



Universidad de Oviedo

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

# **Caracterización de aptámeros contra componentes de la matriz extracelular tumoral**

**María del Carmen Santos Ciudad**

**julio 2022**

## Índice

Abstract .....	1
Lista de abreviaturas.....	2
1. Introducción .....	3
1.1. La matriz extracelular asociada al cáncer.....	3
1.2. El colágeno .....	4
1.3. Métodos analíticos para la detección de colágeno.....	6
1.4. Aptámeros como elemento de reconocimiento molecular .....	8
1.5. Medida electroquímica .....	11
1.5.1. Cronoamperometría.....	11
1.5.2. Electrodo serigrafiados .....	12
2. Objetivos .....	14
3. Experimental .....	15
3.1. Reactivos .....	15
3.2. Instrumentación .....	16
3.3. Procedimientos experimentales .....	17
3.3.1. Modificación de partículas magnéticas con los péptidos.....	17
3.3.2. Obtención de la curva de enlace.....	18
3.3.3. Ensayo competitivo .....	18
3.3.4. Detección cronoamperométrica.....	19
4. Resultados y discusión.....	20
4.1. Selección de los aptámeros.....	20
4.2. Caracterización de aptámeros .....	22
4.3. Ensayos competitivos .....	27
5. Conclusiones y perspectivas futuras .....	33
Bibliografía.....	34
Anexo: Datos correspondientes a las figuras presentadas.....	39

## Abstract

Fragments of the  $\alpha 1$  chain of collagen XI have been found to be secreted into the extracellular matrix in response to disease processes, particularly metastatic stages of some types of cancer. Therefore, studies have been conducted to detect collagen XI and its use as a tumour biomarker. Until now, most assays have used antibodies as recognition molecules for these collagen fragments, but more and more studies are using aptamers as synthetic receptors due to their greater stability and their reproducibility and low production cost.

In the present work, we have selected six aptamers that in previous assays have shown affinity for a 16-nucleotide peptide belonging to collagen XI, demonstrating that the region that usually binds these aptamers is the one corresponding to the 10 nucleotides at the N-terminus. Therefore, herein the characterization assays were carried out with the 10mer peptide, using the six aptamers chosen based on the stability of their secondary structure and the presence of recurrent motifs. The binding curves show that the B4T aptamer presents the highest affinity for the peptide, obtaining a value of  $K_D$  15 nM and it was used in different types of competitive assays.

The competitive assay performed with MPs - 10mer and increasing concentrations of 10mer in solution, allows the detection of the peptide from 6.3 nM to 1000 nM with a LOD of 4.8 nM and an RSD range of 16.5 to 24%. However, when MPs – 16mer were used, the analytical useful interval is unexpectedly shifted to larger peptides concentrations, suggesting higher affinity for the 16mer peptide. Therefore, more assays should be performed to elucidate this aspect and to test the feasibility of detecting the intact collagen from biological samples.

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>Ab</b>	Anticuerpo
<b>CE</b>	Contraelectrodo
<b>COL11A1</b>	Gen que codifica la cadena $\alpha 1$ del colágeno XI
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicano
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>LC-MS</b>	Cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>mAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
<b>MPs</b>	Partículas magnéticas
<b>pAb</b>	Anticuerpo policlonal
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDAC</b>	Adenocarcinoma ductal pancreático
<b>RE</b>	Electrodo de referencia
<b>SELEX</b>	Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial
<b>SPCE</b>	Electrodo serigrafiado de carbono
<b>SPE</b>	Electrodo serigrafiado
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
<b>WE</b>	Electrodo de trabajo

# 1. Introducción

## 1.1. La matriz extracelular asociada al cáncer

La matriz extracelular (MEC) está formada por proteínas entrecruzadas que proporcionan soporte estructural a los órganos y tejidos y anclaje a las células. Además, presenta una remodelación controlada y continua <sup>1</sup>. Las proteínas que constituyen la MEC intervienen en procesos importantes de diferenciación, proliferación, supervivencia y migración celular. Por lo tanto, la MEC además de proporcionar señales biofísicas de deformabilidad o rigidez, también proporciona señales bioquímicas que regulan el comportamiento celular <sup>2</sup>.

Existen dos tipos de MEC en los mamíferos que se diferencian en la composición y en el lugar donde están ubicadas. La primera es la matriz de tejido conjuntivo intersticial que se encuentra alrededor de las células y estructura los tejidos y, por otro lado, la membrana basal, que se trata de una forma especializada de MEC que separa el epitelio del estroma <sup>3</sup>.

Entre los principales componentes de la MEC caben destacar tres grupos de proteínas principales con diferentes funciones:

- *Los colágenos*: son las principales proteínas estructurales que componen la MEC y se clasifican en formas fibrilares, que comprenden los colágenos I, II, III, V y XI, y formas no fibrilares. Los colágenos que forman fibras proporcionan resistencia a la tracción de la MEC y limitan la tensión de los tejidos <sup>3</sup>.
- *Los proteoglicanos*: son proteínas que constan de cadenas laterales de glicosaminoglicano (GAG) unidas que se intercalan entre las fibrillas de colágeno. Estas uniones confieren a los proteoglicanos propiedades de hidratación, ya que su conformación extendida les permite captar el agua y cationes divalentes como Ca(II) <sup>4</sup>.
- *Las glicoproteínas* (lamininas, elastinas, fibronectinas, tenascinas, trombospondinas): se trata de proteínas unidas a uno o varios glúcidos, presentan varias funciones, entre las más importantes se encuentran el ensamblaje de la MEC, actúan como ligandos de los receptores de la superficie celular mediando en la interacción célula – matriz, también funcionan como reservorio de factores de crecimiento <sup>4</sup>.

Existen otras proteínas asociadas a la MEC que no forman parte del matrisoma, fracción de proteínas reguladoras, pero que son importantes en la remodelación de la MEC. Se trata de factores de crecimiento, citocinas, mucinas, lectinas de tipo C secretadas y enzimas modificadoras de la MEC que intervienen en el entrecruzamiento <sup>4</sup>.

El estudio de la MEC es importante para comprender el desarrollo celular normal, pero también se ha descubierto que la remodelación desregulada de la MEC está asociada con condiciones patológicas y puede aumentar el desarrollo de la enfermedad <sup>1</sup>. Hay estudios que demuestran que los depósitos anormales de MEC y la rigidez son característicos de la fibrosis y el cáncer y que la degradación excesiva de la MEC está relacionada con la osteoartritis <sup>3</sup>.

En los últimos años se ha descubierto la contribución de la MEC en la progresión tumoral, debido a modificaciones en la estructura de la matriz y en las propiedades biofísicas. Además, un depósito excesivo de MEC, conocido como desmoplasia, es característico de tumores con mal pronóstico <sup>1</sup>. El colágeno es una de las principales proteínas que constituyen la MEC que se altera y sobre-expresa durante la progresión del tumor acumulándose en el estroma <sup>5</sup>. Por ello el estudio del contenido de colágeno en la MEC puede ser crucial como posible indicador de algunos tipos de cáncer que se caracterizan por el desarrollo de la desmoplasia, así como organización irregular y presencia de modificaciones postraduccionales, como es el caso del adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) <sup>6</sup>.

## 1.2. El colágeno

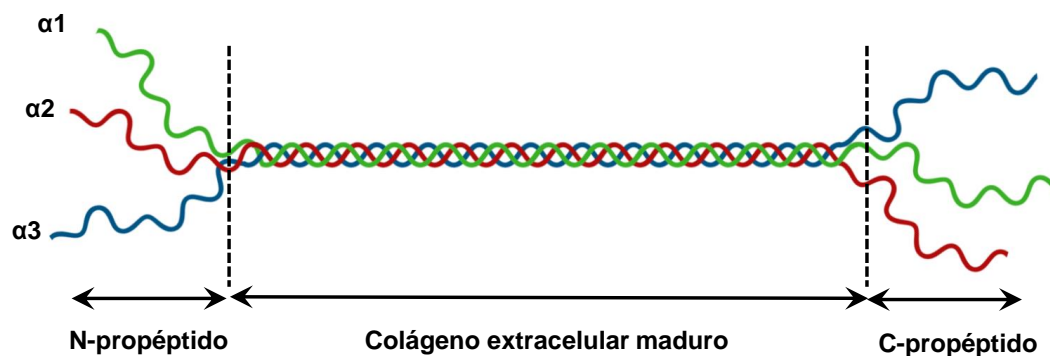
Los colágenos son las proteínas más abundantes en los mamíferos. Hay 28 tipos atendiendo a la existencia de diferentes isoformas moleculares y estructuras. La característica estructural común de todos los colágenos es que constan de un dominio de triple hélice con secuencias repetidas formadas por Gly-XY, siendo X e Y frecuentemente prolina y 4-hidroxiprolina, respectivamente <sup>7</sup>.

La familia del colágeno se divide en tres grupos: colágenos fibrilares, que son los más abundantes de esta familia y forman fibrillas ordenadas dentro de la MEC; colágenos que no forman fibrillas, incluyen al colágeno tipo IV que se encuentra en la membrana basal, no forman ni se asocian a fibrillas; y colágenos asociados a fibrillas, que contienen triples hélices interrumpidas, se asocian y ayudan a la regulación de los colágenos fibrilares <sup>8</sup>.

En el presente trabajo nos centraremos en el colágeno XI el cual se ve implicado en diversos procesos relacionados con enfermedades humanas y, más recientemente, se ha relacionado con procesos de transformación neoplásica dando lugar al cáncer.

El colágeno XI es un tipo de colágeno fibrilar que está formado por tres subunidades o cadenas polipeptídicas designadas como  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  codificados por diferentes cromosomas (figura1), expresándose como procolágenos, es decir, precursores del colágeno, que posteriormente se unen para producir trímeros maduros, en los que se han fortalecido los enlaces intermoleculares <sup>9</sup>. Las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  son genéticamente distintas a otros colágenos, mientras que la  $\alpha_3$  es una forma hiper-glucosilada de la cadena  $\alpha_1$  del colágeno II. El colágeno XI polimeriza con los colágenos II y IX, manteniendo el diámetro y función de las fibrillas del tejido conjuntivo. Además, la mutación o ausencia de la cadena  $\alpha$  da como resultado fibrillas de cartílago engrosadas. El gen que codifica la cadena  $\alpha_1$  del colágeno XI (COL11A1) puede presentar mutaciones que se ven envueltas en multitud de enfermedades <sup>8</sup>.

La sobreexpresión del COL11A1 es un importante marcador del cambio neoplásico como de la progresión del cáncer. Se han desarrollado técnicas computacionales para identificar genes comunes en algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, colon o pulmón, entre los que se encuentra el gen COL11A1 en etapas avanzadas de la enfermedad asociadas a metástasis <sup>10</sup>.



**Figura 1:** Estructura del colágeno XI donde se diferencian las regiones que presenta y las cadenas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ . Imagen adaptada de <sup>11</sup>.

### 1.3. Métodos analíticos para la detección de colágeno

Los colágenos o fragmentos de éstos se han medido en diferentes fluidos biológicos, principalmente sangre y orina, como posibles biomarcadores de diagnóstico del cáncer o incluso para conocer el pronóstico y realizar un seguimiento del tratamiento recibido por el paciente. El hecho de que se mida en fluidos biológicos es debido al dinamismo de la MEC que está en constante remodelación. Estos fluidos se consideran de desecho y pueden indicar una actividad anómala de remodelación que suele asociarse al cáncer. La mayoría de los ensayos realizados hasta ahora se basan en anticuerpos monoclonales (mAb) o policlonales (pAb) que reconocen la región repetida del colágeno, pero no reconocen el colágeno desnaturalizado. La detección de epítomos, región de la molécula reconocida por el sistema inmunitario, tras la degradación se ha conseguido mediante el aislamiento y caracterización de mAb por inmunización sustractiva <sup>12</sup>, técnica empleada para producir mAbs específicos para antígenos que están presentes en baja proporción en una mezcla de proteínas o similares en secuencia y estructura a otras proteínas <sup>13</sup>.

Los primeros ensayos de reconocimiento de los fragmentos de colágeno fueron ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), como el desarrollado para la detección en suero de pacientes con melanoma de un epítipo específico (HU177) del colágeno IV. Éste consiste en un ensayo ELISA tipo sándwich en el que se emplea un mAb como receptor de captura, un Ab anti-colágeno IV biotinilado como receptor secundario y un conjugado mAb antibiotina con HRP. La reacción enzimática da lugar a un producto coloreado detectable mediante espectroscopía UV-Visible medida a 400 nm <sup>14</sup>. Otros ensayos ELISA tipo sándwich se emplearon para la detección de matriquinas, fragmentos generados por la escisión proteolítica de los colágenos, que regulan la actividad celular <sup>12</sup>. Algunos tipos de matriquinas presentan función protectora contra el crecimiento tumoral como la endostatina del colágeno XVIII <sup>15</sup> y la tumstatina de colágeno IV <sup>16</sup>, compuestos importantes debido a su función antiangiogénica y antitumoral ya que previenen la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para el crecimiento del tumor <sup>12</sup>. Otro tipo de matriquinas presentan el efecto contrario, ya que se liberan a la circulación como respuesta a procesos de cáncer <sup>12</sup>.

