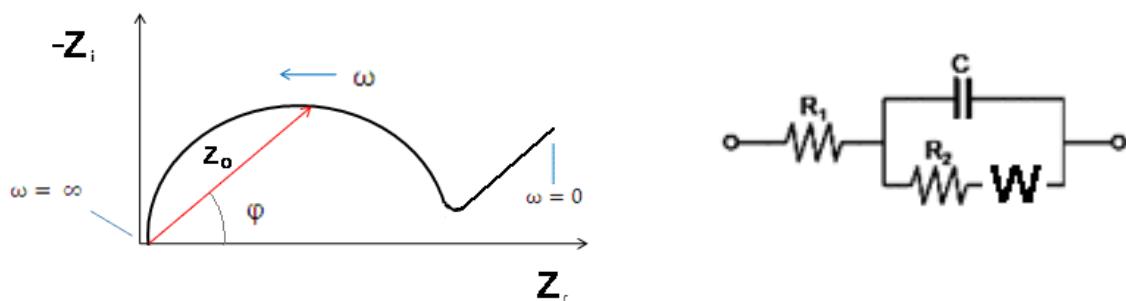


Figura 3. Diagrama de Nyquist para una reacción electródica y su circuito eléctrico equivalente formado por una resistencia R_1 en paralelo con un par resistencia (R_2), warburg (W), y condensador (C).

La figura 3, muestra el diagrama de Nyquist normalmente observado con una reacción electroquímica ideal y el correspondiente circuito eléctrico equivalente, llamado circuito de Randles, formado por un condensador (C) en paralelo con una resistencia (R_2), ambos en serie con otra resistencia (R_1) (circuito $R(RC)$), más el término de Warburg originado en la difusión. El espectro de impedancia se representa por un semicírculo que comienza en el punto que corresponde al valor de R_1 , y el punto final corresponde a la suma de R_1+R_2 . El valor de la capacidad del condensador C se obtiene a partir del valor máximo de impedancia imaginaria del espectro. Muchos espectros de impedancia corresponden a sistemas electroquímicos que muestran equivalencia con este tipo de diagrama. El parámetro R_1 representa la resistencia de la solución, R_2 corresponde en nuestro caso a la resistencia de la transferencia de carga (R_{ct}) entre la solución y la superficie del electrodo, y C es la capacidad de la doble capa, debida a la interfase entre el electrodo y la solución electrolítica.

En muchos casos, debido a la complejidad electroquímica del sistema los espectros de impedancia y los correspondientes circuitos eléctricos equivalentes son más complejos que el representado por el circuito eléctrico de Randles en la figura 3.

Entre las aplicaciones de la técnica EIS destacan todo tipo de caracterizaciones de sistemas electroquímicos; los más populares son los estudios de fenómenos de corrosión¹¹, de superficie¹² y la asignación de mecanismos para reacciones electroquímicas^{13,14}. Un campo de estudio en que la EIS ha resultado especialmente útil es el diagnóstico y optimización para sensores químicos^{15,16} y biosensores^{17,18}. Como comentario final, sólo se recuerda que en las medidas de impedancia, lo que se deduce no es una parte existente y otra virtual (imaginaria) sino la presencia de desfase entre la señal AC de excitación y la señal AC resultante.

1.3. Biosensores

Un biosensor es un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico de reconocimiento altamente selectivo en íntimo contacto con el transductor capaz de detectar el evento de reconocimiento molecular entre el analito y la molécula, transformándolo en una señal analítica, normalmente de tipo eléctrica^{4,22,23}.

El material biológico confiere la selectividad del biosensor mientras que el transductor confiere sensibilidad. Es por ello que es muy importante escoger bien el transductor.

Las etapas de operación de un biosensor son las siguientes:

1. Interacción específica del analito de la muestra con el material biológico inmovilizado.
2. Detección de la variación de alguna propiedad física o química del sistema provocada por la reacción de bioreconocimiento.
3. Procesamiento de la señal y obtención de los resultados.

El material biológico, que puede ser muy variado²² (DNA, enzimas, bacterias, aptámeros, tejidos, células,...), puede inmovilizarse en el transductor de diferentes maneras²³. Una primera clasificación distingue la inmovilización superficial que incluye la retención en membrana, adsorción física sobre el transductor, entrecruzamiento mediante agentes bifuncionales o enlace covalente; una segunda familia sería la inmovilización por atrapamiento en una matriz polimérica, entre la que destaca la tecnología habitual en nuestros laboratorios, los biocomposites²⁴.

1.4. Biosensores de Aptámeros: Aptasensores

Los aptasensores (biosensores o genosensores de aptámeros) son dispositivos capaces de proporcionar una señal analítica a partir del evento de unión entre una molécula diana y un aptámero. Combinan un elemento de reconocimiento biológico (en este caso una simple hebra de DNA sintética, llamada aptámero) que confiere selectividad, con un transductor que confiere sensibilidad y que permite generar una señal eléctrica a partir del evento de reconocimiento.

1.5. Aptámeros

Los aptámeros son ligandos de cadena simple de ácidos nucleicos (RNA o DNA) que tienen una alta afinidad y especificidad con otras moléculas que no sean ácidos nucleicos, por ejemplo proteínas²⁵. Los aptámeros de ácidos nucleicos han sido denominados "anticuerpos químicos", ya que interactúan con sus moléculas diana con una alta afinidad y especificidad, y sus interacciones

son comparables a las de los anticuerpos y los antígenos. Además, ciertas características únicas de los aptámeros los aventajan frente a los anticuerpos. En primer lugar, los aptámeros se obtienen por síntesis química, de una forma fácil y reproducible. En segundo lugar, los aptámeros de ácidos nucleicos pueden ser seleccionados en condiciones fisiológicas o no fisiológicas contra una amplia variedad de moléculas diana. En tercer lugar, los aptámeros químicamente modificados pueden tener una estabilidad excelente en condiciones extremas. En cuarto lugar, la formación del complejo aptámero-diana se puede revertir de forma activa a través de la hibridación intermolecular en condiciones fisiológicas²⁵.

Debido a estas características distintivas, los aptámeros han sido utilizados en diferentes aplicaciones biológicas y biomédicas así como para el desarrollo de biosensores, siendo éste un campo bastante novedoso en este momento²⁶. El desarrollo de aptámeros de ácidos nucleicos implica dos pasos críticos. El primer paso es la selección, es decir, el desarrollo de aptámeros de larga cadena a partir de bibliotecas de ADN o ARN con un proceso llamado Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX)²⁷. El segundo paso es la identificación de los nucleótidos esenciales y no esenciales de los aptámeros.

El proceso SELEX que aparece en la figura 4, comienza con la generación de una biblioteca que contiene al azar hasta 10^{14} - 10^{15} oligonucleótidos de cadena sencilla de DNA o RNA.

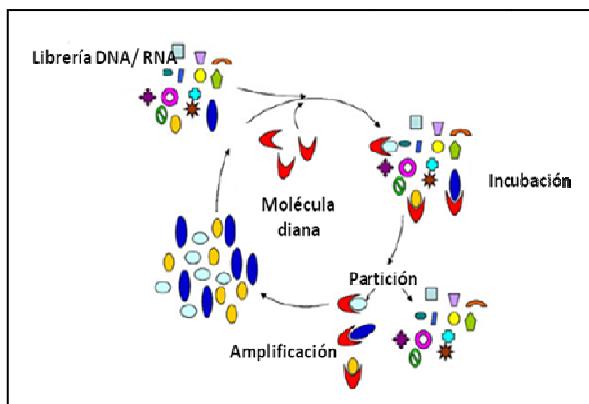


Figura 4. Procedimiento general del método SELEX.

Los oligonucleótidos son sintetizados por una técnica de síntesis de química combinatoria. Estos oligonucleótidos se componen de N-nucleótidos al azar en el centro de sus secuencias, flanqueados por una región-primer enlazada a cada extremo. Durante la selección de los aptámeros, las moléculas diana se incuban en la biblioteca para permitir el reconocimiento molecular entre las moléculas diana y los oligonucleótidos. En teoría, los aptámeros se unen con fuerza a las moléculas objetivo y los otros oligonucleótidos libres permanecen en la solución vinculante. Debido a que el complejo aptámero y los oligonucleótidos libres tienen diferentes propiedades físicas, se pueden separar con un método de partición. Después de la separación, las secuencias

unidas a las moléculas diana pueden ser amplificadas para generar una nueva biblioteca para un mejor reconocimiento. Este proceso se suele repetir de 8 a 12 ciclos²⁵.

Los aptámeros identificados por el procedimiento de selección (es decir, aptámeros de cadena larga) suelen tener de 80 a 100 nucleótidos. Sin embargo, no todos los nucleótidos de un aptámero juegan un papel crítico en la unión a su objetivo, por ello los nucleótidos no esenciales son eliminados. El aptámero utilizado en el presente trabajo, selectivo a la proteína trombina, es uno altamente estudiado y caracterizado, con una secuencia responsable del reconocimiento de 19 bases Timina y Guanina, 5'-TTTGGGTTGGTGTGGTTGG-3'.

