



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Química Física y Analítica

Programa de doctorado en análisis químico, bioquímico y
estructural y modelización computacional

**DETECCIÓN DE CAMBIOS EN LA
GLICOSILACIÓN DE LA PSA ASOCIADOS
AL CÁNCER DE PRÓSTATA: SELECCIÓN
DE APTÁMEROS Y DISEÑO DE
APTASENORES ELECTROQUÍMICOS**

Tesis Doctoral

ANA DÍAZ FERNÁNDEZ

Oviedo, 2020



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Año Académico: 2020 / 2021

1.- Datos personales del autor de la Tesis		
Apellidos: DÍAZ FERNÁNDEZ	Nombre: ANA	
DNI/Pasaporte/NIE: 15507450-E	Teléfono: 606539734	Correo electrónico: anadfdez@gmail.com

2.- Datos académicos	
Programa de Doctorado cursado: Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	
Departamento en el que presenta la Tesis Doctoral: Química Física y Analítica	
Título definitivo de la Tesis	
Español: Detección de cambios en la glicosilación de la PSA asociados al cáncer de próstata: selección de aptámeros y diseño de aptasensores electroquímicos	Inglés: Detection of prostate cancer-related glycosylation changes in PSA: selection of aptamers and design of electrochemical aptasensors
Rama de conocimiento: Ciencias	

3.- Autorización del Directores y Tutor de la tesis	
D ^a : María Jesús Lobo Castañón	DNI/Pasaporte/NIE: 11073439C
Departamento/Instituto: Química Física y Analítica	
D ^a : Noemí de los Santos Álvarez	DNI/Pasaporte/NIE: 9418716-D
Departamento: Química Física y Analítica	
Autorización del Tutor de la tesis	
D ^a : María Jesús Lobo Castañón	DNI/Pasaporte/NIE: 11073439C
Departamento: Química Física y Analítica	

Autoriza la presentación de la tesis doctoral en cumplimiento de lo establecido en el Art. 32 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, aprobado por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 20 de julio de 2018 (BOPA del 9 de agosto de 2018)

Oviedo, 22 de octubre de 2020

Directoras de la Tesis

Tutora de la Tesis

Fdo.: María Jesús
Lobo Castañón

Fdo.: Noemí de los
Santos Álvarez

Fdo.: María Jesús
Lobo Castañón

SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

RESOLUCIÓN DE PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Año Académico: 2020/ 2021

1.- Datos personales del autor de la Tesis		
Apellidos: Díaz Fernández	Nombre: Ana	
DNI: 15507450-E	Teléfono: 606539734	Correo electrónico: anadfdez@gmail.com

2.- Datos académicos	
Programa de Doctorado cursado: Análisis Químico, bioquímico y estructural y modelización computacional	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	
Departamento en el que presenta la Tesis Doctoral: Química Física y Analítica	
Título definitivo de la Tesis	
Español: Detección de cambios en la glicosilación de la PSA asociados al cáncer de próstata: selección de aptámeros y diseño de aptasensores electroquímicos	Inglés: Detection of prostate cancer-related glycosylation changes in PSA: selection of aptamers and design of electrochemical aptasensors
Rama de conocimiento: Ciencias	
Señale si procede:	
<input checked="" type="checkbox"/> Mención Internacional	
<input checked="" type="checkbox"/> Idioma de presentación de la Tesis distinto al español	
<input type="checkbox"/> Presentación como compendio de publicaciones	

3.- Autorización del Presidente de la Comisión Académica	
D ^a : Elisa Blanco González	DNI: 10581314A
Departamento: Química Física y Analítica	

Resolución: La Comisión Académica del Programa de Doctorado Análisis Químico, bioquímico y estructural y modelización computacional en su reunión de fecha 22 de octubre 2020 acordó la presentación de la tesis doctoral a la Comisión de Doctorado, previa comprobación de que la tesis presentada y la documentación que la acompaña cumplen con la normativa vigente, según lo establecido en el Art.32.8 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, aprobado por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 20 de julio de 2018 (BOPA del 9 de agosto de 2018)

Además, informa:

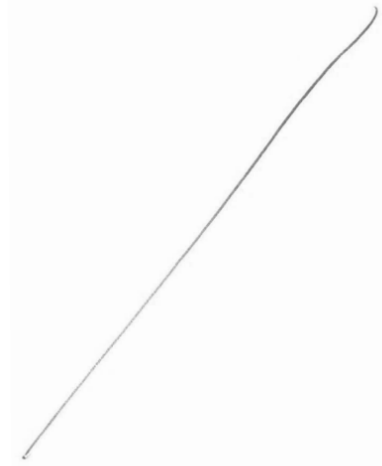
	Favorable	Desfavorable
• Mención Internacional	<input checked="" type="checkbox"/>	€
• Idioma	<input checked="" type="checkbox"/>	€
• Presentación como compendio de publicaciones	€	€

FOR-MAT-VOA-012 (Reg. 2018)



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Justificación



En Oviedo, 22 de octubre de 2020

Presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado

Fdo.: Elisa Blanco González

Contra la presente Resolución, podrá interponer recurso de alzada ante el Rectorado, en el plazo de un mes, a partir del día siguiente al de la presente notificación, de conformidad con el art. 122 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, de Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas

SRA. ANA DÍAZ FERNÁNDEZ
SRA. MARÍA JESÚS LOBO CASTAÑÓN
SRA. NOEMÍ DE LOS SANTOS ÁLVAREZ
SR. DIRECTOR DEL CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Detección de cambios en la glicosilación de la PSA asociados al cáncer de próstata: selección de aptámeros y diseño de aptasensores electroquímicos	Inglés: Detection of prostate cancer-related glycosylation changes in PSA: selection of aptamers and design of electrochemical aptasensors

2.- Autor	
Nombre: Ana Díaz Fernández	DNI: 15507450-E
Programa de Doctorado: Análisis químico, bioquímico y estructural y modelización computacional	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN

El cáncer se asocia con procesos de glicosilación aberrante y en consecuencia cada tipo de cáncer se caracteriza por un cambio distintivo en la estructura de los glicanos enlazados a ciertas proteínas. Por lo tanto, el estudio de las alteraciones en las estructuras de glicanos asociadas al cáncer constituye una herramienta valiosa para el diagnóstico de este conjunto de enfermedades. En concreto, para el cáncer de próstata se han descrito variaciones en la estructura de los glicanos asociados al antígeno específico de la próstata (PSA por sus siglas en inglés), una glicoproteína biomarcadora de este cáncer. Más en detalle, se han descrito cambios en el contenido de ácidos siálicos y fucosa del núcleo en la estructura del glicano y un aumento de las estructuras multiantenarias.

Actualmente la cuantificación de un azúcar específico de una glicoproteína se lleva a cabo mediante ensayos que usan lectinas o derivados de ácido borónico para su reconocimiento. Estos receptores son genéricos para todas las glicoproteínas debido a que solamente tienen la capacidad de unirse a los azúcares. Por este motivo estos se

utilizan en combinación con un receptor específico (anticuerpo o aptámero) de la proteína de interés, para discriminar entre glicoproteínas que poseen los mismos azúcares en su estructura glucídica. Por lo tanto, hay una clara necesidad de disponer de nuevos receptores para las glicoproteínas que incorporen en el reconocimiento tanto a los azúcares como a su región peptídica (reconocimiento binario). Debido a su naturaleza, los aptámeros podrían ser un buen receptor para lograr este reconocimiento binario de las glicoproteínas.

En la presente Tesis Doctoral se han diseñado dos metodologías SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) distintas para dirigir la selección de aptámeros hacia el sitio de glicosilación de la PSA.

El primer SELEX se basa en la incorporación de etapas de contra-selección frente a una forma recombinante de la PSA, que carece de la estructura de glicanos. Así se eliminan de la colección de secuencias de ADN aquellas que se unen a la parte peptídica de la proteína. Tras seis rondas de selección, de las cuales dos fueron contra-selecciones, se identificaron los aptámeros de la última ronda mediante secuenciación masiva y se clasificaron en familias empleando herramientas bioinformáticas. Los aptámeros seleccionados de cada familia se caracterizaron mediante ensayos de unión con detección electroquímica y medidas de SPR para evaluar su afinidad por la PSA y la capacidad de reconocimiento de los glicanos. Uno de los aptámeros seleccionados, el PSA-1, es capaz de reconocer los glicanos pero no tiene selectividad frente a otras glicoproteínas con una estructura de glicanos similar.

En el segundo SELEX se intentó mejorar el proceso de selección para obtener un receptor con la capacidad de reconocimiento binario. Este se basa en la incorporación de etapas de contra-selección frente a la PSA recombinante y la elución competitiva de las secuencias que se hayan unido a la PSA con la lectina PhoSL. Los aptámeros que sobrevivieron hasta la última ronda de selección se clonaron, secuenciaron y se

clasificaron en familias con programas bioinformáticos. Los aptámeros seleccionados se caracterizaron con ensayos de unión con detección electroquímica, obteniéndose uno (PSAG-1) capaz de reconocer específicamente los glicanos de la PSA debido a que interacciona no solo con la estructura de azúcar sino también con aminoácidos del entorno del sitio de glicosilación.

Se estudiaron los complejos aptámero-proteína mediante ensayos empíricos y modelización computacional para conocer los azúcares que están involucrados en el reconocimiento. Con ambas metodologías se observa que el aptámero PSA-1 reconoce a los azúcares más externos del glicano (ácido siálico y galactosa) y que no reconoce la zona peptídica. Por el contrario, el aptámero PSAG-1 reconoce los azúcares más internos de la estructura, incluida la fucosa del núcleo y algunos aminoácidos de la PSA.

Los aptámeros seleccionados y uno ya descrito previamente para la PSA (anti-PSA), que reconoce solo a la PSA por la parte peptídica, se emplearon para la construcción de aptasensores electroquímicos con formato tipo sándwich o directos sin el empleo de marcas, y en ambos casos se utilizaron electrodos de oro como transductor. Ambos aptasensores responden a diferentes concentraciones de PSA en suero humano y se aplicaron al análisis de muestras de suero de pacientes con patologías benignas o malignas de próstata o con patologías no relacionadas con la próstata.

El sensor basado en un formato tipo sándwich, en el que se emplean los aptámeros PSA-1 y anti-PSA, tiene un límite de detección de 0.66 ng/mL y un intervalo de trabajo entre 0.66 ng/mL y 25 ng/mL en suero con una mínima dilución, cubriendo el intervalo de concentraciones con relevancia clínica para el diagnóstico del cáncer de próstata. Además, el sensor desarrollado posee una excelente selectividad frente a otras glicoproteínas y componentes de la sangre. En el análisis de suero de pacientes mostró una mejor capacidad de discriminación entre

pacientes con cáncer de próstata e hiperplasia benigna de la próstata que el test ELISA que se emplea como referencia.

El sensor con un formato directo es una plataforma dual impedimétrica en la que se emplean los aptámeros PSAG-1 y anti-PSA para la cuantificación en suero de la PSA con un determinado patrón de glicosilación y de la PSA total, respectivamente. Estos sensores tienen un intervalo de trabajo entre 0.26 y 62.5 ng/mL para el sistema basado en el aptámero PSAG-1, y entre 0.64 y 62.5 ng/mL para el basado en anti-PSA. Empleando esta plataforma sensora se obtuvo un índice empírico, que se denominó "*Glycan Score*", que mide la relación entre la cantidad de PSA reactiva al aptámero PSAG-1 y la PSA total. La correlación entre el valor del *Glycan Score* y el diagnóstico permite diferenciar claramente entre pacientes con cáncer de próstata de aquellos pacientes sanos o con una patología benigna de la próstata.

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral muestran que la detección de los glicanos asociados a PSA empleando aptámeros es una buena alternativa para la detección del cáncer de próstata, con potencial para mejorar los resultados clínicos del test ELISA para PSA actualmente en uso en los laboratorios clínicos. La traslación de este tipo de ensayos a la clínica podría reducir el número de biopsias de próstata innecesarias para el diagnóstico de cáncer de próstata.

SUMMARY

Cancer is associated with aberrant glycosylation and, as a consequence, each type of cancer is characterized by a distinct change in the structure of glycans bound to certain proteins. Therefore, analysis of tumour-linked glycan alterations is regarded as a valuable tool for cancer diagnosis. In the case of prostate cancer, it has been recently described that there is a variation in the glycans of the glycoprotein Prostate Specific Antigen (PSA). Specifically, it has been described changes in the content of sialic acids and core fucose in the glycan structure, and an increase of multi-antennary structures.

The quantification of a specific sugar of a glycoprotein is currently performed by assays using lectins or boronic acid derivatives for its recognition. These receptors are generic for all glycoproteins because they bind exclusively to the sugar. In consequence, they are used in combination with a receptor (antibody or aptamer) that recognizes the protein in order to discriminate among glycoproteins with identical glycan structures. Therefore, there is a need for new glycan receptors that incorporate in the recognition both the glycan and the peptide region of a glycoprotein (binary recognition). Due to their nature, aptamers could be a good receptor to achieve this binary recognition.

In this Doctoral Thesis two different SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) have been designed to direct the selection of aptamers toward the glycosylation site of PSA.

The first SELEX is based on the incorporation of counter-selection steps against a recombinant PSA (unglycosylated). That way the sequences that bind to the peptide region of the protein are eliminated. After six rounds of selection and two counter-selections, the aptamers in the last cycle were identified by next generation sequencing and classified into families using bioinformatics tools. The selected aptamers from each family are characterized by electrochemical binding assays and surface plasmon resonance measurements to evaluate their affinity

to PSA and the capability of recognizing the glycans. One of the selected aptamers, the so-called PSA-1, recognizes the glycans but it lacks selectivity against other glycoproteins with similar glycan structure.

In the second SELEX the selection process was refined to obtain a receptor with binary recognition. This is based on the incorporation of counter-selection steps against the recombinant PSA (unglycosylated) and the competitive elution using a specific lectin (PhoSL). The aptamers in the last cycle are cloned, sequenced and classified into families using bioinformatic tools. The selected aptamers were characterized by electrochemical binding assays. One of the obtained aptamers specifically recognizes the glycans of PSA due to the simultaneous interaction with some amino acids of the protein.

The aptamer-protein complexes were studied both through empirical characterization and computational modelling to get insight on the sugars involved in the recognition interaction. By using both methods it was observed that PSA-1 aptamer recognizes the external sugars of the protein (sialic acid and galactose) but not the peptide region. In contrast, PSAG-1 aptamer recognizes the innermost sugars, including the core fucose, and the peptide region of PSA.

The selected aptamers and an aptamer previously described, which only recognizes the peptide moiety (anti-PSA), were employed in the development of electrochemical aptasensors, based on sandwich or direct label-free assays using gold electrodes as a support. Both aptasensors respond to different levels of PSA in human serum and were applied to the analysis of serum samples from patients with benign or malignant pathologies of the prostate as well as with other unrelated pathologies.

The sandwich format assay, using PSA-1 and anti-PSA aptamers, has a detection limit of 0.66 ng/mL and a working concentration range between 0.66 ng/mL and 25 ng/mL in serum with minimal dilution,

covering the range of serum PSA concentrations with clinical relevance in the diagnosis of prostate cancer. The sensor has excellent selectivity against other glycoproteins and blood compounds. When it was applied to the analysis of serum samples it shows better discrimination capacity between prostate cancer and benign prostate hyperplasia than the ELISA test used as a reference.

The direct label-free assay was designed as a dual impedimetric platform employing anti-PSA and PSAG-1 aptamers for the quantification of total and glycosylated PSA in serum after a simple dilution. The sensors of this platform have a working concentration range between 0.26 and 62.5 ng/mL for PSAG-1, and between 0.64 and 62.5 ng/mL for anti-PSA. Using this platform, we defined an empirical index, "*Glycan Score*", which measures the ratio between the concentration of PSA reactive to PSAG-1 aptamer and the total PSA concentration. The correlation between the *Glycan Score* and the diagnosis allows clearly differentiating patients with prostate cancer from healthy patients or with a benign pathology of the prostate.

The results obtained in this Doctoral Thesis suggest that the detection of glycans employing aptamers is a promising alternative for the detection of prostate cancer, with potential to improve clinical outcomes of current PSA tests. The translation of these assays to the clinics might reduce the number of unnecessary biopsies at the diagnosis of prostate cancer.

Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Skłodowska-Curie

AGRADECIMIENTOS

Hace cuatro años que comencé la aventura de realizar el doctorado en el Grupo de Electroanálisis. Sí, en electroquímica, a pesar de haber pensado durante la carrera que era la rama de la Química Analítica que menos me gustaba, pero...vaya como nos acaba sorprendiendo el futuro y el destino. Primero empecé haciendo unas prácticas extracurriculares y ahora aquí me encuentro, habiendo realizado una tesis en electroquímica. Por ello quiero agradecer a todas las personas que han recorrido conmigo este camino y que de una manera u otra han hecho que hoy este aquí.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis, las Dras. María Jesús Lobo Castañón y Noemí de los Santos Álvarez, por la confianza que depositaron en mí desde el primer día que comencé en su grupo de investigación, por su continuo apoyo, positivismo, guía y consejo a lo largo de estos años de investigación. Me habéis transmitido todo lo necesario para ser científica y sin vosotras esto no hubiera sido posible.

Quiero agradecer también a la Dra. Rebeca Miranda Castro, por haber estado siempre ahí, por su continuo interés en mis resultados y sus buenos consejos. También quiero dar las gracias al Dr. Arturo Miranda, del cual tuve la suerte de aprender durante los primeros años de mi Tesis, por seguir interesándose por mi trabajo, por su positivismo y sus ideas geniales.

Quiero agradecer también a la Dra. Natalia Díaz y al Dr. Dimas Suárez por su colaboración e implicación en la parte computacional de esta Tesis Doctoral. También al Dr. Eloy Fernández Rodríguez y la Dra. Sara García Alonso del Hospital Universitario de Cabueñes por proporcionar las muestras de suero de PSA.

I would like to thank Dr. Pedro Estrela for welcoming me in his group, for his support and guidance. Thank you for making me feel part of your group.

Los siguientes en esta lista de agradecimientos no podían ser otros que mis Electrolatinos: Ramón, Raquel y Clara. Gracias por todos los momentos vividos tanto dentro como fuera del laboratorio, por vuestro apoyo constante, nuestros cafés, nuestros viernes de llorar y los salseos que hicieron más ameno el trabajo; y también por todos los buenos ratos que pasamos fuera del laboratorio. Gracias por todos los momentos que hemos vivido juntos a lo largo de estos años, sois los mejores compañeros de laboratorio y amigos que jamás podría haberme imaginado.

Gracias a Susana por enseñarme en mis primeros días en el laboratorio y con la que compartí la experiencia SELEX. También a los nuevos miembros del grupo: Paula, Sofía, Alex e Inés con los que he compartido estos últimos meses.

También quiero dar las gracias al resto de compañeros de doctorado del departamento. En especial a las chicas del laboratorio de enfrente: Alba, Olaya y Andrea. Gracias por vuestros consejos, ya que si alguien lo sabía teníais que ser vosotras, y por estar ahí para cualquier cosa que necesité (sobre todo para robaros material). Gracias también a mis compañeros del máster (Franco, Laura, Isa y Loreto) por todos los buenos momentos que vivimos juntos.

I would like to thank all the members of the Biosensors group (Josh, Uros, Kasia, Vishnu, Josephine and Serife) for their warm welcome that made me feel like one of the group from the first moment. In particular, to Josephine, for her help in the lab and for being with me during the long impedance measurements and thank you for being a friend.

No me puedo olvidar de Pelayo, Martín y Pablo, con los que empecé los estudios de Química y que juntos nos adentramos en el doctorado. Ha sido un placer compartir todos estos años con vosotros y sé que si no hubierais estado ahí no habría sido lo mismo. También quiero agradecer a Celia por su apoyo, interés en mi trabajo y por ser una gran compañera de clases de step.

Gracias a Rossella por cruzarte en mi camino al principio de mi aventura en el grupo de electroanálisis, de ti aprendí mucho de lo que sé ahora. Gracias por hacerme más ameno el trabajo con el gluten, por tu continua ayuda y por transmitirme tu perseverancia y pasión por la investigación. Gracias por ser mi amiga y por todos los momentos que vivimos juntas desde que la electroquímica nos juntó.

Gracias también a mis amigas de Candás, mis chicas de “Pipino el Breve”, por interesaros siempre por mi trabajo, alegraros por mis logros y por los chupitos por la ciencia para celebrarlo.

Me gustaría agradecer a mi familia, *güelitos*, tíos y primos, por estar siempre ahí, apoyándome y alegrándose con cada logro que he conseguido.

Gracias Víctor por tu continuo apoyo, tus consejos, tu paciencia en las insoportables charlas sobre mi trabajo de laboratorio y por estar en los buenos y malos momentos por los que he pasado en estos años. Gracias por creer siempre en mí y animarme a perseguir mis sueños.

Por último, quiero agradecer a mi padre y a mi madre, porque gracias a ellos he llegado a donde estoy ahora. Gracias por enseñarme todo lo que sé, por vuestra confianza, consejos, ayuda y apoyo incondicional en todo lo que me he propuesto en la vida. Gracias a vosotros me he convertido en la persona que soy ahora, y gracias a vuestros ideales de que con trabajo y esfuerzo todo se puede lograr, sé que podré conseguir todo lo que me proponga.

AGRADECIMIENTOS POR EL APOYO ECONÓMICO

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral ha sido financiado por la Fundación científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) y la Junta Provincial de Asturias de la AECC a través de la concesión de una beca predoctoral.

Así mismo, la parte del trabajo realizado en la Universidad de Bath ha sido financiado por el Banco Santander y la Universidad de Oviedo mediante una beca de movilidad de excelencia para docentes e investigadores del año 2019.

Por último, los gastos de ejecución asociados a la presente Tesis Doctoral fueron financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ2015-63567-R), y el Ministerio de Ciencia y Universidades del Gobierno Español (RTI2018-095756-B-I00); y por el Gobierno del Principado de Asturias (IDI2018-000217 and IDI2018-000177).