En los años posteriores se desarrolló un ensayo ELISA competitivo que permitió medir los niveles del dominio NC1 del colágeno IV, conocido como tetrastatina, en fluidos humanos (suero, fluidos de aspiración bronquial, lavado broncoalveolar y extractos de tejido pulmonar) determinando que los niveles eran mayores en pacientes con cáncer de pulmón que en los controles sanos y concluyendo que este tipo de ensayos podría ser útil para el diagnóstico de



enfermedades relacionadas con la alteración del metabolismo de la membrana basal, como son los casos de progresión tumoral <sup>17</sup>.

Hay empresas también centradas en el desarrollo de nuevos bioensayos que puedan ser empleados para la detección de marcadores tumorales, como es el caso de la empresa *Nordic Bioscience* (Dinamarca) que ha desarrollado ensayos competitivos que emplean péptidos específicos de ciertos colágenos marcados con biotina para anclarlos a placas modificadas con estreptavidina. Los mAbs se obtienen *in vivo* para cada nuevo epítipo seleccionado a través de un proceso que requiere la escisión enzimática del colágeno, identificación de los fragmentos enlazados al Ab mediante LC-MS y selección de la secuencia <sup>18</sup>. Este tipo de ensayos se emplearon para la detección de fragmentos de proteína que están relacionados con la formación del colágeno III (PRO-C3), el colágeno III degradado con metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) y IV (C3M y C4M) detectados por espectrofotometría en muestras de suero de pacientes con melanoma metastásico empleando una terapia novedosa surgida para este tipo de cáncer. El colágeno IV degradado con granzima B, proteasa de serina, (C4G) se detectó mediante un ensayo de electroquimioluminiscencia competitivo. Debido a que PC3X se libera al torrente sanguíneo durante la formación excesiva de colágeno y el entrecruzamiento entre moléculas del péptido se realiza un ensayo tipo sándwich, en vez del habitual ensayo competitivo. <sup>19</sup>.

Otro potencial biomarcador no invasivo es el colágeno XI, desarrollándose ensayos ELISA dirigidos a sitios específicos de escisión enzimática (PRO-C11-253 y PRO-C11-511) en muestras de pacientes con PDAC, siendo el primer estudio hasta el momento llevado a cabo en esta línea de investigación <sup>20</sup>.

Como se ve, los ensayos desarrollados se han centrado en el empleo de anticuerpos para la detección de diferentes fragmentos de colágenos como biomarcadores de la progresión tumoral, pero las nuevas tendencias se dirigen al empleo de aptámeros como receptores de estas proteínas. Los aptámeros presentan mayor sensibilidad a las variaciones del medio, por lo que las expectativas se centran en desarrollar dispositivos de diagnóstico *in vivo* <sup>21</sup>. Presentan estructuras sencillas capaces de plegarse tridimensionalmente con facilidad de forma que su unión a la molécula diana es muy estable, se pueden obtener de forma muy reproducible por síntesis química y a bajo coste.

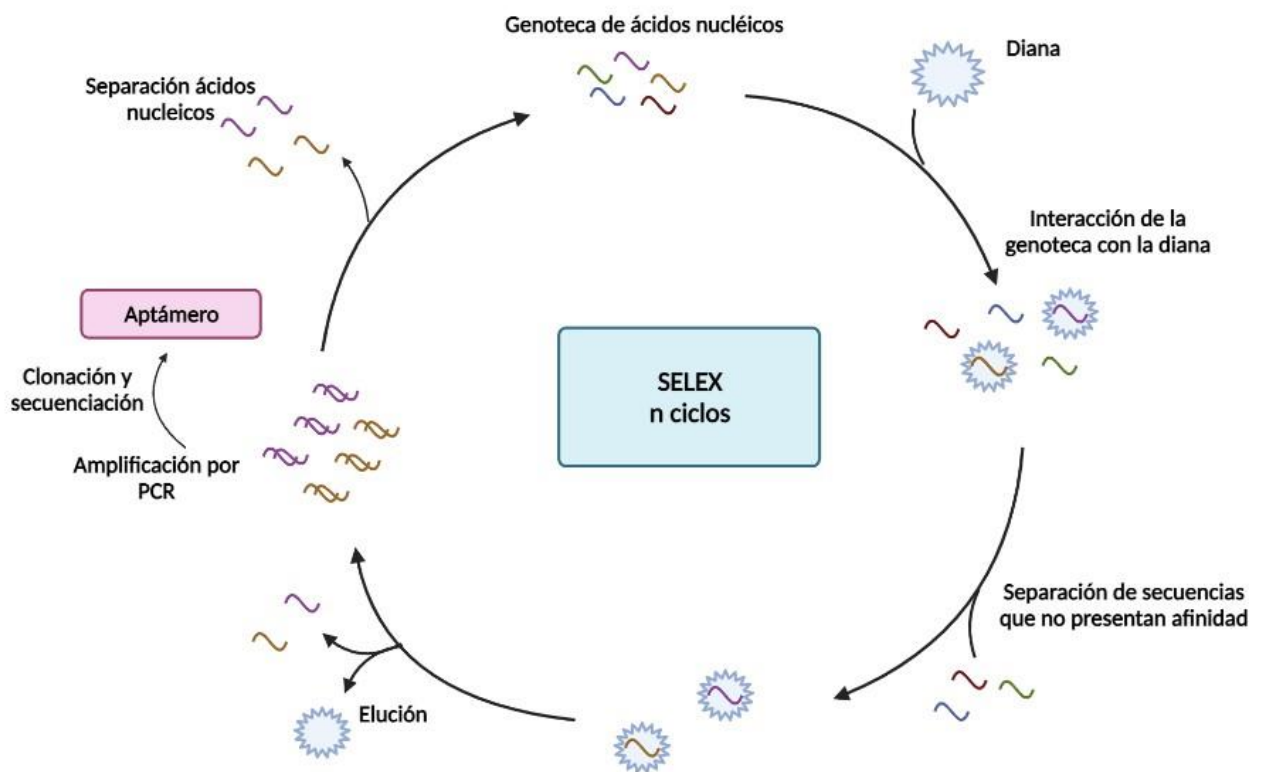
#### 1.4. Aptámeros como elemento de reconocimiento molecular

La palabra aptámero proviene del latín *aptus* que significa “encajar”<sup>22</sup> y del sufijo griego *mer* que significa “partícula”<sup>23</sup>, hace referencia a secuencias cortas de oligonucleótidos específicas de ADN o ARN que son capaces de unirse a moléculas diana distintas de los ácidos nucleicos con una alta afinidad y especificidad<sup>22</sup>. Los aptámeros son estables química y térmicamente, su desnaturalización es reversible y se pueden sintetizar de forma reproducible y barata.

El método de obtención de aptámeros conocido como evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX, *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) fue propuesto en 1990 con el fin de poder conocer las secuencias de unión preferidas a partir de secuencias aleatorias de ARN<sup>24,25</sup>.

El proceso SELEX (figura 2) tiene lugar inicialmente con una colección de ácidos nucleicos, conocida como genoteca, que contiene  $10^{14} - 10^{15}$  secuencias individuales distintas obtenidas por síntesis química aleatoria. Esta genoteca se incuba con la molécula diana de interés y se lleva a cabo la separación de las secuencias individuales que se unen a la diana mediante técnicas de separación teniendo en cuenta las propiedades tanto químicas como físicas del complejo formado entre diana – aptámero y el resto de los ácidos nucleicos libres. La separación se puede llevar a cabo mediante dos estrategias. Por un lado, separación homogénea en la que tanto la diana como la genoteca se encuentran en disolución, en cuyo caso la técnica de separación más empleada es la electroforesis capilar. Por otro lado, cuando la separación es heterogénea, es decir, la diana se encuentra inmovilizada sobre un soporte sólido, se suelen emplear partículas magnéticas debido a que permiten su separación fácilmente del sobrenadante al aplicar un campo magnético externo, ya que únicamente presentan magnetismo cuando se aplica este campo magnético. Una vez eliminadas las secuencias no unidas, se procede a la recuperación de las enlazadas mediante un proceso de elución donde se desnaturalizan los complejos formados diana – aptámero y se realiza la amplificación por PCR (*polymerase chain reaction*) para obtener una genoteca de secuencia afines a la diana que se empleará en los siguientes ciclos de selección/amplificación. De esta forma se obtienen ácidos nucleicos de doble hebra. Como sólo una de las hebras tiene afinidad por la molécula diana hay que separarla en una etapa de acondicionamiento antes de volverlas a incubar con ésta para comenzar un nuevo ciclo. En cada ciclo las condiciones de interacción y separación son cada vez más restrictivas para obtener secuencias de alta afinidad,

sabiendo que es necesario llevar a cabo de 8 a 15 ciclos para su obtención. Finalmente, los aptámeros potenciales se identifican mediante procesos de clonación y secuenciación <sup>26</sup>.



**Figura 2:** Esquema del proceso SELEX para la obtención de aptámeros.

Los aptámeros completos que forman la genoteca presentan una longitud de entre 80 a 100 nucleótidos, divididos en tres regiones funcionales. Los aptámeros están formados por una zona central aleatoria y dos regiones cortas y constantes en los extremos que actúa como zona de hibridación de los cebadores en la etapa de amplificación por PCR. Las regiones centrales aleatorias de los aptámeros suelen ser las que mayor interés presentan al ser la zona donde se espera que se una la diana. Si esto es así se puede truncar el aptámero para quedarnos con estas zonas centrales, eliminando los nucleótidos no esenciales lo que, además, puede aumentar la afinidad del aptámero por la diana <sup>27</sup>. Además, los aptámeros formados por un menor número de nucleótidos presentan mayor libertad para la formación de estructuras más pequeñas que puedan ser empleadas en dispositivos de biodetección con mayor sensibilidad y menor tamaño <sup>28</sup>.

Cada vez está más extendido el uso de los aptámeros en ensayos de diagnóstico clínico debido a sus características de receptores de alta afinidad y selectividad, ya que son capaces de distinguir

entre pequeñas diferencias moleculares, como diferencias en un grupo funcional <sup>29</sup>, e incluso pueden presentar enantioselectividad, lo que permite su uso como selectores quirales en estudios que emplean cromatografía de afinidad <sup>30</sup>. Además, los aptámeros son fácilmente modificables para mejorar sus propiedades y se desnaturalizan de forma reversible, aspecto que los hace aún más atractivos para su uso como receptores en bioensayos de afinidad <sup>31</sup>.

En los últimos años ha habido un enorme crecimiento en el descubrimiento de aptámeros afines a multitud de moléculas y la descripción de sus aplicaciones en ensayos *in vitro*, permitiendo reflexionar sobre los grandes logros conseguidos en el empleo de aptámeros como receptores de afinidad sintéticos en comparación con los anticuerpos <sup>32</sup>. El primer ensayo conocido para la detección de colágeno mediante el empleo de aptámeros se llevó a cabo seleccionando aptámeros afines a un péptido de 26 aminoácidos de la cadena  $\alpha 1$  del colágeno I. Este aptámero se marcó en un extremo con un fluoróforo y en el otro extremo con un quencher para que pueda ser detectado mediante la técnica de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) <sup>12</sup>.

El grupo de investigación de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo (GEUO) ha obtenido secuencias afines a un péptido de 16 aminoácidos perteneciente a la cadena  $\alpha 1$  del colágeno XI en solo 4 ciclos de enriquecimiento. Tras clonar y secuenciar 44 secuencias se encontraron ocho motivos repetidos en varias de ellas tras su análisis con técnicas bioinformáticas, lo que permitió su agrupamiento. Se procedió a seleccionar algunas secuencias que presentaban mayor número de motivos repetidos con el fin de caracterizarlos todos y además que presentasen estructura secundaria estable. De este modo se probaron nueve secuencias (B2, B3, C1, C2, C10, D1, D8, G8 y H1), siendo la D1 la que mostró mejores resultados con un valor de constante de afinidad ( $K_D$ ), que da información sobre la afinidad de unión entre las biomoléculas, próximo a 25 nM <sup>11</sup>. Cuanto menor sea el valor de  $K_D$  mayor será la afinidad del aptámero por la diana.