1.6. *Trombina*

La trombina es una enzima glicoproteínica de tipo peptidasa, formada por dos cadenas de polipéptidos de 36 y 259 aminoácidos unidas por un puente disulfuro. Se encuentra relacionada con la coagulación sanguínea²⁸. Esta proteína no se encuentra presente en la sangre, si no que se forma como parte del proceso de coagulación sanguíneo a partir de la protrombina. La protrombina necesita la presencia de iones Ca²⁺ y otras sustancias que se encuentran en las plaquetas y en el plasma, para proceder a su ruptura entre los aminoácidos Arg274-Thr275 y Arg323-Ile324, y producir la trombina, de peso molecular 32 KDaltons. Una vez formada posee la capacidad de coagular el fibrinógeno formando coágulos en condiciones fisiológicas y trombos en patológicas²⁹. Se cree que juega un papel importante en un gran número de enfermedades cardiovasculares³⁰. Además, regula muchos procesos en la inflamación y la reparación del tejido de la pared de los vasos sanguíneos. Cuando aparece en sangre a un nivel pM indica la presencia de formación de trombos²⁶. Por ello es importante evaluar esta proteína a nivel de trazas con alta sensibilidad.

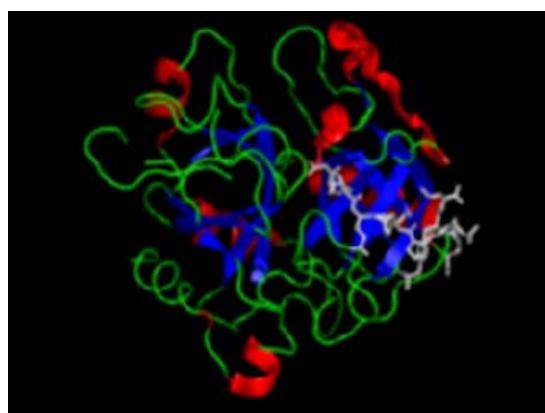


Figura 5. Estructura en 3D de la trombina

1.7. Inmovilizaciones empleadas

Como ya he mencionado anteriormente, las estrategias para inmovilizar aptámeros, así como otros materiales biológicos son muy variadas^{2,3}, por ello, en este trabajo se han utilizado dos de ellas.

1.7.1. Inmovilización por adsorción física

Esta técnica consiste en la adsorción directa de aptámero en la superficie del electrodo a través de interacciones débiles con los sitios activos del sustrato, en este caso del composite. La adsorción física es el método más simple de inmovilización en superficies debido a que no requiere reactivos especiales ni utilización de aptámeros funcionalizados³¹. Las principales desventajas que presenta son: posibilidad de desorción del aptámero de la superficie y adsorción inespecífica en la superficie de electrodo por parte de la molécula diana. Debido a esta última desventaja, se puede utilizar una etapa de bloqueo por medio de polietilenglicol (PEG) o Albúmina Sérica (BSA), entre otras sustancias, que bloquean los sitios donde no se ha producido adsorción física, aumentando así las prestaciones de esta técnica de inmovilización.

1.7.2. Inmovilización por enlace covalente

Este tipo de técnica es la más elegante y la que posee mayor eficiencia en el bioreconocimiento, a la vez es la más difícil de conseguir. Consiste en la formación de un enlace covalente entre el transductor y el reactivo inmovilizante, con la condición que el elemento de reconocimiento resulte con actividad y con la orientación adecuada. Requiere normalmente la derivatización de éstos.

Una de las metodologías de inmovilización covalente más desarrollada en la bibliografía, es la unión covalente sobre grafito funcionalizado con grupos carboxilo³²⁻³⁴. Esta reacción utiliza para la inmovilización del aptámero, la reacción de la carbodiimida³⁴⁻³⁶, con la que se inmovilizan proteínas a partir del enlace amida entre grupos amino terminales con grupos reactivos carboxilo presentes en la superficie^{38,39}. Con este objetivo, los aptámeros utilizados pueden ser funcionalizados con grupos amino terminales.

Para la funcionalización de los electrodos con grupos carboxilos se utilizó *activación electroquímica*. Esta técnica consiste en la aplicación de potencial al electrodo para la formación de grupos carboxilos en la superficie de éste. Existen diferentes estrategias donde utilizan diferentes tipos de soluciones y distintos pH⁴⁰⁻⁴².

1.8. Aplicaciones analíticas y tipos de aptasensores

Gracias a sus características, los aptámeros pueden ser utilizados en numerosas aplicaciones analíticas, desde técnicas de separación a biosensores. De entre las técnicas de separación, la Cromatografía, la Espectroscopía de Masas y la Electroforesis capilar utilizan las propiedades de los aptámeros para detectar y separar proteínas, enantiómeros⁴²,... Dentro del campo de los biosensores se han convertido en sustitutos de los anticuerpos y enzimas como elementos de bioreconocimiento en diferentes transductores para detectar proteínas, toxinas, anticuerpos⁴³,... Utilizando aptámeros la miniaturización, la integración y la automatización de biosensores es más fácil que utilizando anticuerpos o enzimas, gracias a su menor tamaño. Entre los diferentes modos de transducción; electroquímicos, acústicos, piezoeléctricos, ópticos,..., los transductores electroquímicos son los más recientes. El primer uso de aptámeros como elementos de bioreconocimiento en aptasensores fue en 1996, con un biosensor óptico basado en aptámeros marcados con fluorescencia para la detección de IgG⁴⁴. En 2004 fue descrito el primer aptasensor electroquímico, basado en un formato sándwich donde los aptámeros estaban marcados con glucosa oxidasa para la detección de trombina mediante amperometría⁴⁵.

Actualmente, gracias a las propiedades de las técnicas electroquímicas, se están desarrollando numerosos aptasensores basados en las técnicas de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR), en EIS, en Potenciómetría, en Transistores de Efecto de Campo (ISFET), Microbalanzas de cristal de cuarzo⁴⁶, etc.

2. OBJETIVOS

Durante el desarrollo de la introducción del presente trabajo, se ha comentado la importancia de detectar o cuantificar mediante un biosensor concentraciones de trombina del orden picomolar.

En este contexto, los principales objetivos son:

1. Construir sensores de grafito-epoxi.
2. En base a (1), desarrollar y optimizar aptasensores para cuantificar trombina basados en diferentes técnicas de inmovilización.
3. Comprobar que la inmovilización del aptámero de trombina mediante adsorción física, y mediante enlace covalente con la reacción EDAC-NHS en la superficie del electrodo son técnicas viables.
4. Demostrar que la técnica de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica es una técnica muy sensible e idónea para detectar cambios en la superficie del electrodo en el proceso de bioreconocimiento del sistema, sin necesidad de elementos de marcaje.
5. Comprobar si los aptasensores desarrollados pueden reutilizarse, tras su regeneración química.
6. Comparar los resultados obtenidos para cada tipo de inmovilización de aptámero en la superficie del electrodo.

3. EXPERIMENTAL

Se presenta una breve descripción de la metodología experimental utilizada para llevar a cabo el presente trabajo.

3.1. Reactivos

En la construcción de los aptasensores se utilizó polvo de grafito de partícula de 50 μm de Merck, resina Epotek H77 y endurecedor Epotek H77 de Epoxy Technology, K₃[Fe(CN)₆] y K₄[Fe(CN)₆] de Panreac, cloruro de sodio de Merck, hidrogenofosfato de sodio dihidratado de Sigma, polietilenglicol (PEG) de Fluka, cloruro de potasio de Merck, dihidrogenofosfato de potasio de Merck, ácido nítrico de Sigma, ácido perclórico de Sigma, clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDAC), N-hidroxisuccinimida (NHS). Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Todas las disoluciones fueron preparadas con agua Milli-Q.

Todos los aptámeros de trombina (AptThr) utilizados en este trabajo fueron preparados por TIB-MOLBIOL, y fueron modificados con el grupo amino terminal en la posición 5', su secuencia es la siguiente: 5'-TTGGGTTGGTGTGGTTGG-3'. Las disoluciones stock de los aptámeros fueron diluidas con agua Milli-Q, separadas en fracciones de 10 μl y almacenadas en el congelador a temperatura de -20°C. Las proteínas (albúmina bovina, BSA, Thr, fibrinógeno, Fbr, Inmunoglobulina G, IgG) se prepararon de igual manera que los aptámeros y fueron obtenidas de Sigma Aldrich.

3.1.2. Buffer

El buffer utilizado fue PBS de pH ajustado a 7.6, cuya composición aparece en la tabla 3.

Tabla 1. Composición del buffer PBS.

Sal	Concentración (mM)
NaCl	187
KCl	2.7
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	8.1
KH ₂ PO ₄	1.76

3.2. Construcción de los electrodos de trabajo

Para la construcción de los cuerpos de los electrodos se utilizó una conexión hembra de 2 mm de diámetro al que se le acopló una rosca metálica. En su extremo se soldó una lámina de cobre circular con estaño, de la cual se eliminó mediante una solución de HNO_3 diluido la capa de óxido que podría tener. Esta capa de óxido de no eliminarse podría aumentar la resistencia al paso de la corriente, y por lo tanto, disminuir la conductividad eléctrica del transductor. Esta conexión se introdujo en un tubo cilíndrico de PVC de 6 mm de diámetro interno, de 8 mm de diámetro externo y de 20 mm de longitud. La rosca metálica que posee la conexión permitió que este último quedara bien fijado en su extremo del tubo de PVC, mientras que en el otro extremo quedó una cavidad virtual de 3 mm de profundidad. Todo ello se puede observar en la figura 6.