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo



ÍNDICE

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL	I
Resumen.....	I
Summary	V
AGRADECIMIENTOS	XI
AGRADECIMIENTOS POR EL APOYO ECONÓMICO	XV
ÍNDICE	XVII
LISTADO DE ABREVIATURAS	XXIII
CAPÍTULO 1: Introducción	1
1.1 El cáncer de próstata.....	3
1.1.1 Diagnóstico del cáncer de próstata.....	8
1.1.1.1 Tacto rectal.....	9
1.1.1.2 Análisis del antígeno específico de la próstata en sangre..	9
1.1.1.3 Biopsia del tejido de la próstata.....	15
1.1.2 Otros biomarcadores para el diagnóstico del cáncer de próstata	18
1.2 Glicosilación y cáncer	23
1.2.1 Glicosilación aberrante de la PSA.....	29
1.3 Bioensayos para detectar la glicosilación	32
1.3.1 Aptámeros como receptores de biomarcadores glicosilados .	37
1.4 Aptámeros y aptasensores para la PSA.....	42
CAPÍTULO 2: Objetivos/Objectives	45

CAPÍTULO 3: Selección de aptámeros frente a la estructura de glicano de la PSA	51
3.1 Introducción	53
3.2 Protocolos	53
3.2.1 Modificación de las partículas magnéticas	53
3.2.2 Ensayo de Bradford	54
3.2.3 Proceso de selección	55
3.2.4 Ensayos de unión con detección electroquímica	60
3.2.5 Ensayos de unión mediante SPR	62
3.3 Resultados y discusión	64
3.3.1 Proceso de selección	64
3.3.2 Secuenciación masiva e identificación de los aptámeros	72
3.3.3 Caracterización de la afinidad de los aptámeros seleccionados	80
CAPÍTULO 4: Selección de aptámeros con reconocimiento binario de la glicoproteína PSA	89
4.1 Introducción	91
4.2 Protocolos	92
4.2.1 Proceso de selección	92
4.2.2 Clonación	94
4.2.3 Ensayos de unión con detección electroquímica	95
4.3 Resultados y discusión	96
4.3.1 Proceso de selección	96
4.3.2 Caracterización de los aptámeros seleccionados.....	107

4.3.2.1 Estudio estructural del aptámero PSAG-1.....	112
CAPÍTULO 5: Estudio empírico y computacional del sitio de unión de los aptámeros	117
5.1 Introducción	119
5.2 Protocolos	119
5.2.1 Estudio de desglicosilación.....	119
5.2.2 Ensayo de desplazamiento.....	120
5.2.3 Ensayo de unión competitivo.....	121
5.2.4 Modelización computacional	121
5.2.4.1 Predicción de la estructura tridimensional de los aptámeros	121
5.2.4.2 Adecuación de la estructura cristalina de la PSA	122
5.2.4.3 Docking rígido entre el aptámero y la PSA.....	123
5.3 Resultados y discusión	124
5.3.1 Estudio empírico del sitio de unión de los aptámeros.....	124
5.3.2 Estudio computacional del sitio de unión del aptámero PSA-1	130
5.3.3 Estudio computacional del sitio de unión del aptámero PSAG-1.....	133
5.3.3.1 Predicción de la estructura tridimensional del aptámero PSAG-1.....	133
5.3.3.2 Caracterización del aptámero T-PSAG-1	137
5.3.3.3 Modelización del complejo aptámero/proteína	139

CAPÍTULO 6: Aptasensores electroquímicos para detectar la PSA glicosilada	143
6-1: Aptasensores con formato sándwich	147
6-1.1 Introducción.....	147
6-1.2 Protocolos	149
6-1.2.1 Ensayo sándwich sobre electrodos de oro	149
6-1.2.2 Ensayo sándwich sobre electrodos de carbono.....	150
6-1.2.3 Análisis de muestras de suero	151
6-1.3 Resultados y discusión	151
6-1.3.1 Selección y caracterización del aptámero de captura	151
6-1.3.2 Ensayo sándwich empleando el aptámero PSA-1.....	154
6-1.3.2.1 Caracterización del aptasensor	154
6-1.3.2.2 Selectividad del ensayo sándwich.....	158
6-1.3.2.3 Análisis de PSA en muestras de suero	159
6-1.3.3 Ensayo sándwich empleando el aptámero PSAG-1	162
6-2: Aptasensor con formato directo	165
6-2.1 Introducción.....	165
6-2.2 Protocolos	167
6-2.2.1 Fabricación de los electrodos de oro	167
6-2.2.2 Fabricación del aptasensor	168
6-2.2.3 Detección de PSA	169
6-2.2.4 Medidas de EIS.....	169
6-2.2.5 Medidas de SPR.....	169
6-2.3 Resultados y discusión	171

6-2.3.1 Preparación y caracterización de la fase sensora	171
6-2.3.1 Caracterización de la afinidad de los aptámeros inmovilizados.....	174
6-2.3.2 Caracterización analítica de la plataforma dual impedimétrica	175
6-2.3.3 Análisis de PSA en muestras reales.....	179
6-3 Utilidad clínica de los aptasensores	185
CAPÍTULO 7: Conclusiones y perspectivas de futuro	191
7.1 Conclusiones	193
7.2 Perspectivas de futuro	197
7.3 Conclusions	198
7.4 Future perspectives.....	202
BIBLIOGRAFÍA	203
ANEXOS	227
A1: Reactivos e instrumentación	229
A1.1 Reactivos	229
A1.2 Disoluciones	234
A1.3 Instrumentos y equipos	235
A2: Producción científica	237
A2.1 Artículos científicos.....	237
A2.2 Participación en congresos	238
A2.2.1 Congresos internacionales.....	238
A2.2.1 Congresos nacionales.....	240

LISTADO DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ACT	α 1-antiquimotripsina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AFP	α -fetoproteína
AFP-L3	Fracción de la AFP reactiva a la lectina <i>Lens culinaria</i>
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
AuNPS	Nanopartículas de oro
BPSA	PSA benigna
BSA	Albúmina de suero bovino
btn	Biotina
C	Citosina
cPSA	PSA complejada
CTCs	Células tumorales circulantes
ctNA	Ácidos nucleicos tumorales circulantes
ΔG	Energía libre de Gibbs
dNTPs	Desoxinucleótidos tri-fosfato
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
EIS	Espectroscopia de impedancia electroquímica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FDA	U.S. Food & Drug administration

fPSA	PSA libre
6FAM	Fluoresceína
Fuc	L-fucosa
G	Guanina
Gal	D-Galactosa
GaMD	Dinámica molecular con acelerado gaussiano
GalNac	N-acetil-D-galactosamina
Glc	D-glucosa
GlcA	Ácido D-glucorónico
GlcNac	N-acetil-D-glucosamina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GS	Glycan score
GST	Glutación-S transferasa
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
hK2	Calicreína 2
hPSA	PSA humana
HSA	Albúmina de suero humano
IdoA	Ácido L-idurónico
IgG	Inmunoglobulina G
iPSA	PSA inactiva
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
K_D	Constante de disociación
4Kscore	Panel de cuatro calicreínas
LBS	Medio selectivo de <i>Lactobacillus</i>

LD	Límite de detección
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Man	Manosa
mARN	ARN mensajero
miARNs	Micro ARN
MD	Dinámica molecular
Met	Metionina
MIP	Polímeros molecularmente impresos
MH	6-mercapto-1-hexanol
MPs	Micropartículas magnéticas
MS	Espectrometría de masas
MUA	Ácido 1-mercaptoundecanoico
NAG	N-acetil-D-glucosamina
NHS	N-hidroxisuccinimida
NGAL	Lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos
NeuAc	Ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico
Neu5Ac	Ácido N-acetilneuramínico
nt	Nucleótidos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCA3	Gen del cáncer de próstata 3
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas

PHI	Índice de salud prostática
PhoSL	Lectina <i>Pholiota squarrosa</i>
POC	Análisis a la cabecera del paciente
PSA	Antígeno específico de la próstata
p2PSA	[-2]proPSA
PSAD	Densidad de la PSA
PSAV	Velocidad de la PSA
qRT-PCR	PCR cuantitativa con transcripción inversa
R_{ct}	Resistencia a la transferencia de carga
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROC	Características operativas del receptor
rPSA	Antígeno específico de la próstata recombinante
RT	Temperatura ambiente
SA	Ácido siálico
SAM	Monocapa autoensamblada
SELEX	Evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial
Ser	Serina
S.O.C	Medio de caldo superóptimo con represión por catabolito
SPAuE	Electrodos serigrafados de oro
SPR	Resonancia de plasmón superficial
ssADN	ADN de hebra simple
T	Timina
tARN	ARN de transferencia
Thr	Treonina

TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
tPSA	PSA total
VIS-UV	Visible-ultravioleta
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
Xyl	D-xilosa

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1 El cáncer de próstata

El término cáncer da nombre a un grupo de enfermedades en las que se produce un crecimiento descontrolado de células anormales, que al multiplicarse sin interrupción invaden los tejidos cercanos. De esta manera y siendo transportadas por los sistemas sanguíneo y linfático pueden llegar a diseminarse por todo el cuerpo¹. Las características distintivas del cáncer que permiten el crecimiento del tumor y la formación de metástasis comprenden seis capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo por pasos de los tumores: la capacidad de mantener la señalización proliferativa, de evadir los mecanismos que limitan la proliferación (activación de genes supresores del crecimiento), de resistir a la muerte celular, de permitir la inmortalidad replicativa impidiendo la senescencia, de inducir la angiogénesis y de activar los mecanismos de invasión y metástasis².

Un tipo específico de cáncer es el producido en la próstata. Se trata del segundo cáncer más comúnmente diagnosticado en hombres y la quinta causa de muerte a nivel mundial; en 2018 se diagnosticaron 1276106 casos nuevos y se registraron 358989 muertes. La incidencia y mortalidad en todo el mundo está relacionada con el envejecimiento, con una edad promedio en el momento del diagnóstico de 66 años. Cabe destacar que las tasas de incidencia y la mortalidad son mayores en los hombres afroamericanos que en los blancos, debido posiblemente a diferencias en los factores sociales, ambientales y genéticos³. En España, es el tercer cáncer en incidencia, si se tienen en cuenta ambos sexos, y en los varones es el primero en incidencia y el tercero en mortalidad⁴.

Este cáncer tiene lugar en la próstata, una glándula pequeña (~ 4 cm de largo por 3 cm de ancho, en hombres jóvenes y sanos) con forma de castaña, que se encuentra en la pelvis y es atravesada directamente por la uretra. La próstata está rodeada por el recto en la parte posterior, y por la vejiga en la superior. Detrás de la próstata se encuentran las glándulas seminales⁵ (Figura 1.1). La próstata constituye una parte del sistema

1.1 El cáncer de próstata

urinario y reproductor masculino, relacionándose anatómicamente con otras estructuras como los conductos deferentes y las vesículas seminales.

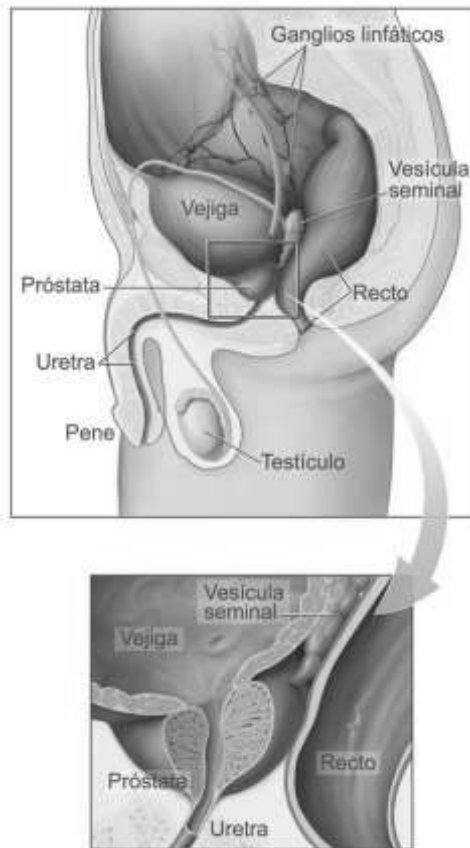


Figura 1.1: Situación anatómica de la próstata en el sistema reproductor masculino. Obtenida de National Institute of Health (NIH), imagen de dominio público.

Desde el punto de vista fisiológico, la principal función de la próstata es la de actuar como una glándula secretora involucrada en la eyaculación. Las secreciones de la próstata constituyen aproximadamente el 20 % del semen y contienen sustancias que proporcionan nutrientes y un medio adecuado para la supervivencia y activación de los espermatozoides⁶.

Histológicamente, la próstata está formada en un 70 % por epitelio glandular y en un 30 % por estroma fibromuscular, ambos fundidos y envueltos por la cápsula prostática. La próstata se puede dividir en tres

zonas: la zona central, la de transición y la periférica (Figura 1.2). Estas regiones tienen diferentes orígenes embriológicos y pueden distinguirse por sus histologías, puntos de referencia anatómicos, funciones biológicas y susceptibilidad a trastornos patológicos. La zona central es relativamente resistente a la aparición de patologías mientras que la zona de transición es en la que habitualmente se desarrolla el adenoma de próstata (tumor benigno). Es en la zona periférica donde se producen la mayor parte de los procesos cancerosos⁷.

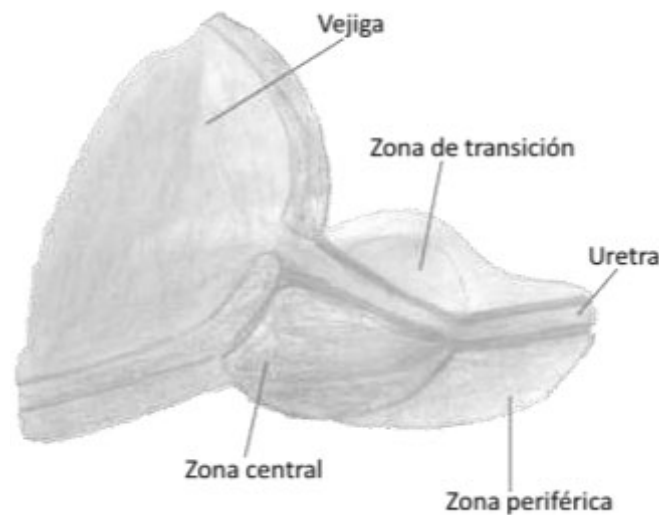


Figura 1.2: Esquema de la localización de las tres zonas en las que se divide la próstata: central en morado, periférica en azul y de transición en amarillo.

El 95 % de los cánceres de próstata son adenocarcinomas que surgen en las células epiteliales del tejido glandular. Se distinguen tres tipos de células epiteliales: células lumbinales, encargadas de la producción de proteínas secretoras liberadas en el esperma durante la eyaculación; células neuroendocrinas que se encuentran dispersas por toda la capa epitelial y se cree que contribuyen al crecimiento y mantenimiento prostático; y células madre indiferenciadas encargadas de mantener la población de células epiteliales⁸. Cuando se produce el cáncer de próstata, algunas células epiteliales normales del tejido glandular de la próstata se

1.1 El cáncer de próstata

transforman en células malignas (cancerosas) y comienzan a multiplicarse repetidamente sin control. La proliferación de estas células cancerosas está controlada por una interacción compleja entre las propias células epiteliales, los componentes de la matriz extracelular y las células del estroma⁹. Estas células cancerosas, si no se eliminan, pueden pasar al sistema linfático y al torrente sanguíneo, llegando a otras partes del cuerpo donde se alojan y crecen tumores secundarios. El cáncer de próstata provoca predominantemente metástasis en los huesos dando lugar a lesiones osteoblásticas, que se caracterizan por un aumento en el crecimiento óseo. También puede producir metástasis en los pulmones, ganglios linfáticos, hígado y cerebro¹⁰ (Figura 1.3). Los andrógenos tienen una gran influencia tanto en el inicio como en el desarrollo de este cáncer¹¹.

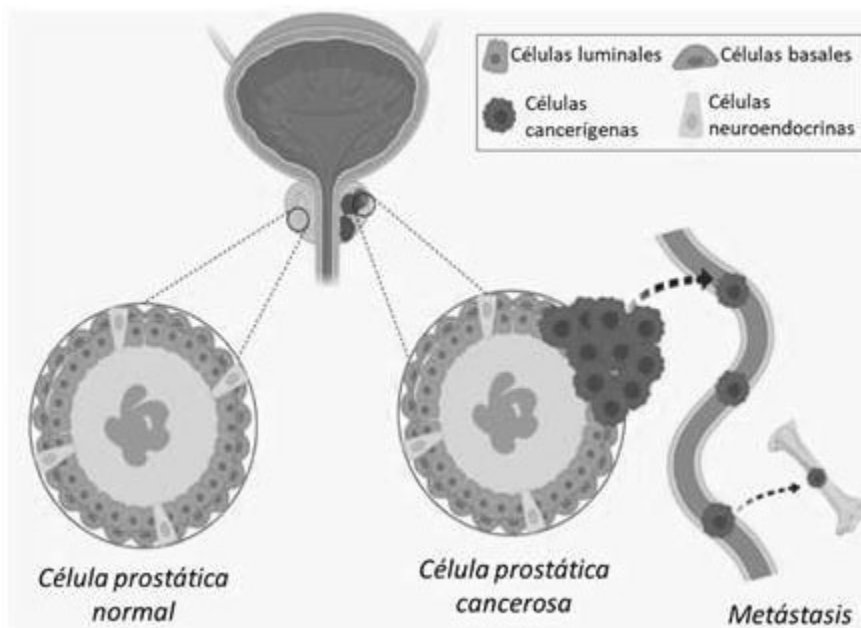


Figura 1.3: Comparación de las células prostáticas normales y cancerosas. Representación de la agrupación de células cancerosas, que acaban pasando al torrente sanguíneo y creando metástasis en los huesos.

Los factores de riesgo que favorecen el desarrollo de cáncer de próstata son los siguientes^{12,13}:

- **Edad**

La incidencia del cáncer de próstata se ve fuertemente incrementada con la edad. Típicamente este cáncer se desarrolla lentamente y puede estar precedido por lesiones displásicas. Los estudios realizados a partir de los resultados de autopsias sugieren que la mayoría de los hombres padecerían cáncer de próstata si vivieran más de 100 años.
- **Etnia**

El cáncer de próstata presenta distinta incidencia según la zona del mundo. Se ha encontrado una mayor incidencia en los varones afroamericanos, mientras que la menor aparece en los varones chinos.
- **Historial familiar**

Diversos estudios han encontrado una prevalencia del cáncer en algunas familias, observándose que aquellos varones con antecedentes familiares de primer grado (padre y/o hermanos) que tienen cáncer de próstata presentan un riesgo dos veces superior de padecer esta enfermedad.
- **Cambios en los genes**

Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 están asociadas con algunos cánceres de próstata. Las mutaciones en BRCA2 están asociadas con cánceres de mayor grado, progresión rápida y menor supervivencia. Otro gen que se ve afectado es el HOXB13, aunque estas alteraciones en los genes no explican más del 10 % de los casos de cáncer de próstata.
- **Alteraciones hormonales**

Se ha descrito que la reducción de los andrógenos (testosterona) y altos niveles de estrógenos podrían reducir el riesgo de sufrir cáncer de próstata.

1.1 El cáncer de próstata

- **Dieta**

Una dieta rica en alto contenido en grasas y la ingesta de mucha carne roja podría aumentar el riesgo de padecer cáncer de próstata, aunque no hay una evidencia consistente.

Otros factores de riesgo podrían ser la obesidad, las infecciones en el tracto urinario, y la exposición a ciertas sustancias químicas como el cadmio.

1.1.1 Diagnóstico del cáncer de próstata

La mayoría de los hombres que padecen cáncer de próstata en un estadio temprano no presentan síntomas derivados del cáncer propiamente dicho. Sin embargo, cuando el cáncer se encuentra en un estado avanzado puede provocar síntomas en el tracto urinario inferior (obstrutivo o irritante), hematospermia, disminución del volumen eyaculado y disfunción eréctil si el cáncer se extiende más allá de la próstata afectando al cuello de la vejiga, la uretra, los conductos eyaculadores, las vesículas seminales o los nervios erectogénicos, respectivamente¹⁴.

Sin embargo, estos síntomas también son compatibles con otras enfermedades de la próstata como la hiperplasia benigna de próstata (HBP). Por este motivo es muy importante realizar tanto un cribado poblacional como un diagnóstico precoz, en estadios tempranos de la enfermedad, cuando los síntomas aún no son visibles y el tratamiento y la curación son más favorables. De ahí el interés de disponer de biomarcadores adecuados que puedan identificar la presencia del tumor.

Un biomarcador se define como una característica definida que se mide como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas biológicas a una exposición o intervención, incluida la intervención terapéutica. En concreto un biomarcador de diagnóstico se define como el biomarcador utilizado para detectar o confirmar la

presencia de una enfermedad o condición de interés o para identificar individuos con un subtipo de la enfermedad¹⁵.

En el caso concreto del cáncer de próstata, las pruebas diagnósticas que se realizan actualmente son el tacto rectal, el análisis del antígeno específico de la próstata en sangre y la biopsia de tejido prostático. A continuación, se describen estas pruebas, sus inconvenientes, así como otros biomarcadores o combinaciones que se están explorando en la actualidad para la detección del cáncer de próstata.

1.1.1.1 Tacto rectal

Hasta 1990 el tacto rectal era la prueba más común para el cribado del cáncer de próstata, y de otras enfermedades en la parte inferior del recto y la pelvis. Se trata de una prueba de detección rutinaria usada para localizar bultos o endurecimientos en la próstata. El tacto rectal es una prueba útil cuando el volumen de la próstata es aproximadamente 0.2 mL o mayor. Sin embargo, no permite diagnosticar por si sola el cáncer de próstata debido a la falta de especificidad y precisión, y porque los resultados también dependen de las habilidades del médico que realiza la prueba¹⁶.

1.1.1.2 Análisis del antígeno específico de la próstata en sangre

Esta prueba consiste en la medida de la concentración, en ng/mL, del antígeno específico de la próstata (PSA por sus siglas en inglés, *Prostate Specific Antigen*) existente en la sangre. Desde que la proteína PSA fuera descubierta en 1979 por Wang y sus colaboradores¹⁷, el diagnóstico del cáncer de próstata cambió drásticamente, convirtiéndose la PSA en el marcador de referencia para el cribado de este cáncer.

La PSA es una glicoproteína de 33 kDa producida por las células epiteliales de la próstata, tanto en los tejidos prostáticos sanos como en los tejidos con cáncer de próstata de cualquier grado y estado. Esta proteína se libera al líquido seminal donde su concentración está

comprendida entre 0.3 y 3 mg/mL. La PSA es una serina proteasa y tiene actividad enzimática de quimotripsina, siendo así su principal función la de licuar el líquido seminal, rompiendo las proteínas semenogelin I y II¹⁶.

Esta proteína pertenece a la familia de las proteasas glandulares denominadas calicreínas. En los humanos, los genes que codifican para las quince calicreínas glandulares se agrupan en una región que abarca aproximadamente 280 kb del cromosoma 19q133–4. La regulación de la PSA por los andrógenos se efectúa a través de los elementos de respuesta androgénica que se encuentran en el promotor del gen que codifica la PSA, el gen KLK3, y por esta razón a la PSA también se la conoce como calicreína 3 o hK3¹⁸.

La PSA se sintetiza inicialmente como un pre-propolipéptido (preproPSA) cuya secuencia de aminoácidos se representa en la Figura 1.4. Esta proteína contiene un péptido señal de 17 aminoácidos, que posteriormente se escinde para generar una proteína precursora y enzimáticamente inactiva de 244 aminoácidos ([-7]proPSA). La escisión de los siete aminoácidos N-terminales en la proPSA genera la PSA activa, de 237 aminoácidos y 33 KDa, que tiene cinco enlaces disulfuro intracadena y un único sitio de glicosilación unido a la asparagina. La escisión de la proPSA normalmente ocurre como se ha indicado, entre la arginina de la posición 7 y la isoleucina de la posición 8, convirtiéndose este aminoácido en el N-terminal de la proteína madura activa. Esta escisión la lleva a cabo principalmente la enzima activadora hK2 (calicreína 2). También tienen lugar otras escisiones en sitios específicos, generando la PSA inactiva (iPSA) y la PSA benigna (BPSA). Además, dentro de las células se produce el truncamiento de la proPSA dando lugar a diferentes isoformas con un péptido señal de uno ([-1]proPSA), dos ([-2]proPSA), cuatro ([-4]proPSA) o cinco aminoácidos ([-5]proPSA)^{19,20}.

1
17
24
MWVPVVFLTLSVTWIGAAPLILSRIVGGWECEKHSQPWQVLVASR
 GRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSVILLGRHSLFHPEDTGQVFQ
 VSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSHDLMLLRLSEPAELTDAVKV
 MDLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLTPKKLQCVDLHVISNDVCA
 QVHPQKVTKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSW
261
GSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP

Figura 1.4: Secuencia de aminoácidos del pre-propolipéptido de la PSA. En azul se indica el péptido señal de 17 aminoácidos que se escinde para dar lugar a la proPSA. En naranja, la secuencia de 7 aminoácidos que se pierde para generar la PSA madura y activa. Secuencia obtenida de la base de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org>).

La estructura de la próstata mantiene la PSA fuertemente confinada en su interior, de modo que solo una pequeña porción se filtra al sistema circulatorio, siendo la concentración de PSA en la sangre (< 4 ng/mL) un millón de veces menor que en el líquido seminal^{21,22}. En la sangre, la PSA presenta una menor o nula actividad enzimática debido a la presencia de una gran concentración de inhibidores como la α 1-antiquimotripsina (ACT) y la α 2-macroglobulina, que inactivan la PSA mediante la formación de complejos covalentes estables²³.

La PSA total (tPSA) circulante en la sangre engloba diferentes formas moleculares de la PSA (Figura 1.5). El 84% de la PSA total se encuentra complejada a inhibidores (cPSA). El 16 % restante corresponde a la PSA libre (fPSA), aquella proteína que no se encuentra complejada con ningún inhibidor. Dentro de la PSA libre se incluyen varias isoformas de la proPSA ya descritas, la PSA benigna (BPSA) y la PSA inactiva (iPSA)²⁰.