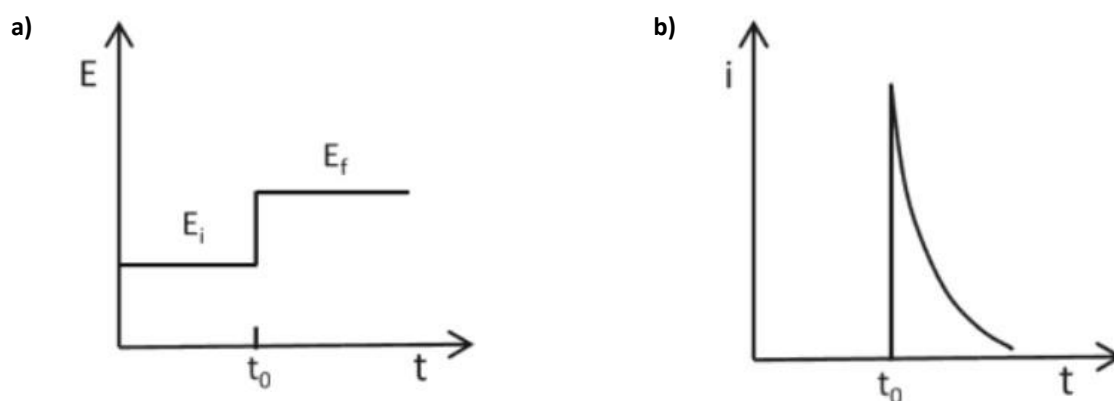
GEUO también ha desarrollado el primer ensayo competitivo electroquímico basado en aptámeros para el mismo péptido 16mer del colágeno XI, empleando partículas magnéticas con marcaje enzimático y el aptámero D1 caracterizado anteriormente. En primer lugar, se seleccionó la marca más apropiada para el aptámero (biotina o 6-carboxifluoresceína) obteniendo con la primera marca señales más elevadas por detección electroquímica y fue la que se empleó en los ensayos competitivos. Debido a los prometedores resultados obtenidos se aplicó el ensayo competitivo a la detección del colágeno XI $\alpha 1$  en lisados celulares. Estos ensayos demostraron la capacidad del aptámero para detectar este fragmento del colágeno XI en muestras complejas, comprobando que la región de la diana con la que interacciona el aptámero es la formada por los

10 aminoácidos del extremo N-terminal (10mer), siendo posible su utilización en un futuro como biomarcador del cáncer <sup>33</sup>.

## 1.5. Medida electroquímica

### 1.5.1. Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica electroquímica de pulso en la que tanto el electrodo como la disolución se mantienen en estado estacionario. En un primer lugar se aplica un pulso desde un potencial ( $E_i$ ) hasta un valor de potencial final ( $E_f$ ), figura 3a, y durante este pulso de potencial se genera una corriente (figura 3b) debido a la transferencia de electrones teniendo lugar la reacción redox correspondiente en la superficie del electrodo. Se produce un gradiente de concentración debido a la difusión de la especie oxidada o reducida (dependiendo del tipo de reacción redox que se produzca) desde el seno de la disolución hasta la superficie del electrodo con su correspondiente transporte de masa <sup>34</sup>. La medida se produce al final del pulso de potencial, ya que en este momento la corriente capacitiva ( $i_c$ ) es mínima y, por lo tanto, la relación entre corriente faradaica ( $i_f$ ) y corriente capacitiva es máxima ( $i_f/i_c$ ), de esta forma aumenta la sensibilidad respecto a otras técnicas electroquímicas.



**Figura 3:** a) Señal de excitación de la medida cronoamperométrica; b) Corriente registrada en función del tiempo <sup>35</sup>.

La señal analítica es la corriente faradaica que se registra en función del tiempo descrita por la ecuación de Cottrell para un electrodo plano y difusión lineal <sup>35</sup>.

$$i_f = \frac{nFAD^{1/2}C^*}{(\pi t)^{1/2}}$$

Donde  $i_f$  es la corriente faradaica registrada en amperios (A),  $n$  el número de electrones que intervienen en la reacción electroquímica,  $F$  la constante de Faraday (C/mol),  $A$  es el área del electrodo en  $\text{cm}^2$ ,  $D$  el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en  $\text{cm}^2/\text{s}$ ,  $C^*$  la concentración de la especie electroactiva en disolución en  $\text{mol}/\text{cm}^3$ , y  $t$  el tiempo en el que transcurre el pulso de potencial.

Esta corriente contiene un componente de corriente capacitiva o no faradaica que, durante el pulso de potencial, cae exponencialmente con el tiempo <sup>35</sup>. Este comportamiento se describe a continuación mediante la siguiente ecuación:

$$i_c = \frac{\Delta E}{R_s} \exp\left(\frac{-t}{R_s C_{dl}}\right)$$

Donde  $R_s$  es la resistencia de la disolución en ohmios ( $\Omega$ ) y  $C_{dl}$  la capacidad de la doble capa en faradios (F).

#### 1.5.2. Electrodo serigrafado

En los años 90 se empezó a extender el uso de electrodos serigrafados (SPE) ya que son transductores electroquímicos capaces de producirse en masa, desechables, suponen bajo coste de producción, son reproducibles y sensibles a la determinación de analitos a niveles traza incluso en fluidos biológicos cuando se modifican adecuadamente <sup>36</sup>. El proceso de serigrafado presenta ciertas ventajas como el fácil control del área del electrodo, el grosor y la composición; además permiten la comparación estadística de los resultados por la gran reproducibilidad en su fabricación e incorporar modificaciones añadidas a la tinta de serigrafía, pero presentan una desventaja y es la limitación de que la serigrafía únicamente se puede emplear en sustratos planos <sup>37</sup>.

Los conocidos habitualmente como SPE son en realidad celdas electroquímicas miniaturizadas ya que contienen los tres electrodos (electrodo de trabajo, de referencia y contraelectrodo) que se encuentran impresos en el material plástico o cerámico empleado para su fabricación. Los diferentes tipos de SPE hacen referencia al material del que se compone el electrodo de trabajo, siendo los más habituales los de carbono, oro, plata, y platino; determinando la selectividad y sensibilidad que se busca en cada tipo de análisis <sup>38</sup>.

Uno de los SPE más utilizados son los electrodos serigrafiados de carbono que actualmente encuentran grandes aplicaciones en el ámbito electroquímico y bioquímico, además se pueden emplear para el almacenamiento de energía y la microelectrónica, permitiendo la incorporación de materiales químicamente funcionalizados de forma sencilla <sup>37</sup>.

## 2. Objetivos

El colágeno es una de las principales proteínas que forma la matriz extracelular y, concretamente, el colágeno XI se ve envuelto en varios procesos de sobreexpresión tumoral asociados a metástasis. Para la detección de este tipo de proteínas existen pocos receptores específicos que tengan gran afinidad por los mismos, la mayoría basados en anticuerpos. El objetivo del presente trabajo Fin de Máster es comparar varios aptámeros de ADN descritos anteriormente por el Grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo (GEUO) para un fragmento del colágeno XI humano, el cual se ha descubierto que es un potencial biomarcador tumoral para algunos tipos de cáncer, y su uso en ensayos analíticos.

El objetivo general se pretende lograr mediante los siguientes objetivos más específicos:

- Selección de los aptámeros de entre los descritos previamente en base a los motivos recurrentes.
- Caracterización de la afinidad de los aptámeros mediante ensayos de unión empleando partículas magnéticas modificadas y medida electroquímica para la comparación de los resultados.
- Diseño y evaluación de ensayos competitivos que permitan cuantificar el colágeno XI.

Además de estos objetivos específicos, el principal objetivo académico propuesto durante el desarrollo del presente Trabajo Fin de Máster es poner en práctica los conocimientos adquiridos teóricamente en las asignaturas Métodos Avanzados de Detección Electroquímica y Sensores y Biosensores al diseño y evaluación de bioensayos electroquímicos, conocer la dificultad que conlleva el trabajo realizado en un laboratorio de investigación, así como adquirir la capacidad de interpretar los resultados obtenidos de forma autónoma.



### 3. Experimental

#### 3.1. Reactivos

Los aptámeros de ADN marcados con biotina empleados en los diferentes ensayos llevados a cabo en el presente trabajo se detallan en la tabla 1, todos ellos fueron sintetizados por la casa comercial *Metabion* (Alemania). Los motivos recurrentes se han marcado en azul y gris.

**Tabla 1:** Aptámeros caracterizados con su energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y secuencia correspondiente con los motivos azul y gris señalados.

Nombre	$\Delta G$ (Kcal/mol)	Secuencia (5' – 3')
<b>B4</b>	-4,97	GAC GCA AGA AAT TCA GGG CAC CTG GAA CGA CGC GTC GGC T
<b>B4T</b>	-4,97	TTT TTA TTC AGG GCA CCT GGA ACG ACG CGT CGG CT
<b>D4</b>	-0,66	GGA CGT GGA GTC GGC GCA ATT AAT CGT GAG GGG TGT TGC C
<b>F3</b>	0,21	GTA AGC GCC TAG TCT GTG TCC AAA TCG AGT CGT CCC GA
<b>C3</b>	-1,57	CGC AAG CGG ATG TCC CCA TCG TTA GTC AGT TTG GAC TTG G
<b>D1</b>	-3,17	GGT TGA CGG CAG TCG GCG GTA TGC GCA TAT CGT GTT GGT A

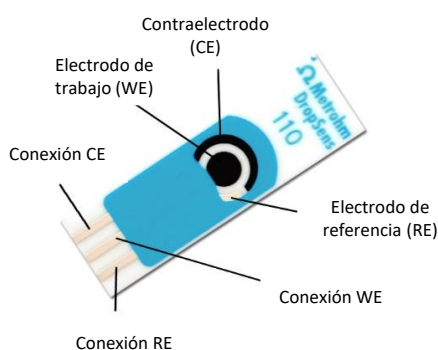
Los péptidos 10mer y 16mer pertenecientes a la cadena de colágeno XI $\alpha$ 1 humano marcados con biotina con los que se han empleado en estos estudios fueron sintetizados químicamente por *Biomedal* (España). Las partículas magnéticas modificadas con el péptido correspondiente en cada caso *Dynabeads<sup>TM</sup> MyOne<sup>TM</sup> Streptavidin C1*, el conjugado estreptavidina – HRP y Tween-20 (70%) fueron suministrados por *Thermo Fisher Scientific* (España).

El sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), así como la solución salina tamponada con fosfato 10x (PBS) se adquirió a *Sigma-Aldrich* (España).

Todas las disoluciones se prepararon con agua ultrapura purificada con un sistema *Milli-Q<sup>®</sup> Lab Waters Solutions* suministrado por la casa comercial *Merck* (España).

### 3.2. Instrumentación

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo con un potenciostato  $\mu$ AUTOLAB Type II controlado por un ordenador con el software Nova 2.1.4 (*Metrohm Autolab*, Países Bajos). Las celdas serigrafiadas de carbono (SPCE), figura 4, son de la marca comercial *Metrohm DropSens* (España) modelo DRP-110, en el que el electrodo de trabajo (WE) es de carbono de 4 mm de diámetro, al igual que el contraelectrodo (CE) y el electrodo de referencia (RE) es de plata. Para realizar las conexiones entre el potenciostato y el SPCE se emplea un conector DSC (*Metrohm DropSens*) que actúa como interfase, las dimensiones son de 6,5x6,5x4 cm.



**Figura 4:** Celda serigrafiada de carbono (SPCE) donde WE: carbono, CE: carbono y RE: plata. Imagen modificada obtenida de la página web de la casa comercial *Metrohm DropSens* ([https://www.dropsens.com/screen\\_printed\\_electrodes\\_pag.html](https://www.dropsens.com/screen_printed_electrodes_pag.html)).

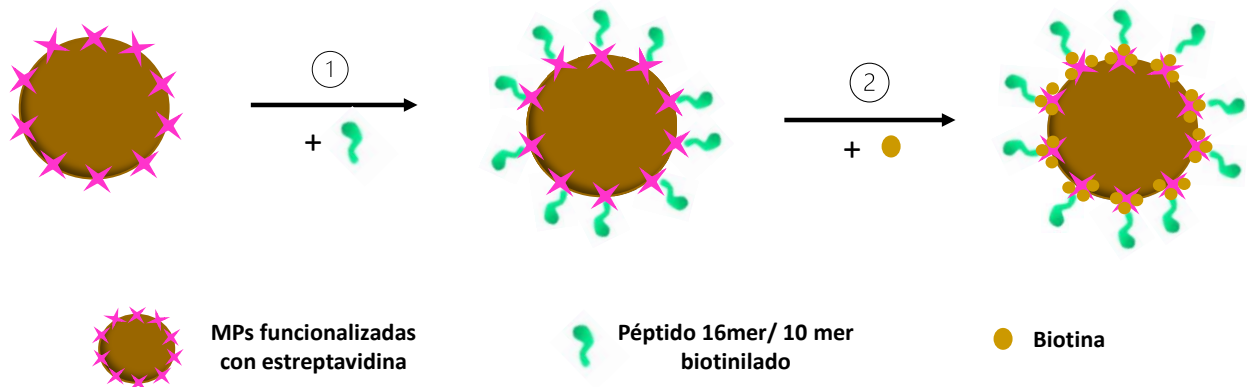
Las operaciones de lavado e incubación que requieren una temperatura determinada se llevaron a cabo con un *ThermoMixer Comfort* (*Eppendorf*, España) para tubos de 1,5 mL de capacidad. Los procedimientos de mezclado a temperatura ambiente se realizaron con una rueda mezcladora *Dynabeads™ MX* de 12 tubos de la marca *Thermo Fischer Scientific*. Para la separación del sobrenadante de las partículas magnéticas modificadas (MPs) se empleó un imán *DynaMag™-2* (*Thermo Fischer Scientific*) después de cada etapa de lavado.