Figura 6. Fotografía de los componentes del electrodo



Figura 7. Fotografía de electrodo con y sin composite

En la cavidad del electrodo posteriormente se introdujo el composite, figura 7. Una vez curado el electrodo se lijó con papel esmeril de 220, 400, 800, 1000, 1200 y papel de alúmina (Thermo scientific Orion) respectivamente.

Preparación del composite

El composite grafito-epoxi se preparó mezclando resina epoxi y endurecedor en una relación en peso de 20:3 respectivamente. Posteriormente, se adicionó grafito en polvo en una proporción del 20%. El material resultante fue homogenizado con la ayuda de una espátula durante una hora e incorporado en el cuerpo del electrodo. Éstos fueron curados durante 3 días a 80°C.

3.3. Instrumentación

Para realizar las mediciones de EIS se utilizaron dos unidades de impedancia: IM6e (BAS-Zahner, Alemania) y Autolab (Metrohm Autolab B.V, Holanda). El software utilizado para la adquisición de las medidas fue: en la unidad Im6E el programa Thales (BAS-Zahner), y en la unidad Autolab el programa Fra (Eco Chemie, Utrecht, Holanda). Para obtener el ajuste de los valores se utilizó el programa Zview (Scribner Associates, Southern Pines, NC, EEUU). Para la construcción de la celda se utilizaron tres electrodos: un electrodo auxiliar de platino (Crison 52-67 1, Barcelona, España), un electrodo de referencia Ag/AgCl, es decir, un alambre de plata cubierto de AgCl y el electrodo composite construido de grafito-epoxi como electrodo de trabajo. Para realizar la regeneración del aptasensor se utilizó un termomixer compact (Eppendorf Hamburg, Alemania)

3. 4. Procedimientos para la detección de trombina

En este trabajo se muestran diferentes procedimientos para construir un aptasensor de trombina. A continuación se explica cada procedimiento al detalle.

3.4.1. Procedimiento 1 - Aptasensor basado en inmovilización por adsorción física del aptámero en la superficie del electrodo

La fabricación del primer aptasensor consistió en tres etapas: inmovilización del aptámero en la superficie del composite por adsorción física, bloqueo para prevenir la adsorción inespecífica, y reconocimiento por parte del aptámero de la molécula diana, en este caso de la trombina.

El primer paso consistió en someter a 160 μ l de AptThr de una concentración de 1 μ M a la temperatura de 80 a 90°C, durante 3 minutos para que adquiriese una conformación más estable. Una vez pasado este tiempo, se dejó enfriar en un baño de agua fría. Se introdujo el electrodo en un eppendorf que contenía el aptámero y se dejó incubar durante 15 minutos. Posteriormente, el electrodo se lavó dos veces con 160 μ l de buffer PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.

La etapa de bloqueo consistió en incubar el electrodo con 160 μ l de una solución de PEG 40 mM durante 15 minutos. Posteriormente, se lavó el electrodo dos veces con 160 μ l de buffer 10 minutos a temperatura ambiente, para eliminar los posibles restos de PEG.

Una vez bloqueados los sitios no adsorbidos por el aptámero, se inició la etapa de bioreconocimiento. En un eppendorf que contenía 160 μ l de una solución con una concentración

dada de trombina, se introdujo el electrodo. Se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavó el electrodo dos veces con 160 μ l de buffer PBS durante 10 minutos, para eliminar los restos de proteína que no fueron reconocidos. Para los estudios de especificidad, se utilizó el mismo procedimiento anterior, con proteínas diferentes a la trombina.

Tanto la concentración del aptámero como de proteína y de PEG fueron optimizadas mediante curvas de calibrado. Las condiciones experimentales y el buffer PBS fueron optimizadas por componentes del grupo en trabajos anteriores del campo de los genosensores.

Regeneración del aptasensor

Para llevar a cabo la regeneración del aptasensor se utilizó NaCl 2M. Despues del proceso de incubación de trombina, se sumergió el electrodo en un eppendorf que contenía 160 μ l de una solución 2M de NaCl. Se dejó incubar durante 20 minutos en un termomixer a 42°C con agitación. Posteriormente, se lavó dos veces con 160 μ l de PBS durante 10 minutos.

3.4.2. Procedimiento 2 - Aptasensor basado en inmovilización del aptámero por enlace covalente mediante activación electroquímica del electrodo.

Este último procedimiento consistió en cuatro etapas: activación de la superficie del electrodo, inmovilización del aptámero de trombina mediante la reacción EDAC-NHS, bloqueo de la superficie del electrodo con PEG, y bioreconocimiento de trombina por parte del aptámero.

El primer paso de este procedimiento consistió en la activación de la superficie del electrodo. Se aplicó al electrodo un potencial de 0.8V respecto al electrodo de referencia Ag|AgCl|KCl(sat.) en una disolución 1M de HClO₄ durante 5 horas.

El procedimiento de inmovilización consistió en sumergir el electrodo en un eppendorf que contenía 1mg de EDAC, 0.5mg de NHS y 160 μ l de AptThr 1 μ M. Se dejó incubar durante 24 horas. Posteriormente, el electrodo se lavó dos veces con 160 μ l de PBS durante 10 minutos.

Una vez el aptámero quedó inmovilizado en la superficie del electrodo se procedió al bloqueo de la superficie del electrodo mediante el polímero PEG. El electrodo se sumergió en un eppendorf que contenía 160 μ l de PEG 40 mM, se dejó incubar 15 minutos y posteriormente se lavó dos veces con 160 μ l de buffer PBS durante 10 minutos.

A continuación se realizó el último paso del procedimiento: bioreconocimiento de trombina por parte del aptámero. El electrodo se sumergió en un eppendorf que contenía 160 μ l de una cierta

concentración de trombina, se dejó incubar durante 15 minutos. Una vez finalizado este tiempo, se procedió a lavar el electrodo dos veces con 160 μ l de buffer PBS durante 10 minutos.

3.5. Detección EIS

Para llevar a cabo la caracterización de los electrodos así como para obtener todas las medidas se utilizó la técnica de Espectroscopía Electroquímica de Impedancia. Las medidas fueron realizadas en buffer PBS que contenía una mezcla 0.01M de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) como marcador redox. Se aplicó un potencial de 0.17 V (correspondiente al potencial de equilibrio vs al electrodo de referencia Ag/AgCl) y un rango de frecuencias de 50KHz a 0.05Hz con una amplitud AC de 10mV. El espectro obtenido fue representado como gráfico de Nyquist ($-Z_i$ vs Z_r). La curva teórica fue utilizada para ajustar los datos al correspondiente circuito eléctrico. Los datos χ^2 que miden el buen ajuste del modelo se obtuvieron gracias al programa Z_{view} . En todos los casos, antes de cualquier inmovilización de la superficie se realizó el espectro de impedancia del electrodo con el buffer y el mediador redox. Posteriormente, después de cada etapa de inmovilización, de bloqueo, de bioreconocimiento,...se realizaron también medidas de impedancia.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gracias al interés por los sensores y especialmente por los biosensores se ha llevado a cabo el desarrollo de aptasensores capaces de realizar medidas rápidas a partir de un instrumental sencillo y de una técnica versátil como la Espectroscopía Electroquímica de Impedancia, que nos permite estudiar fenómenos de bioreconocimiento en la superficie de electrodos.

En este trabajo, en concreto, se construyeron dos aptasensores para la determinación de trombina; uno basado en la inmovilización del aptámero en la superficie del electrodo mediante adsorción física y otro mediante enlace covalente. La cuantificación de trombina se realizó comparando los cambios de resistencia de transferencia electrónica interfacial del electrodo utilizando la pareja redox $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$, como muestra la figura 8.

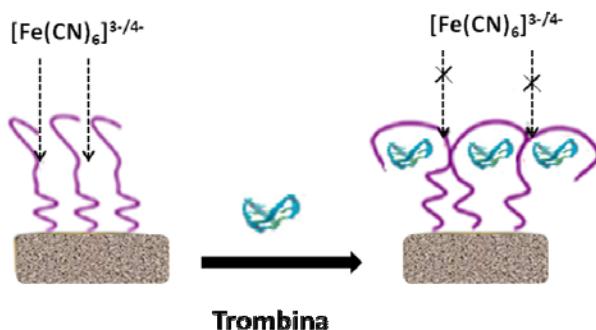


Figura 8. Esquema del proceso de detección utilizando el marcador redox $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$.

Los espectros experimentales obtenidos fueron representados como diagramas de Nyquist, como muestra la figura 9. El semicírculo del gráfico corresponde a la cinética de la reacción, y la diagonal a la derecha corresponde a la contribución de la difusión de las especies. El semicírculo, que es nuestra señal analítica, se utiliza para ajustar los datos experimentales a un circuito eléctrico equivalente. El mejor ajuste propuesto corresponde al circuito eléctrico que aparece en la figura 10. Como ya he mencionado anteriormente, cada elemento del circuito es posible asociarlo a un fenómeno electroquímico. En este caso la resistencia R_1 corresponde a la resistencia de la disolución, R_2 (también llamada R_{ct}) representa la resistencia a la transferencia de carga entre la solución y la superficie del electrodo. CPE está asociado a la capacitancia de la doble capa debida a la interfase entre el electrodo y la solución electrolítica. El uso de un elemento de fase constante CPE en vez de un condensador se requiere para obtener un mejor ajuste de los datos experimentales, y está causado por la falta de idealidad de la superficie del electrodo.