1.1 El cáncer de próstata

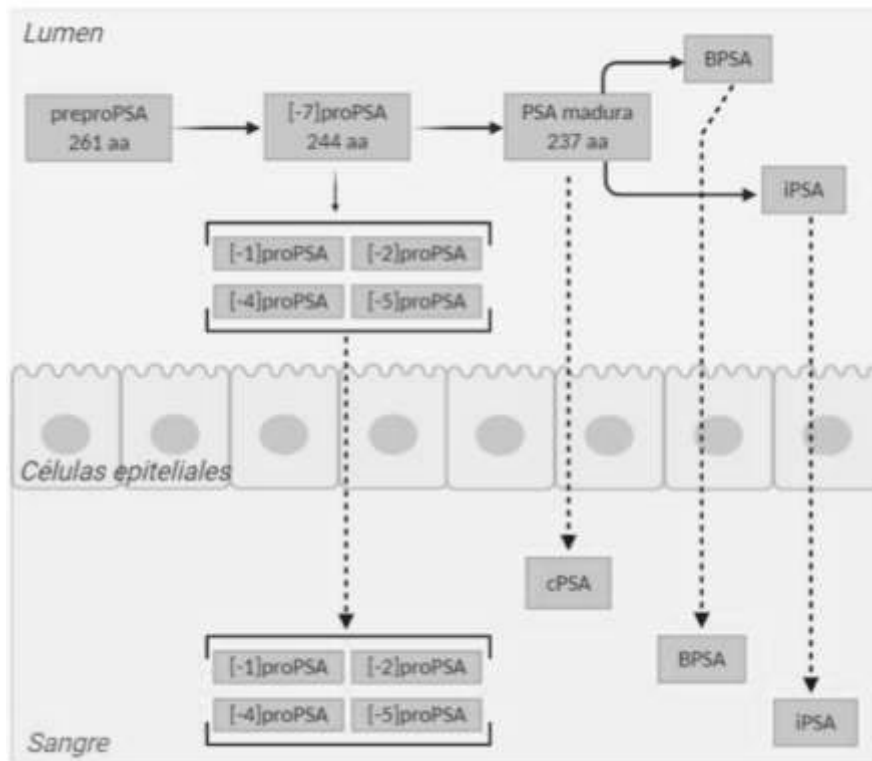


Figura 1.5: Descripción de la síntesis de la PSA en las células y de las isoformas presentes en la sangre.

Los niveles normales de PSA en la sangre pueden verse elevados por la destrucción de la membrana basal de las células epiteliales de la próstata, causada por la presencia del cáncer de próstata, pero también por enfermedades benignas de la misma, como la hiperplasia benigna de próstata (HBP) o por traumas físicos en la misma, e incluso por la edad o el aumento del volumen prostático. De esta forma, una elevación en los niveles de PSA en la sangre es indicativo de patologías de la próstata, pero no es una prueba específica de cáncer²⁴.

Por este motivo el análisis de los niveles de PSA en sangre, con los métodos actuales de cuantificación, es una prueba de cribado, que solo indica la posibilidad de tener cáncer y siempre es necesario la realización de una biopsia para su confirmación.

La FDA (U.S. Food and Drug Administration) aprobó en 1986 la medida de la concentración total de PSA en sangre para la monitorización de los pacientes con tratamientos contra el cáncer de próstata y como marcador de cribado del cáncer de próstata en 1994²⁵. En un principio se estableció un valor de corte de 4 ng/mL como valor discriminante para recomendar la biopsia de próstata. Posteriormente, se estableció la denominada zona gris, para valores entre 4 y 10 ng/mL; en este intervalo el resultado no es concluyente y antes de realizar la biopsia se recomienda realizar otras pruebas o un seguimiento del nivel de PSA con el tiempo. Además, algunos estudios recientes han encontrado que aproximadamente el 20 % de los hombres con valores de PSA inferiores a 4 ng/mL tienen cáncer de próstata (falsos negativos), y que por el contrario, en muchos casos niveles de PSA muy superiores no se corresponden con cáncer de próstata (falsos positivos), demostrando la baja especificidad de este marcador²⁶.

Para la realización de esta prueba hay muchos ensayos comerciales disponibles, siendo el método de referencia el test Hybritech® tras su aprobación por la FDA en 1986 y posteriormente su adaptación a una prueba automática (Access® Immunoassay System) en el año 2000. La mayoría de los nuevos test diseñados para la PSA se validan y calibran respecto al test Hybritech®²⁷. Todos ellos tienen en común que son inmunoensayos enzimáticos (ELISA) tipo sándwich para la cuantificación de PSA total, suma de la PSA libre y la PSA complejada a inhibidores. Esta prueba se basa en la reacción anticuerpo-antígeno-anticuerpo, y para ello se utilizan dos anticuerpos, uno de captura que se inmoviliza sobre una superficie, y otro de detección, que está marcado y proporciona una señal (quimioluminiscente o colorimétrica), que se relaciona con la concentración de PSA en la sangre.

A pesar del amplio uso de la PSA para el cribado del cáncer de próstata y como consecuencia de que se trata de un marcador específico de órgano más que de cáncer, un valor elevado de la PSA obliga a la realización de una biopsia para descartar o confirmar la presencia del cáncer. De hecho,

diversos estudios muestran que hasta el 75 % de los hombres con un valor de PSA elevado tienen un resultado benigno de biopsia, es decir, el análisis de la PSA produce un gran número de falsos positivos con los problemas asociados que conlleva, no solamente la realización de una biopsia innecesaria, sino también los problemas psicológicos y de estrés que provoca tanto a los pacientes como a sus familiares²⁸. Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas o pruebas complementarias como el análisis de la PSA libre, la densidad o velocidad de la PSA.

- **Porcentaje de PSA libre (% fPSA)**
El término PSA libre hace referencia a aquella proteína que una vez en la sangre no se encuentra complejada con ningún inhibidor. El porcentaje de PSA libre se define como la cantidad de PSA libre presente en el suero respecto a la de PSA total. Algunos estudios han demostrado que el porcentaje de PSA libre en el suero es menor en pacientes con cáncer de próstata que en aquellos que padecen HBP, pudiendo ser una buena herramienta para distinguir estas dos enfermedades en aquellos casos en los que el resultado del análisis de la PSA total está en la zona gris²⁹.
- **Densidad de la PSA (PSAD)**
Debido a que los niveles de la PSA dependen del volumen de la próstata, en 1992 Benson y colaboradores introdujeron el término “densidad de la PSA”³⁰, que correlaciona los niveles de PSA con el volumen de la próstata. PSAD se define como la cantidad de PSA total dividida entre el volumen prostático, calculado mediante un tacto rectal. El incremento en PSAD está asociado con un mayor riesgo de padecer cáncer de próstata³¹.
- **Velocidad de la PSA (PSAV)**
Este parámetro hace referencia a los cambios en los niveles de PSA en la sangre con el tiempo y se define como el cambio en la concentración de PSA por año (ng/mL·año). Para hombres con una concentración de PSA por debajo de 4 ng/mL, se observó que un valor de PSAV mayor de 0.75 ng/mL·año se asociaba

significativamente con la presencia de cáncer de próstata. En cambio, para aquellos que tiene un valor de PSA mayor de 4 ng/mL se estableció un valor de corte de 0.4 ng/mL·año³².

1.1.1.3 Biopsia del tejido de la próstata

Es la única prueba con la que es posible confirmar la presencia del cáncer de próstata y se realiza siempre que las otras pruebas diagnósticas hayan proporcionado resultados compatibles con la posibilidad de padecerlo. Consiste en la obtención de pequeñas muestras de tejido prostático para su posterior análisis al microscopio. La obtención de las muestras, guiada con un ecógrafo transrectal, se realiza introduciendo una aguja delgada y hueca en la próstata, a través de la pared del recto (biopsia transrectal) o a través de la piel entre el escroto y el ano (biopsia transperineal). Al retirar la aguja se extrae un pequeño cilindro del tejido prostático. Normalmente se utilizan antibióticos de fluoroquinolona para la preparación de los tejidos prostáticos³³.

Esta prueba es sencilla y corta, aunque es molesta e incluso dolorosa en algunos casos. No suele tener riesgos asociados, aunque puede provocar algunas complicaciones debido a su carácter invasivo, como hemorragias, infecciones urinarias o prostáticas y retención urinaria, que en la mayoría de los casos no son graves y se solucionan con el tratamiento adecuado³⁴.

La técnica óptima para realizar la biopsia, incluyendo la cantidad de muestras a tomar y la colocación de la aguja para obtener el tejido, sigue sin estar del todo clara, pudiendo darse la posibilidad de perder un cáncer relevante. Sin embargo, se ha observado que las biopsias realizadas dentro de la zona periférica de la próstata pueden ser importantes para excluir el cáncer de próstata en hombres con valores elevados de PSA y resultados no sospechosos en el tacto rectal. Recientemente, la identificación mediante resonancia magnética de las biopsias está ganando popularidad

1.1 El cáncer de próstata

para identificar con mayor precisión los cánceres de alto grado y para reducir el muestreo de cánceres de bajo grado.

Las muestras obtenidas son analizadas al microscopio para observar si los tejidos contienen células cancerosas, dando lugar a tres posibles resultados: positivo para cáncer, en el que se han observado células cancerosas en las muestras de tejido; negativo para cáncer, no se observan células cancerosas en las muestras de tejido; y sospechoso, se ha observado algo anormal en las muestras de tejido, pero puede que no sea cáncer^{14,33}.

Si se encuentran células cancerosas en la biopsia se las clasifica histológicamente asignándoles un grado, que hace referencia al grado de diferenciación de las células neoplásicas. El sistema de graduación más ampliamente utilizado es el sistema de Gleason, aunque también se empiezan a aplicar métodos alternativos como el propuesto en 2013 por un grupo de investigadores del hospital Johns Hopkins y que ha sido aceptado por la Organización Mundial de la Salud³⁵.

El sistema de puntuación de Gleason o grado de Gleason se basa en el patrón arquitectónico de las células cancerosas, numerado desde 1 (bien diferenciadas) hasta 5 (pobrementemente diferenciadas). Los patrones para cada grado fueron definidos y dibujados por el Dr. Donald F. Gleason (Figura 1.6)³⁶.



Figura 1.6: Sistema de Gleason para la clasificación de los adenocarcinomas de próstata en 5 grados según su patrón arquitectónico. Adaptación del dibujo original del Dr. D. F. Gleason.

Debido a la heterogeneidad que presentan algunos cánceres de próstata, estos cinco patrones básicos se utilizan para generar una segunda puntuación histológica, que puede variar desde 2 a 10. Para obtener esta puntuación final, se combinan el patrón primario, el más abundante en el área de estudio, y el secundario, el segundo más abundante, sumándose ambos. Si solo se observa un grado en la muestra de tejido, este se multiplica por dos. Según esta segunda puntuación de Gleason se pueden agrupar los cánceres en cinco categorías que van desde 1, más propensos a crecer y propagarse lentamente, hasta 5, más propensos a crecer y propagarse rápidamente.

- Grupo de grado 1: Puntuación de Gleason de 6 o menor.
- Grupo de grado 2: Puntuación de Gleason de 3+4=7.
- Grupo de grado 3: Puntuación de Gleason de 4+3=7.
- Grupo de grado 4: Puntuación de Gleason de 8.
- Grupo de grado 5: Puntuación de Gleason de 9 a 10.

1.1 El cáncer de próstata

A los cánceres con una puntuación de Gleason 6 o menor se les denomina cánceres bien diferenciados o de bajo grado; a los de puntuación 7, cánceres moderadamente diferenciados o de grado intermedio y a los de puntuación de 8 a 10, cánceres pobremente diferenciados o de alto grado. El sistema de puntuación de Gleason es una de las mejores herramientas para predecir resultados específicos del cáncer; cuanto mayor sea el grado de Gleason, mayor es el riesgo de progresión del cáncer, con o sin tratamiento^{14,37}.

1.1.2 Otros biomarcadores para el diagnóstico del cáncer de próstata

Debido a los problemas asociados al uso del antígeno específico de la próstata como biomarcador para el cribado del cáncer de próstata, se están buscando nuevos biomarcadores no invasivos para conseguir un diagnóstico más fiable y evitar la realización de biopsias innecesarias.

Una alternativa prometedora a las biopsias de tejidos es la llamada biopsia líquida, definida como la detección de biomarcadores relacionados con el tumor en una muestra de fluido biológico. Esta presenta múltiples ventajas ya que es una técnica mínimamente invasiva, suele llevar asociado un bajo consumo de reactivos y es relativamente fácil de usar. Las biopsias líquidas se han centrado fundamentalmente en el análisis de células tumorales circulantes (CTCs), ácidos nucleicos tumorales circulantes (ctNA) y vesículas extracelulares (exosomas) derivadas de tumores, que se hayan desprendido de los tumores o de las zonas metastásicas al torrente sanguíneo, saliva, orina y líquido cefalorraquídeo, entre otros fluidos periféricos³⁸. En un sentido más amplio, también se pueden incluir como biomarcadores en biopsia líquida proteínas circulantes o metabolitos asociados específicamente al tumor.

En concreto para el cáncer de próstata se han propuesto los siguientes nuevos biomarcadores o combinaciones de ellos para poder llevar a cabo biopsias líquidas tanto en sangre como en orina.

- Índice de salud prostática

El índice de salud prostática de Beckam Coulter (PHI por sus siglas en inglés *Prostatic Health Index*) es un parámetro que se define mediante una fórmula matemática en la que se combina la concentración en suero de tres isoformas de la PSA, la [-2]proPSA (p2PSA), la PSA libre y la PSA total. El PHI se calcula mediante la siguiente ecuación $([p2PSA]/[fPSA]) \times \sqrt{[tPSA]}$. Este índice fue aprobado por la FDA en 2012 para el diagnóstico temprano del cáncer de próstata en hombres mayores de 50 años, con niveles de PSA en la zona gris y un tacto rectal no sospechoso, tras un estudio realizado por varios centros en el que se relacionaban valores altos de PHI (mayores de 35) con el cáncer de próstata^{39,40}. Además, los valores de PHI se pueden asociar con la agresividad del cáncer, ya que los pacientes con cánceres más agresivos presentan valores más altos⁴¹.

- Panel de cuatro calicreínas

El panel de cuatro calicreínas (4Kscore) es un algoritmo que combina la concentración en suero de cuatro proteínas de la familia de las calicreínas, la PSA total, PSA libre, PSA intacta y la calicreína humana 2, en combinación con parámetros clínicos (edad, hallazgos en el tacto rectal e historial de biopsias previas) para predecir el riesgo que tiene un paciente de sufrir cáncer de próstata de alto grado⁴². El panel de cuatro calicreínas, que se puede realizar con la prueba 4Kscore® comercializada por OPKO Inc., permite reducir el número de hombres que se someten a biopsias, utilizando un umbral de riesgo del 6 % para el cáncer de próstata de alto grado⁴¹.

- Glicoformas de la PSA

La PSA, como la mayoría de los marcadores tumorales séricos, es una glicoproteína. Se han descrito cambios específicos en los patrones de glicosilación de la PSA en las células tumorales LNCaP⁴³. Se ha demostrado que estas diferencias también se

pueden encontrar en la PSA sérica, observándose diferentes patrones de glicosilación entre pacientes con cáncer de próstata y sanos⁴⁴.

- Células tumorales circulantes (CTCs)

Las células tumorales tienen la capacidad de atravesar las paredes de los vasos y llegar al torrente sanguíneo, donde pueden ser detectadas. La única plataforma aprobada por la FDA para la detección de CTCs provenientes de cáncer de próstata es CellSearch[®], que permite la detección de CTCs mediante un método directo basado en una captura inmunológica seguida de una combinación de selecciones inmunológicas positivas y negativas. Este método se está comenzando a aplicar a pacientes con cáncer de próstata, por lo que aún no hay datos que permitan avalar la capacidad de pronóstico de este método⁴¹.

- Gen del cáncer de próstata 3 (PCA3)

El PCA3 es un gen que transcribe un ARN mensajero (mARN) largo no codificante que se encuentra sobreexpresado en los tejidos con cáncer de próstata. La medida de la concentración de PCA3 se realiza mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR) en muestras de orina, obtenidas tras un masaje prostático para enriquecer la muestra en células prostáticas. Esta medida tiene que ser normalizada con la concentración del mARN del gen PSA presente en la muestra, el cual se expresa de igual manera en las células benignas y cancerosas. El test PROGENSA PCA3 de Hologic Inc. obtuvo la Conformidad Europea en 2006 y fue aprobado por la FDA en 2012 para decidir si repetir la biopsia en aquellos pacientes mayores de 50 años con biopsias previas negativas. El kit combina la captura selectiva, mediante hibridación con sondas de ADN de captura apropiadas, de moléculas de ARN procedentes de células prostáticas presentes en la orina, la amplificación isotérmica de las mismas mediante la amplificación mediada por transcripción y la detección mediante

el ensayo de protección de la hibridación, que incorpora sondas quimioluminiscentes complementarias al amplicón. Los resultados obtenidos se expresan como PCA3 score (puntuación de PCA3) que se calcula como la relación entre el número de copias de PCA3 y las copias de PSA en un mililitro de muestra multiplicado por mil. El límite de corte para esta prueba aún no está bien definido, aunque la FDA sugiere que una puntuación de PCA3 menor de 25 se asocia con una probabilidad baja de tener una biopsia positiva^{41,45,46}.

- Gen de fusión TMPRSS2:ERG
La fusión aberrante de los genes ERG y TMPRSS2, regulada por andrógenos, se ha observado en el 15-59 % de los cánceres de próstata. La cantidad de genes fusionados TMPRSS2:ERG se puede determinar en muestras de orina obtenidas tras un masaje prostático. Al igual que para el PCA3, esta concentración debe normalizarse con respecto a la del mRNA del gen PSA. La puntuación de los análisis para el PCA3 y el TMPRSS2:ERG se usan de forma combinada para predecir la presencia de cáncer en una biopsia. Además, la puntuación del análisis del TMPRSS2:ERG se puede relacionar con la puntuación de Gleason y el estado clínico del tumor⁴⁵.
- ExoDX IntelliScore
Los exosomas son pequeñas vesículas de membrana que son secretadas por muchos tipos de células, incluidas las tumorales. Son vehículos funcionales que llevan una carga compleja de proteínas, lípidos y fragmentos de ADN o ARN de las células de las que proceden. La prueba ExoDX Prostate IntelliScore (Exosome Diagnostics Inc.⁴⁷) está diseñada para predecir la presencia de cáncer de próstata con una puntuación de Gleason mayor de 7 en hombre mayores de 50 años y con unos niveles de PSA entre 2 y 10 ng/mL. Esta prueba consiste en el aislamiento de exosomas procedentes de células tumorales en muestras de orina sin la

necesidad de la realización de un tacto rectal o masaje prostático previo. En estos exosomas se mide la concentración de dos genes que se sobreexpresan en casos de cáncer (PCA3, TMPRSS2:ERG) y del gen SPDEF que se emplea para normalizar la expresión génica. Posteriormente, mediante un algoritmo que incluye los valores de los ciclos umbral de cada amplificación qRT-PCR se obtiene una puntuación final entre 0 y 100, con un valor de corte de 15.6 a partir del cual el resultado se asocia con un cáncer de tipo 2 o superior^{48,49}.

- SelectMDX

Esta prueba desarrollada y comercializada por MDx Health⁵⁰ consiste en medir los niveles de mRNA de dos biomarcadores relacionados con el cáncer, el HOXC6 y el DLX1, en muestras de orina obtenidas tras un tacto rectal. Para obtener la puntuación final se pueden combinar con otras variables clínicas como la concentración de PSA en suero, la densidad de la PSA, el resultado del tacto rectal, la edad y el historial familiar de casos con cáncer de próstata. Esta prueba tiene un gran nivel de exactitud en la predicción de cánceres de próstata de alto grado⁴⁸.

- Test de microARNs

Los microARNs (miARNs) son un tipo de ARNs regulatorios pequeños, de 18 a 25 nucleótidos. Se ha descrito que los patrones de expresión de los miARNs se pueden utilizar como firmas fenotípicas del cáncer de próstata y se relacionan con la progresión, agresividad, metástasis y recurrencia del cáncer de próstata. Se ha encontrado que los niveles en suero y orina de algunos miARNs, como el miR-141, miR-107 y miR-574-39, pueden distinguir entre pacientes sanos y con cáncer de próstata, aunque son necesarios más estudios para que se acepte su uso en clínica²⁶.

En los párrafos precedentes, se han constatado las carencias y problemas asociados a los biomarcadores de cáncer de próstata que se usan para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de esta enfermedad.

De la revisión realizada se concluye la necesidad de identificar nuevos biomarcadores que superen a las pruebas tradicionales. El conjunto de los nuevos ensayos que se están estudiando para su posible implantación en el diagnóstico del cáncer de próstata apuntan al empleo combinado de diversos biomarcadores.

1.2 Glicosilación y cáncer

La glicosilación es una modificación postraducciona que tiene lugar en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, en la cual mediante un proceso enzimático se produce la unión de carbohidratos (también llamados sacáridos o glicanos) a otros sacáridos, lípidos o proteínas. El glicoma representa la colección total de glicanos sintetizados por una célula, tejido u organismo bajo unas condiciones específicas de tiempo, espacio y entorno. Los glicoconjugados resultantes se definen principalmente de acuerdo con la naturaleza de la parte no glicosilada y el tipo de enlace a la misma. Las moléculas glicosiladas presentes en las células son las glicoproteínas, los glicolípidos, los proteoglicanos, las proteínas ancladas mediante GPI (glicosilfosfatidilinositol) y los glicanos libres. La función biológica de los azúcares y los glicoconjugados en las células es muy variada, estando involucrados en mecanismos de reconocimiento, estructura, modulación y señalización celular; en la adhesión célula-célula, en la inflamación, en las interacciones patógeno-huésped y en la entrada viral. A nivel de proteína los azúcares están involucrados en la maduración y renovación de las proteínas y en la unión y activación de receptores^{51,52,53}.

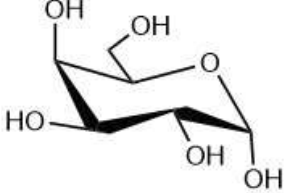
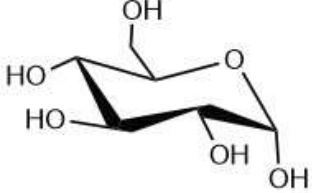
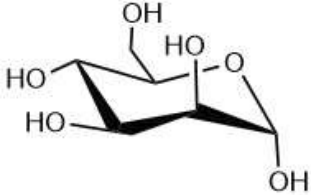
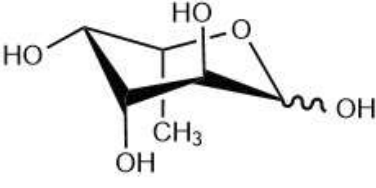
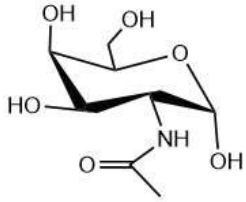
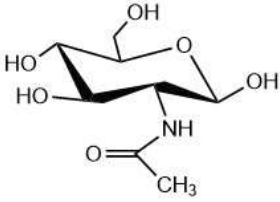
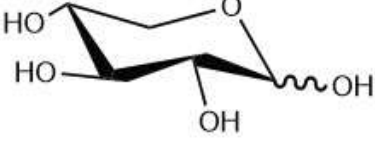
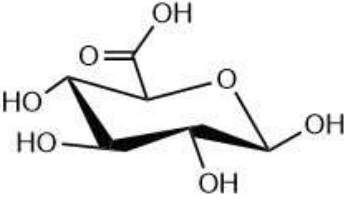
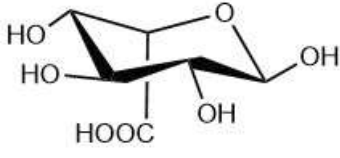
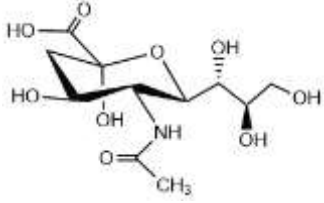
El proceso de biosíntesis de los glicanos no está basado en plantillas como el de los ácidos nucleicos. En los mamíferos se construyen a partir de la combinación de diez monosacáridos, que actúan como bloques de construcción conectándose uno al otro a través de enlaces glucosídicos. Esta unión puede producirse con múltiples combinaciones mediante la

acción combinada de las enzimas glicosiltransferasa y glicosidasa. La acción de las enzimas está controlada por la disponibilidad del sustrato, la actividad enzimática, los niveles de transcripción génica y la localización de las enzimas dentro de los orgánulos. Se obtiene aún una mayor diversidad estructural a través de modificaciones de estos sacáridos, como por ejemplo la fosforilación, sulfatación, acetilación y el enlace de los glicanos a varias macromoléculas⁵⁴.