### 3.3. Procedimientos experimentales

#### 3.3.1. Modificación de partículas magnéticas con los péptidos

Para la modificación de las partículas magnéticas (MPs) con el péptido biotinilado correspondiente (16mer o 10mer) se transfieren 50  $\mu\text{L}$  de la disolución comercial de MPs modificadas con estreptavidina a un eppendorf y se dispersan en 0,5 mL de PBS 1x con 0,01% Tween-20. Después se lavan dos veces con la misma disolución de PBS 1x con 0,01% Tween-20 y se procede a realizar la inmovilización del péptido biotinilado 2  $\mu\text{M}$  disuelto en PBS 1x con 0,01% Tween-20. La disolución obtenida se incuba 30 minutos bajo agitación a 1300 rpm a 30  $^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realiza otro lavado de la misma manera y se realiza el bloqueo de los sitios no modificados añadiendo una disolución de biotina 500  $\mu\text{M}$  en 0,5 mL de PBS 1x con 0,01% Tween-20 y se incuba 30 minutos bajo rotación en rueda. A continuación, se lava de nuevo dos veces con disolución de PBS 1x con 0,01% Tween-20 y una tercera vez con disolución PBS 1x. Finalmente se reconstituye en 0,5 mL de PBS 1x y se almacena en nevera.

En la figura 5 se muestra un esquema de este protocolo seguido para la modificación de las partículas magnéticas con el péptido correspondiente.



**Figura 5:** Esquema del protocolo seguido para la modificación de MPs con péptido 16mer o 10mer biotinilado, en el que se detallan las siguientes etapas 1) Inmovilización del péptido 16mer o 10mer a la superficie de las MPs; 2) Bloqueo de la superficie libre de las MPs con biotina.

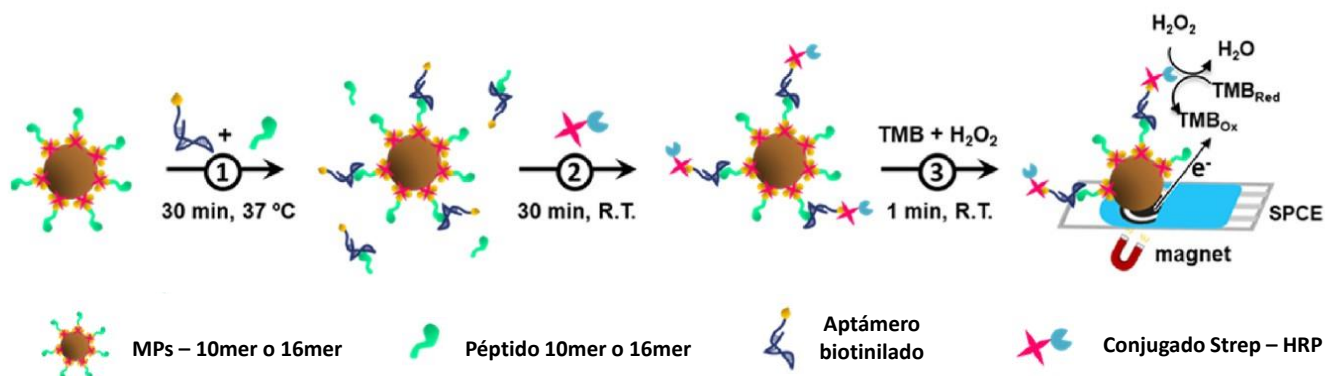
### 3.3.2. Obtención de la curva de enlace

Se toman 10  $\mu\text{L}$  de MPs modificadas previamente con péptido biotinilado, se añade el volumen correspondiente de aptámero en cada caso para obtener concentraciones crecientes del mismo en un volumen total de 0,5 mL y se incuba durante 30 minutos a 37 °C y 650 rpm en *thermomixer*. Se lava dos veces con 0,5 mL de PBS 1x con 0,01% Tween-20 y se procede a realizar el marcaje enzimático añadiendo 0,5 mL de 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del conjugado estreptavidina – HRP incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente y 650 rpm. Una vez hecho esto se elimina el sobrenadante y se lava dos veces de la misma forma explicada anteriormente y una última vez con disolución PBS 1x. Finalmente se reconstituye en 15  $\mu\text{L}$  de PBS 1x para proceder a la realización de la medida cronoamperométrica, empleando TMB como sustrato de la reacción enzimática como se indicará más adelante.

### 3.3.3. Ensayo competitivo

En primer lugar, se transfieren 10  $\mu\text{L}$  de MPs modificadas con péptido 10mer o 16mer a un eppendorf y se mezclan con una disolución que contiene una concentración fija de 25 nM de aptámero B4T y concentraciones crecientes de péptido 10mer o 16mer, en un volumen total de 0,5 mL de PBS 1x. La disolución se lleva a incubación durante 30 minutos a 37 °C y 650 rpm en *thermomixer* y posteriormente se lava dos veces con 0,5 mL de PBS 1x con 0,01% de Tween-20. El marcaje enzimático con estreptavidina – HRP se realiza añadiendo 0,5 mL de 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del conjugado, como se describe en el protocolo anterior, así como los lavados y la reconstitución en 15  $\mu\text{L}$  de PBS 1x para la posterior medida cronoamperométrica de la reacción con TMB.

En la figura 6 se puede ver representado el esquema del ensayo competitivo con cada una de las etapas descritas anteriormente.



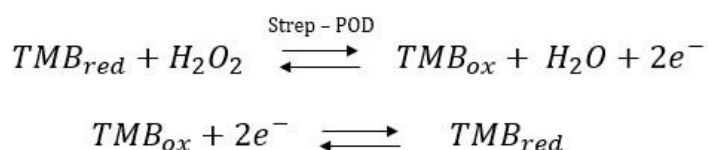
**Figura 6:** Esquema de los ensayos competitivos llevados a cabo en el presente trabajo, donde se detallan las siguientes etapas: 1) Incubación de péptido biotinilado libre con MPs modificadas con péptido correspondiente para la competición del aptámero B4T biotinilado; 2) Marcaje enzimático con strep – HRP; 3) Inmovilización de MPs sobre electrodo serigrafiado de carbono, reacción enzimática de TMB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y detección mediante cronoamperometría. Imagen adaptada de <sup>33</sup>.

### 3.3.4. Detección cronoamperométrica

La detección electroquímica tanto para la obtención de las curvas de enlace como para los ensayos competitivos fue realizada mediante cronoamperometría. Con esta técnica se puede monitorizar la extensión de la reacción de oxidación del TMB en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> empleando como catalizador la enzima estreptavidina – HRP.

La medida cronoamperométrica se realiza en electrodos serigrafiados de carbono en los que se ha añadido por detrás del WE un pequeño imán que mantenga adheridas las MPs que se depositan sobre él. Por lo tanto, se depositan 15 μL de MPs, tras un minuto se añaden 40 μL del sustrato enzimático, dejando que tenga lugar la reacción durante un minuto. Una vez transcurrido ese tiempo tiene lugar la medida cronoamperométrica durante 60 s a un potencial fijado de 0 V al que se produce la reducción del TMB previamente oxidado. La señal de corriente generada durante la reacción de reducción del TMB es una medida de la actividad enzimática inmovilizada sobre las MPs y, por tanto, de la cantidad de aptámero enlazado.

Las reacciones que tienen lugar durante este proceso son las siguientes:



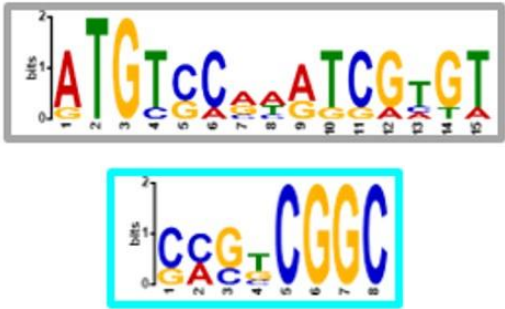
## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Selección de los aptámeros

En primer lugar, se procede a la selección de los aptámeros que posteriormente se caracterizan de entre los descritos previamente atendiendo a los motivos recurrentes que presentan. Como se ha comentado anteriormente, en ensayos previos se encontró que el aptámero que presenta menor  $K_D$  y por tanto mayor afinidad por la diana (péptido 16mer) es el denominado D1 <sup>11</sup>. Se observa que este aptámero presenta dos motivos recurrentes marcados como motivo azul y gris (figura 7). En base a esto se eligen otros aptámeros que presentan alguno de estos motivos o los dos para estudiar la afinidad de estos nuevos aptámeros por el péptido 10mer, zona del péptido 16mer por la que los aptámeros ya estudiados presentan mayor afinidad.

En la tabla 2 se encuentran todas las secuencias en las que se presentan los motivos recurrentes azul y gris.

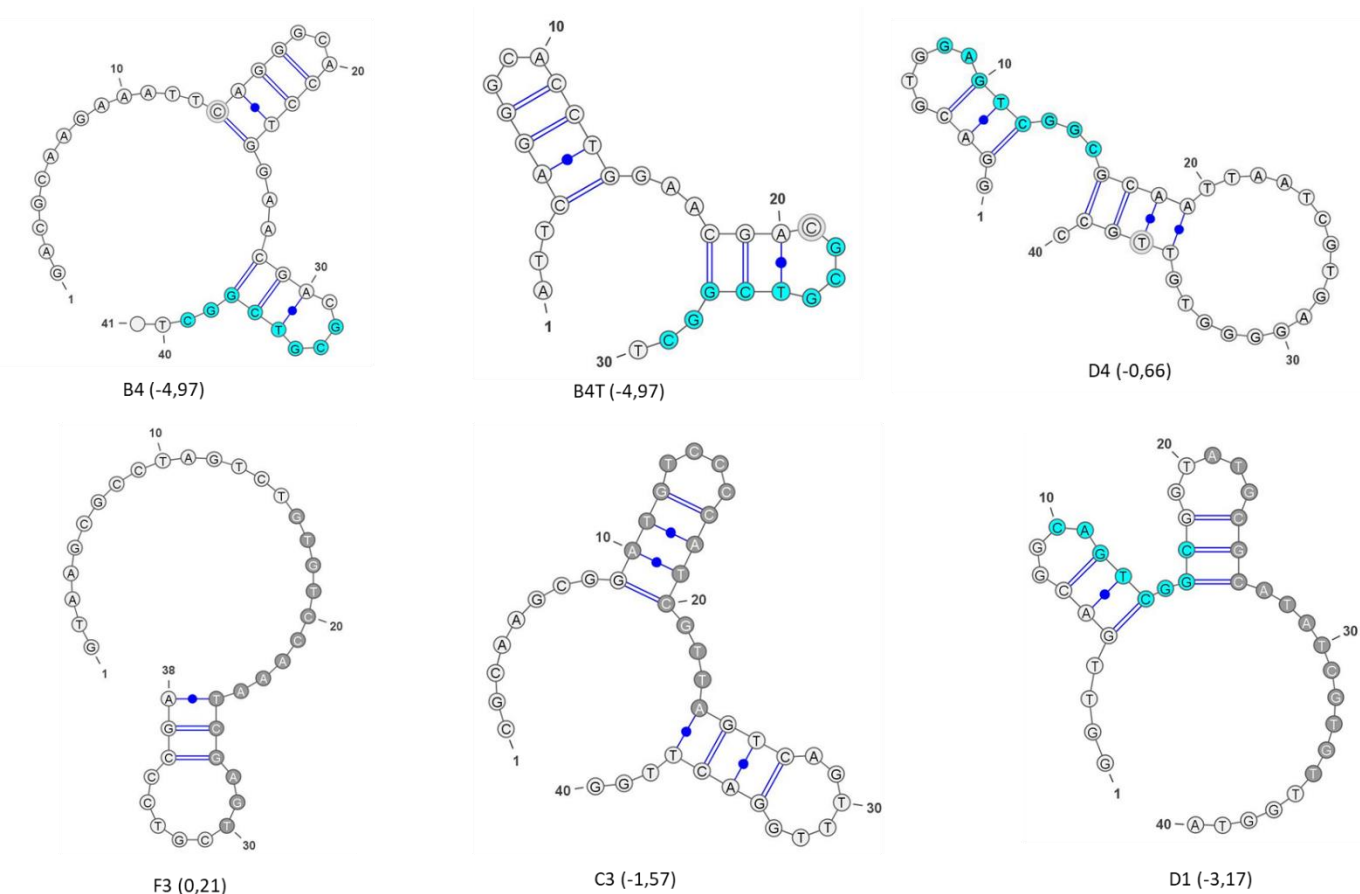
**Tabla 2:** Secuencias que presentan los motivos recurrentes azul y gris, con su  $\Delta G$  correspondiente y representación de secuencia consenso de cada motivo. Datos obtenidos de <sup>11</sup>.