Para todos los ajustes, se observó el valor χ^2 del programa Zview, el cual evalúa el ajuste de la distribución observada (datos del diagrama de Nyquist) a una teórica (valores obtenidos por el circuito eléctrico). En todos los casos fueron calculados y resultaron ser menor que 0.2, mucho

menor que el valor tabulado para 50 grados de libertad (67.505 al nivel de confianza del 95%).

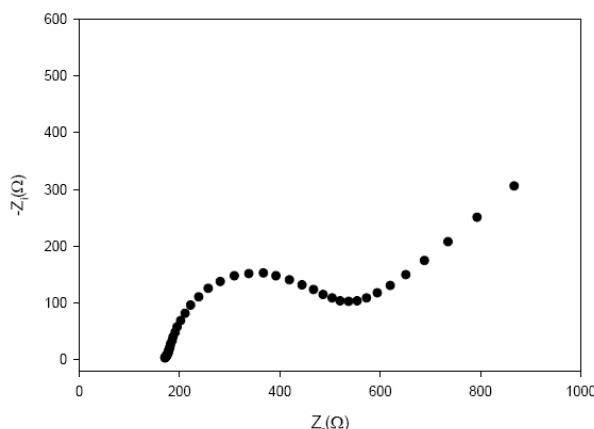


Figura 9. Típico diagrama de Nyquist obtenido en experimentos con el marcador redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$.



Figura 10. Circuito equivalente utilizado para obtener las medidas de impedancia.

Los resultados de los diferentes protocolos utilizados se expresaron como incrementos de variación de R_{ct} entre la resistencia de la transferencia de carga obtenida en los diferentes experimentos y la debida al buffer con el marcador redox. De hecho, los valores de R_{ct} del electrodo con el buffer son distintos para cada electrodo, lo cual produce que la comparación directa entre valores sea difícil. Además, el mismo electrodo puede mostrar valores de R_{ct} distintos en diferentes experimentos. Este hecho se explica teniendo en cuenta que la superficie del electrodo se renueva después de cada experimento ya que se pule con papel de esmeril generando diferentes superficies. Estas diferencias producen que los valores de R_{ct} sean diferentes. Por esta razón, los datos obtenidos requieren su normalización para llegar a ser independientes y poder ser comparados.

4.1. Δ y Δ_{ratio}

Por las razones mencionadas anteriormente se tiene la necesidad de expresar los resultados obtenidos como variaciones relativas de R_{ct} . Existen dos formas para expresar esta variación: Δ y Δ_{ratio} . Sus fórmulas se muestran a continuación:

$$\Delta = R_{ct(AptThr)} - R_{ct(electrodo-buffer)}$$

$$\Delta_{ratio} = \Delta_s / \Delta_p$$

Donde $\Delta_s = R_{ct(AptThr-Thr)} - R_{ct(electrodo-buffer)}$ y $\Delta_p = R_{ct(AptThr)} - R_{ct(electrodo-buffer)}$.

En estas expresiones Δ_p corresponde a la variación de R_{ct} después de la inmovilización del aptámero, mientras que Δ_s representa la variación de R_{ct} después del último paso del bioreconocimiento. La figura 11 muestra los valores de R_{ct} correspondientes a las ecuaciones utilizadas anteriormente, representados como diagrama de Nyquist.

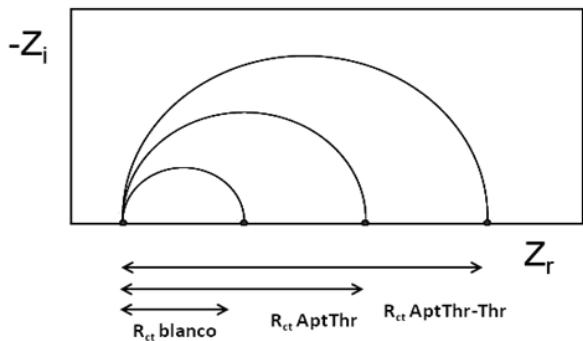


Figura 11. Evolución de la señal analítica R_{ct} durante las etapas de empleo del aptasensor.

4.2. Reproducibilidad de los electrodos

Se estudió la reproducibilidad de todos los electrodos a partir de los datos obtenidos, utilizando:

- el mismo transductor después de estar pulido (reproducibilidad de pulido)
- diferentes transductores (reproducibilidad de construcción de los electrodos)

Como la técnica impedimétrica es muy sensible a un cambio o modificación de la superficie del electrodo, el procedimiento de pulido utilizado para renovar la superficie del electrodo puede influir en los resultados. Por ello, se estudió la reproducibilidad del pulido. En cuanto a la reproducibilidad de construcción de los electrodos, se observó la influencia de la construcción manual de cada electrodo con los resultados impedimétricos.

Para los dos estudios, los espectros de impedancia de los electrodos fueron obtenidos con una solución de buffer PBS que contenía 10mM de una mezcla de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) a pH=7.6. Los valores obtenidos de resistencia a la transferencia de carga debido al marcador redox fueron usados para calcular la desviación estándar relativa (RSD%) de los resultados, y éstos fueron de 5.59% para la reproducibilidad de pulido y 8.28% para la reproducibilidad de construcción. Cada valor de RSD% correspondió a 5 o más experimentos.

El valor de RSD% correspondiente al procedimiento de pulido de la superficie del electrodo fue menor que el que corresponde a la construcción del transductor. Esto significa que la influencia de

la renovación de la superficie es menor que la debida a la construcción del electrodo, motivo predecible, ya que existen factores incontrolables en la construcción manual.

4.3. Aptasensor basado en inmovilización por adsorción física

En la construcción de este aptasensor se utilizó como inmovilización del aptámero en la superficie del electrodo la técnica de adsorción física. Esta técnica consiste en la adsorción directa de aptámero en la superficie del electrodo a través de interacciones débiles con los sitios activos del sustrato, en este caso del composite. El procedimiento para llevar a cabo este aptasensor consistió en tres etapas como muestra la figura 12: inmovilización del aptámero en la superficie del electrodo, bloqueo con PEG para prevenir la adsorción inespecífica, y reconocimiento por parte del aptámero de la molécula diana, en este caso de la trombina.

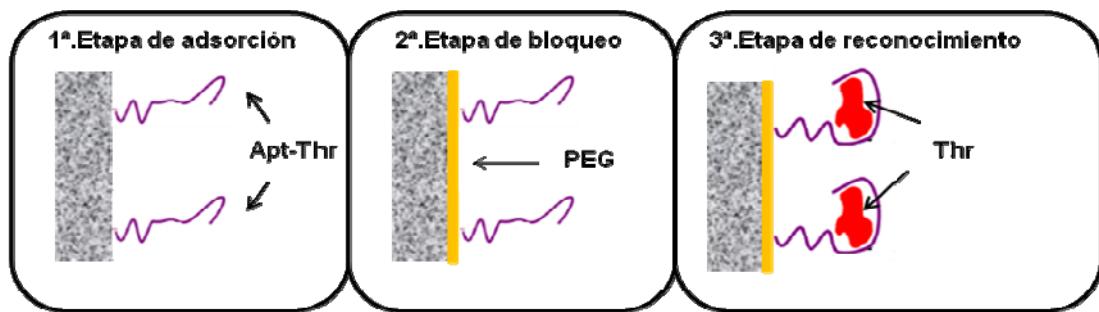


Figura 12. Esquema del protocolo experimental en el aptasensor por adsorción.

4.3.1. Optimización de las concentraciones de aptámero y PEG.

Antes de estudiar la detección de trombina, las concentraciones de aptámero y PEG fueron optimizadas mediante curvas de calibrado.

La figura 13, muestra la curva de calibrado de AptThr adsorbido en la superficie del electrodo. Se observó como la diferencia de resistencias (Δ) aumentaba hasta llegar a un valor fijo. Esto era debido a que la adsorción física del aptámero en la superficie del electrodo seguía una isotermia de Langmuir, donde se llegaba a un valor constante que correspondió a la saturación de éste en la superficie del electrodo. Este valor correspondió a la concentración de $1\mu\text{M}$ de aptámero.

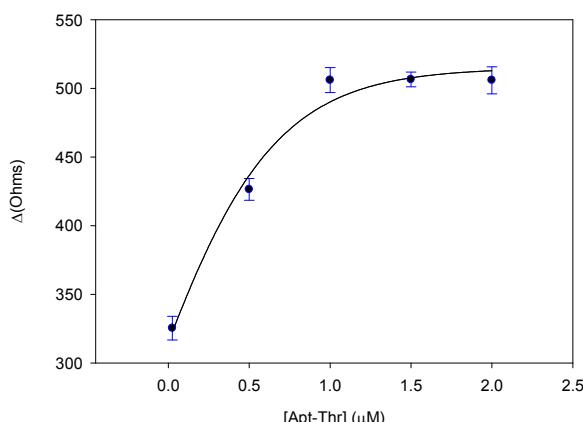


Figura 13. Optimización de la concentración de aptámero de trombina en el aptasensor.

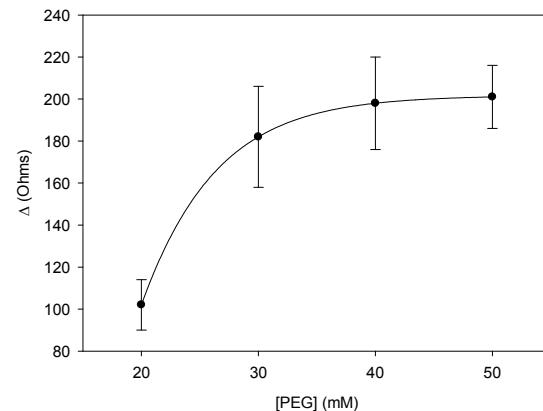


Figura 14. Optimización de la concentración de bloqueante PEG para la operación del biosensor.