Los monosacáridos que forman los glicanos son carbohidratos (polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas) que no pueden hidrolizarse a una forma más simple, con la fórmula empírica general $C_x(H_2O)_n$, donde n es un número entero entre 3 y 9. En su forma libre se encuentran en una mezcla de las formas cíclica y abierta en equilibrio, con un porcentaje de cada una de ellas que depende de la estructura del azúcar, mientras que cuando se unen para formar un glicano estos se encuentran en forma de anillo. Esta forma de anillo genera un centro quiral anomérico en el carbono 1 de los polihidroxialdehídos, o en el carbono 2 en las polihidroxicetonas, a través del cual se produce el enlace glucosídico de los monosacáridos entre sí. Este enlace puede ser de dos tipos α o β según la posición relativa entre el oxígeno glucosídico y el carbono anomérico. Los glicoconjugados resultantes pueden ser muy ramificados, complejos o lineales y debido a la gran cantidad de estructuras posibles, estos contienen una gran cantidad de información⁵⁴.

Los diez monosacáridos que forman los glicoconjugados son los siguientes: D-galactosa (Gal), D-glucosa (Glc), D-manosa (Man), L-fucosa (fuc), N-acetil-D-galactosamina (GalNac), D-xilosa (Xyl), N-acetil-D-glucosamina (GlcNac), ácido D-glucurónico (GlcA), ácido L-idurónico (IdoA) y ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico (SA, Neu5Ac o NeuAc)⁵² (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Estructura química de los diez monosacáridos que forman los glicanos.

<p>D-GALACTOSA</p> 	<p>D-GLUCOSA</p> 
<p>D-MANOSA</p> 	<p>L-FUCOSA</p> 
<p>N-ACETIL-D-GALACTOSAMINA</p> 	<p>N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA</p> 
<p>D-XILOSA</p> 	<p>ÁCIDO D-GLUCORÓNICO</p> 
<p>ÁCIDO L-IDURÓNICO</p> 	<p>ÁCIDO SIÁLICO</p> 

Las glicoproteínas son glicoconjugados en los que la proteína tiene uno o más glicanos unidos covalentemente al esqueleto polipeptídico. Dependiendo del aminoácido y del átomo al que se unan los glicanos se distinguen dos tipos de glicoproteínas, las O-glicoproteínas y las N-glicoproteínas. En las O-glicoproteínas el glicano se une a través del carbono anomérico del monosacárido N-acetilgalactosamina o del de la xilosa al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de una serina o treonina. En las N-glicoproteínas, el carbono anomérico de la N-acetilgalactosamina se enlaza a un átomo de nitrógeno del grupo amida de la asparagina (Asn). Esta unión se produce solo si la asparagina es parte de la secuencia de aminoácido Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X representa cualquier aminoácido⁵⁵. La glicosilación de las proteínas no es un proceso aleatorio si no que es específico del sitio, ya que se han encontrado tipos de glicanos específicos en subconjuntos restringidos de proteínas⁵⁶.

Los cambios en el proceso de glicosilación de las glicoproteínas de membrana asociados al cáncer fueron descubiertos en 1969⁵⁷. Las células tumorales muestran una amplia gama de alteraciones en la glicosilación en comparación con las células sanas, entre las que se incluyen la sobreexpresión y la infraexpresión de glicanos presentes de manera natural, así como la neoexpresión de glicanos que normalmente están restringidos a los tejidos embrionarios. Esta glicosilación aberrante de las proteínas, tanto de membrana como secretadas, ha pasado a ser un sello distintivo del cáncer.

Los cambios más comunes en la glicosilación que están asociados a la presencia de cáncer son el truncado e incremento de tamaño de los O-glicanos y la sialilación, fucosilación y ramificación de los N-glicanos (Figura 1.7).

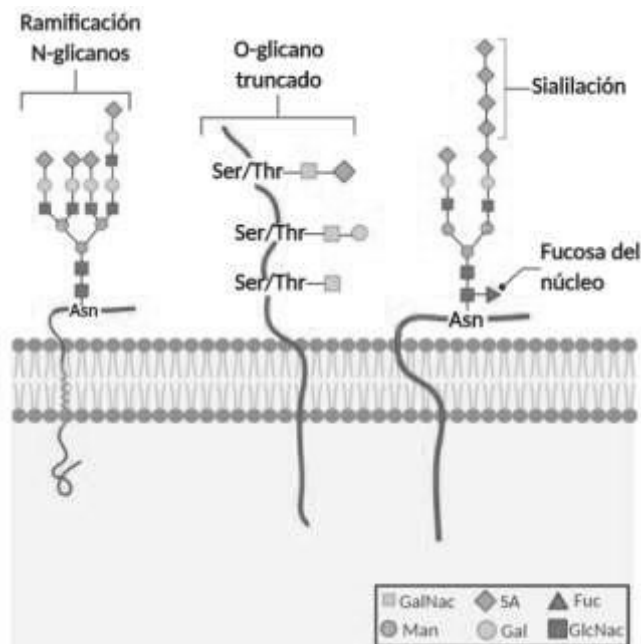


Figura 1.7: Cambios más comunes en la glicosilación de las N- y O-glicoproteínas asociados a la presencia de cáncer.

- Sialilación

La sialilación consiste en la incorporación aberrante de ácidos siálicos en la posición terminal o lateral de los oligosacáridos. Esta es una modificación importante en la glicosilación celular, ya que los glicanos que contienen ácidos siálicos desempeñan importantes funciones en el reconocimiento, la adhesión y la señalización celulares. Se ha asociado el incremento en la sialilación global, especialmente en los ácidos siálicos con unión $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$, con el cáncer debido a la alteración de la expresión de las enzimas sialiltransferasas⁵⁸. El aumento de la sialilación en el cáncer también incluye la expresión del ácido polisialílico, que está asociado con varios tipos de cánceres y con frecuencia se expresa en tumores de alto grado⁵⁹.

- Fucosilación

La fucosilación es una modificación no extensible que consiste en la adición del monosacárido fucosa a la cadena de glicanos,

pudiendo ser fucosilación terminal e interna o del núcleo, también conocida como core. Estas reacciones de transferencia de unidades de fucosa se producen por la acción de múltiples enzimas de la familia fucosiltransferasas. La fucosilación terminal consiste en la unión de una fucosa a un oligosacárido mediante un enlace $\alpha(1,2)$ a una galactosa terminal o mediante un enlace $\alpha(1,3/4)$ a un residuo GlcNac subterminal. La fucosilación del núcleo consiste en la unión de una fucosa mediante un enlace $\alpha(1,6)$ al residuo GalNac más interno del N-glicano a través de la acción de la enzima Fuc-TVIII^{52,60}.

- Ramificación de los N-glicanos
Uno de los cambios más comunes es un incremento en el tamaño y la ramificación de los N-glicanos. El aumento en la ramificación está asociado a un incremento en la actividad de la enzima N-acetilglucosaminiltransferasa V. Las nuevas ramificaciones crean nuevos sitios para la unión de ácidos siálicos terminales, contribuyendo también al aumento de la sialilación global⁶¹.
- Truncamiento de los O-glicanos
Otra característica común de los tumores es la sobreexpresión de O-glicanos truncados resultantes de la síntesis incompleta de los O-glicanos en las células tumorales. También se producen cambios que afectan a las modificaciones post-glicosilación, reduciéndose la sulfatación y la acetilación de los ácidos siálicos⁶².

La alteración de los glicanos de la superficie de las células tumorales afecta a las interacciones con lectinas endógenas, influyendo en el potencial que tienen las células tumorales de formar metástasis, a las interacciones de estas células con su entorno y modula en gran medida su fenotipo. En paralelo, la expresión y los niveles de las proteínas que se unen a carbohidratos también cambian durante la transformación maligna, lo que conduce en general a una presencia alterada de los glicanos y sus receptores. Los mecanismos por los cuales los cambios en la

glicosilación median la metástasis y la invasión de los tumores son en su mayoría desconocidos, conociéndose solamente las funciones de algunas proteínas de la superficie celular y los perfiles de sus glicanos^{51,63}.

Aunque la glicosilación aberrante no está incluida entre los ocho rasgos comunes del cáncer², hay muchas evidencias que muestran que los glicanos están involucrados en la adquisición de todas estas capacidades distintivas de los tumores. Algunos de los cambios en la glicosilación son específicos de los tumores, por lo que estas alteraciones únicas en los patrones de glicosilación pueden servir como una característica distintiva de las células cancerosas, proporcionando nuevas herramientas de diagnóstico. A través del estudio de los patrones de glicosilación de diferentes proteínas es posible identificar nuevos biomarcadores sensibles y específicos del cáncer, que podrían ser útiles en la detección temprana de la enfermedad^{64,65}.

1.2.1 Glicosilación aberrante de la PSA

El antígeno específico de la próstata es una N-glicoproteína que contiene un 8 % de carbohidratos, con un solo sitio de glicosilación en la asparagina en la posición 69 (también denominada asparagina 61, dependiendo del sistema de numeración). El N-glicano de la PSA estabiliza la estructura de la enzima debido a su importancia en el plegamiento mientras que sólo en cierta medida cambia el perfil de activación y la actividad enzimática⁶⁶. Se han encontrado 61 perfiles de glicosilación para la PSA y sus isoformas aisladas de pacientes sanos en varios estudios mediante espectrometría de masas. La estructura mayoritaria encontrada es biantenaria con ácidos siálicos terminales y normalmente con fucosa en el núcleo y N-acetilgalactosaminas terminales (Figura 1.8)^{67,68}. Una mutación en el gen KLK3 provoca la conversión del aminoácido aspartato en asparagina en la posición 102 y, en consecuencia, se crea un nuevo sitio de glicosilación. Sin embargo, el patrón de glicanos asociado a esta posición es diferente del de la Asn 69, probablemente debido a la cercanía

de este aminoácido a la zona activa de la proteína. La diferencia más significativa es que no se encontraron glicanos fucosilados. Esta mutación está relacionada con la supervivencia de los pacientes con cáncer de próstata (Figura 1.9)⁶⁹.

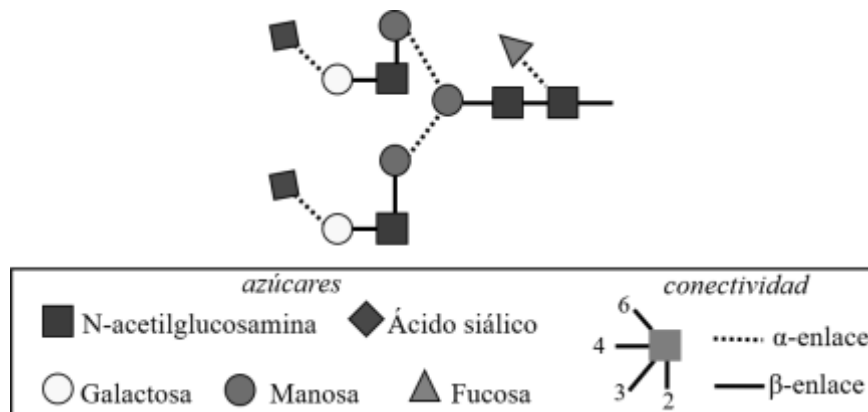


Figura 1.8: Estructura mayoritaria de la PSA en la que se muestra la conectividad y el tipo de enlace entre los azúcares.

Aunque aún no ha sido aprobado por los organismos reguladores, la aplicación del análisis de los perfiles de glicosilación para el diagnóstico robusto y preciso del cáncer de próstata está adquiriendo una importancia creciente en los últimos años⁶⁶.

Los primeros estudios se centraron en la caracterización de los glicanos de la PSA aislada de la línea celular tumoral LNCaP, observándose una diferencia con respecto a los glicanos de la PSA proveniente de células sanas, obtenida del líquido seminal. En la PSA procedente de células tumorales se encontró una mezcla de estructuras biantenarias y triantenarias, con un menor contenido de ácido siálico y un incremento en el contenido de fucosa y N-acetilgalactosamina^{43,70}. Tras esta primera observación era de esperar que estas estructuras alteradas también estuviesen presentes en la PSA proveniente del suero de pacientes con cáncer de próstata. Sin embargo, se observaron patrones de glicosilación significativamente diferentes entre la PSA aislada de la línea celular LNCaP

y la de pacientes con cáncer de próstata⁷¹. Por este motivo, múltiples estudios se han centrado en encontrar las diferencias en la glicosilación de la PSA obtenida de suero de individuos sanos o con HBP y de pacientes con cáncer de próstata. En la PSA aislada de suero de pacientes con cáncer de próstata se observaron cambios en el contenido de fucosa del núcleo y en el ácido siálico $\alpha(2,6)$ de los glicanos biantenarios. También se observaron ácidos siálicos $\alpha(2,3)$, uniones GalNac y GlcNac y un aumento de las estructuras multiantenarias, principalmente triantenarias y tetraantenarias. Además, se ha observado en la PSA aislada de pacientes con cáncer la presencia de O-glicanos truncados unidos a la Thr de la posición 125, que consisten en una GalNac unida a una GlcNac (Figura 1.9)^{20, 66,72, 73}.

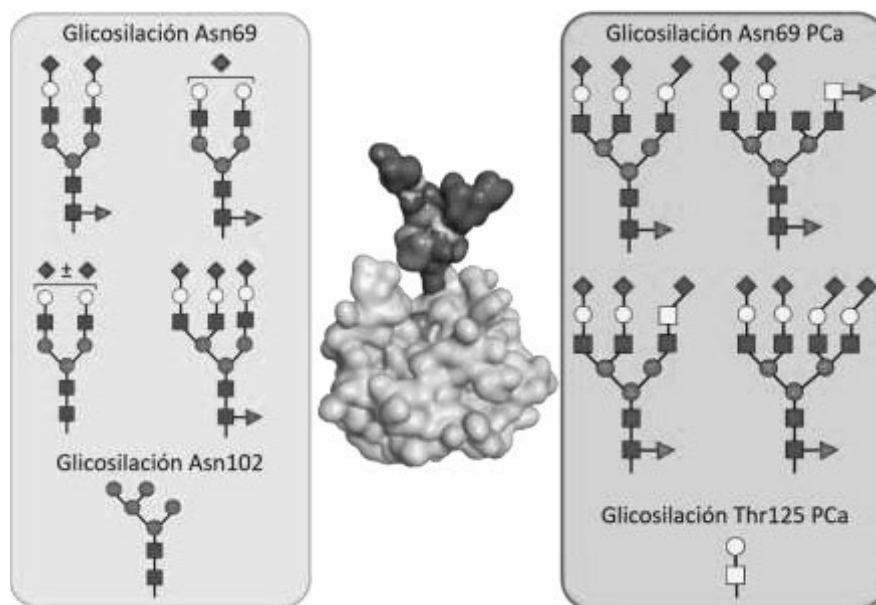


Figura 1.9: Estructuras mayoritarias de los N-glicanos de la Asn69 y Asn102 de la PSA de pacientes sanos o con BPH (cuadro verde) y de los pacientes con cáncer de próstata (cuadro rojo). En el centro se representa la estructura tridimensional de la PSA (PDB 3QUM) con el centro activo en marrón.

De esta forma la detección de cambios en los glicanos de la PSA asociados al desarrollo del cáncer de próstata puede ser una buena

alternativa para mejorar la especificidad de los ensayos actualmente en uso, con el objetivo de detectar este tipo de cáncer de forma temprana.

Antecedentes con otras proteínas avalan esta hipótesis. Este es el caso de la α -fetoproteína, la medida de los niveles de la fracción fucosilada de la α -fetoproteína en suero permitió desarrollar un método de diagnóstico más fiable, con una mejor discriminación entre el cáncer hepatocelular y otras enfermedades hepáticas benignas⁷⁴.

1.3 Bioensayos para detectar la glicosilación

El análisis de la glicosilación de las proteínas se puede realizar con múltiples técnicas según el nivel de detalle e información deseados. Estas se pueden dividir en técnicas que permiten el análisis de los patrones de glicosilación mediante un análisis estructural completo de los glicanos, denominadas técnicas glicómicas o glicoproteómicas, y técnicas que permiten la caracterización de azúcares específicos dentro de la estructura del glicano.

Para el análisis estructural de los glicanos de las proteínas presentes en el suero que pueden actuar como biomarcadores del cáncer se han utilizado varias metodologías analíticas, entre las que destacan la espectrometría de masas (MS), la resonancia magnética nuclear (RMN), la electroforesis capilar, la cromatografía de líquidos y sus combinaciones. La mayoría de estas técnicas necesitan una preconcentración de la muestra seguida de una digestión química o enzimática para separar los glicanos del núcleo proteico y un marcaje o manipulación química antes del análisis. Estas técnicas se han convertido en una herramienta poderosa para el análisis de los perfiles de los glicanos debido a su relativa sensibilidad y precisión. Sin embargo son técnicas con protocolos largos, de alto coste, que necesitan personal cualificado tanto para la realización del análisis como para la interpretación de los resultados y suelen

necesitar un pretratamiento de la muestra, lo que dificulta el análisis directo de muestras clínicas y su compatibilidad con el diagnóstico a la cabecera del paciente (POC por sus siglas en inglés-*point of care*)^{75,76,77}.

Para el diseño de pruebas de diagnóstico que puedan llegar a trasladarse a la práctica clínica son necesarios ensayos más sencillos que permitan la detección de determinados azúcares asociados a la glicosilación aberrante en el cáncer, tales como los ensayos bioanalíticos y en concreto los biosensores. En estos ensayos se caracterizan azúcares específicos del glicano en la proteína completa y no los perfiles o patrones de glicanos completos.

Un sensor químico se define como un dispositivo capaz de proporcionar información analítica en tiempo real sobre una muestra. Los sensores están formados por dos elementos: el elemento de reconocimiento, que posee afinidad por el analito de interés y con el que este interactúa de manera selectiva; y el de transducción, que es el encargado de transformar el cambio producido en el elemento de reconocimiento tras la interacción con el analito en una señal física medible. Los biosensores son sensores químicos en los que el elemento de reconocimiento es de naturaleza biológica o bioquímica⁷⁸. Las ventajas que presentan los biosensores frente a otras técnicas son la alta sensibilidad y especificidad, rapidez, fácil manejo, utilización de volúmenes pequeños de muestra y no requieren personal cualificado para su uso⁷⁹.

Para el diseño y desarrollo de ensayos bioanalíticos con buenos resultados para la detección específica de azúcares de las glicoproteínas es necesario disponer de bioelementos de reconocimiento con alta afinidad y especificidad hacia la región de los glicanos de una determinada proteína biomarcadora del cáncer. Con este fin se han descrito ensayos basados en el uso de receptores naturales (anticuerpos y lectinas) y

artificiales (ácido borónico y sus derivados y aptámeros), los cuales se comentarán a continuación.

- Ensayos basados en el enlace al ácido borónico

Los ácidos borónicos se enlazan covalentemente a los grupos 1,2- y 1,3-dioles de los glicanos, mediante una reacción reversible de formación de un éster, que es dependiente del pH y del disolvente. La fuerza del enlace entre el ácido borónico y los azúcares viene determinada por la orientación y la posición relativa de los grupos hidroxilo, y por este motivo los diferentes derivados del ácido borónico pueden discriminar entre sacáridos similares estructuralmente^{80,81}.

Los ácidos borónicos muestran una buena unión a los azúcares con forma de furanosa (anillo de cuatro carbonos y un oxígeno), mientras que la mayoría de los carbohidratos en las moléculas biológicas más relevantes tienen una forma de piranosa (anillo de cinco carbonos y un oxígeno). Las mejores constantes de enlace o la mayor afinidad se obtienen en medios alcalinos, que no serían compatibles con los sistemas biológicos⁸².

Además, se ha utilizado la funcionalización con ácidos borónicos para conferir esta capacidad de enlace hacia los carbohidratos a otros receptores como péptidos, polímeros molecularmente impresos (MIP) y aptámeros⁸².

- Ensayos basados en anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmune en respuesta a una molécula extraña que entra al organismo, denominada antígeno. Estos se unen específicamente a una pequeña parte del antígeno denominada epítipo, que normalmente consiste en una pequeña porción de la molécula.

La obtención de anticuerpos extraordinariamente selectivos frente a glicanos es difícil debido a que estos son poco inmunogénicos. También debe tenerse en cuenta la similitud en las secuencias de carbohidratos asociados a los glicoconjugados

entre diferentes especies, que conlleva que estos no sean inmunogénicos en los mamíferos que habitualmente sirven como vehículos para la producción de anticuerpos monoclonales. Esto ha llevado a explorar la posibilidad de utilizar otras especies no vertebradas, evolutivamente más separadas de los humanos, para obtener estos anticuerpos^{83,84}. Además, la interacción anticuerpo-carbohidrato es más débil que la existente entre un anticuerpo y una proteína resultando en una menor afinidad que limita la sensibilidad de los ensayos. No obstante, la afinidad puede incrementarse generando anticuerpos que contengan dos o más sitios de unión a glicanos o mediante la unión no covalente a oligómeros con múltiples sitios de unión⁸⁵.

A pesar de los esfuerzos y estudios realizados, muchos de los anticuerpos obtenidos frente a glicanos tienen baja afinidad y falta de especificidad, puesto que reconocen familias de glicanos estructuralmente relacionados en lugar de una sola estructura. Además, los anticuerpos disponibles cubren un conjunto pequeño de familias y de glicanos, careciendo de su correspondiente anticuerpo muchos de los glicanos más importantes que sufren modificaciones⁸³.

- Ensayos basados en lectinas

Las lectinas son proteínas que se unen a los glicanos pero no tiene un origen inmunogénico, es decir, se excluyen los anticuerpos. Están presentes en plantas, bacterias y animales. Se aíslan de fuentes naturales y muestran una gran selectividad frente a enlaces glicosídicos entre sacáridos definidos. Las lectinas participan en numerosos eventos fisiológicos, entre los que se encuentran las interacciones entre las células. Normalmente una lectina tiene dos o más sitios de unión facilitando la aglutinación de las células, característica distintiva frente a otras proteínas capaces de unirse a los glicanos. Además desempeñan un papel crucial como herramienta en el cribado de glicanos, en la

purificación de glicoproteínas y, en el marcaje de células. Pueden formar parte de los nanodispositivos diseñados para transportar fármacos en terapias dirigidas (balas mágicas) y ser útiles para la detección del cáncer^{86,87,88}.

Las lectinas presentan baja afinidad por los monosacáridos, con constantes de disociación en el orden milimolar. Para los oligosacáridos y los glicanos de glicoproteínas las afinidades son del orden micromolar, a pesar de la multivalencia por la que tienen lugar múltiples contactos con la superficie de la lectina. Esto puede ser debido a que los sitios de unión, que se encuentran en la superficie de las lectinas, son pocos profundos y están muy expuestos al disolvente, generándose una competencia entre la interacción con los glicanos y con el disolvente. Esta es también una posible explicación a la falta de selectividad por los azúcares individuales. Para aumentar la afinidad se ha comenzado a realizar ingeniería de lectinas para crear lectinas artificiales, obteniendo lectinas dirigidas hacia los azúcares de interés^{82,89}.

Hasta la actualidad se han identificado varios cientos de lectinas, de las que aproximadamente cien están disponibles comercialmente. Se utilizan solas en ensayos de unión a glicanos o en micromatrices compuestas por diferentes lectinas para la rápida caracterización del perfil de los glicanos presentes en una muestra⁸².