Nombre	$\Delta G$ (Kcal/mol)	Secuencia (5' – 3')	Motivos
<b>B4</b>	-4,97	GAC GCA AGA AAT TCA GGG CAC CTG GAA CGA <b>CGC GTC GGC</b> T	
<b>B4T</b>	-4,97	A TTC AGG GCA CCT GGA ACG ACG <b>CGT CGG</b> CT	
<b>C2</b>	-2,19	ACC AGC CGT TAT TAC C <b>GG ACT</b> <b>CCC TAG AGC ACC GCC GGC</b> C	
<b>C3</b>	-1,57	CGC AAG CGG ATG TCC CCA TCG <b>TTA</b> GTC AGT TTG GAC TTG G	
<b>C9</b>	-0,73	GCC AGA TTT TAC <b>ATG TCC GTG</b> <b>TCG CGT</b> TAG CCG TTGCAT C	
<b>D1</b>	-3,17	GGT TGA CGG <b>CAG TCG GCG</b> GTA <b>TGC GCA TAT CGT GTT</b> GGT A	
<b>D4</b>	-0,66	GGA CGT G <b>GA GTC GGC</b> GCA ATT AAT CGT GAG GGG TGT TGC C	
<b>F1</b>	0,02	GGG ATT GTA GTT CAA AGA TTA GTT CTC A <b>CA CTC GGC</b> TTT C	
<b>F3</b>	0,21	GTA AGC GCC TAG TCT <b>GTG TCC</b> <b>AAA TCG AGT</b> CGT CCC GA	

<b>F9</b>	-1,35	CAA TGC CCA TGT TCC GGC GGC AAT TTT TTA ACA TTA GCA G
<b>G8</b>	-3,54	CCC GGG TAC ATT AGA ATG GTT TAC CGC CCC GCG GCG CCC T
<b>H3</b>	-0,08	GGG CAA TGT GCGAAG GGT GTC TAG TCT AAT ATA TGC GGC C
<b>H8</b>	0,10	GGC ATA TTG TCG CTC TTA TGT CAA AGT CAT GTT TTG GGT C

Los aptámeros elegidos para la realización de los ensayos de caracterización con 10mer son el B4 y D1 que han sido probados con el péptido 16mer obteniendo buenos resultados; el B4T, es el aptámero B4 truncado en el extremo 5' eliminando 10 nucleótidos de la secuencia debido a que en cálculos computacionales preliminares se vio que estos nucleótidos no forman estructura secundaria y, por tanto, la probabilidad de que estén involucrados en la interacción con el péptido es mucho menor; el D4 que también presenta el motivo azul y las secuencias C3 y F3 que presentan el motivo gris. Todos ellos son elegidos atendiendo también a la estabilidad de su estructura secundaria, eligiendo los más estables.

La estructura secundaria más estable para los aptámeros objeto de estudio, así como los motivos comunes en ellos se encuentran representados en la figura 7. Observando las estructuras de cada uno de los aptámeros e identificando los motivos azul y gris en cada uno de ellos se puede apreciar que éstos siempre se encuentran en zonas donde se forma un bucle, lo que puede indicar que el motivo de enlace es debido a la zona estructurada, es decir, la presencia de estructura secundaria se asocia a una mayor interacción entre aptámero y diana debido a que la unión de afinidad se caracteriza por complementariedad química y geométrica entre los dos compuestos que se unen. Por este motivo, es llamativo que los motivos señalados se encuentren en zonas de bucle y parece indicar que los motivos encontrados bioinformáticamente, sin conocer previamente su disposición geométrica, están en zonas identificadas como posibles zonas de interacción.



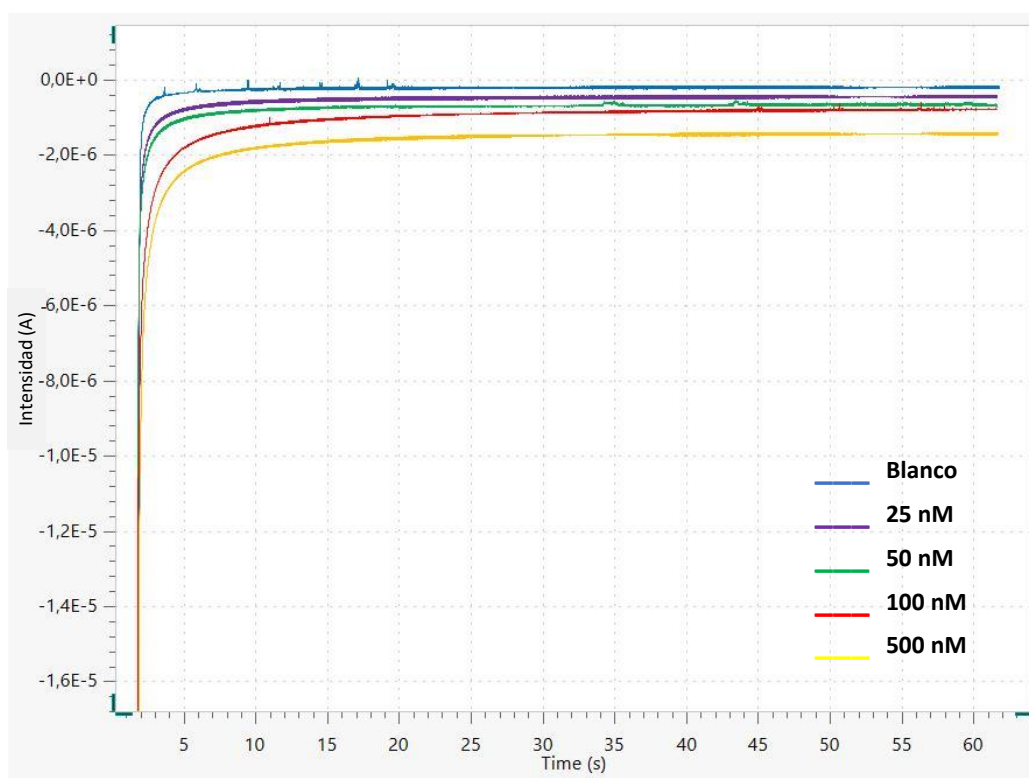
**Figura 7:** Estructura secundaria más estable de los aptámeros. Entre paréntesis se indica su  $\Delta G$  en Kcal/mol, en azul y gris oscuro se indican los motivos comunes. Datos obtenidos de mfold a 37 °C y  $[Na^+] = 0,154$  M. Extrayendo la notación VIENNA se obtienen las estructuras con el software VARNA GUI 3.8.

## 4.2. Caracterización de aptámeros

Estudios previos han demostrado la afinidad de algunos aptámeros biotinilados por el péptido 16mer de la cadena  $\alpha 1$  de colágeno XI por contar con motivos comunes que podrían ser importantes en la unión. Se probó la capacidad de los aptámeros para unirse al péptido, para ello se inmovilizó el péptido 16mer biotinilado con estreptavidina – MPs y se incubó con concentraciones crecientes de cada aptámero <sup>11</sup>.



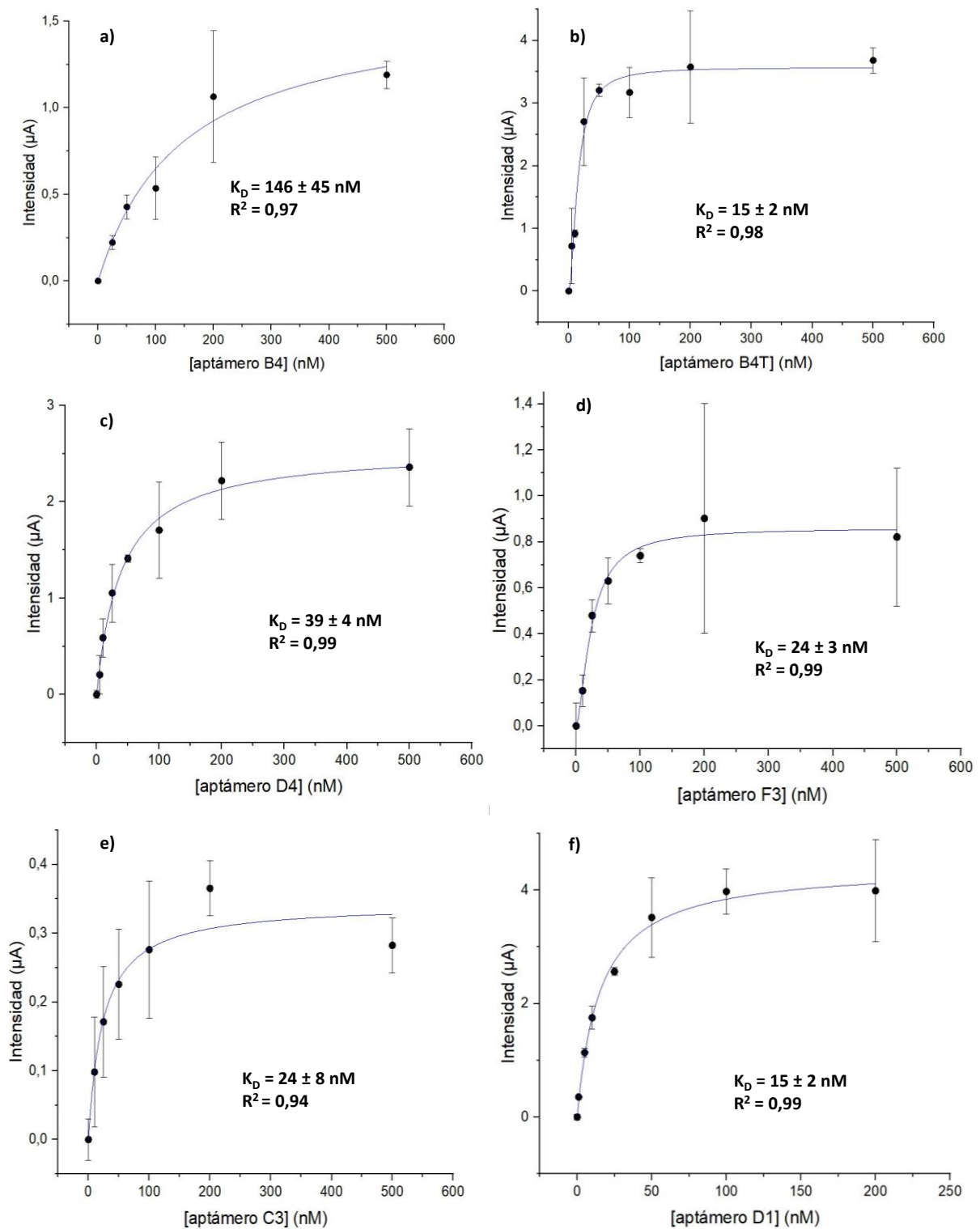
Para la caracterización de los seis aptámeros se inmoviliza el péptido biotinilado 10mer, de secuencia más corta que el 16mer ya que únicamente presenta la zona de mayor afinidad hacia los aptámeros, sobre estreptavidina – MPs. Una alícuota de dichas partículas modificadas se incuba con concentraciones crecientes de cada uno de los aptámeros, realizando el marcaje enzimático con el conjugado estreptavidina – HRP. Sobre el electrodo de trabajo se atrapan las MPs con ayuda de un imán y se añade el sustrato TMB para que tenga lugar la correspondiente reacción enzimática. Se registra la corriente cronoamperométrica medida a 0 V generada por la reducción de la especie oxidada de TMB (figura 8, como ejemplo representativo) que está relacionada con la cantidad de aptámero que se ha unido al péptido. La corriente catódica registrada es proporcional a la cantidad de aptámero en superficie, que aumenta conforme aumenta la concentración de aptámero añadida.



**Figura 8:** Cronoamperograma obtenido registrando la señal de corriente del TMB oxidado medida a 0 V obtenida tras la interacción del péptido 10mer inmovilizado sobre MPs y concentraciones crecientes de aptámero B4.