Para eliminar una posible adsorción inespecífica en la superficie, se utilizó un agente bloqueante ampliamente utilizado, el polietilenglicol (PEG). Como se puede observar en la figura 14, existió un aumento de resistencia hasta alcanzar el valor de 40 mM de PEG, posteriormente, se observó una estabilización. Esto fue debido a que ocurrió el mismo fenómeno que en el caso anterior, el polímero PEG siguió una isotérmica de Langmuir, donde se llegó a un valor constante que correspondió a la concentración de saturación de éste en la superficie. Por lo tanto, la concentración óptima de bloqueante se escogió como 40 mM.

4.3.2. Detección de trombina

Siguiendo el protocolo experimental mencionado anteriormente para la detección de trombina, se obtuvieron los resultados que aparecen en la figura 15.

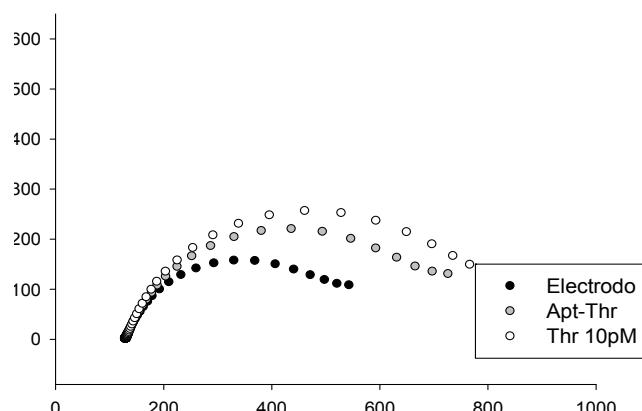


Figura 15. Respuesta del aptasensor a una muestra de Trombina de 10 pM.

Como podemos observar, en cada paso del procedimiento la resistencia R_{ct} entre la superficie del electrodo y la disolución aumentó. Esto fue debido a que en cada etapa se retrasó la cinética de la transferencia de electrones del marcador redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ en la interfase del electrodo.

4.3.3. Curva de calibrado de trombina

Para poder cuantificar la concentración de trombina se construyó su curva de calibrado. La cadena simple de oligonucleótidos que forma el aptámero de trombina, reconoce a la proteína mediante un plegamiento tridimensional. Durante este plegamiento se crean interacciones débiles entre el sistema aptámero-proteína dando lugar al complejo AptThr-Thr²⁷.

La figura 16, muestra la evolución de los diagramas de Nyquist durante la experiencia de calibración frente a trombina. Se observó como al aumentar su concentración aumentó la resistencia de transferencia interfacial electrónica entre la superficie del electrodo y la solución, ya que la proteína era reconocida por parte del aptámero, hasta llegar a una concentración donde la superficie del electrodo quedó saturada, por lo que no existió por parte del aptámero más reconocimiento de proteína.

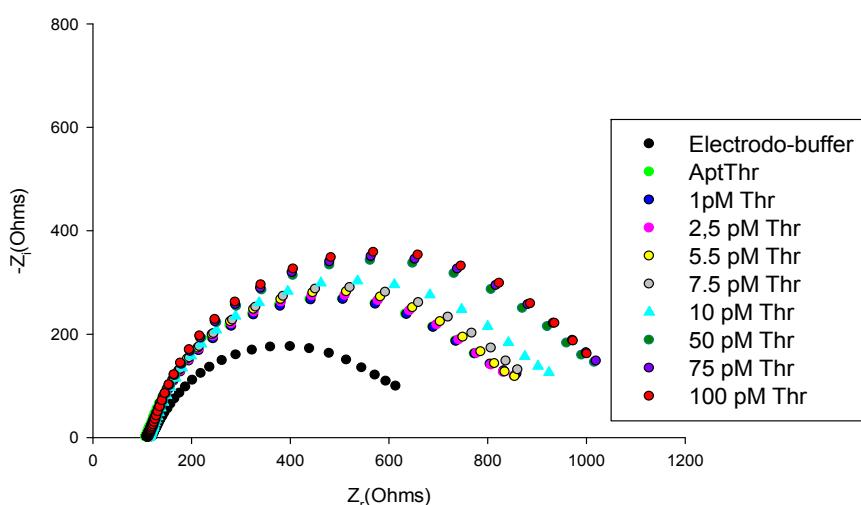


Figura 16. Diagramas de Nyquist correspondientes a la variación de la concentración de trombina.

Para evaluar el límite de detección del sistema AptThr-Thr, así como el rango lineal de concentración de Thr, se construyó una curva de calibrado, representando la señal analítica como Δ_{ratio} respecto a la concentración de proteína, figura 17 .La curva que aparece en la figura 17 muestra una tendencia sigmoidal. La zona central puede aproximarse a una recta, que comprende

la concentración de 7.5 pM a 75 pM de proteína. Posteriormente, se obtuvo mediante regresión lineal la recta correspondiente.

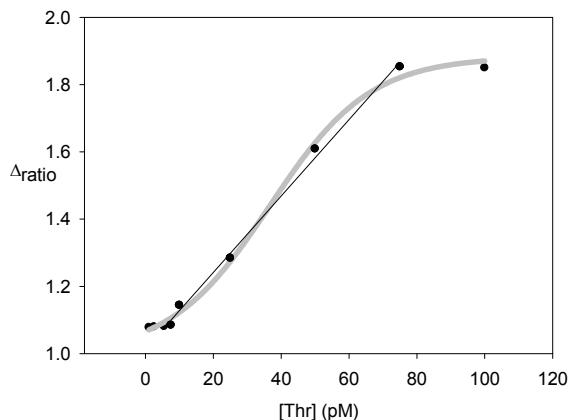


Figura 17.Curva de calibrado de la concentración de trombina respecto a Δ_{ratio} y recta de regresión.

La recta muestra que hay una buena relación lineal (coeficiente de correlación $r^2 = 0.9981$) entre la señal analítica (Δ_{ratio}) y la concentración de trombina en el rango de 7.5 a 75 pM, de acuerdo con la ecuación:

$$\Delta_{\text{ratio}} = 1.013 + 1.106 \cdot 10^{10} [\text{Thr}]$$

El EC₅₀ se estimó en 44 pM y el límite de detección, calculado como tres veces la desviación estándar de la regresión lineal, fue de 5 pM. Éste es un valor favorable para detectar trombina, ya que es exactamente éste el nivel de concentración en el que interviene cuando se forman trombos, lo que puede dar lugar a diferentes enfermedades cardiovasculares. La reproducibilidad del método muestra una desviación estándar relativa (RSD) de 7.2%, obtenida para series de 5 experimentos para una concentración de Thr de 75 pM.

4.3.4. Especificidad del aptasensor

La trombina se encuentra presente en suero sanguíneo junto con hormonas, lípidos,...y otras proteínas²⁸. Para evaluar la especificidad del sistema, se evaluó la respuesta con proteínas típicamente presentes en suero. En el primer caso, se utilizó como proteína albúmina (BSA), que se encuentra en el suero en una proporción de más del 60% del total de proteínas presentes. Normalmente en suero se encuentra en un intervalo de 35 a 50 g/l⁴⁷. Para realizar la prueba se utilizó la concentración más alta, 50 g/l. En la figura 18, podemos observar que cuando se incubó con esta proteína, la resistencia interfacial electrónica no aumentaba, en este caso se observaba una ligera disminución. Al incubar nuevamente con trombina se observó como la resistencia si

aumentaba. Por lo tanto, podemos decir que la albúmina no fue reconocida por parte del AptThr, y por lo tanto no interfiere en el sistema aptámero-trombina. En el segundo caso, se utilizó como proteína fibrinógeno.

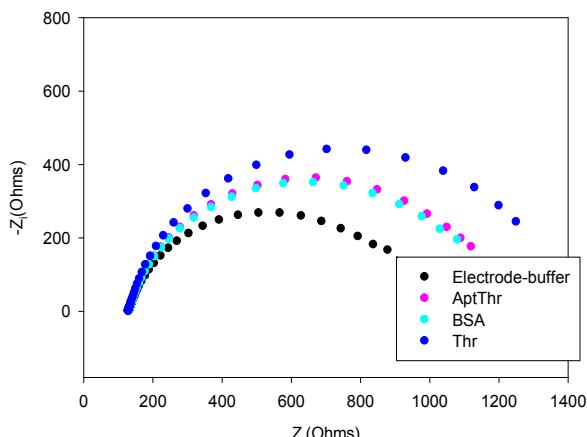


Figura 18. Respuesta del aptasensor a la BSA.

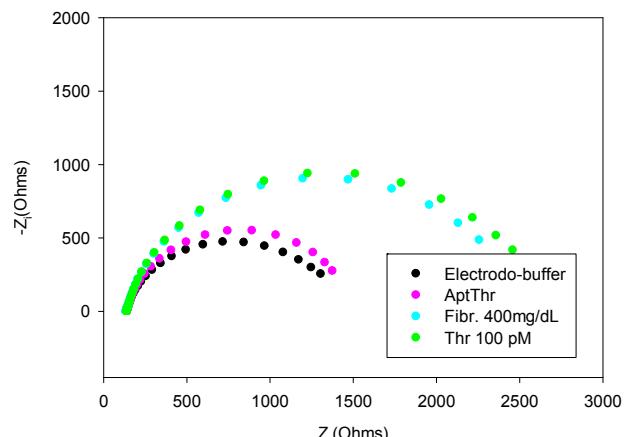


Figura 19. Respuesta del aptasensor al Fibrinógeno.