Estos receptores han sido utilizados en el desarrollo de ensayos bioanalíticos para detectar las modificaciones aberrantes que se producen en uno o varios azúcares de los glicanos de una proteína. Sin embargo, muchas de las proteínas secretadas de las células tumorales comparten cambios similares en la expresión de los glicanos, y si solo se detectan los azúcares no es posible asociarlos a una determinada proteína. Esto significa que idealmente los receptores deben reconocer el glicano aberrante específico en cada sitio específico, es decir, es necesaria información de las cadenas de carbohidratos y péptidos. Actualmente,

estos tipos de receptores no están disponibles y dirigir anticuerpos a una determinada región que comprenda parte de la proteína y parte de los glicanos no es una tarea fácil. Mientras tanto se han desarrollado ensayos que combinan dos receptores, un anticuerpo para el reconocimiento de proteínas y una lectina, para el glicano de interés.

Para cumplir con este requisito se han propuesto los aptámeros como receptores ideales por sus características, las cuales se describen en la siguiente sección.

1.3.1 Aptámeros como receptores de biomarcadores glicosilados

Los aptámeros (del latín *aptus* que significa encajar y del griego *mero* que significa partícula) son oligonucleótidos de ARN o ADN, de cadena simple, sintéticos y capaces de reconocer selectivamente una gran variedad de dianas, desde iones hasta células. La unión aptámero-diana se produce como consecuencia de interacciones reversibles en las que solo intervienen enlaces no covalentes, como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o enlaces hidrofóbicos. Estas interacciones se establecen entre grupos funcionales adecuados de las dos moléculas que interaccionan, en un número muy elevado para conferir gran estabilidad al complejo formado. Sin embargo, todas estas interacciones son de corto alcance, por lo que para que puedan ser operativas los aptámeros adoptan alguna estructura tridimensional complementaria en forma a la diana, que permite el enlace de afinidad con el mismo. Una vez identificados, los aptámeros se pueden obtener en un proceso de síntesis química, muy reproducible y a un coste razonable.

Los aptámeros se seleccionan mediante un proceso de selección *in vitro* denominado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) descrito por primera vez en 1990 por investigadores de dos laboratorios diferentes^{90,91}. Se trata de un proceso de evolución darwiniano, similar a la selección natural, en el que se utilizan rondas iterativas de selección y amplificación para enriquecer una colección inicial

de oligonucleótidos de ADN o ARN, que contiene 10^{12} - 10^{14} secuencias diferentes con afinidad muy variada por la diana, en oligonucleótidos que presenten una elevada afinidad y selectividad por la molécula que se desea bajo unas condiciones definidas⁹².

El punto de partida de un proceso de selección es la colección inicial de oligonucleótidos de ADN o ARN de cadena sencilla, formada por una región central variable, típicamente con un tamaño de entre 20 y 80 nucleótidos, y dos zonas constantes que la flanquean, normalmente de un tamaño de 20-25 nucleótidos cada una y que definen las secuencias que se utilizarán como cebador en la necesaria amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Las etapas básicas de este proceso son las siguientes: incubación de la colección inicial con la diana, separación de las secuencias no enlazadas, elución de las que se hayan enlazado, amplificación de estas mediante PCR y acondicionamiento de las secuencias obtenidas para transformarlas en secuencias de hebra sencilla. Esta nueva y enriquecida colección de secuencias se utiliza para comenzar una nueva etapa de interacción con la diana, y con ella un nuevo ciclo de selección con condiciones idénticas o más restrictivas (Figura 1.10). Mediante la repetición de estos ciclos de selección se consigue reducir la gran variabilidad inicial, enriqueciendo la colección en secuencias con motivos similares y con gran afinidad y especificidad por la diana. Tras alcanzar un cierto grado de enriquecimiento, la última ronda del SELEX se detiene después de la amplificación y los productos de la PCR se clonan para obtener aptámeros individuales que serán secuenciados y analizados⁹³. Una vez seleccionados y conociendo su secuencia, los aptámeros pueden sintetizarse mediante un proceso químico que permite obtener escalas más grandes que en la producción de anticuerpos, a un menor coste. Además, la síntesis química es muy reproducible y reduce la variabilidad entre lotes, un problema que afecta a los anticuerpos empleados como reactivos analíticos y conduce a falta de reproducibilidad en los resultados obtenidos.

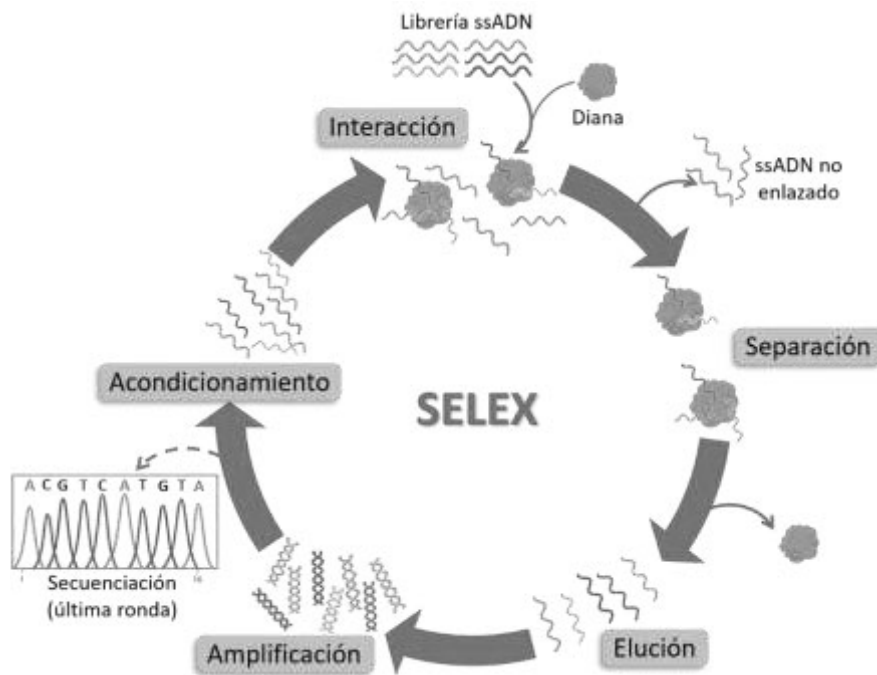


Figura 1.10: Esquema de las etapas de un proceso SELEX para la obtención de aptámeros hacia una determinada diana.

Los aptámeros son de pequeño tamaño, menores de 100 bases, lo que permite que se unan a sitios de la diana que son inaccesibles para los anticuerpos, de mayor tamaño. El proceso de selección es muy versátil y puede diseñarse para dirigirlo hacia un epítipo o región en concreto de la molécula o estructura diana, consiguiendo receptores que pueden llegar a tener afinidades en el rango subnanomolar. Por todos estos motivos, los aptámeros son buenos candidatos para ser receptores para los glicanos. A pesar de que los azúcares no se consideran muy aptagénicos debido a que sus estructuras tienen pocos grupos cargados y carecen de anillos aromáticos, se han descrito aptámeros dirigidos hacia diferentes tipos de carbohidratos como monosacáridos, oligo y polisacáridos, aminoglicósidos y otros antibióticos y a los glicanos de glicoproteínas, e incluso aptámeros capaces de diferenciar un único grupo funcional del carbohidrato^{94,95}.

Dado que la mayoría de los marcadores tumorales son glicoproteínas se han descrito aptámeros contra las mismas. Sin embargo, la mayoría de estos SELEX frente a glicoproteínas se han realizado sin dirigir la selección hacia ninguna región específica de la diana, por lo que no se sabe en qué medida están involucrados los glicanos, la región peptídica o ambos en el reconocimiento. Asimismo, la dificultad de caracterizar completamente el complejo aptámero-ligando está retrasando la obtención de esta información. La selección de aptámeros dirigida frente a los glicanos es imposible si como diana se utilizan péptidos sintéticos pequeños o proteínas expresadas en células no humanas, ya que las bacterias no son capaces de incorporar la cadena de azúcares. Solamente aquellos aptámeros obtenidos en procesos en los que se empleen proteínas humanas purificadas o péptidos recombinantes expresados en líneas celulares humanas podrán tener la habilidad de reconocer los glicanos. Sin embargo, hasta el momento solamente unos pocos aptámeros han sido evaluados por su capacidad para discriminar azúcares.

Los primeros intentos de dirigir la selección frente a los glicanos consistieron en la utilización de carbohidratos aislados como dianas⁹⁶. Recientemente se comenzaron a utilizar diferentes variantes del proceso de selección para poder utilizar dianas más grandes como la glicoproteína completa. Una posibilidad es la incorporación de nucleótidos modificados, como la introducción de un nucleótido modificado con ácido borónico (ácido borónico-timidina-5'-trifosfato) en la colección inicial de secuencias para dirigir la selección frente a la región de los glicanos de las glicoproteínas⁹⁷. Otra posibilidad son los denominados SELEX de epítipo específico, que es un tipo especial de SELEX híbrido en el que las primeras rondas se realizan de la forma tradicional (descrita previamente) y las últimas requieren un competidor específico para la elución de las secuencias enlazadas⁹⁸. También se pueden utilizar fragmentos peptídicos sintéticos que contengan el glicano, en lugar de la glicoproteína completa como diana en el proceso de selección. El uso de péptidos sintéticos como dianas permite la incorporación de etapas de contra-selección usando la

variante sintética no glicosilada, siendo esta otra posibilidad para dirigir los aptámeros hacia el sitio de glicosilación⁹⁹.

Debido a que muchas de las estructuras de los glicanos unidos a las proteínas del suero humano aún siguen sin conocerse, es clara la necesidad de receptores que reconozcan la zona de glicosilación y que sean capaces de diferenciar mínimos cambios estructurales. Debido a la importancia biológica de las glicoproteínas se están realizando esfuerzos para desarrollar este tipo de receptores, pero hasta el momento ninguno de los comentados anteriormente cumple los requisitos. El desarrollo de receptores sintéticos parece la ruta más prometedora para conseguir la estricta selectividad necesaria. En este sentido, los aptámeros podrían ser una solución tanto si se utilizan glicopéptidos o la glicoproteína al completo como diana. Como se ha comentado, hasta ahora los aptámeros seleccionados contra las glicoproteínas se unen preferentemente a la secuencia peptídica a menos que haya muchos azúcares idénticos en la estructura, por lo que son necesarias nuevas estrategias que dirijan la selección hacia el glicano y su región circundante. Hasta el momento solo se ha descrito un aptámero capaz de reconocer simultáneamente al péptido y a la región de los glicanos, aunque solamente se ensayó frente a péptidos pequeños. Se desconoce por tanto si mantiene la afinidad frente a la proteína completa, cuya estructura secundaria puede diferir de la del péptido¹⁰⁰. Actualmente no existe un receptor sintético capaz de integrar el reconocimiento del glicano y de los péptidos que lo rodean en una glicoproteína intacta completa, y solo recientemente se ha descubierto que una lectina de mamíferos, Dectin-1, es capaz de reconocer los glicanos y algunos péptidos cercanos en los anticuerpos IgG¹⁰¹.

1.4 Aptámeros y aptasensores para la PSA

Hasta la actualidad se han descrito cinco aptámeros para la PSA, tres de ellos son de ADN y dos de ARN (Tabla 1.2). En ninguno de los casos se dirigió la selección hacia la región glicosilada por lo que cabe esperar que los aptámeros obtenidos reconozcan la región peptídica de la proteína.

Tabla 1.2: Secuencias y constantes de afinidad de los aptámeros obtenidos para la PSA

Tipo	Secuencia (5'→3')	K _D (nM)	Ref.
ARN	CCGUCAGGUCACGGCAGCGAAGCUCUAGGC GCGGCCAGUUGC	–	102
ARN	2'F-AGCUCCAGAAGAUAAAUUACAGGUCCA GGCGCGUUAGCAAAACCGCGGAUCAAAACU UAGUUGACAACUAGGAUACUAUGACCC	630	103
	2'F-AGCUCCAGAAGAUAAAUUACAGGUACG GUUCACGCCUGUCUCAUGCUGACUAAGAA AGUUUAGCAACUAGGAUACUAUGACCC	870	
ADN	TTTTTAATTAAGCTCGCCATCAAATAGCTTT	>100	104
ADN	GGGCGGGGCGGACGAGACAGTAAGGGCTGT GGGTGTGGTG	0.7	105
ADN	GCAATGGTACGGTACTTCCTATGGCGATGTG TTGGCTGTGTGTGGGGTGCAAAAGTGACACGC TACTTTGCTAA	360	106

S. Jeong *et al.* diseñaron un proceso de selección de aptámeros de ARN frente a la PSA activa. Para dirigir la selección introdujeron contra-selecciones frente a la proPSA inactiva y a la proteína GST (Glutación-S transferasa). Tras nueve rondas de selección obtuvieron un aptámero capaz de unirse a la PSA activa, del cual no aportan datos sobre su afinidad. Todas las proteínas PSA fueron expresadas de manera recombinante en *Escherichia coli*, bacteria que no posee mecanismo de glicosilación, por lo que las proteínas utilizadas no poseen región glicosilada y por lo tanto es imposible que los aptámeros obtenidos reconozcan esta región de la proteína¹⁰².

M. Svobodova *et al.* emplearon ARN modificado con un F en la posición 2' de la ribosa para obtener aptámeros frente a la PSA modificada con biotina inmovilizada sobre partículas magnéticas de estreptavidina. En algunas rondas se incubó la colección de ARN con PSA en disolución y después se atrapó el complejo PSA-ARN con partículas magnéticas, para eliminar posibles impedimentos estéricos y superar los problemas asociados a la inmovilización de proteínas, reducción de la movilidad de la PSA y eliminación de posibles sitios de enlace. También se realizaron selecciones negativas frente a las partículas magnéticas sin modificar. Tras trece rondas de selección se obtuvieron dos aptámeros con constantes de disociación de 870 nM y 630 nM¹⁰³.

N. Savory *et al.* realizaron tres rondas de un SELEX tradicional junto con modificaciones post-SELEX utilizando algoritmos genéticos de amplificación, cruzamiento y mutación *in silico* para la obtención de aptámeros de ADN frente a la PSA. De los aptámeros obtenidos, se escogió uno de ellos como el mejor candidato con una constante de disociación estimada de varias decenas en el orden nanomolar¹⁰⁴.

Park *et al.* utilizaron una separación bajo la acción de un campo acústico (acoustophoresis) en un sistema microfluídico durante el proceso SELEX, ya que de esta forma es posible realizar las etapas de lavado y separación a la vez, sin ninguna etapa adicional. A partir de la cuarta ronda introdujeron contra-selecciones frente a otras proteínas presentes en el suero humano como la albúmina de suero humana (HSA), IgG y fibrinógeno. Tras ocho rondas de selección realizaron la secuenciación masiva de los oligonucleótidos que pervivían en la última ronda obteniendo siete aptámeros de ADN frente a la PSA. El mejor de ellos presenta una constante de disociación de 0.7 nM¹⁰⁵.

Li *et al.* realizaron un proceso de selección tradicional de aptámeros de ADN frente a la PSA inmovilizada sobre una membrana. El mejor candidato

obtenido tras siete rondas presenta una constante de disociación de 360 nM¹⁰⁶.

Se han utilizado estos aptámeros para el desarrollo de múltiples aptasensores con diferentes tipos de transducción: ópticos, de masa o electroquímicos. En una búsqueda realizada en octubre de 2020 en la base de datos *Scopus* con las palabras “PSA” y “aptámero” se obtuvieron 151 resultados de artículos científicos, y 56 si se añade el término “electroquímico”. La mayoría de estos sensores para la PSA se encuentran recogidos en varios artículos de revisión¹⁰⁷⁻¹¹¹. Sin embargo, en la búsqueda de aptasensores para la detección de la glicosilación de la PSA solamente se obtuvieron 2 resultados en la base de datos *Scopus* buscando los términos “PSA”, “aptámero” y “glicanos”. Ambos aptasensores tienen un formato tipo sándwich y utilizan el aptámero desarrollado por Savory *et al.* inmovilizado sobre el transductor. Jolly *et al.* inmovilizaron el aptámero sobre canales de microfluídica y utilizaron la lectina *Sambucus nigra*, específica del ácido siálico, para la cuantificación de la PSA glicosilada mediante medidas de quimioluminiscencia. Obtuvieron un límite de detección de 0.5 ng/mL para la fPSA y de 3 ng/mL para la fPSA glicosilada¹¹². Xia *et al.* utilizaron electrodos de oro para inmovilizar el mismo aptámero y nanopartículas modificadas con el ácido 4-mercaptofenilborónico para la detección de los glicanos, con un límite de detección de 1.6 pg/mL¹¹³. Para ninguno de ellos se ha estudiado su respuesta en una matriz de suero humano ni se han analizado muestras de pacientes con cáncer de próstata.

Además, después del inicio de la presente Tesis Doctoral se fundó la empresa *Glycanostics* que está trabajando en el desarrollo de un kit para el diagnóstico no invasivo del cáncer de próstata. Está basado en el análisis de los cambios en los glicanos de la PSA, aunque de momento no está disponible comercialmente¹¹⁴.

CAPÍTULO 2

Objetivos / Objectives

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo y su detección temprana uno de los retos que plantea nuestra sociedad. La mayoría de los marcadores de cáncer, usados como dianas terapéuticas o en el diagnóstico clínico, son glicoproteínas. Además, los tumores producen glicoproteínas cuyo patrón de glicosilación se ve alterado con respecto al que producen las células normales. Por tanto, la explotación de estas diferencias en los patrones de glicosilación entre los tejidos malignos y sanos ofrece excelentes oportunidades para identificar biomarcadores sensibles y específicos del cáncer, que podrían actuar como primeros centinelas en la detección temprana de la enfermedad. La detección de estos cambios ofrece la posibilidad de aumentar la especificidad diagnóstica y realizar un pronóstico más preciso. Sin embargo, no se dispone en la actualidad de ensayos lo suficientemente selectivos que permitan validar clínicamente estos marcadores.

Una de las claves en el desarrollo de estos ensayos analíticos es la disponibilidad de receptores moleculares, capaces de reconocer de manera selectiva las alteraciones en los glicanos de una glicoproteína en concreto. El receptor ideal debería poseer un reconocimiento binario de la glicoproteína, estando involucrados tanto péptido como glicano, para garantizar la selectividad entre glicoproteínas que tienen una estructura de glicanos muy similar. Sin embargo, en el momento de inicio de la presente Tesis Doctoral no se dispone de ningún receptor, ni natural ni artificial, con la capacidad de este reconocimiento binario de las glicoproteínas.

Teóricamente, los aptámeros pueden reconocer selectivamente cualquier glicoproteína, y con un buen diseño del proceso de selección es posible dirigir la selección de los aptámeros de manera específica hacia el sitio de glicosilación, que incluye tanto el glicano como las estructuras peptídicas circundantes.

En este contexto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la selección de aptámeros para obtener receptores de alta afinidad y selectividad hacia la región de glicosilación de la glicoproteína PSA, biomarcador del cáncer de próstata. Se utilizarán estos aptámeros en el desarrollo de biosensores y ensayos analíticos para la detección de los cambios en la glicosilación de la PSA en suero humano.

Se pretende alcanzar el objetivo general propuesto a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Selección mediante el método SELEX de aptámeros dirigidos contra el sitio de glicosilación de la glicoproteína PSA. Se buscará obtener aptámeros con reconocimiento binario hacia la proteína, con capacidad de reconocer el glicano y la parte peptídica.
2. Caracterización de la afinidad y selectividad de los aptámeros obtenidos en el proceso de selección.
3. Estudio de los complejos aptámero-proteína, tanto desde el punto de vista empírico como mediante la construcción de modelos computacionales, con el fin de obtener información sobre los azúcares involucrados en el reconocimiento.
4. Diseño, construcción y evaluación de las características analíticas de sensores que utilicen los aptámeros seleccionados como receptores de afinidad. Desarrollo y validación de aplicaciones analíticas de los sensores que mejores características analíticas presenten. Aplicación a la cuantificación de la PSA glicosilada en muestras de suero humano de individuos sanos y en pacientes con cáncer de próstata.

Cancer is one of the main causes of death in the world and its early detection is one of the challenges we face as a society. Most of the cancer biomarkers used for clinical diagnosis or as therapeutic targets are glycoproteins. Moreover, tumours produce glycoproteins with altered glycosylation patterns compared to normal cells. Therefore, the study of the differences in the glycan pattern between normal and tumour tissues is a new strategy to identify sensitive and cancer-specific biomarkers. These biomarkers could act as first sentinels in the early detection of the disease. The detection of alterations in the glycosylation of certain proteins could improve the diagnosis specificity and the possibility of having a more reliable and precise diagnosis. However, there are not available test with enough selectivity to clinically validate these new biomarkers.

One of the key points in the development of such analytical assays is to have molecular receptors able to selectively recognize the alterations in the glycans of a specific glycoprotein. The ideal receptor would achieve the binary recognition of the glycoprotein, through both the peptide part and the glycan moiety. This requirement is necessary to assure adequate selectivity to distinguish between glycoproteins carrying very similar glycan patterns. Nevertheless, at the beginning of this Thesis none of the describe receptors possess binary recognition of glycoprotein, neither natural nor artificial receptors.

Theoretically, aptamers can selectively recognize any glycoprotein and with a well-designed selection process it could be possible to specifically direct the selection toward the glycosylation site, including in the recognition process both the glycan and the surrounding peptide structures.

In this context, the general objective of this PhD Thesis is the selection of aptamers to obtain receptors with high affinity and selectivity against the glycosylation site of the glycoprotein PSA, a biomarker of prostate

cancer. These aptamers will be used in the development of biosensors and analytical assays for the detection of the changes in the glycosylation pattern of PSA in human serum that may be associated to prostate cancer development.

We will achieve this general objective through the following specific objectives:

1. Selection of aptamers against the glycosylation site of the glycoprotein PSA using the SELEX technology. We seek to obtain aptamers able to achieve the binary recognition of the protein, recognizing both the glycan and the peptide moieties.
2. Characterization of the affinity and selectivity of the aptamers obtained in the SELEX processes.
3. Study of aptamer-protein complexes both through empirical characterization and computational modelling to get insight on the sugars involved in the recognition interaction.
4. Design, building, and evaluation of the analytical characteristics of biosensors that use the selected aptamers as affinity receptors. Development and validation of analytical applications of the sensors showing the best analytical performance. Application of the biosensors to the quantification of glycosylated PSA in human serum from healthy and prostate cancer patients.

CAPÍTULO 3

*Selección de aptámeros frente a la
estructura de glicano de la PSA*

3.1 Introducción

Se ha visto que durante el proceso de transformación tumoral se producen cambios en la estructura de los oligosacáridos unidos a algunas proteínas. Por esta razón, es posible explotar las variaciones en el patrón de glicosilación de las glicoproteínas asociadas al cáncer para mejorar los métodos de detección de esta enfermedad, ofreciendo la posibilidad de aumentar la especificidad y precisión diagnóstica. Una de las claves en el desarrollo de ensayos analíticos que permitan detectar estos cambios es la disponibilidad de receptores moleculares capaces de reconocer de manera selectiva los glicanos que se ven alterados. Por este motivo, hay una clara y urgente necesidad de desarrollar nuevos receptores sintéticos frente a la región glicosilada de glicoproteínas que se caractericen por una alta afinidad y puedan competir favorablemente, tanto en afinidad como en selectividad, con algunos de sus receptores naturales como son las lectinas. Los aptámeros se presentan como una excelente alternativa, pero es necesario un buen diseño de su proceso de selección para lograr el objetivo deseado.

En el presente capítulo se propone un método de selección de aptámeros hacia la parte de glicano de la PSA. Se seleccionó esta glicoproteína como diana modelo por ser un biomarcador ampliamente estudiado y para el que se han descrito los patrones de glicosilación de la proteína en su forma nativa y los cambios en los mismos asociados a la presencia del cáncer de próstata.

3.2 Protocolos

3.2.1 Modificación de las partículas magnéticas

Las diferentes proteínas (PSA, PSA recombinante y BSA) se inmovilizaron sobre la superficie de partículas magnéticas Dynabeads® M-280 tosilactivadas, que permiten la unión covalente de la proteína a la

superficie de las partículas a través de los grupos amino o sulfhidrilo (o grupo tiol), mediante el siguiente protocolo:

- 5 mg (165 μ L) de partículas magnéticas Dynabeads® M-280 tosilactivadas se equilibraron en un tubo eppendorf con 1 mL del disolvente BM (19 mM NaH_2PO_4 , 81 mM Na_2HPO_4 pH 7.4) y tras retirar el sobrenadante se incubaron con 100 μ g de la proteína en cuestión en 100 μ L de BM2 (3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.4) en el thermomixer durante 12-18 horas a 37 °C a una velocidad de agitación de 1300 r.p.m.
- Tras la separación magnética se descartó el sobrenadante, que se reservó para la posterior cuantificación de la proteína presente en el mismo mediante el ensayo de Bradford, y se acondicionaron las partículas en 1 mL de BLmod (PBS 1 \times + 0.5 % BSA) incubándolas en el thermomixer durante 1 h a 37 °C y 1300 r.p.m.
- Finalmente, las partículas se lavaron tres veces con 1 mL de BLmod2 (PBS 1 \times + 0.1% BSA) y se resuspendieron en 250 μ L de BLmod2 para su conservación a 4 °C.