De esta forma se pueden construir las curvas de enlace para cada uno de los aptámeros representando la intensidad de corriente (I) frente a la concentración de aptámero. Los resultados se ajustan a los modelos de enlace de Langmuir y Hill de los que se pueden obtener los valores

de las constantes de afinidad ( $K_D$ ). En la figura 9 se muestran las curvas de enlace para cada uno de los aptámeros ensayados.



**Figura 9:** Curvas de enlace obtenidas para cada uno de los aptámeros objeto de estudio, a) B4; b) B4T; c) D4; d) F3; e) C3; d) D1, con los valores de  $K_D$  y del coeficiente de correlación.

Para los aptámeros B4, D4, C3 y D1 el mejor ajuste se obtiene con el modelo de Langmuir cuya ecuación describe una hipérbola equilátera:

$$y = \frac{P_1 \cdot x}{P_2 + x}$$

siendo  $y$  la intensidad de corriente medida a cada concentración en microamperios ( $\mu\text{A}$ ),  $P_1$  intensidad de corriente máxima o de saturación en  $\mu\text{A}$ ,  $P_2$  es la concentración en nM a la cual se alcanza el 50% de la intensidad de corriente máxima y corresponde al valor de la constante de afinidad ( $K_D$ ) y  $x$  la concentración de aptámero correspondiente en nM.

El modelo de Langmuir implica que la señal de corriente registrada aumenta conforme aumenta la concentración de aptámero añadida hasta que llega un momento en el que se satura, es decir, el aptámero se ha unido a todas las MPs modificadas con el péptido y ya no puede unirse más. En este modelo la estequiometría siempre es 1:1.

A continuación, en la tabla 3 se muestran los parámetros de ajuste obtenidos para estos aptámeros con el modelo de Langmuir.

**Tabla 3:** Datos de ajuste al modelo de Langmuir.

<b>Aptámero</b>	<b>P<sub>1</sub> (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b>P<sub>2</sub> (nM)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>B4</b>	1,6 $\pm$ 0,2	146 $\pm$ 45	0,97
<b>D4</b>	2,55 $\pm$ 0,08	39 $\pm$ 4	0,99
<b>C3</b>	0,34 $\pm$ 0,03	24 $\pm$ 8	0,94
<b>D1</b>	4,4 $\pm$ 0,1	15 $\pm$ 2	0,99

Por el contrario, las curvas de enlace obtenidas para los aptámeros B4T y F3 presentan forma sigmoideal ajustándose a la función de Hill.

$$y = \frac{P_1 \cdot x^n}{k^n + x^n}$$

La intensidad de corriente en microamperios ( $\mu\text{A}$ ) se representa como  $y$ ,  $P_1$  es la señal analítica máxima en  $\mu\text{A}$ ,  $n$  es la cooperatividad,  $k$  es la constante de afinidad y  $x$  la concentración de aptámero en cada caso en nM.

El modelo de Hill mide el grado de cooperación de los aptámeros que se unen a las MPs modificadas con el péptido, ya que la unión del aptámero a la diana aumenta si ya existen otros

enlazados, es decir, se produce una unión cooperativa. Por lo tanto, el modelo de Hill asume cualquier estequiometría, es decir, se pueden unir varios aptámeros a una misma molécula.

En la tabla 4 se muestran los datos obtenidos para los dos aptámeros que se ajustan mejor a la ecuación de Hill.

**Tabla 4:** Datos de ajuste al modelo de Hill.

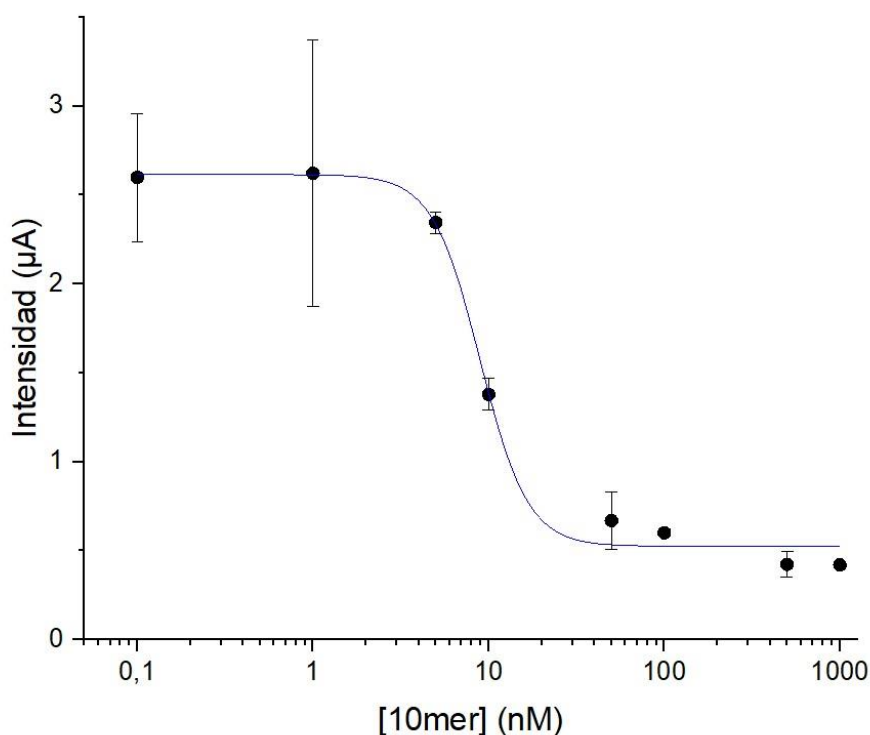
<b>Aptámero</b>	<b>P<sub>1</sub> (μA)</b>	<b>K<sub>D</sub> (nM)</b>	<b>n</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>B4T</b>	3,6 ± 0,2	15 ± 2	1,7 ± 0,3	0,98
<b>F3</b>	0,86 ± 0,04	24 ± 3	1,6 ± 0,3	0,99

Como se puede observar en las tablas 3 y 4 el aptámero que presenta un menor valor de K<sub>D</sub> y, por lo tanto, mayor afinidad por el péptido 10mer es el B4T. La afinidad mejora respecto al aptámero B4 al eliminar los nucleótidos superfluos de éste, lo que confirma la predicción computacional de que la región monocatenaria, es decir, sin estructura secundaria no interviene en el enlace. Además de presentar un menor valor de K<sub>D</sub>, las señales de intensidad obtenidas son bastante altas, por lo que facilitará trabajar con él en ensayos analíticos.

Atendiendo a los resultados de K<sub>D</sub> obtenidos para los aptámeros B4 (171 ± 19 nM) y D1 (190 ± 15 nM) en los ensayos anteriores realizados con el péptido 16mer y comparándolos con los valores de K<sub>D</sub> para los ensayos con 10mer, que son 146 ± 45 nM y 15 ± 2 nM respectivamente, se puede determinar que es preferible trabajar con 10mer ya que el truncamiento del hexámero hace que disminuya los valores de K<sub>D</sub> en el caso de D1, pero las señales obtenidas en ambos casos para este ensayo fueron más altas, hecho que favorece también el uso del péptido 10mer con el aptámero B4<sup>33</sup>.

### 4.3. Ensayos competitivos

De acuerdo con los resultados presentados en el apartado anterior, para la realización del ensayo competitivo se elige una concentración fija de aptámero B4T de 25 nM, ya que es la que produce una señal aproximadamente del 50% de la señal máxima según la curva de enlace (figura 9b). Esta concentración de aptámero se pone en disolución con las MPs modificadas con el péptido y se mezcla con concentraciones crecientes de péptido 10mer durante 30 minutos. Se realiza el marcaje enzimático con el conjugado estreptavidina – HRP y todo ello se deposita sobre el electrodo serigrafiado de carbono recubriéndolo con el sustrato TMB para que tenga lugar la reacción enzimática. Se obtienen señales decrecientes (figura 10) lo que significa que, cuanto mayor es la cantidad de 10mer en disolución, menor es la concentración de aptámero B4T que se une al péptido 10mer inmovilizado sobre las MPs. Por lo tanto, el péptido 10mer en disolución compete con el 10mer sobre las MPs, comportamiento esperado en vista a los resultados obtenidos en los ensayos de afinidad.



**Figura 10:** Ensayo competitivo realizado con partículas magnéticas modificadas con 10mer. Representación de la intensidad de corriente frente a la concentración de péptido 10mer en disolución en presencia de 25 nM de aptámero B4T.

La gráfica obtenida presenta forma de curva sigmoïdal mostrando un buen ajuste a la ecuación logística de cuatro parámetros cuya ecuación se muestra a continuación.

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$

donde  $y$  es la intensidad de corriente medida a cada concentración de péptido en  $\mu\text{A}$ ,  $A_1$  es la intensidad máxima correspondiendo con el blanco o ausencia del péptido en disolución,  $A_2$  el valor de intensidad mínimo,  $x$  la concentración de péptido 10mer añadida en disolución (nM),  $x_0$  es el valor de concentración de péptido que corresponde al 50% de la máxima señal (IC50), y  $p$  es la pendiente de la curva en el punto de inflexión.

La ecuación con los datos obtenidos para el ajuste del ensayo competitivo realizado es la siguiente:

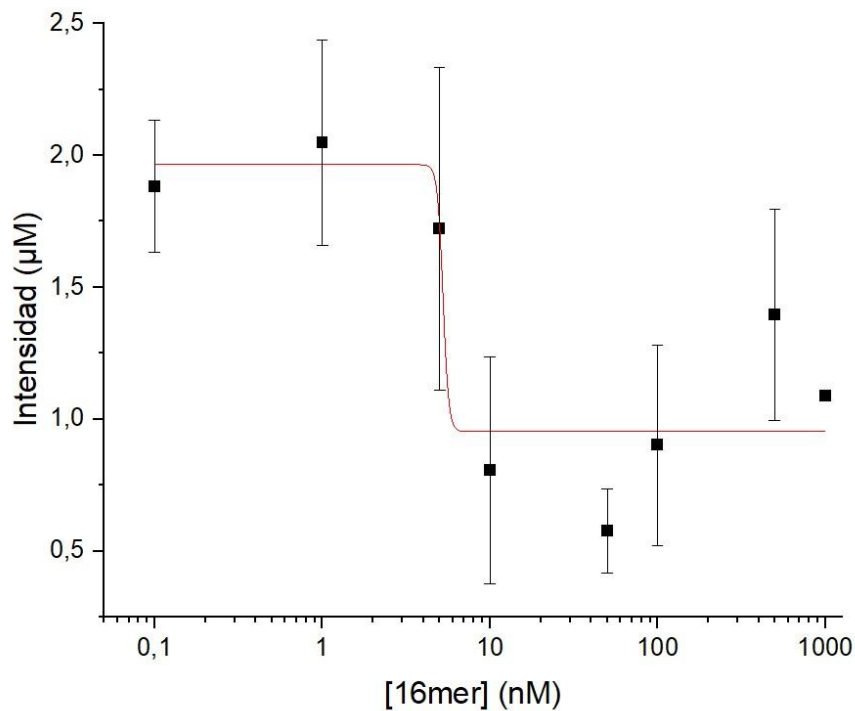
$$I (\mu\text{A}) = (0,52 \pm 0,05) + \frac{[(2,62 \pm 0,08) - (0,52 \pm 0,05)]}{1 + \left(\frac{[10mer] (nM)}{8,9 \pm 0,6}\right)^{(3,2 \pm 0,8)}}$$

$$r^2 = 0,993$$

El intervalo analítico útil definido como el intervalo de concentraciones que corresponde al intervalo de señales entre el 20% y el 80% de la máxima señal, es de 6,3 nM a 1000 nM, esta última es la máxima concentración ensayada ya que no se alcanza el valor del 20% de la máxima señal por no ensayar concentraciones mayores, y el LOD se fijó en 4,8 nM definido como el 90% de la máxima señal obtenida. El intervalo de valores de RSD obtenido para el intervalo analítico útil es de 16,5 – 24%.

En estudios anteriores se observa que el aptámero D1 tienen mayor afinidad por el péptido 10mer que por el 16mer<sup>11,33</sup>. Por ello se realizan dos ensayos competitivos “mixtos”, es decir, combinando los péptidos 10mer y 16mer en disolución o sobre las MPs, pero siempre siendo distintos. El comportamiento que cabría esperar si se confirmasen los estudios previos sería que no hubiera competencia, al menos a concentraciones bajas de 16mer en disolución. Por tanto, la señal analítica sería la máxima, es decir, el aptámero no tiene afinidad por el péptido en disolución y se une todo al péptido sobre las partículas. Pero a concentraciones más elevadas de 16mer cabría esperar una disminución en la señal. Sin embargo, los resultados obtenidos (figura 11) muestran un comportamiento inusual ya que a concentraciones bajas de 16mer la señal es

decreciente, y muy similar a la obtenida con 10mer en disolución (figura 10), pero a partir de una concentración de 50 nM del péptido la señal vuelve a subir cuando las concentraciones son elevadas.