El fibrinógeno es una proteína fibrilar que participa en el proceso de coagulación sanguíneo. Por acción de la trombina, se degrada en fibrina y da lugar a la formación de coágulos²⁹. Esta proteína está presente en suero humano en un intervalo de concentración de 200 a 400 mg/dL⁴⁸. En la figura 19, podemos observar como la resistencia interfacial electrónica aumentó, como consecuencia de algún tipo de reconocimiento por parte del AptThr, por lo tanto, existe por parte de esta proteína interferencia. En el último caso, se utilizó inmunoglobulina G (IgG). La IgG es una proteína globular que se sintetiza como respuesta a la invasión del organismo por parte de bacterias, virus y hongos. Se encuentra presente en suero humano en un intervalo de concentración de 950 mg/dL a 1550 mg/dL de suero, siendo un valor normal el de 1250 mg/dL⁴⁹. Como podemos observar en la figura 20, existe por parte de IgG interferencia respecto a la trombina, ya que aumentó la resistencia R_{ct} . El motivo de este aumento, así como en el del caso del fibrinógeno, puede ser debido a algún proceso biológico que se escapa de nuestro conocimiento. En estos dos últimos casos, al añadir trombina al sistema, la resistencia interfacial entre el electrodo y la superficie también aumentaba, esto pudo ser debido a que se pudo producir algún fenómeno de desplazamiento parcial entre la trombina y las proteínas interferentes.

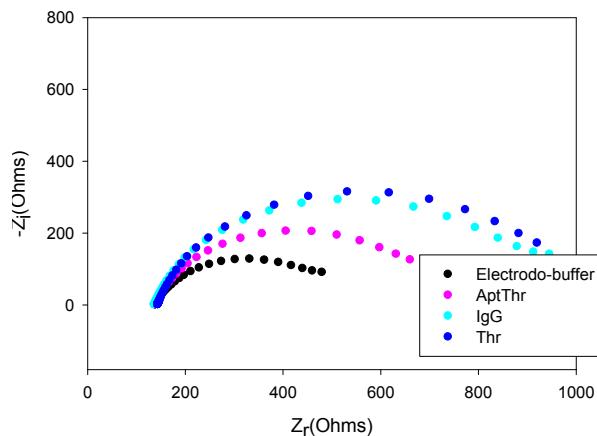


Figura 20. Respuesta del aptasensor a la IgG y posteriormente la adición de Thr

4.3.5. Sensibilidad del aptasensor

Para poder evaluar la sensibilidad del aptasensor se compararon los calibrados de Fbr, IgG y Thr, figura 21. En la tabla 2, podemos observar las ecuaciones de las rectas de calibrado de cada proteína y de la trombina, así como sus respectivas pendientes y límites de detección.

El aptasensor muestra la mayor sensibilidad para su molécula diana, la trombina, 6 órdenes de magnitud mayor que la pendiente para IgG y 5 órdenes de magnitud más que para Fbr, tal como se aprecia en la figura 21. Por lo tanto, podemos decir que el aptasensor muestra una alta sensibilidad a Thr respecto a las proteínas potencialmente interferentes.

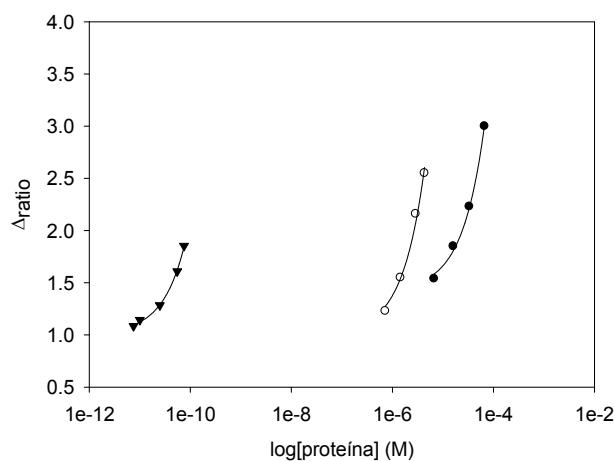


Figura 21. Respuesta a las proteínas evaluadas: ● IgG, ○ Fbr y ▼ Thr.

Tabla 2. Rectas de regresión y pendientes de las curvas de calibrado de diferentes proteínas.

Proteína	Recta Regresión	Sensibilidad (M^{-1})	Límite de detección	conc. Típica en suero
Thr	$\Delta_{ratio} = 1.013 + 1.106 \cdot 10^{10} [Thr]$	$1.106 \cdot 10^{10}$	5 pM	0
Fbr	$\Delta_{ratio} = 1.007 + 3.698 \cdot 10^5 [Fbr]$	$3.698 \cdot 10^5$	2 μM	6-12 μM
IgG	$\Delta_{ratio} = 1.424 + 2.385 \cdot 10^4 [IgG]$	$2.385 \cdot 10^4$	10 μM	60-100 μM
Albumina	sin respuesta	-	-	0.52-0.75 mM

4.3.6. Regeneración del aptasensor

El complejo AptThr-Thr, formado por interacciones débiles, se disocia al añadir medio salino, aumentar la temperatura y agitar, lo que permite la regeneración del biosensor. En la figura 22 se pueden apreciar tres ciclos de sensado, intercalados por una medida de blanco. Al añadir trombina al medio aumenta la R_{ct} gracias a la formación del complejo AptThr-Thr. Posteriormente al añadir medio salino, aumentar la temperatura y agitar, se disocia el complejo y disminuye esta resistencia hasta el valor correspondiente de $R_{ct(AptThr)}$, y así sucesivamente. Se calcularon los valores de Δ_{ratio} de cada paso del proceso y se representaron en el diagrama de barras de la figura 23.

En la figura 23, podemos observar el mismo fenómeno anterior: la Δ_{ratio} aumentó cuando se incubó el electrodo con Thr y disminuyó cuando se regeneró el sensor. En la tercera incubación con Thr, Δ_{ratio} aumentó más que en las otras incubaciones, esto fue debido a que se incubó con una concentración superior. Este tipo de regeneración puede ser una alternativa a la regeneración por pulido, y presenta la ventaja que se regenera la superficie del electrodo sin perder la inmovilización del aptámero en la superficie de éste.

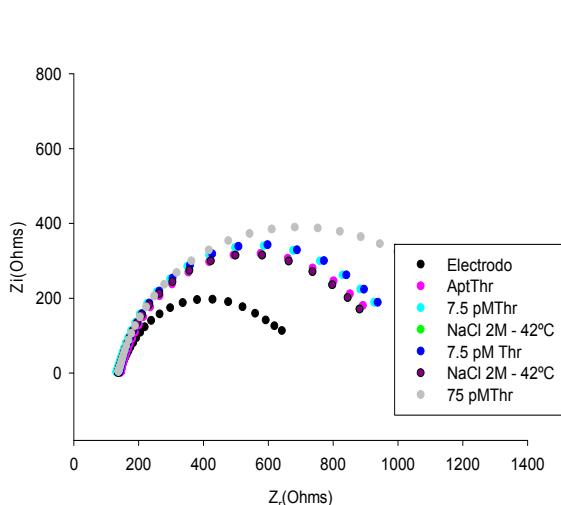


Figura 22. Diagrama de Nyquist del proceso de regeneración.

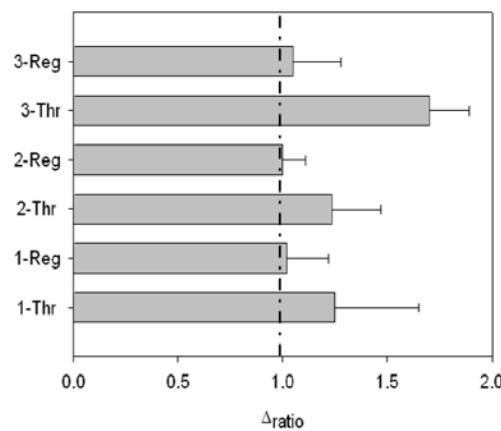


Figura 23. Señales obtenidas para los tres procesos de regeneración. [Thr] utilizada: 7.5 pM (1 y 2), y 75 pM (3).

4.4. Aptasensor basado en inmovilización por enlace covalente

Con el objetivo de utilizar una técnica de inmovilización considerada más eficiente y elegante que la anterior, se propuso desarrollar un aptasensor basado en inmovilización del aptámero en la superficie del electrodo mediante enlace covalente de la reacción EDAC-NHS. Para realizar esta inmovilización, previamente la superficie del electrodo fue activada electroquímicamente con el objeto de generar grupos carboxilos superficiales. En la figura 24, se muestran las diferentes etapas que comprenden el procedimiento experimental.