3.2.2 Ensayo de Bradford

Para estimar la cantidad de proteína inmovilizada sobre la superficie de las partículas se utilizó el ensayo Bradford. Este es uno de los ensayos colorimétricos más utilizados para la cuantificación de proteínas. Se basa en el cambio producido en la intensidad de radiación absorbida por el colorante Coomassie® entre 470 nm y 595 nm tras la unión de la proteína al mismo, siendo la absorbancia medida proporcional a la cantidad de proteína presente. La cuantificación se realizó con relación a una curva de calibrado realizada con la misma proteína. Este método permitió cuantificar la concentración de proteína presente en el sobrenadante después del proceso de conjugación a las micropartículas magnéticas, que corresponde a la que no se ha enlazado a su superficie.

El calibrado se preparó pipeteando 100 μL de la disolución BM/BM2 3:2 para el blanco, y 100 μL de las disoluciones estándar en varios tubos de ensayo. Para la muestra se pipetearon 100 μL del sobrenadante. A continuación, se añadieron 5 mL del reactivo de Bradford (diluido a una concentración 1 \times) a cada tubo y se incubaron a temperatura ambiente 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm. Como disoluciones estándar para la realización del calibrado se utilizaron disoluciones de BSA con concentraciones entre 0.1 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ preparadas en BM/BM2 3:2. La concentración de proteína inmovilizada se obtuvo como la diferencia entre la concentración de proteína utilizada para la incubación con las partículas (0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y la concentración en el sobrenadante, obtenida a partir de la curva de calibrado.

3.2.3 Proceso de selección

La colección de secuencias de ADN utilizada como punto de partida del proceso de selección de aptámeros está formada por una región central aleatoria de 40 nucleótidos (la región variable), flanqueada por dos regiones de 20 nucleótidos de secuencia conocida. Estas regiones constantes se diseñan para que sean complementarias a los cebadores de la PCR. La colección se obtuvo mediante síntesis química y se adquirió a Sigma con purificación PAGE (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Secuencias de los ácidos nucleicos empleados en el proceso de selección.

Nombre	Secuencia (5' \rightarrow 3')
Colección	AGGGTTGATAGGTTAAGAGC(N) ₄₀ CGATGTCAACTAGCTGTTGG
Cebador directo	Fluoresceína-AGGGTTGATAGGTTAAGAGC
Cebador inverso	Biotina-CCAACAGCTAGTTGACATCG

En la primera etapa del proceso SELEX, se calentó 1 nmol de esta colección, preparada en el medio de selección (BS: PBS 1×, pH 7.4), a 98 °C durante 4 min y seguidamente se enfrió en hielo otros 4 minutos. A continuación, se añadió BSA y tARN, para que en un volumen final de 1 mL se obtenga una concentración de 1.23 µg/mL de cada uno, con el fin de minimizar las uniones inespecíficas y favorecer la competición usando un ácido nucleico no específico, respectivamente. La relación de las concentraciones de tARN y ADN se mantuvo para todas las rondas de selección en 0.1. Después se añadió el volumen necesario de partículas magnéticas modificadas con BSA (selección negativa) para mantener la relación de concentraciones ADN/proteína en 10:1. El conjunto se dejó interactuar durante 1 hora en el thermomixer a 25 °C y 1300 r.p.m. Tras la separación magnética, se recogió el sobrenadante para realizar la interacción con las partículas magnéticas modificadas con PSA. La selección negativa se realizó para eliminar aquellas secuencias que interaccionen inespecíficamente con la superficie de las partículas magnéticas o con la BSA que hay sobre las mismas. Sobre el sobrenadante se añadieron las partículas magnéticas modificadas con la PSA humana, manteniendo la relación ADN/proteína inicial, prolongando el proceso de interacción durante 1 hora en el thermomixer a 25 °C y 1300 r.p.m. Tras la separación magnética, se descartó el sobrenadante (selección positiva) y se lavaron las partículas 2 veces con 500 µL de BSL (BS + 0.01 % tween-20). Finalmente, se eluyeron las secuencias de ADN enlazadas a la PSA incubando las partículas con 30 µL de agua a 95 °C durante 15 min y la posterior separación magnética. Se determinó la concentración de ADN en el sobrenadante mediante medidas de absorbancia a 260 nm.

Las secuencias eluidas se amplificaron mediante PCR. Se utilizaron tubos de PCR de 50 µL a los que se añadieron 2 µL del eluato, 1 µM de los cebadores inverso y directo, 3 mM de MgCl₂, 0.2 mM de nucleótidos (dNTPs) y 1 unidad de la enzima inmolasa *hot-start* ADN polimerasa. Se empleó el cebador directo marcado con una molécula de fluoresceína y el directo con biotina, para la realización de la posterior etapa de

acondicionamiento de las hebras (Tabla 3.1). El protocolo de amplificación fue el siguiente: una primera etapa a 95 °C durante 10 minutos para activar la enzima, a continuación 15 ciclos de 94 °C durante 45 s, 57 °C durante 45 s y 72 °C durante 45 s; y una etapa final a 72 °C durante 10 minutos.

Para verificar que la amplificación tuvo lugar de la manera esperada se realizó una separación mediante electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación. En un gel de agarosa al 2 %, preparado en el tampón TBE (0.45 M Tris-Borato, 0.01 M EDTA, pH 8.3) y al que se le añadió el intercalante *simply safe*, sustancia que se intercala entre las bases del ADN de cadena doble y que es fluorescente, se cargó una muestra de 2 µL del producto de PCR, mezclada con 6 µL el tampón de carga, una muestra del blanco de la PCR mezclada también con el tampón de carga y una mezcla de marcador de tamaños de 20 pb. Tras la aplicación de un voltaje de 120 V durante 30 minutos, se iluminó el gel con una lámpara ultravioleta para observar las bandas correspondientes a los productos amplificados (Figura 3.11).

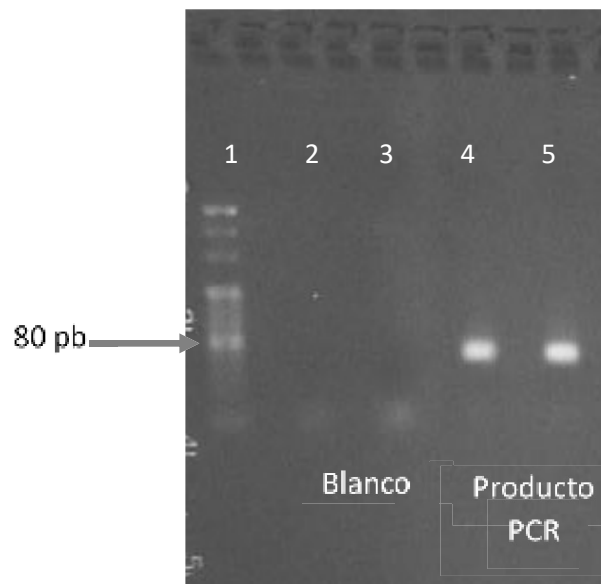


Figura 3.11: Gel de agarosa al 2 % en el que se muestran la escalera de tamaños (calle 1), el blanco de PCR sin ADN (calles 2 y 3) y el producto de la amplificación de la PCR (calles 4 y 5).

Una vez comprobado que el producto de amplificación tiene el tamaño esperado (80 pares de bases) se cuantificó su concentración mediante fluorescencia utilizando el fluorímetro Qubit®. Para ello 2 μL de producto de PCR se mezclan con 198 μL del intercalante. La cuantificación del ADN se realizó con relación a un calibrado externo con patrones de calibración en el intervalo de concentraciones 0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ -500 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Tras la medida de la fluorescencia el equipo proporcionó la concentración en unidades de $\text{ng}_{\text{ADN}}/\mu\text{L}$ que fue transformada a pmoles de ADN empleando la masa molecular del ADN de hebra doble de 80 pares de bases (49658 Da).

Para comenzar una nueva ronda de selección se requieren 250 pmoles de ADN de cadena sencilla, por lo que es necesario separar las hebras del ADN de cadena doble que se obtuvieron como resultado de la amplificación. Para ello se utilizaron partículas magnéticas modificadas con estreptavidina, que permiten atrapar la hebra doble a través del cebador inverso marcado con biotina. El protocolo que se realizó se detalla a continuación:

- El volumen de partículas Dynabeads® MyOne Streptavidin C1 necesario para separar 250 pmoles se lavó 3 veces con la disolución BLstrep (10 mM Tris-HCl, 2 M NaCl + 0.01 % tween-20).
- Tras la separación magnética, las micropartículas se resuspendieron en la misma disolución sin tween-20, en un volumen igual al de ADN que se quiere separar. Se añadió el ADN a separar y se incubó durante 15 minutos en el thermomixer a 25 °C a 1300 r.p.m. Pasado este tiempo se colocó el tubo en el imán, lavando las partículas tres veces con 500 μL de BLstrep.
- A continuación, se añadieron 50 μL de NaOH 100 mM y se incubó durante 10 minutos en el thermomixer a 25 °C y 1300 r.p.m. De esta forma se desnaturaliza la doble hélice del ADN y se separan las hebras, quedando unida a la superficie de las partículas magnéticas la que tiene el cebador inverso marcado con biotina y

su complementaria en disolución, que es la de interés para el SELEX.

- Tras la separación magnética se recoge el sobrenadante, en el que se encuentra la hebra que contiene el cebador directo. Por último, se añaden 6.04 μL de HCl 1 M para neutralizar la disolución y se diluye con 126 μL de BS para comenzar una nueva ronda de selección.

Cuando tras la etapa de amplificación PCR se obtuvieron menos de los 250 pmoles de ADN necesarios para iniciar un nuevo ciclo, se amplificó una nueva alícuota del eluato del ciclo anterior mediante PCR, comprobándose siempre el tamaño de los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa, seguido de la cuantificación espectrofotométrica.

Para dirigir la selección hacia la región glicosilada de la PSA se introdujeron dos contra-selecciones frente a la PSA recombinante en las rondas 3 y 6. Estas consistieron en la incubación de la colección de secuencias con partículas magnéticas modificadas con PSA recombinante y tras la incubación y separación magnética se recoge el sobrenadante para realizar la selección positiva frente a la PSA y el resto de las etapas del proceso de selección.

A lo largo de los ciclos de selección se disminuyó el tiempo de incubación y se incrementaron los lavados con las condiciones descritas en la Tabla 3.2. Así mismo se ajustaron los volúmenes de las partículas magnéticas modificadas con las diferentes proteínas y las concentraciones del competidor tARN y BSA a utilizar para mantener la misma relación que en la primera ronda de selección, ya que a partir de la segunda se comienza la selección con 250 pmoles de ADN.

3.2 Protocolos

Tabla 3.2: Condiciones empleadas en las sucesivas rondas de selección.

Ronda	Contra-selección	Tiempo incubación (min)	Lavados
1		60	2
2		60	2
3	si	60	2
4		30	2
5		30	5
6	si	30	5

3.2.4 Ensayos de unión con detección electroquímica

La selección de aptámeros requiere una etapa de cribado, en la que se evalúan las características de afinidad de las diferentes secuencias candidatas frente a la PSA. Para ello se utilizaron electrodos serigrafados de oro (SPAuE) con PSA inmovilizada. En primer lugar, es necesaria una etapa de limpieza y acondicionamiento de los SPAuE, para ello se limpiaron con etanol y agua y se secaron con una corriente de nitrógeno. A continuación, se realizó un pulido electroquímico en 50 μ L de una disolución de H₂SO₄ 0.5 M, colocada sobre los tres electrodos, mediante la realización de 10 barridos cíclicos de potencial entre 0 V y 1.3 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Por último, se lavaron con agua, se secaron con nitrógeno y el electrodo de referencia y el contraelectrodo se cubrieron con una fina capa de esmalte transparente no surfactante.

El electrodo de trabajo de los SPAuE se modificó con una monocapa autoensamblada (SAM) mixta del ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) y 6-mercapto-1-hexanol (MH) en relación 1:3 (0.25 mM MUA y 0.75 mM MH), ambos preparados en acetato sódico (NaAc) 10 mM pH 5.5. La

mezcla se incubó sobre el electrodo de oro durante toda la noche a 4 °C en atmósfera con humedad controlada para evitar la evaporación de la gota. A continuación, se procedió a la inmovilización covalente de la proteína en dos etapas: i) la activación de los grupos carboxilo por incubación en una disolución 1:1 de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 100 mM y N-hidroxisuccinimida (NHS) 25 mM en agua durante 30 minutos, y ii) la unión de la proteína incubando el electrodo durante 30 minutos con una disolución de 50 µg/mL de la proteína en NaAc 10 mM pH 5.5. Por último, se bloquearon aquellos grupos activados que no hayan unido proteína con una disolución de 200 µg/mL de BSA en BS durante 15 minutos (Figura 3.12).

Los ensayos de unión se realizaron incubando el electrodo de trabajo con disoluciones de concentración creciente de los aptámeros marcados con fluoresceína en el extremo 5', preparados en BS, durante 30 minutos. A continuación, se añadió el conjugado Fab-antifluoresceína-peroxidasa en una concentración 0.5 U/mL preparado en disolución BS-0.5% caseína, dejando que la interacción con la superficie tenga lugar durante 30 minutos. Finalmente se realizó la medida electroquímica mediante la adición de 35 µL de TMB-H₂O₂. Tras 30 s de reacción enzimática, el producto de oxidación del TMB se midió mediante cronoamperometría a -0.2 V durante 60 s. Para la realización de esta medida se utilizó un electrodo externo de referencia de Ag|AgCl|KNO₃ y un contra electrodo de platino. Se registró como señal analítica la intensidad promedio de los últimos 10 segundos de la medida (Figura 3.12).

Todas las interacciones se realizaron en un volumen de 10 µL a temperatura ambiente (RT), y tras cada etapa los electrodos se lavaron con la disolución de la etapa siguiente y se secaron con corriente de nitrógeno.

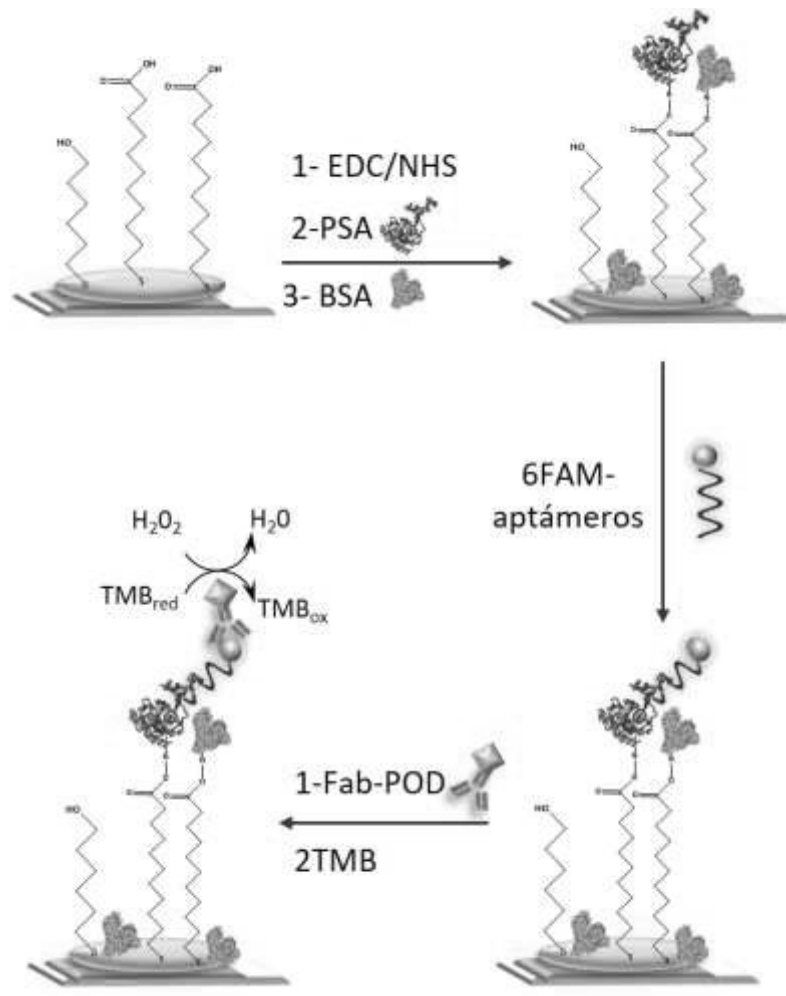


Figura 3.12: Esquema de las etapas del ensayo de unión con detección electroquímica de los aptámeros a las proteínas inmovilizadas sobre electrodos de oro.

3.2.5 Ensayos de unión mediante SPR

Previo a la modificación del disco de oro del equipo de espectroscopia de plasmón de superficie (SPR), este se limpió sucesivamente con disolución piraña (70:30 H_2SO_4/H_2O_2) durante 10 minutos y etanol y se secó con una corriente de nitrógeno. A continuación, se modificó con una SAM mixta de una mezcla 1:3 de MUA y MH en etanol como se indicó en las medidas electroquímicas, durante toda la noche a 4 °C en atmósfera húmeda. Pasado este tiempo se lavó el disco con etanol y agua y se secó

con nitrógeno para colocarlo sobre el prisma limpio, deslizándolo sobre una fina capa de aceite con índice de refracción conocido (1.518 ± 0.002).

El prisma junto con el disco se colocó en el equipo Autobal ESPRIT y a partir de este momento todas las etapas de inyección y registro de señal se realizaron de forma automática con el automuestreador y secuenciador del equipo controlado por el software Data Acquisition 4.4 y a temperatura controlada de 25 ± 1 °C. Todas las etapas se realizaron con un volumen de muestra de 35 μ L y bajo agitación a 33.3 μ L/s.

Los grupos carboxílicos de la SAM se activaron con tres inyecciones de 10 minutos cada una de una mezcla 1:1 de EDC 100 mM y NHS 25 mM en agua (etapa 1) y después se lavó con la disolución del circuito (NaAc 10 mM pH 5.5¹¹⁵- etapa 2). A continuación, se inyectó una disolución de 50 μ g/mL de la proteína a inmovilizar en la misma disolución durante 20 minutos (etapa 3) y por último, tras lavar con la disolución (etapa 4), se bloquearon los grupos carboxílicos activados sin reaccionar con una disolución de etanolamina 1 M en BS durante 15 minutos (etapa 5) (Figura 3.13).

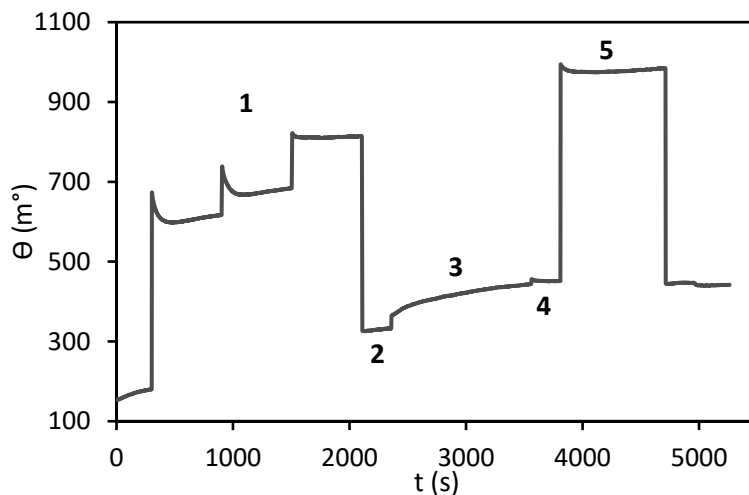


Figura 3.13: Sensograma del enlace covalente de la PSA al cristal modificado del SPR. 1) Activación con EDC/NHS. 2) Línea base con NaAc. 3) Unión de la PSA. 4) Línea base con NaAc. 5) Bloqueo con etanolamina. 6) Línea base con NaAc.

La etapa de interacción entre el aptámero y la proteína se realizó inyectando disoluciones con concentraciones crecientes del ssADN y registrando la curva de enlace. Cada interacción consiste en la adquisición por triplicado de la línea base de la disolución de PBS durante 5 minutos, la inyección de una concentración de aptámero determinada en uno de los canales y de disolución sin aptámero en el canal de referencia, durante 10 minutos, y por último tras un breve lavado el registro de la etapa de disociación en la misma disolución sin aptámero durante 10 min hasta obtener una señal estable. La diferencia en el ángulo de resonancia (en m°) de la línea de disociación y de la línea base se relaciona con la cantidad de aptámero unido a la proteína, previa substracción de la señal inespecífica medida en el canal de referencia. Este ciclo se repite con cada nueva concentración de ssADN sin regeneración de la superficie.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Proceso de selección

En algunos casos el proceso SELEX tradicional no logra obtener aptámeros con las características de afinidad y selectividad deseadas. Se han comenzado a utilizar diferentes variantes del SELEX para mejorar la eficacia del proceso de selección y la funcionalidad analítica. Una de estas metodologías es el *Counter-SELEX*¹¹⁶, utilizada para desarrollar aptámeros con gran afinidad hacia una parte específica de la molécula diana. Este procedimiento consiste en hacer interaccionar la colección de ADN con un compuesto estructuralmente relacionado, por ejemplo, una isoforma de la proteína, utilizando las secuencias no unidas para la ronda posterior de selección. Estas contra-selecciones se alternan con las etapas básicas del proceso de selección comentadas en el capítulo de introducción.

La selección de nuevos aptámeros de ADN que se unan a la región glicosilada del antígeno específico de la próstata se considera difícil puesto

que esta zona es poco aptagénica y además corresponde a una pequeña fracción de la proteína. Por ello se propone el método *Counter-SELEX* como estrategia a llevar a cabo. Esta se basa en la introducción de contra-selecciones bien diseñadas frente a la PSA expresada recombinantemente en *Escherichia coli* (rPSA), proteína con la misma secuencia peptídica que la PSA humana (hPSA) pero sin los glicanos, ya que estas bacterias no tienen la capacidad de sintetizarlos.

Para la realización de las rondas de selección es necesario tener la molécula diana anclada sobre una superficie. En nuestro caso se utilizaron partículas magnéticas por su fácil manejo, ya que facilita las etapas de lavado y separación.

Durante todo el proceso de selección, antes de cada etapa de interacción con la hPSA se introdujeron etapas de selección negativa frente a partículas magnéticas modificadas con BSA para eliminar todas aquellas secuencias que muestren cierta afinidad bien por la superficie de las partículas magnéticas o bien por la BSA, uniéndose a ellas inespecíficamente. Las contra-selecciones se realizaron una vez que la colección inicial comenzó a enriquecerse en secuencias afines hacia la hPSA, lo que se produjo a partir del segundo ciclo de selección; específicamente se realizaron dos etapas de contra-selección en las rondas 3 y 6. Estas consistieron en la incubación de la colección de secuencias de ADN resultantes del ciclo anterior con partículas magnéticas modificadas con rPSA. Después de la incubación y separación magnética se recogió el sobrenadante para realizar la selección positiva frente a la hPSA. De esta forma, en el sobrenadante se encontrarán aquellas secuencias que no son capaces de unirse a la rPSA y puesto que la única diferencia entre ambas proteínas son los glicanos, estas secuencias serán aquellas que van dirigidas a los glicanos de la PSA. A continuación, se desarrollaron el resto de etapas del proceso SELEX (elución, amplificación y separación). En la Figura 3.14 se muestra un esquema del proceso de selección llevado a cabo.

3.3 Resultados y discusión



Figura 3.14: Esquema del proceso de selección.