**Figura 11:** Ensayo competitivo realizado con partículas magnéticas modificadas con 10mer. Representación de la intensidad de corriente frente a la concentración de péptido 16mer en disolución en presencia de 25 nM de aptámero B4T.

Teniendo en cuenta la irreproducibilidad, en parte debidos a variaciones importantes de temperatura en el laboratorio durante los días de ensayo, los resultados obtenidos realizando el ensayo competitivo de esta forma no son concluyentes y no representan una curva sigmoidea con buen ajuste a la función logística, por lo que no se ha calculado el intervalo analítico útil ni el LOD, ya que no tienen utilidad analítica.

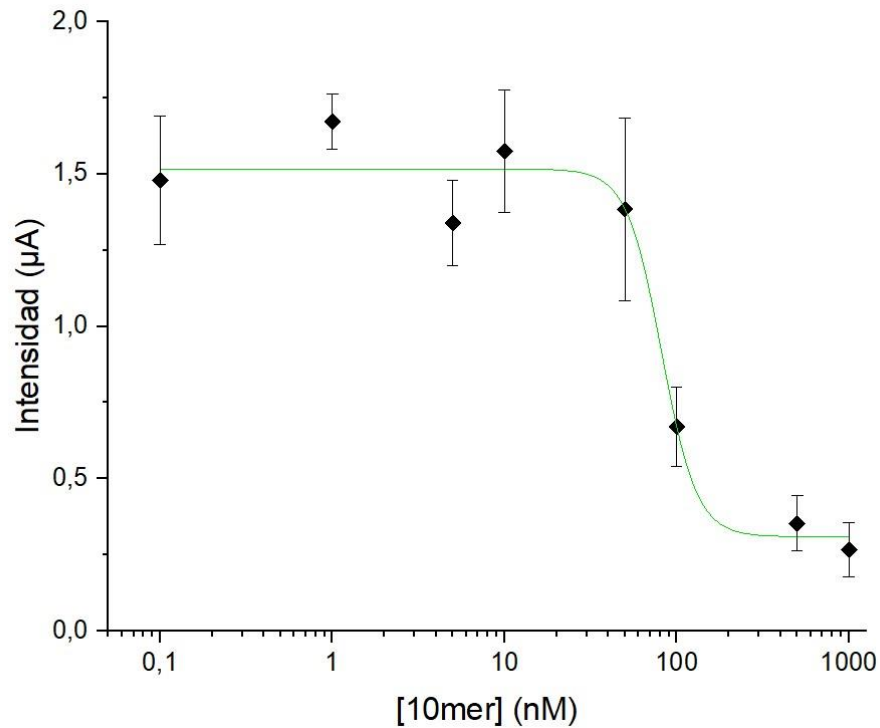
Cuando se realiza un ensayo competitivo en formato inverso, es decir, se emplearon MPs modificadas con péptido 16mer y se pone en disolución concentraciones crecientes de péptido 10mer, se obtiene la curva sigmoidea representada en la figura 12, que corresponde al

comportamiento que se esperaba en el ensayo anterior. Aparentemente el aptámero B4T tiene más afinidad por el péptido 16mer unido a las MPs que por el 10mer en disolución. Esto no es lo que cabría esperar comparando las  $K_D$  obtenidas para los ensayos de afinidad para 16mer y 10mer con el aptámero B4, ya que se esperaba que tuviera mayor afinidad por el péptido 10mer en disolución.

Los datos presentan forma de curva sigmoïdal cuyo ajuste a la función logística es el siguiente:

$$I (\mu A) = (0,31 \pm 0,09) + \frac{[(1,52 \pm 0,06) - (0,31 \pm 0,09)]}{1 + \left(\frac{[10mer](nM)}{82 \pm 11}\right)^{(4 \pm 2)}}$$

$$r^2 = 0,972$$

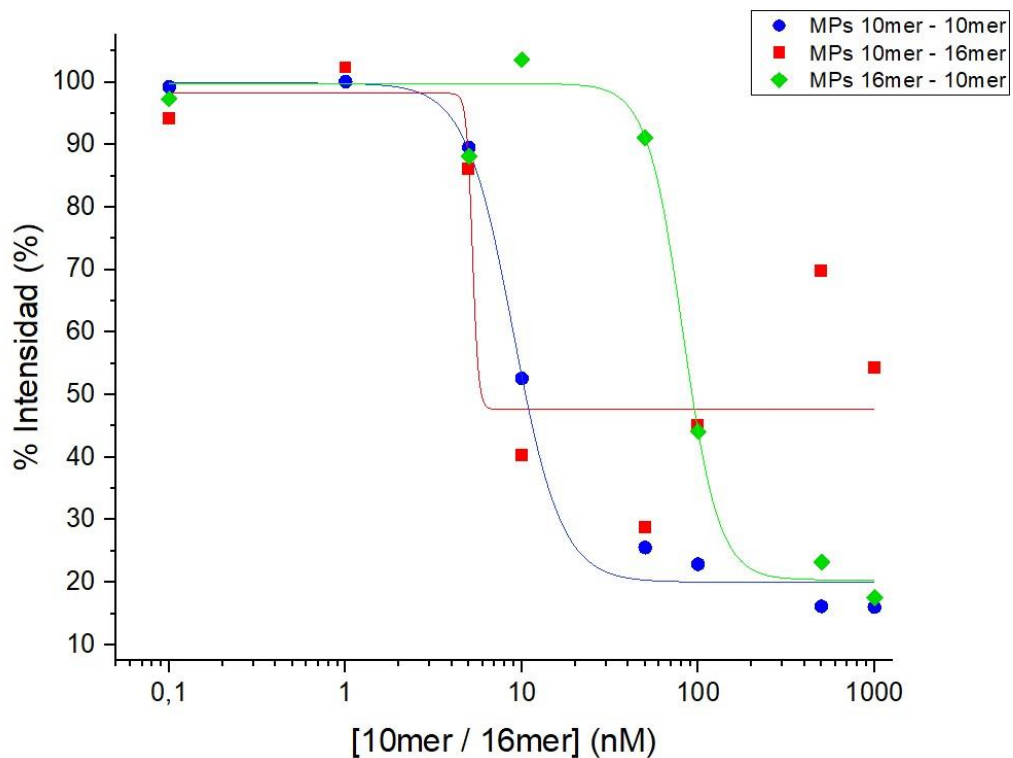


**Figura 12:** Ensayo competitivo realizado con partículas magnéticas modificadas con 16mer. Representación de la intensidad de corriente frente a la concentración de péptido 10mer en disolución en presencia de 25 nM de aptámero B4T.



El intervalo analítico útil y el LOD definidos como se indica anteriormente es de 54 – 204 nM y 28 nM respectivamente. El intervalo de valores de RSD para el intervalo analítico útil obtenido es menor del 20%.

En la figura 13 se muestra una comparativa de los resultados obtenidos para las tres variantes de ensayos competitivos realizados. En este caso se representa la intensidad en porcentaje respecto de la señal máxima, para corregir las posibles fluctuaciones existentes entre medidas realizadas en distintos días debidas a las diferencias de temperatura, frente a la concentración de péptido biotinilado.



**Figura 13:** Comparación de los tres tipos de ensayos competitivos realizados. En azul se representa el ensayo con MPs 10mer y 10mer en disolución, en rojo MPs 10mer y 16mer, y en verde MPs 16mer y 10mer.

En la gráfica se puede apreciar que cuando se utilizan MPs – 10 mer da igual el péptido que se ponga en disolución, ya que las curvas son casi superponibles hasta una concentración de 50 nM. A partir de ese momento aparece el comportamiento anómalo en presencia de 16mer que no se entiende en profundidad, pero se repite en las réplicas del ensayo realizadas.

Observando el ensayo competitivo con MPs – 16mer se puede apreciar que es más difícil y menos interesante desde el punto de vista analítico, ya que el intervalo útil se desplaza a valores más elevados y lo óptimo es detectar la menor cantidad posible.

## 5. Conclusiones y perspectivas futuras

Se seleccionaron seis aptámeros de los obtenidos previamente mediante SELEX para el péptido 16mer de la cadena  $\alpha$  del colágeno XI, atendiendo a la presencia de los motivos recurrentes análogos a los que presentaba el aptámero con mayor afinidad (D1) y a la estabilidad de su estructura secundaria.

Se caracterizó la afinidad de los seis aptámeros por el péptido 10mer. El aptámero que presenta una mayor afinidad es el B4T ( $K_D = 15 \pm 2$  nM), que es una versión truncada del aptámero B4 fundamentada en estudios estructurales computacionales. Este resultado apunta a que los estudios computacionales pueden ser muy útiles en el refinamiento de los aptámeros que conlleva una reducción de su longitud y, consecuentemente, de su coste. Además, las intensidades de corriente obtenidas con este aptámero fueron bastante elevadas, por lo que fue el elegido para ensayos competitivos realizados posteriormente.

El ensayo competitivo con MPs – 10mer permite la detección del péptido 10 mer en un intervalo de 6,3 a 1000 nM con un LOD de 4,8 nM. Sin embargo, cuando se puso en disolución el péptido 16mer, los resultados no fueron concluyentes debido a que la señal analítica aumenta en lugar de disminuir a concentraciones elevadas de péptido.

El ensayo competitivo con MPs – 16mer y péptido 10mer en disolución parece indicar que el aptámero B4T tiene mayor afinidad por el péptido 16mer contrariamente a lo que indican las  $K_D$  estimadas. Esto puede ser debido al efecto de “avidéz” que se produce cuando existe una elevada concentración superficial de analito sobre las partículas magnéticas.

Para completar este estudio sería interesante realizar el ensayo con MPs – 16mer y péptido 16mer en disolución y también realizar el ensayo competitivo con la molécula de colágeno completa obtenida de lisados celulares.

## Bibliografía

- (1) Naba, A.; Clauser, K. R.; Hoersch, S.; Liu, H.; Carr, S. A.; Hynes, R. O. The Matrisome: In Silico Definition and in Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. *Molecular and Cellular Proteomics* **2012**, *11*. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014647>.
- (2) Hynes, R. O. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* **2009**, *326*, 1212–1216. <https://doi.org/10.1126/science.1176488>.
- (3) Bonnans, C.; Chou, J.; Werb, Z. Remodelling the Extracellular Matrix in Development and Disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2014**, *15*, 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>.
- (4) Hynes, R. O.; Naba, A. Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2012**, *4*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>.
- (5) Cukierman, E.; Bassi, D. E. Physico-Mechanical Aspects of Extracellular Matrix Influences on Tumorigenic Behaviors. *Seminars in Cancer Biology* **2010**, *20*, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.04.004>.
- (6) Shields, M. A.; Dangi-Garimella, S.; Redig, A. J.; Munshi, H. G. Biochemical Role of the Collagen-Rich Tumour Microenvironment in Pancreatic Cancer Progression. *Biochemical Journal* **2012**, *441*, 541–552. <https://doi.org/10.1042/BJ20111240>.
- (7) Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2011**, *3*, 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
- (8) Raglow, Z.; Thomas, S. M. Tumor Matrix Protein Collagen XI $\alpha$ 1 in Cancer. *Cancer Letters* **2015**, *357*, 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.011>.
- (9) Yoshioka, H.; Iyama, K.-I.; Inoguchi, K.; Khaleduzzaman, M.; Ninomiya, Y.; Ramirez, F. Developmental Pattern of Expression of the Mouse  $\alpha$ 1(X1) Collagen Gene (CoZII $\alpha$ 1). *Developmental Dynamics* **1995**, *204*, 41–47.
- (10) Kim, H.; Watkinson, J.; Varadan, V.; Anastassiou, D. Multi-Cancer Computational Analysis Reveals Invasion-Associated Variant of Desmoplastic Reaction Involving

- INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC Medical Genomics* **2010**, *3*.  
<https://doi.org/10.1186/1755-8794-3-51>.
- (11) Lorenzo-Gómez, R.; Miranda-Castro, R.; de los Toyos, J. R.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J. Aptamers Targeting a Tumor-Associated Extracellular Matrix Component: The Human Mature Collagen XI $\alpha$ 1. *Analytica Chimica Acta* **2022**, *1189*.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339206>.
- (12) Lorenzo-Gómez, R.; Miranda-Castro, R.; De-Los-Santos-Álvarez, N.; Jesús Lobo-Castañón, M. Bioanalytical Methods for Circulating Extracellular Matrix-Related Proteins: New Opportunities in Cancer Diagnosis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2022**, *414*, 147–165. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03416-2/Published>.
- (13) Sleister, H. M.; Rao, A. G. Subtractive Immunization: A Tool for the Generation of Discriminatory Antibodies to Proteins of Similar Sequence. *Journal of Immunological Methods* **2002**, *261*, 213–220. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00567-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00567-1).
- (14) Ng, B.; Zakrzewski, J.; Warycha, M.; Christos, P. J.; Bajorin, D. F.; Shapiro, R. L.; Berman, R. S.; Pavlick, A. C.; Polsky, D.; Mazumdar, M.; Montgomery, A.; Liebes, L.; Brooks, P. C.; Osman, I. Shedding of Distinct Cryptic Collagen Epitope (HU177) in Sera of Melanoma Patients. *Clinical Cancer Research* **2008**, *14*, 6253–6258.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4992>.
- (15) Monboisse, J. C.; Oudart, J. B.; Ramont, L.; Brassart-Pasco, S.; Maquart, F. X. Matrikines from Basement Membrane Collagens: A New Anti-Cancer Strategy. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **2014**, *1840*, 2589–2598.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.029>.
- (16) Luo, Y. Q.; Li-Juan, Y.; Zhao, L.; Sun, A. yuan; Dong, H.; Du, J. P.; Wu, S. Z.; Hu, W. Development of an ELISA for Quantification of Tumstatin in Serum Samples and Tissue Extracts of Patients with Lung Carcinoma. *Clinica Chimica Acta* **2010**, *411*, 510–515.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.01.001>.
- (17) Dupont-Deshorgue, A.; Oudart, J. B.; Brassart, B.; Deslee, G.; Perotin, J. M.; Diebold, M. D.; Monboisse, J. C.; Ramont, L.; Brassart-Pasco, S. A Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantification of Tetrastatin in Body Fluids and Tumor

- Extracts. *Analytical Biochemistry* **2015**, *482*, 16–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.04.023>.
- (18) Okrah, K.; Tarighat, S.; Liu, B.; Koeppen, H.; Wagle, M. C.; Cheng, G.; Sun, C.; Dey, A.; Chang, M. T.; Sumiyoshi, T.; Mounir, Z.; Cummings, C.; Hampton, G.; Amler, L.; Fridlyand, J.; Hegde, P. S.; Turley, S. J.; Lackner, M. R.; Huang, S. M. Transcriptomic Analysis of Hepatocellular Carcinoma Reveals Molecular Features of Disease Progression and Tumor Immune Biology. *npj Precision Oncology* **2018**, *2*.  
<https://doi.org/10.1038/s41698-018-0068-8>.
- (19) Hurkmans, D. P.; Jensen, C.; Koolen, S. L. W.; Aerts, J.; Karsdal, M. A.; Mathijssen, R. H. J.; Willumsen, N. Blood-Based Extracellular Matrix Biomarkers Are Correlated with Clinical Outcome after PD-1 Inhibition in Patients with Metastatic Melanoma. *Journal for Immunotherapy of Cancer* **2020**, *8*. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001193>.
- (20) Nissen, N. I.; Kehlet, S.; Johansen, A. Z.; Chen, I. M.; Karsdal, M.; Johansen, J. S.; Diab, H. M. H.; Jørgensen, L. N.; Sun, S.; Manon-Jensen, T.; He, Y.; Langholm, L.; Willumsen, N. Noninvasive Prognostic Biomarker Potential of Quantifying the Propeptides of Type XI Collagen Alpha-1 Chain (PRO-C11) in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* **2021**, *149*, 228–238.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.33551>.
- (21) Díaz-Fernández, A.; Lorenzo-Gómez, R.; Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J. Electrochemical Aptasensors for Cancer Diagnosis in Biological Fluids – A Review. *Analytica Chimica Acta* **2020**, *1124*, 1–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.022>.
- (22) Mairal, T.; Cengiz Özalp, V.; Lozano Sánchez, P.; Mir, M.; Katakis, I.; O’Sullivan, C. K. Aptamers: Molecular Tools for Analytical Applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, 989–1007. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1346-4>.
- (23) You, K. M.; Lee, S. H.; Im, A.; Lee, S. B. Aptamers as Functional Nucleic Acids: In Vitro Selection and Biotechnological Applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2003**, *8*, 64–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02940259>.
- (24) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249*, 505–510.

- (25) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- (26) Jayasena, S. D. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clinical Chemistry* **1999**, *45*, 1628–1650.
- (27) Zhou, J.; Battig, M. R.; Wang, Y. Aptamer-Based Molecular Recognition for Biosensor Development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, 2471–2480. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3987-y>.
- (28) Maehashi, K.; Katsura, T.; Kerman, K.; Takamura, Y.; Matsumoto, K.; Tamiya, E. Label-Free Protein Biosensor Based on Aptamer-Modified Carbon Nanotube Field-Effect Transistors. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 782–787. <https://doi.org/10.1021/ac060830g>.
- (29) de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. Modified-RNA Aptamer Based Sensor for Competitive Impedimetric Assay of Neomycin B. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 3808–3809.
- (30) Michaud, M.; Jourdan, E.; Villet, A.; Ravel, A.; Grosset, C.; Peyrin, E. A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 8672–8679.
- (31) de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. Aptamers as Recognition Elements for Label-Free Analytical Devices. *Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27*, 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.03.003>.
- (32) Dunn, M. R.; Jimenez, R. M.; Chaput, J. C. Analysis of Aptamer Discovery and Technology. *Nature Reviews Chemistry* **2017**, *1*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41570-017-0076>.
- (33) Lorenzo-Gómez, R.; Casero-Álvarez, A.; Miranda-Castro, R.; García-Ocaña, M.; de los Toyos, J. R.; de-los-Santos-Alvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J. A Competitive Assay for the Detection of a 16-Mer Peptide from A1 Chain of Human Collagen XI. *Talanta* **2022**, *240*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123196>.
- (34) Pingarrón Carrazón, J. M.; Sánchez Batanero, P. *Química Electroanalítica. Fundamentos y Aplicaciones*; Editorial Síntesis: Madrid, **1999**.

- (35) Fernández Abedul, M. T.; Núñez-Bajo, E. Chronoamperometric Determination of Ascorbid Acid on Paper-Based Devices. In *Laboratory Methods in Dynamic Electroanalysis*; Fernández Abedul, M. T., Editorial Elsevier: Londres, **2020**; 75–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815932-3.00008-5>.
- (36) Wring, S. A.; Hart, J. P. Chemically Modified, Screen-Printed Carbon Electrodes\*. *Analyst* **1992**, *117*, 1281–1286.
- (37) Fletcher, S. Screen-Printed Carbon Electrodes. In *Advances in Electrochemical Science and Engineering*, **2016**; *16*, 425–443. <https://doi.org/10.1002/9783527697489.ch12>.
- (38) Taleat, Z.; Khoshroo, A.; Mazloum-Ardakani, M. Screen-Printed Electrodes for Biosensing: A Review (2008-2013). *Microchimica Acta* **2014**, *181*, 865–891. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1181-1>.



## Anexo: Datos correspondientes a las figuras presentadas

**Tabla I (figura 9a):** Datos correspondientes a la curva de enlace del aptámero B4.

<b>[Aptámero B4] (nM)</b>	<b>Intensidad Promedio (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b>Señal neta (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b>Desv.</b>
<b>0</b>	0,2117	0	0,01
<b>25</b>	0,4337	0,2221	0,04
<b>50</b>	0,6392	0,4276	0,07
<b>100</b>	0,7470	0,5353	0,2
<b>200</b>	1,2754	1,0638	0,4
<b>500</b>	1,4017	1,1901	0,08

**Tabla II (figura 9b):** Datos correspondientes a la curva de enlace del aptámero B4T.

<b>[Aptámero B4T] (nM)</b>	<b>Intensidad Promedio (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b>Señal neta (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b>Desv.</b>
<b>0</b>	0,1912	0	0
<b>5</b>	0,9078	0,7165	0,6
<b>10</b>	1,1093	0,9181	0,06
<b>25</b>	2,8957	2,7044	0,7
<b>50</b>	3,3958	3,2045	0,1
<b>100</b>	3,3615	3,1703	0,4
<b>200</b>	3,7672	3,5760	0,9
<b>500</b>	3,8727	3,6815	0,2

**Tabla III (figura 9c):** Datos correspondientes a la curva de enlace del aptámero D4.

<b>[Aptámero D4] (nM)</b>	<b>Intensidad Promedio (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Señal neta (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Desv.</b>
<b>0</b>	0,2544	0	0,04
<b>5</b>	0,4596	0,2053	0,2
<b>10</b>	0,8426	0,5883	0,2
<b>25</b>	1,3073	1,0529	0,3
<b>50</b>	1,6653	1,4109	0,04
<b>100</b>	1,9593	1,7049	0,5
<b>200</b>	2,4726	2,2182	0,4
<b>500</b>	2,6136	2,3592	0,4

**Tabla IV (figura 9d):** Datos correspondientes a la curva de enlace del aptámero F3.

<b>[Aptámero F3] (nM)</b>	<b>Intensidad Promedio (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Señal neta (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Desv.</b>
<b>0</b>	0,2310	0	0,1
<b>10</b>	0,3838	0,1529	0,07
<b>25</b>	0,7103	0,4793	0,07
<b>50</b>	0,8607	0,6297	0,1
<b>100</b>	0,9706	0,7396	0,03
<b>200</b>	1,1330	0,9021	0,5
<b>500</b>	1,0518	0,8208	0,3

**Tabla V (figura 9e):** Datos correspondientes a la curva de enlace del aptámero C3.

<b>[Aptámero C3] (nM)</b>	<b>Intensidad Promedio (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b>Señal neta (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b>Desv.</b>
<b>0</b>	0,1660	0	0,03
<b>10</b>	0,2641	0,0981	0,08
<b>25</b>	0,3373	0,1712	0,08
<b>50</b>	0,3919	0,2258	0,08
<b>100</b>	0,4421	0,2761	0,1
<b>200</b>	0,5313	0,3653	0,04
<b>500</b>	0,4485	0,2825	0,04

**Tabla VI (figura 9f):** Datos correspondientes a la curva de enlace del aptámero D1.

<b>[Aptámero D1] (nM)</b>	<b>Intensidad Promedio (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b>Señal neta (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b>Desv.</b>
<b>0</b>	0,1442	0	0,05
<b>1</b>	0,4981	0,3538	0,02
<b>5</b>	1,2811	1,1368	0,08
<b>10</b>	1,8960	1,7518	0,2
<b>25</b>	2,7085	2,5642	0,07
<b>50</b>	3,6633	3,5190	0,7
<b>100</b>	4,1208	3,9766	0,4
<b>200</b>	4,1316	3,9874	0,9

**Tabla VII (figura 10):** Datos correspondientes al ensayo competitivo con MPs modificadas con 10mer y 10mer en disolución.

<b>[Aptámero B4T] (nM)</b>	<b>[10mer] (nM)</b>	<b>Intensidad Promedio (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Señal neta (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Desv.</b>
<b>0</b>	0	0,1783	0	0,03
<b>25</b>	0,1	2,7780	2,5998	0,4
<b>25</b>	1	2,8006	2,6223	0,8
<b>25</b>	5	2,5238	2,3455	0,06
<b>25</b>	10	1,5571	1,3788	0,09
<b>25</b>	50	0,8477	0,6694	0,2
<b>25</b>	100	0,7784	0,6001	0,02
<b>25</b>	500	0,6014	0,4231	0,07
<b>25</b>	1000	0,5980	0,4197	0,001

**Tabla VIII (figura 11):** Datos correspondientes al ensayo competitivo con MPs modificadas con 10mer y 16mer en disolución.

<b>[Aptámero B4T] (nM)</b>	<b>[16mer] (nM)</b>	<b>Intensidad Promedio (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Señal neta (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Desv.</b>
<b>0</b>	0	0,3567	0	0,08
<b>25</b>	0,1	2,2393	1,8826	0,3
<b>25</b>	1	2,4031	2,0465	0,4
<b>25</b>	5	2,0783	1,7217	0,6
<b>25</b>	10	1,1634	0,8067	0,4
<b>25</b>	50	0,9322	0,5755	0,2
<b>25</b>	100	1,2583	0,9017	0,4
<b>25</b>	500	1,7517	1,3950	0,4
<b>25</b>	1000	1,4442	1,0875	-

**Tabla IX (figura 12):** Datos correspondientes al ensayo competitivo con MPs modificadas con 16mer y 10mer en disolución.

<b>[Aptámero B4T] (nM)</b>	<b>[10mer] (nM)</b>	<b>Intensidad Promedio (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Señal neta (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Desv.</b>
<b>0</b>	0	0,2011	0	0,02
<b>25</b>	0,1	1,6808	1,4797	0,2
<b>25</b>	1	1,8730	1,6718	0,09
<b>25</b>	5	1,5404	1,3392	0,1
<b>25</b>	10	1,7758	1,5747	0,2
<b>25</b>	50	1,5861	1,3849	0,3
<b>25</b>	100	0,8714	0,6702	0,1
<b>25</b>	500	0,5545	0,3534	0,09
<b>25</b>	1000	0,4685	0,2674	0,09