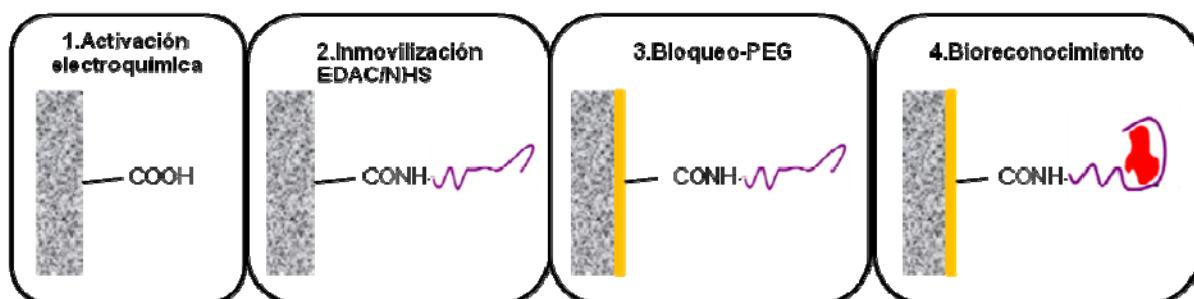


Figura 24. Esquema del proceso experimental del aptasensor basado en inmovilización por enlace covalente.

4.4.1. Activación electroquímica

La superficie del electrodo se activó electroquímicamente con el objetivo de oxidar el carbono grafito del composite a carboxilo, para posteriormente, mediante la reacción EDAC-NHS inmovilizar el aptámero en la superficie del electrodo. Se aplicó un potencial fijo de 0.8V durante 5 horas en ácido perclórico 1M⁴⁰. El carbono grafito, posee una estructura hexagonal y es muy poco reactivo, al aplicar un potencial de oxidación en condiciones controladas como en este caso, se crean puntos de reactividad en los extremos del hexágono, estos puntos son más activos electroquímicamente, por lo que la resistencia interfacial electrónica disminuye. Este fenómeno fue observado y se puede apreciar en la figura 25.

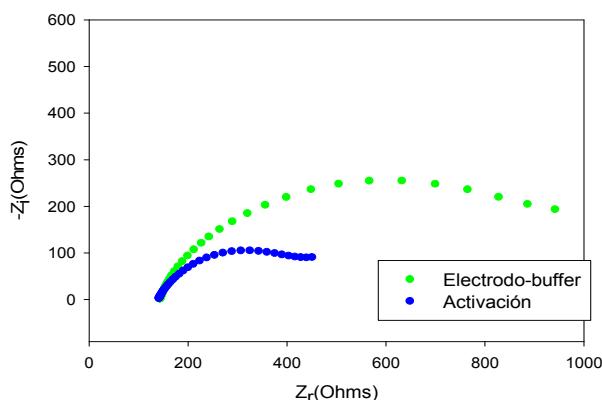


Figura 25. Espectro de Impedancia antes y después del proceso de activación electroquímica de la superficie del electrodo.

4.4.2. Inmovilización por enlace covalente mediante la reacción EDAC-NHS.

Este tipo de inmovilización se basa en la formación de un enlace covalente entre el aptámero de trombina modificado con un grupo amino y la superficie del electrodo. El reactivo que ayuda en la reacción de formación de la amida entre el grupo carboxilo de la superficie del electrodo y el grupo amino terminal del aptámero modificado, es la carbodiimida, el compuesto EDAC⁵⁰. Como en esta reacción se obtienen rendimientos bajos, se agrega NHS a la reacción para asistir a la carbodiimida en su función, obteniéndose así mayores rendimientos⁵¹. La reacción de formación del enlace amida entre el grupo amino terminal del aptámero y el grupo carboxilo de la superficie del electrodo se muestra en la figura 26.

Como se observa en la figura, el reactivo EDAC con el grupo carboxilo de la superficie del electrodo forma un intermedio inestable, derivado de la urea. Este intermedio es susceptible de hidrolizarse.

La adición del éster sulfo-NHS estabiliza el intermedio aumentando así la eficiencia de la reacción entre el grupo amino terminal y el intermedio⁴⁶.

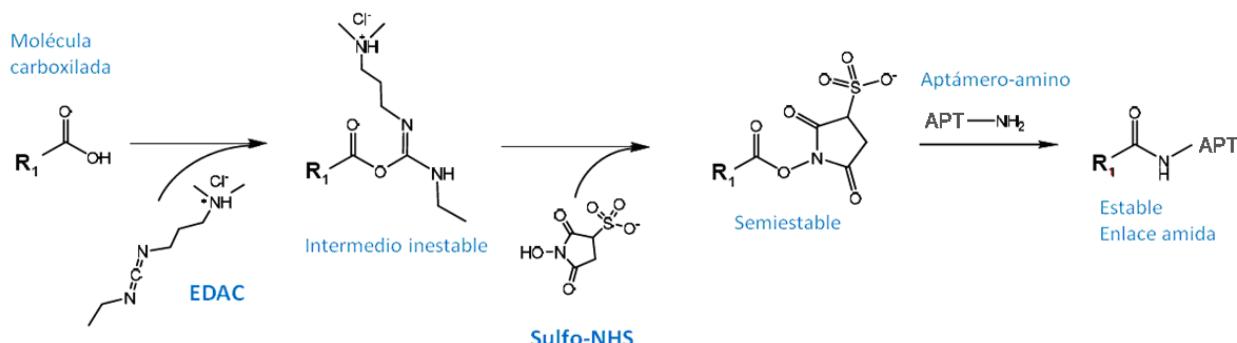


Figura 26. Mecanismo de reacción entre los reactivos EDAC-NHS y el grupo amino del aptámero.

4.4.3. Detección de trombina

Para cuantificar la concentración de trombina, como en el caso anterior de inmovilización por adsorción física, se realizó una curva de calibrado de dicha proteína, figura 27. Como ocurría en el caso anterior, al aumentar la concentración de trombina, aumentaba la resistencia interfacial entre la solución y el electrodo, debido a la formación del complejo AptThr-Thr. Por lo tanto, podemos decir que existe una relación proporcional entre el AptThr y la concentración de Thr, hasta llegar al punto de saturación que corresponde alrededor de 100 pM. En la figura 27, se puede observar la recta de regresión calculada a partir del calibrado.

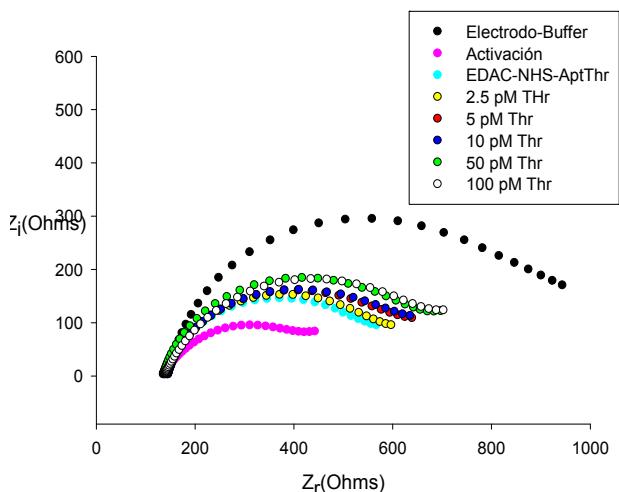


Figura 27. Diagrama de Nyquist de la calibración de trombina.

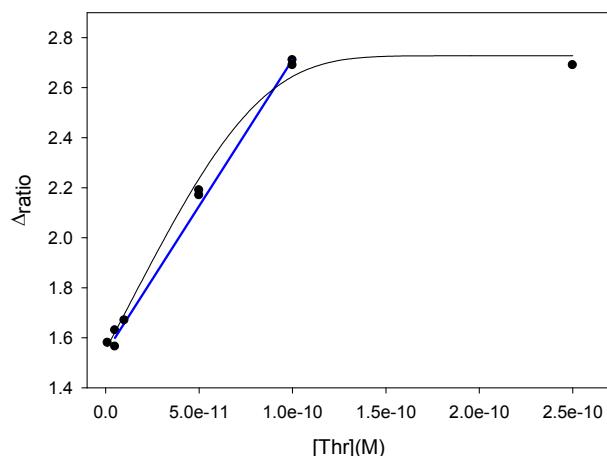


Figura 28. Curva de calibrado y recta regresión Δ_{ratio} respecto la concentración de trombina.

La recta representada en la figura 28 muestra que hay una buena relación lineal (coeficiente de correlación $r^2 = 0.9922$) entre la concentración de trombina y el valor de señal analítica relativa (Δ_{ratio}) en el rango de 2.5 pM a 100 pM, de acuerdo con la ecuación:

$$\Delta_{\text{ratio}} = 1.512 + 1.208 \cdot 10^{10} [\text{Thr}]$$

Como en el caso anterior, el límite de detección fue calculado como tres veces la desviación estándar obtenida en la regresión lineal, y fue de 1.5 pM, la EC₅₀ se estimó en 50 pM. La reproducibilidad del método muestra una desviación estándar relativa (RSD) de 8.3 %, obtenida para series de 3 experimentos para una concentración de 50 pM de Thr.

4.5. Comparación de las diferentes técnicas de inmovilización

En la tabla 3 se pueden comparar las rectas de regresión obtenidas para cada técnica de inmovilización. Los aptasensores construidos basados en las dos técnicas de inmovilización presentan unos valores de reproducibilidad y sensibilidad similares. En cuanto al rango lineal y el límite de detección con la técnica por enlace covalente se obtuvieron mejores resultados. El rango lineal de concentración de Thr es más amplio, de 2.5 a 100 pM y el límite de detección más bajo, 1.5 pM. En este sistema en el que utilizamos un electrodo de composite, grafito-epoxi, como electrodo de trabajo, la inmovilización por enlace covalente mostró mejores prestaciones, aunque cabe destacar que el aptasensor basado en enlace covalente no fue optimizado mientras que el basado en adsorción física sí. En trabajos posteriores se optimizarán todas las condiciones experimentales de este último aptasensor para poder comparar con mayor criterio estas dos técnicas de inmovilización. Además, posteriormente, se intentarán eliminar los problemas de interferencia mediante el uso de una lengua electrónica basada en una matriz de biosensores para poder cuantificar niveles de trombina en muestras reales.