Para el seguimiento del proceso de selección se evaluó el enriquecimiento de la colección inicial de hebras de ADN de una sola cadena (ssADN) en secuencias con afinidad hacia la hPSA a lo largo de los sucesivos ciclos de selección. Para ello se emplearon tres metodologías: ensayos de enlace con partículas magnéticas modificadas con PSA, espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie (SPR) y estudios de diversidad de la colección de secuencias de ADN por medidas VIS-UV tras un proceso de rediseñación (*remelting*). Los resultados obtenidos con cada una de ellas se describen a continuación.

- Ensayo de enriquecimiento con partículas magnéticas

En esta metodología se parte de las colecciones de ADN de hebra doble obtenidas tras la realización de la PCR de cada ronda. Para realizar el ensayo de enriquecimiento es necesario disponer de hebras simples, por lo que se separaron 25 pmoles de la colección de cada ronda al igual que se hizo en las etapas de acondicionamiento. Al utilizar un cebador directo marcado con fluoresceína en su extremo 5', estas hebras simples también

incorporan esta marca, que se utilizó para seguir el enriquecimiento mediante medidas de fluorescencia. La cantidad de ADN separado se midió mediante absorbancia a 260 nm.

Los 25 pmoles de ssADN de cada ronda se calentaron a 98 °C durante 4 minutos y se enfriaron en hielo durante otros 4 minutos. A continuación, se añadieron 25 pmoles de PSA inmovilizada sobre partículas magnéticas incubándolos junto con las secuencias de ADN en un volumen final de 250 μ L durante 10 minutos en el thermomixer a 25 °C y 1300 r.p.m. Tras la interacción y la separación magnética se recogió el sobrenadante donde se encuentra la fracción de secuencias no enlazadas y se realizaron dos lavados con 200 μ L de BSL. Después se eluyeron las secuencias enlazadas a las partículas con 30 μ L de agua a 95 °C durante 15 minutos. Tras la separación magnética se recogió la fracción enlazada diluyéndola con 120 μ L de PBS 1.25x. Se realizó un experimento similar con partículas magnéticas modificadas con rPSA.

Se midió la cantidad de ADN de cada una de las fracciones mediante fluorescencia utilizando un lector de placas, a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una de emisión de 528 nm, características de la fluoresceína. La intensidad de fluorescencia se transformó en pmoles de ssADN mediante un calibrado externo, en el que se usaron disoluciones de concentraciones conocidas de un ADN de cadena sencilla de 80 nucleótidos marcado con fluoresceína.

En la Figura 3.15 se muestra el porcentaje de ADN obtenido en la fracción enlazada a lo largo de las rondas del proceso de selección. Se observó un enriquecimiento progresivo de la colección de ADN en secuencias con afinidad hacia la PSA humana. Tras seis rondas de selección un 60 % de secuencias se unieron a la glicoproteína inmovilizada, indicando un alto porcentaje de secuencias específicas hacia la PSA en la última ronda. El comportamiento es muy diferente cuando se evalúa la afinidad de las sucesivas colecciones hacia la PSA recombinante. En la Figura 3.15 puede observarse como hay un dramático decrecimiento en la

3.3 Resultados y discusión

afinidad de las secuencias tras las rondas 3 y 6, mostrando la efectividad de las etapas de contra-selección realizadas en esos ciclos.

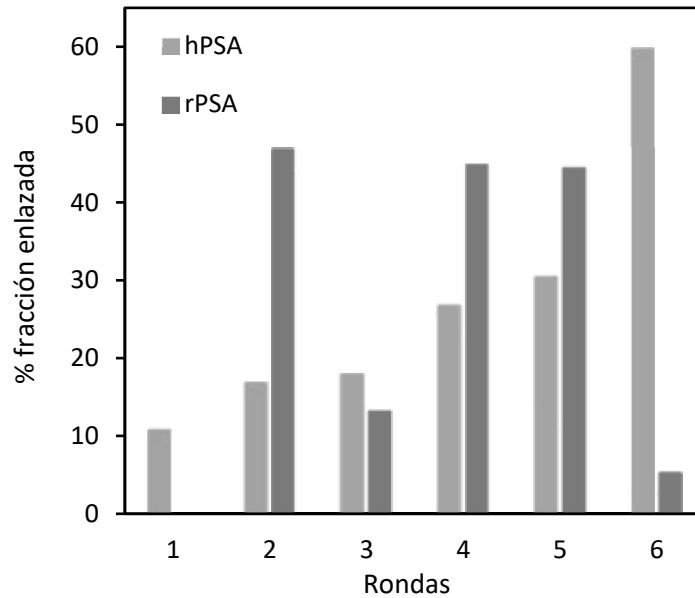


Figura 3.15: Evolución del porcentaje de secuencias de las colecciones obtenidas tras cada ronda que son capaces de unirse a la PSA glicosilada (verde) y a la recombinante (azul).

- Ensayo con espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie

En esta segunda metodología se evalúa la afinidad de enlace promedio de las secuencias de oligonucleótidos de cada ronda a la PSA. Para ello se inmovilizó covalentemente la PSA sobre un disco de oro que se colocó sobre un prisma ópticamente transparente, sobre el que se hace incidir la radiación procedente de un láser, variando el ángulo de incidencia en un intervalo en el que se produce reflexión total. A un cierto ángulo de incidencia se produce un acoplamiento de los fotones incidentes con los plasmones del metal (condición de resonancia), detectándose un mínimo en la radiación reflejada. El ángulo de incidencia al que se produce ese mínimo (θ) cambia al modificarse la interfase metal-disolución ya que cambia el índice de refracción en la porción de disolución adyacente al metal. Por tanto, la medida de este ángulo tras la interacción de la superficie de oro modificado con hPSA con las secuencias de las distintas

rondas permite obtener información en tiempo real sobre la unión de estas a la proteína. Los resultados obtenidos mediante esta metodología se resumen en la Figura 3.16A, donde puede observarse que no hay enlace apreciable a la hPSA utilizando la colección inicial (R0), mientras que se produce un aumento de la afinidad de enlace a medida que progresa la selección. Con las secuencias de la colección resultante de la quinta ronda se puede observar unión a partir de una concentración total de 100 nM, mientras que con las secuencias de la ronda seis se produce interacción de afinidad a concentraciones mucho menores, con señales de SPR mayores que para las obtenidas en la ronda 5 incluso a la concentración más baja ensayada (10 nM).

Con el fin de estudiar en qué medida está involucrado el sitio de glicosilación en el enlace se repitió el experimento anterior con la colección de secuencias de la ronda seis, pero inmovilizando la PSA recombinante sobre el disco de oro del SPR. Al comparar los resultados obtenidos con los registrados para la interacción con la proteína nativa, se observó un desplazamiento de la curva de enlace a la rPSA hacia mayores concentraciones de ADN, lo que indica que los oligonucleótidos de esta ronda reconocen la forma no glicosilada de la proteína recombinante pero con una afinidad significativamente menor que hacia la PSA glicosilada (Figura 3.16B). Estos resultados sugieren que un alto porcentaje de secuencias en la última ronda de selección se enlazan preferentemente a la PSA a través del reconocimiento del glicano, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos con partículas magnéticas y medidas de fluorescencia.

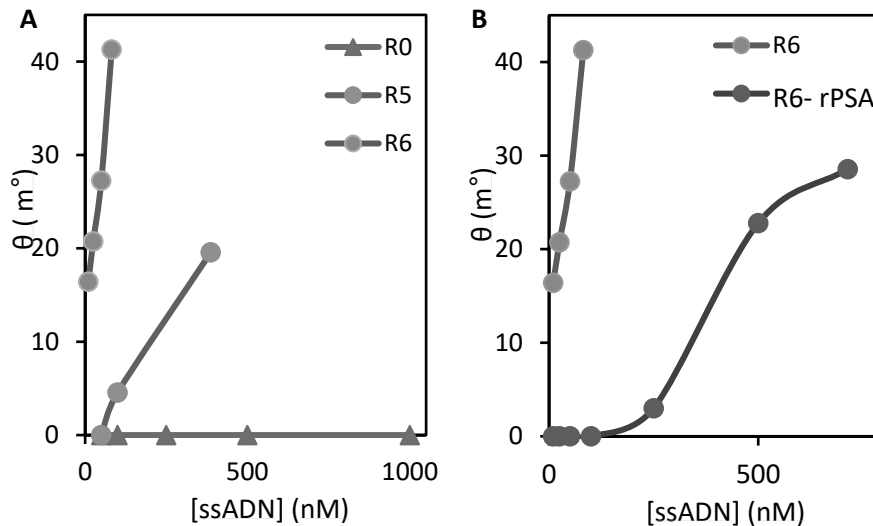


Figura 3.16: A) Medidas de SPR obtenidas para la interacción de diluciones de las secuencias de las colecciones de la ronda 0 (morado), 5 (naranja) y 6 (verde) con la PSA glicosilada. B) Comparación de las señales de SPR obtenidas en la interacción de las secuencias de la ronda 6 con la PSA humana (verde) y con la PSA recombinante (azul).

- Estudios de *remelting*

Este tipo de ensayos permite evaluar el cambio o variabilidad de las secuencias en la colección que se produce a través del proceso de selección. Para ello, las secuencias de hebra simple después de cada ronda deben transformarse en hebra doble mediante PCR. El proceso de hibridación-desnaturalización térmica de estas secuencias proporciona información sobre su diversidad. Cuanto mayor sea la diversidad de secuencias, mayor será la probabilidad de que se produzcan dúplex imperfectos, con lo que la temperatura de fusión (*melting*) de la mezcla disminuirá. Si se monitoriza la velocidad del proceso de disociación (*remelting*) después de una etapa de hibridación (*annealing*), el análisis de las curvas obtenidas ofrece información sobre la temperatura de disociación, y por tanto de la diversidad de la colección de secuencias analizadas. Un incremento en la diversidad se traduce en un decrecimiento de la temperatura de *melting*¹¹⁷.

Las colecciones obtenidas después de cada ciclo de selección se amplificaron utilizando los cebadores de la PCR sin ninguna marca y en las mismas condiciones empleadas en el SELEX. A 25 μL de cada producto de PCR se le añade los compuestos fluorescentes EvaGreen[®] (intercalante) y ROX (referencia, para la normalización de las curvas) en una concentración final 1 \times . Estas disoluciones se calentaron siguiendo el siguiente programa: 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos, 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, y finalmente un incremento progresivo de temperatura durante 20 minutos para alcanzar los 95 $^{\circ}\text{C}$ (*remelting*), que se mantuvo durante 30 segundos. Las curvas de *remelting* se obtuvieron en un sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific).

En la Figura 3.17 se muestran los resultados obtenidos para la colección inicial (R0) y tras la última ronda de selección (R6). Se observó un aumento en la temperatura de *remelting* del ADN desde 81.7 $^{\circ}\text{C}$ para la colección inicial hasta 82.7 $^{\circ}\text{C}$ para la colección obtenida después de la ronda 6, lo que indica una disminución en la diversidad de esta última colección de ADN. Esto es indicativo de que a lo largo del proceso de selección se enriquece la colección de partida en determinadas secuencias, disminuyendo así su diversidad.

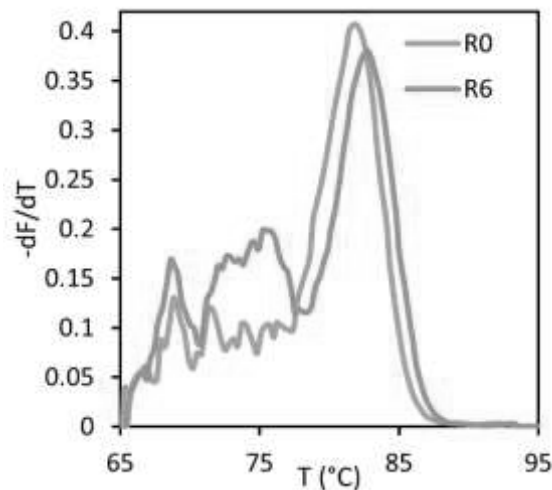


Figura 3.17: Curvas de remelting para el ADN de la ronda 0 (azul) y la ronda 6 (naranja).

3.3.2 Secuenciación masiva e identificación de los aptámeros

Con el fin de estudiar la evolución de las secuencias a través de las rondas de selección y conocer aquellas que sobrevivieron hasta la última se realizó la secuenciación masiva de las rondas 0, 2, 4 y 6. La aplicación de esta tecnología permite realizar cientos de millones de lecturas, obteniendo información sobre las secuencias de ADN en múltiples rondas de selección. Las secuencias de las rondas 0, 2, 4 y 6 se amplificaron mediante PCR, utilizando los cebadores sin marcas y bajo las mismas condiciones de amplificación empleadas en el proceso de selección. La secuenciación masiva se llevó a cabo utilizando el secuenciador IonTorrent™ Personal Genome Machine® (PGM) (Thermo Fisher Scientific).

La secuenciación IonTorrent se basa en que la adición de un nucleótido a un polímero de ADN libera un protón. Mediante la medida del cambio en el pH resultante de la liberación de estos iones utilizando semiconductores, se pueden detectar simultáneamente millones de estos cambios en los distintos canales del chip que se emplea para ello, lo que permite determinar la secuencia de cada fragmento de ADN (Figura 3.18).

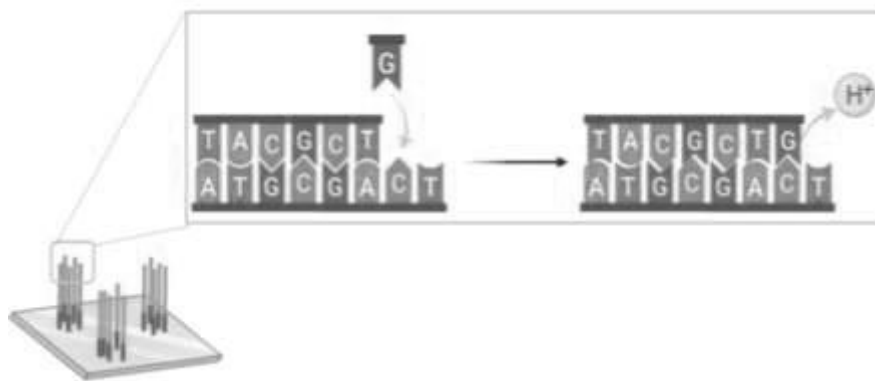


Figura 3.18: Esquema del principio de funcionamiento de la secuenciación IonTorrent basada en la medida de cambios de pH tras la liberación de un ion hidrógeno tras la unión de un nucleótido.

Los datos en bruto obtenidos de la secuenciación, aproximadamente 400000 lecturas en cada ronda, se trataron usando el servidor web Galaxy (www.usegalaxy.org)^{118,119}. En primer lugar, se filtraron las secuencias en función de la calidad de las lecturas. A continuación, se eliminaron las marcas que se introducen para la secuenciación, después se descartaron aquellas que no tenían la región de los cebadores intacta y las que no tenían el tamaño deseado (80 ± 5 bases). Finalmente se quitaron los cebadores de la PCR para extraer la información solamente de la región central de las secuencias, de 40 bases, que se agruparon según el número de repeticiones de cada una encontradas en cada ronda. De este primer análisis se obtuvieron una media de 300000 secuencias diferentes en cada ronda.

Las secuencias obtenidas para cada ronda se analizaron mediante la herramienta bioinformática aptaSUIE¹²⁰ para estudiar la distribución y abundancia de los cuatro nucleótidos en la región central. De este análisis se puede observar que la colección inicial de secuencias tiene la siguiente distribución de nucleótidos: 27.41 % de adeninas (A), 27.65 % de timinas (T), 23.76 % de citosinas (C) y 21.19 % de guaninas (G) para todas las secuencias analizadas (326411 lecturas), ligeramente diferente a la esperada para una colección aleatoria e idéntica distribución de los cuatro nucleótidos (Figura 3.19).

3.3 Resultados y discusión

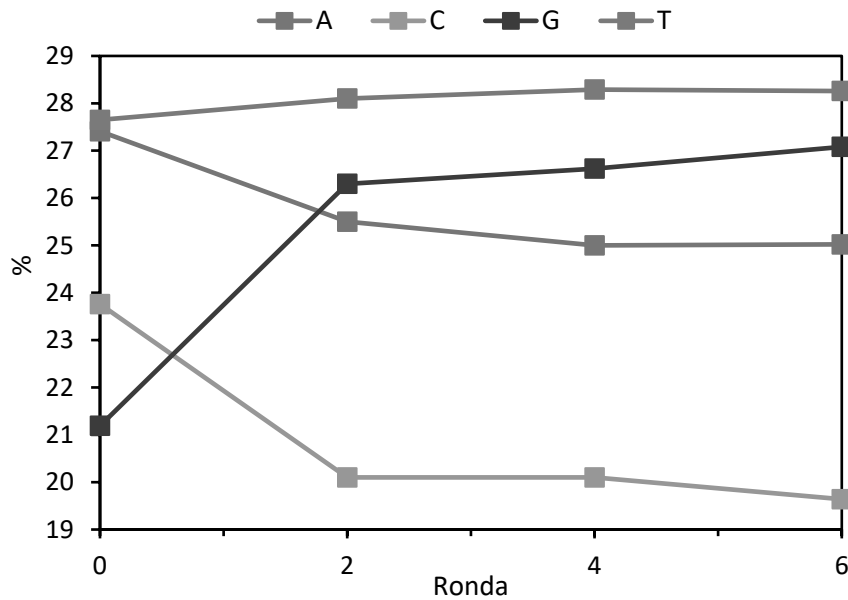


Figura 3.19: Distribución de los cuatro nucleótidos para todas las secuencias analizadas de las rondas 0, 2, 4 y 6.

En la ronda 6 se observó un enriquecimiento en los nucleótidos guanina y timina, menos representados en la colección inicial, encontrándose un 27.08 % de guaninas y un 28.26 % de timinas para todas las secuencias analizadas (304722 lecturas). El estudio de la distribución de los nucleótidos en cada posición de la región central muestra un incremento de timinas en el extremo 3' mientras que las guaninas predomina en el extremo 3' (Figura 3.20).

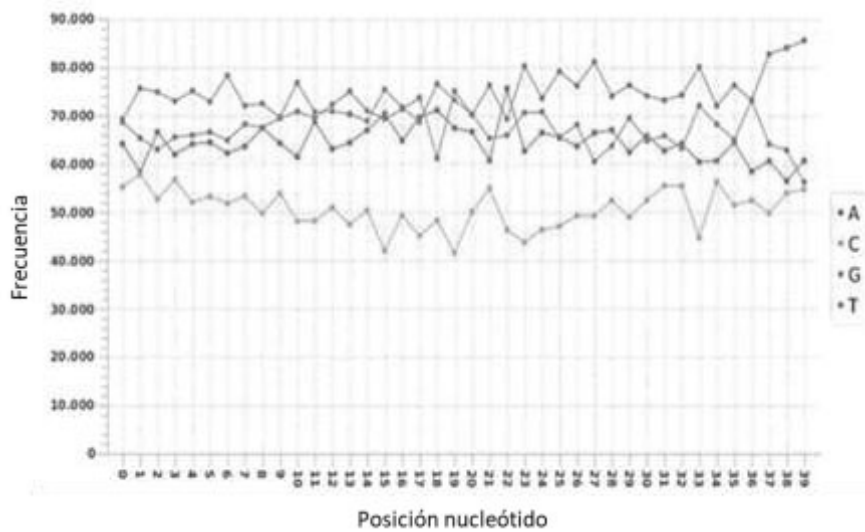


Figura 3.20: Distribución de los cuatro nucleótidos en la ronda 6 en cada posición de la región variable central obtenido con aptaSUIE.

La complejidad en secuencias, estimada como la cantidad relativa de secuencias únicas en referencia al total de lecturas de cada ronda ($\% \text{ complejidad} = \text{únicas}/\text{totales}$), decreció desde 0.19 % en la ronda 2 a 0.09 % en la ronda 6, lo que apunta a una menor diversidad de secuencias tras la última ronda de selección, en concordancia con los resultados obtenidos en el ensayo de *remelting*.

A continuación, con el fin de evaluar cómo evolucionaron las secuencias a lo largo de las rondas de selección, se compilaron mediante la aplicación web Galaxy las secuencias obtenidas en las rondas 0, 2, 4 y 6 para crear una base de datos no redundante. Esta base de datos permite conocer aquellas secuencias que se mantuvieron a lo largo del proceso de selección llegando hasta el último ciclo. Estas secuencias se clasificaron en familias con la herramienta Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega>) obteniéndose el árbol de familias que se muestra en la Figura 3.21.

3.3 Resultados y discusión

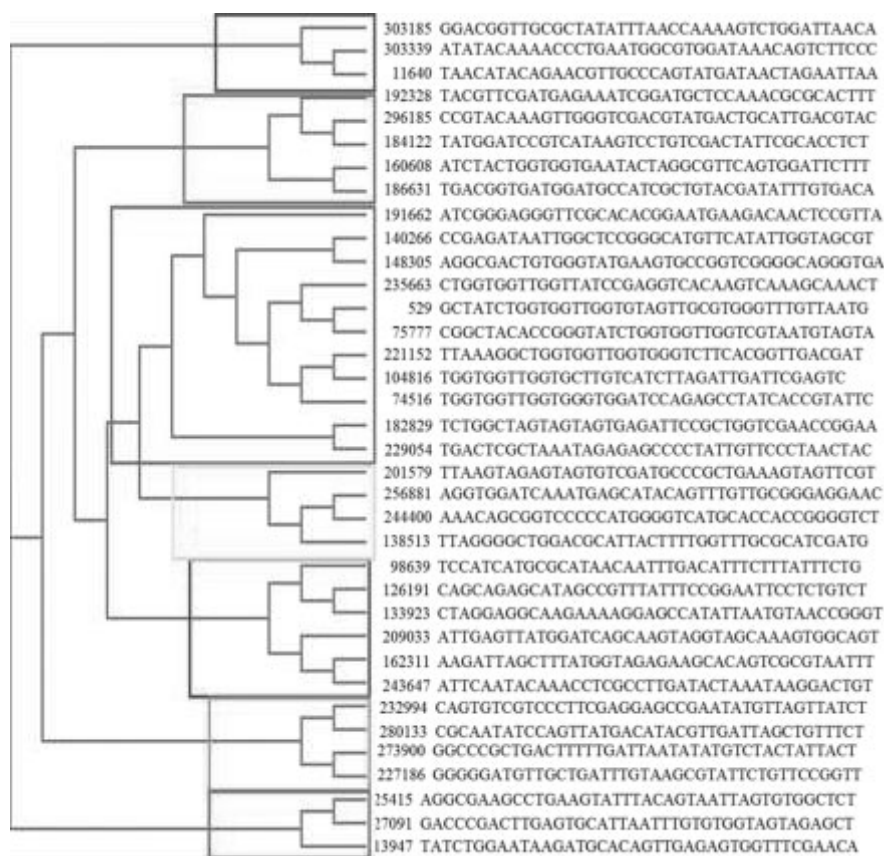

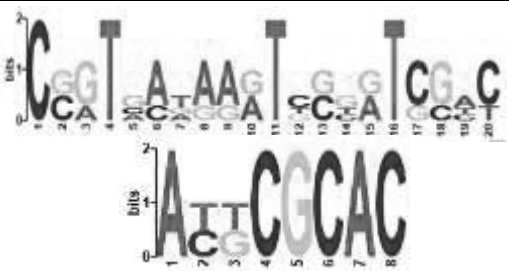







Figura 3.21: Árbol filogenético de las secuencias que se encuentran a o largo de las diferentes rondas de selección, obtenido mediante un alineamiento múltiple y compilado utilizando Clustal Omega.

A continuación, se estudió en más detalle cada una de las familias obtenidas mediante el servidor web Galaxy para identificar los motivos de bases que más se repiten en las secuencias de cada familia. Se buscó cada uno de los motivos obtenidos en la colección de secuencias de la última ronda para conocer cuántas de las secuencias lo poseen. En la Tabla 3.3 se muestran los motivos obtenidos y el número de secuencias de la ronda 6 que los poseen.

Selección de aptámeros frente a la estructura de glicano de la PSA

Tabla 3.3: Motivos representativos encontrados en cada familia de secuencias identificada y número de repeticiones encontradas en las secuencias de la ronda 6, obtenidos con Galaxy web.