Tabla 3. Rectas de regresión lineal obtenidas para cada técnica de inmovilización.

Inmovilización	Regresión lineal	Sensibilidad (M^{-1})	Rango lineal	Límite de detección	RSD %
A.Física	$\Delta_{ratio} = 1.013 + 1.106 \cdot 10^{10} [Thr]$	$1.106 \cdot 10^{10}$	7.5 - 75 pM	5 pM	7.2
E. Covalente	$\Delta_{ratio} = 1.512 + 1.206 \cdot 10^{10} [Thr]$	$1.206 \cdot 10^{10}$	2.5 - 100 pM	1.5 pM	8.3

5. CONCLUSIONES

De forma específica se pueden resaltar las siguientes conclusiones:

1. Se han construido transductores electroquímicos grafito-epoxi, y se ha estudiado la reproducibilidad en cuanto a construcción y pulido, dando mejor valor en pulido, 5.59 % RSD, como era de esperar.
2. El aptasensor desarrollado basado tanto por inmovilización covalente como inmovilización por adsorción física, ha mostrado tener una buena reproducibilidad y sensibilidad. En cuanto a especificidad, se han obtenido datos de interferencia de fibrinógeno e inmunoglobulina G. Este problema se estudiará en trabajos posteriores mediante el uso de una lengua electrónica basada en una matriz de biosensores.
3. Se ha demostrado que las técnicas utilizadas para inmovilizar el aptámero sobre la superficie del electrodo son idóneas para la construcción de aptasensores impedimétricos.
4. La Espectroscopia Electroquímica de Impedancia ha demostrado ser una técnica muy sensible para monitorizar tanto la inmovilización del aptámero como la formación del complejo AptThr-Thr sobre la superficie del electrodo, logrando en todos los casos una buena reproducibilidad de los resultados sin marcaje.
5. La regeneración del aptasensor basado en adsorción física mediante medio salino ha demostrado ser una alternativa a la regeneración por pulido de la superficie del electrodo.
6. Cabe destacar que se ha desarrollado el primer aptasensor en nuestro grupo de investigación, Grup de Sensors i Biosensors. Las dos técnicas de inmovilización utilizadas mostraron valores de sensibilidad y de reproducibilidad similares. En cuanto a límite de detección y rango lineal se obtuvieron mejores resultados con la técnica por enlace covalente, 1.5pM y 2.5 a 100pM respectivamente, aunque el aptasensor basado en enlace covalente no ha sido optimizado. En estudios en curso se están optimizando las condiciones experimentales de este aptasensor para poder comparar con mayor criterio.

REFERENCIAS

- [1] J.R. Stetter; W. R. Penrose; S. Yao, *J. Electrochem. Soc.*, 2003, 150, S11-S16.
- [2] D.R.Thévenot; K. Toth; R.A. Durst; G.S. Wilson, *Biosen. Bioelec.*, 2001, 16, 121-131.
- [3] M. De La Guardia, *Mikrochim. Acta*, 1995, 120, 243-255.
- [4] E.T.Powne; F. Yalcinkaya. *Sensor Review*, 1997, 17, 107-116.
- [5] S.Alegret. *Els sensors químics*. Arxius de les Seccions de Ciència, Institut d'Estudis Catalans 1995, 100, 385-397.
- [6] J.E. Pearson; A. Gill; P. Vadgama, *Ann .Clin. Biochem.*, 2000, 37, 119-145.
- [7] M.P.Byfield; R.A. Abuknesha, *Biosens. Bioelectron.*, 1994, 9, 373-400.
- [8] J.R. MacDonald, *Impedance Spectroscopy*, Wiley, New York, 1987.
- [9] A.J. Bard; L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, Wiley, New York, 1980.
- [10] A.W. Bott, *Current Separations*, 1992, 11, 61-65.
- [11] F. Blin; P. Koutsoukos; P. Klepetsians; M. Forsyth, *Electrochimica Acta*, 2007, 52, 6212-6220
- [12] Y.M.Liao; Z.D.Feng Chen, *Journal of Dentistry*, 2007, 35, 425-430.
- [13] M.Nobial; O. Devos; O.R. Mattos; B. Tribollet, *J. Electroanal. Chem.*, 2007, 600, 87-98.
- [14] O. Azizi; M. Jafarian; F. Global; H. Heli; M. G. Mahjani, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2007, 32, 1755-1761.
- [15] B.Pejcic; R. De Marco, *Electrochim. Acta*, 2006, 51, 6217-6229.
- [16] D. Calvo; J. Bartroli; M. del Valle, *Electrochim. Acta*, 2006, 51, 1569-1575.
- [17] Y. Xiao; C. M. Li; Y.Liu, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 3224-3229.
- [18] A. Bonanni; M. del Valle, *Anal. Chim. Acta*, 2010, 678, 7-17.
- [19] S. Zhang; G. Wright; Y. Yang, *Biosens. Bioelectron.*, 2000, 15, 273-282.
- [20] F. Céspedes; E. Martínez Fábregas; S. Alegret, *Trends Anal. Chem.*, 1996, 15, 296-304.
- [21] D.E. Tallman; S. L. Peterson, *Electroanalysis*, 1990, 2, 499-510.

- [22] T.Vo-Dinh; B. Cullum; Fresenius, *Anal. Chem.*, 2000, 366, 540-551.
- [23] J.E. Frew; H. A. O. Hill, *Anal. Chem.*, 1987, 59, 933A - 944A.
- [24] S. Alegret; J. Alonso; J. Bartroli; F. Cespedes; E. Martinez-Fabregas; M. del Valle, *Sens. Mat.*, 1996, 8, 147-153.
- [25] B. Soontornworajit; M.P. Snipes; Y. Wang; J. Zhou; M. R. Battig, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 2471-2480.
- [26] A-E. Radi; J. Lluís Acero Sánchez; E. Baldrich; C. K. O'Sullivan, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 6320-6323.
- [27] X. Yang; N. Li; D. G. Gorenstein, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2011, 6, 77-90.
- [28] W. H. Seegers, *Sem. Thrombosis Hemostasis*, 1986, 12, 181-183.
- [29] B .A. Houssay, *Fisiología Humana*, 2000, Ed. El Ateneo.
- [30] M.T. Stubbs; W. Bode, *Thrombosis Res.*, 1993, 69, 1-58.
- [31] M. Yang; M.E. McGovern; M. Thompson, *Anal. Chim. Acta.*, 1997, 346, 259-275.
- [32] S. R. Mikkelsen, *Electroanalysis*, 1996, 8, 15-19.
- [33] K. M. Millan; A. Sarauña; S. R. Mikkelsen, *Anal. Chem.*, 1994, 66, 2943-2948.
- [34] K.M. Millan; A. J. Spurmanis; S. R. Mikkelsen, *Electroanalysis*, 1992, 4, 929-932.
- [35] S. S. Ghosh; G. F. Musso, *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15, 5353-5372.
- [36] X. Sun; P. He; S. Lin; J. Yo; Y. Fang, *Talanta*, 1998, 47, 487-495.
- [37] V. Lund; R. Schmid; D. Rickwood; E. Hornes, *Nucleic Acids Res.*, 1998, 22, 10861-10880.
- [38] D. Seghal; I. K. Vijay, *Anal. Biochem.*, 1994, 218, 87-91.
- [39] A. Previero; J. Derancourt; M. A. Coletti, *FEBS Letter*, 1973, 33, 135-138.
- [40] S. Yamazaki; Z. Siroma; T. Loroi; K. Tanimoto; K. Yasuda, *Anal. Chem.*, 2007, 256-262.
- [41] D.M. Anjo; M. Kahr; M.M. Khodabakhsh; S. Nowinski; M. Wanger, *Anal. Chem.*, 1989, 61, 2603-2608.
- [42] Y. Lin; F. Lu; Y. Tu; Z. Ren, *Nano Lett.*, 2004, 4, 191-195.
- [44] S. Tombelli; M. Minunni; M. Mascini, *Biosens. Bioelec.*, 2009, 20, 2424-2434.

- [44] K.A Davis, *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24, 702-706.
- [45] K. Ikebukuro; C. Kiyohara; K. Sode, *Biosens. Bioelec.*, 2005, 2168–2172.
- [46] T. Mairal; V.C Özalp; P. Lozano-Sánchez; M. Mir; I. Katakis; C. K. O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 390, 989-1007.
- [47] F. Tamion, *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 2010, 29, 629-634.
- [48] C.A. Paterno,CETIFAC *Bioingeniería*, 2008, 1994-2000.
- [49] D.R.Davies; S. Chacko, *Acc. Chem. Res.*, 1993, 26, 421-427.
- [50] D. Sehgal; I.K. Vijay, *Anal. Biochem.*, 1994, 218, 87-91.
- [51] M.C. Desai; L.M. Stephens Stramiello, *Tetrahedron Lett.*, 1997, 33, 135-138.