Familia	Motivos	Repeticiones
1		3289
2		3323
3		2752
4		51175
5		915
6		1639
7		903

3.3 Resultados y discusión

Dado que se ha asociado un aumento de diez veces en la afinidad de aptámeros con 5 posiciones conservadas de nucleótidos¹²¹ se seleccionaron cuatro de las siete familias con motivos que contienen al menos 5 nucleótidos inequívocos (secuencias de baja variabilidad o alto consenso) para su evaluación en términos de afinidad y selectividad hacia la PSA. Específicamente, se seleccionaron las secuencias representativas de las familias I, II, III y IV, siendo estos motivos muy recurrentes en la colección de secuencias de la ronda 6, por el número de repeticiones encontradas de cada uno. Se predijo la estructura secundaria de los potenciales aptámeros de cada familia utilizando Mfold¹²², empleando como condiciones de predicción una temperatura de 25 °C y una concentración de sales de 0.154 M de NaCl. Se seleccionaron como candidatas aquellas secuencias que presentaron el menor valor de energía libre, lo que se traduce en una estructura secundaria más estable. Este criterio de selección se sustenta en la observación de que existe una correlación positiva entre la complejidad de las estructuras secundarias de los aptámeros y la afinidad de los mismos hacia su diana¹²¹. Además, también se seleccionó la secuencia más repetida en la última ronda de selección, perteneciente a la familia I. Las cinco secuencias seleccionadas como posibles aptámeros y su estructura secundaria se recogen la Tabla 3.4 y Figura 3.22.

Tabla 3.4: Secuencias de los aptámeros seleccionados tras el proceso de selección.

Nombre	Secuencia 5'→3'
PSA-1	GGACGGTTGCGCTATATTTAACCAAAAGTCTGGATTAACA
PSA-2	TGACGGTGATGGATGCCATCGCTGTACGATATTTGTGACA
PSA-3	GCTATCTGGTGGTTGGTGTAGTTGCGTGGGTTTGTTAATG
PSA-4	AAACAGCGGTCCCCATGGGGTCATGCACCACCGGGTCT
PSA-5	GGTCAAGTCTCGTTAAGTCGACTGTATTCTTCAGGCGCCT

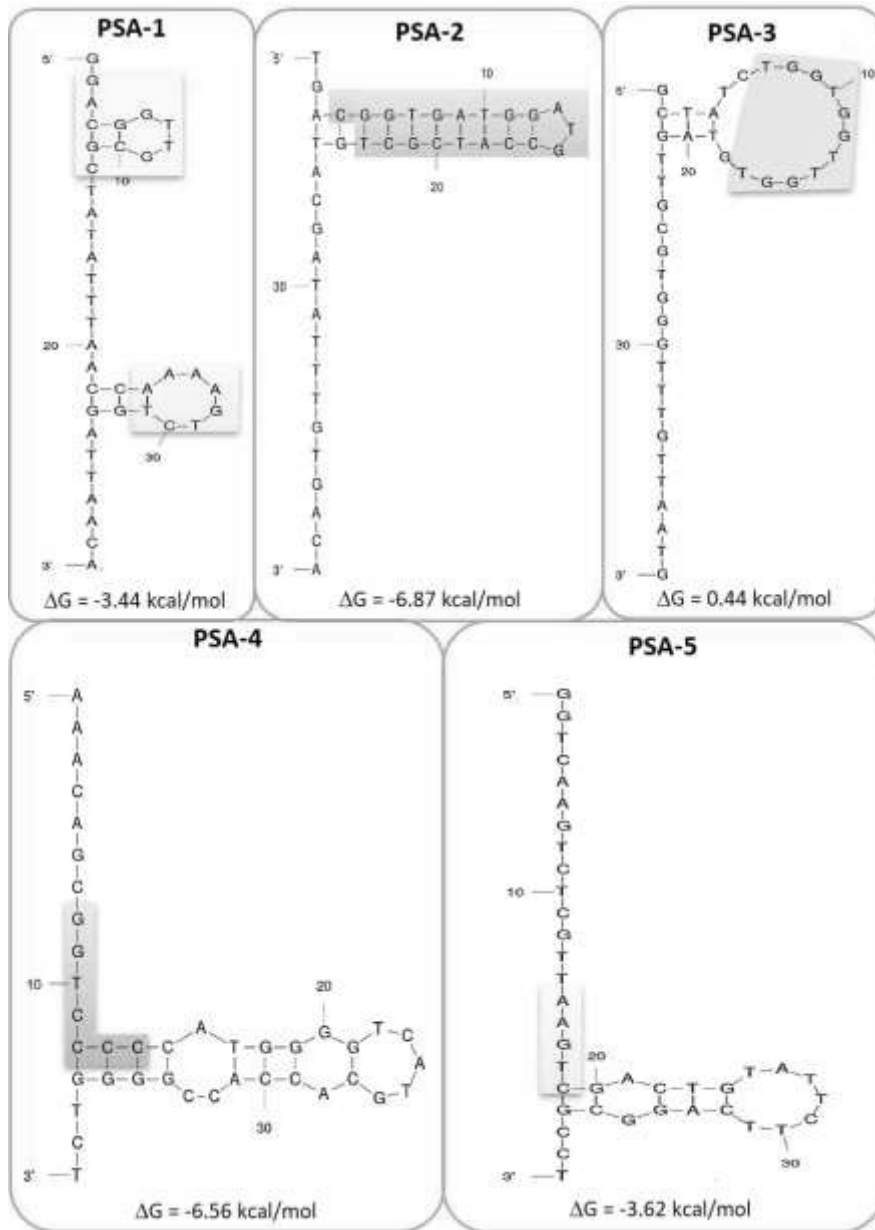


Figura 3.22: Estructura secundaria de las cinco secuencias seleccionadas obtenidas mediante Mfold, en las que se resalta la posición de los motivos repetidos.

3.3.3 Caracterización de la afinidad de los aptámeros seleccionados

Los cinco aptámeros candidatos fueron sintetizados incluyendo un espaciador de cinco timinas y una marca de fluoresceína en el extremo 5' de la región central (40 nucleótidos). Estos fueron sintetizados por la casa comercial Metabion (Alemania) con purificación por HPLC y servidos en formato liofilizado.

Para escoger el aptámero con las mejores características de reconocimiento hacia la PSA glicosilada se evaluó la capacidad de los cinco aptámeros seleccionados de unirse a la PSA humana y a la recombinante (no glicosilada), empleando un ensayo de unión con detección cronoamperométrica. Estas proteínas se inmovilizaron sobre electrodos serigrafados de oro y se incubaron con una disolución 500 nM de cada aptámero marcado con fluoresceína. Para medir la cantidad de aptámero enlazado, después de la etapa de interacción de afinidad aptámero-PSA se incorporó un conjugado anti-fluoresceína-peroxidasa. De esta forma, mediante adición de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno (sustratos de la peroxidasa) es posible obtener mediante cronoamperometría a - 0.2 V una señal que depende de la cantidad de aptámero enlazado en la primera etapa.

En la Figura 3.23 se muestra que todos los aptámeros seleccionados reconocen a la hPSA pero con diferente afinidad, como puede deducirse de la diferente intensidad de corriente obtenida para cada uno de ellos. El aptámero PSA-5, el más abundante en la secuenciación, muestra la mayor señal analítica frente a la PSA humana pero también es capaz de reconocer a la PSA recombinante con un 60 % de la señal para la hPSA. El aptámero PSA-1 es el que muestra la mayor capacidad de discriminación entre la forma glicosilada y no glicosilada de la PSA, siendo el que tiene una menor señal para la rPSA. El aptámero PSA-2 también se enlaza preferencialmente a la hPSA pero su señal es un 33 % menor que la del PSA-1. Por el contrario, el aptámero PSA-3 se une con mayor afinidad a la

PSA recombinante que a la humana. El aptámero PSA-4 muestra una afinidad similar por ambas proteínas.

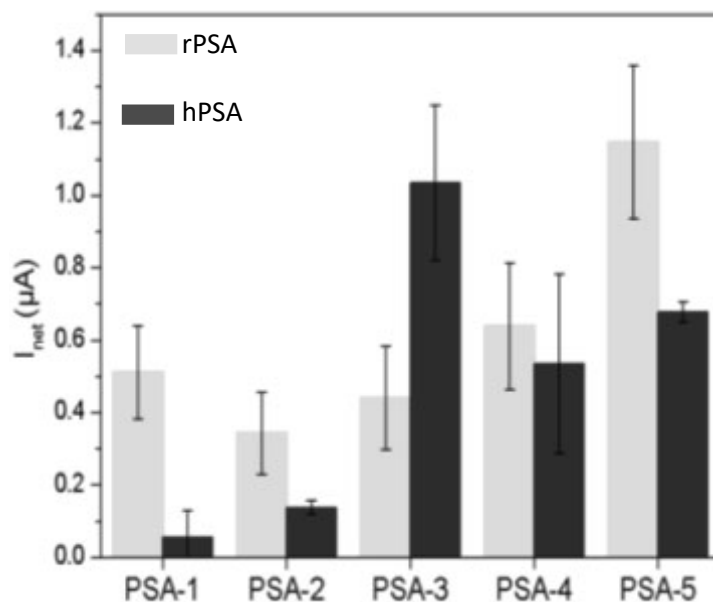
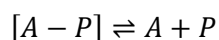


Figura 3.23: Intensidades de corriente netas obtenidas tras la interacción de 500 nM de cada aptámero con la PSA humana (verde) y la PSA recombinante (azul).

A la vista de los resultados obtenidos se selecciona el aptámero PSA-1 como el aptámero con mejor capacidad de reconocer a los glicanos de la PSA, y el aptámero PSA-5 como el de mayor afinidad hacia la PSA. Ambos aptámeros se estudiaron en más detalle evaluando su afinidad hacia la PSA mediante la construcción de una curva de enlace con concentraciones crecientes de aptámero empleando dos técnicas: medidas electroquímicas y la espectroscopia de plasmón de superficie.

El reconocimiento molecular entre el aptámero y la PSA es un proceso reversible en el que pueden tener lugar múltiples interacciones no covalentes como interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. La afinidad de los aptámeros (A) frente a la PSA (P) se puede describir mediante la constante de disociación (K_D), si se tiene en cuenta que se produce el siguiente equilibrio cuando tiene lugar la interacción:



La constante de disociación de este equilibrio se puede escribir como:

$$K_D = \frac{[A]_{eq}[P]_{eq}}{[A - P]_{eq}}$$

La constante de disociación, con unidades de concentración (M) es tanto menor cuanto mayor sea la afinidad de la interacción en estudio.

Una de las estrategias para medir la constante de disociación es utilizar un método de equilibrio. Este método consiste en incubar una cantidad constante de uno de los componentes que interaccionan con cantidades crecientes del otro, dejando que el sistema alcance el equilibrio. A continuación, se mide, directa o indirectamente, la cantidad de complejo de afinidad formado, relacionándola con la cantidad de uno de los componentes que queda libre en el equilibrio. De esta forma se obtiene una curva de enlace, que puede ajustarse mediante métodos de ajuste no lineal, a diferentes modelos. Uno de estos modelos es el de Langmuir, que asume una estequiometría 1:1 en la que hay un sitio de unión por proteína y todos los sitios son equivalentes. Alternativamente, se utiliza el modelo basado en la ecuación de Hill, que supone que la interacción no es uno a uno si no que tiene lugar un efecto de cooperatividad en la unión entre el aptámero y la proteína; la proteína tiene varios sitios de unión al aptámero, y la unión de una molécula de aptámero influye (positiva o negativamente) sobre la unión de las siguientes.

En primer lugar, se determinó la constante de afinidad del aptámero PSA-1 mediante ensayos de unión con detección electroquímica, inmovilizando la PSA sobre electrodos de oro e incubándola con concentraciones crecientes del aptámero. A medida que se aumentó la cantidad de aptámero se observó un incremento en la señal medida. Cuando esta señal se representó frente a la concentración de aptámero libre se obtuvo una curva de enlace (Figura 3.24). Se asume que la cantidad de aptámero enlazada es despreciable frente a la concentración de

aptámero en disolución. El ajuste de esta curva al modelo de Langmuir ($y = y_{\max} \cdot x / P + x$) permitió estimar una constante de disociación de 357 ± 42 nM, con un valor de y_{\max} de 1306 ± 43 nA y una correlación de 0.995. Este valor es menor que el obtenido para la colección de secuencias de la ronda seis del SELEX ($K_D = 480 \pm 44$ nM), lo que sugiere que el PSA-1 es uno de los aptámeros con más afinidad de los presentes en la ronda 6.

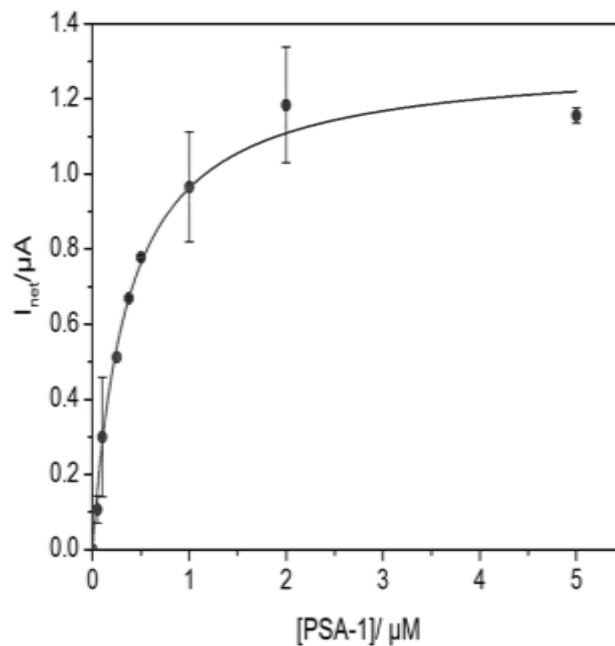


Figura 3.24: Curva de enlace del aptámero PSA-1, ajustada al modelo de Langmuir.

A continuación, se determinó la constante de afinidad mediante SPR. Para ello se modificó el disco de oro de SPR con la PSA humana y se incubó con concentraciones crecientes de aptámero. Cada etapa de interacción consiste en la realización de una línea base (1), la unión del aptámero a la proteína (2) y la disociación (3). La diferencia entre el ángulo de resonancia de la etapa 3 y la 1 se relaciona con la cantidad de aptámero unido a la proteína. Para la siguiente concentración de aptámero se repite este ciclo sin regenerar la superficie (Figura 3.25).

3.3 Resultados y discusión

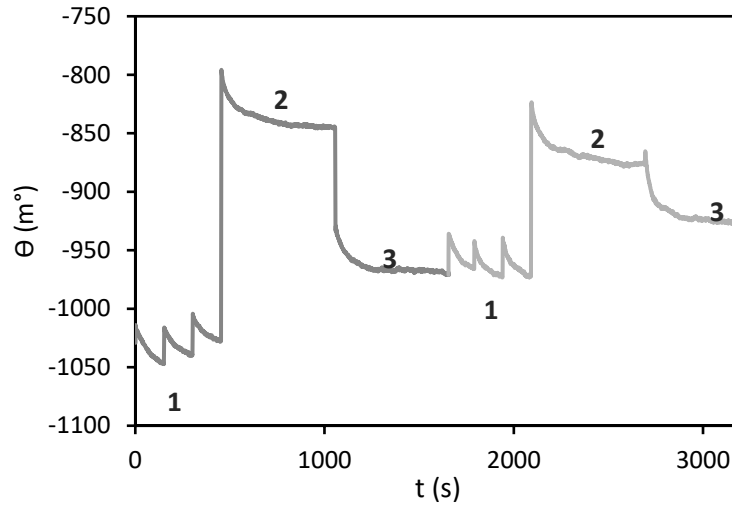


Figura 3.25: Sensograma obtenido para la interacción del aptámero PSA-1 (50 nM en verde y 100 nM en naranja) y con el disco de SPR modificado con hPSA.

Al representar el porcentaje de cambio del ángulo de incidencia con respecto a valor máximo obtenido para cada concentración se obtuvo la curva de enlace que se muestra en la Figura 3.26. El ajuste de los resultados al modelo de Langmuir permitió estimar una constante de disociación de 177 ± 65 nM (Figura 3.26).

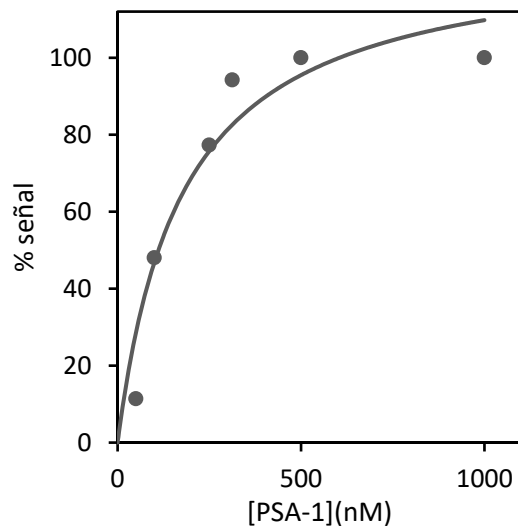


Figura 3.26: Curva de enlace del aptámero PSA-1 obtenida mediante medidas de SPR.

Para el aptámero PSA-5 las curvas de enlace obtenidas para la hPSA, inmovilizada sobre electrodos de oro o el disco del SPR, se ajustan mejor al modelo no lineal de Hill estimándose unas constantes de disociación de 144 ± 65 nM y de 209 ± 16 nM obtenidas mediante medidas electroquímicas o de SPR, respectivamente (Figura 3.27). Esto refleja la cooperatividad en el enlace del PSA-5 ($n = 2.3 \pm 0.8$) estando en concordancia con la mayor señal obtenida con este aptámero, aunque este muestra una menor capacidad de discriminación entre la PSA glicosilada y la no glicosilada que el aptámero PSA-1.

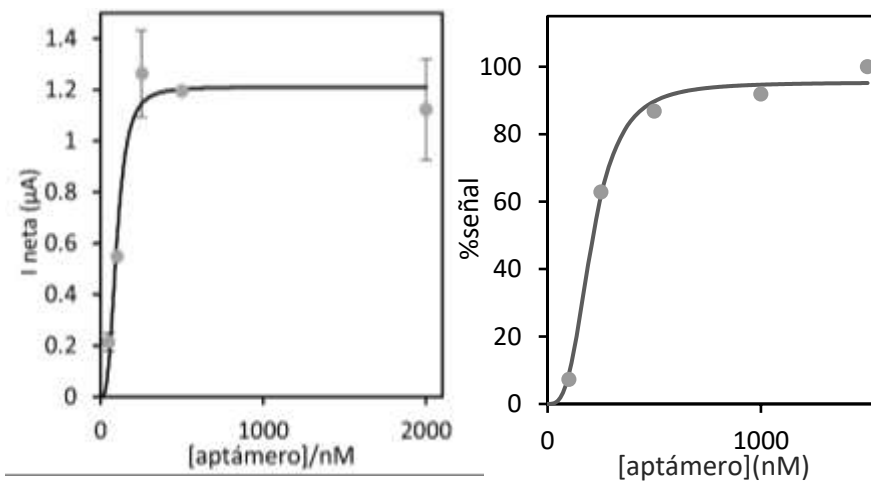


Figura 3.27: Curvas de enlace del aptámero PSA-5 ajustadas al modelo de Hill obtenidas mediante medidas electroquímicas (izquierda) y de SPR (derecha).

La discrepancia en los valores de K_D obtenidos con ambos métodos podría deberse al efecto de la marca de fluoresceína en el ensayo de unión con detección electroquímica. En principio, no era de esperar que la marca afectase a la afinidad ya que el proceso de selección se realizó con secuencias marcadas para minimizar este efecto. Sin embargo, la marca con un conjugado enzimático voluminoso podría hacer que solo una fracción de los aptámeros unidos a la PSA fueran accesibles, limitando la sensibilidad.

También se estudió la capacidad de enlace del aptámero PSA-1 a la PSA recombinante mediante SPR, inmovilizando esta proteína sobre el disco

de oro e incubándola con concentraciones crecientes del aptámero. Para ninguna de las concentraciones de aptámero ensayadas se registró una señal de SPR significativa, ni siquiera para la concentración más alta (1 μM), lo que concuerda con el reconocimiento de los glicanos de la PSA por el aptámero PSA-1 tal y como se había observado en los ensayos electroquímicos.

Las constantes de afinidad estimadas para el PSA-1 son al menos un orden de magnitud mejores que las descritas para las lectinas, receptores que también reconocen a los glicanos. Por ejemplo, la afinidad hacia la fucosa del núcleo de una lectina específica está en el intervalo 3.2 a 22 μM , obtenido mediante cromatografía frontal de afinidad, una técnica diseñada específicamente para el análisis de interacciones débiles¹²³. Recientemente se han descrito para algunas lectinas valores de afinidad en el intervalo nM cuando estas interaccionan con los glicanos de la PSA, mediante SPR¹²⁴, pero estos valores no son comparables directamente con el obtenido para nuestro aptámero. Esto se debe a que, al contrario que los aptámeros, las lectinas son oligómeros que pueden enlazarse entre sí, lo que hace que las lectinas tengan dos o más sitios de unión (multivalencia). Además, la flexibilidad de la estructura de los azúcares limita la afinidad de receptores como las lectinas¹²⁵, lo que en el caso del aptámero PSA-1 no parece suponer una limitación, por su alta afinidad, en el orden de las afinidades obtenidas para la unión a las proteínas.

A continuación, se evaluó la selectividad del aptámero PSA-1 frente a otra glicoproteína, la lipocalina-2 o NGAL (Lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos), que es un biomarcador en estudio del cáncer de páncreas. Esta proteína posee un único sitio de glicosilación y es de un tamaño similar a la PSA. Para ello se inmovilizó la NGAL sobre electrodos de oro, haciéndola interaccionar con una disolución 500 nM de PSA-1 marcado con fluoresceína. La señal se obtiene mediante cronoamperometría a - 0.2 V, al igual que en el ensayo descrito anteriormente. Como se observa en la Figura 3.28, este aptámero también

es capaz de unirse a la NGAL con una intensidad de corriente idéntica a la de la PSA dentro del error experimental. Esto indica que el aptámero PSA-1 reconoce a los glicanos, ya que es capaz de enlazarse a dos glicoproteínas que tienen distinta secuencia y lo único que tienen en común son los glicanos.

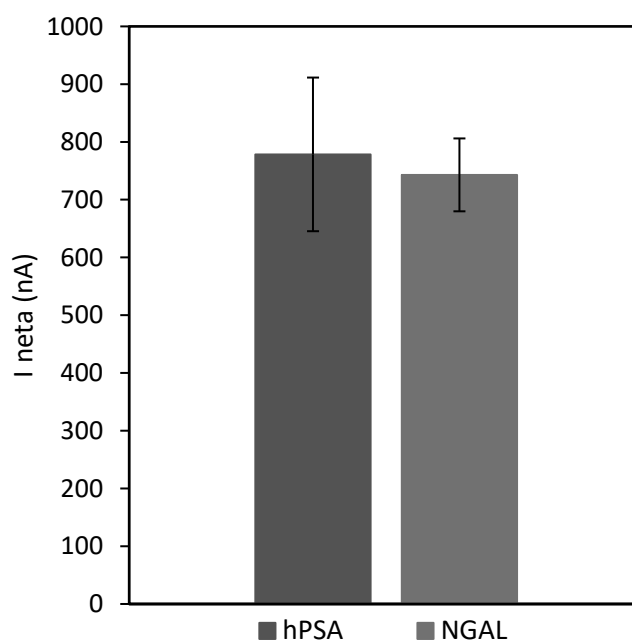


Figura 3.28: Selectividad del aptámero PSA-1 frente a la hPSA (granate) y a la NGAL (azul).

En resumen, se ha demostrado la posibilidad de dirigir la selección de aptámeros hacia la estructura de glicanos de una glicoproteína a través de contra-selecciones frente a la forma no glicosilada recombinante de la proteína diana. Mediante este procedimiento y secuenciación masiva, tras solamente seis rondas de selección con dos etapas de contra-selección se ha identificado un aptámero que reconoce los glicanos de la PSA, con capacidad de discriminar entre la PSA humana y la recombinante. Además, este aptámero es capaz de reconocer los glicanos de cualquier glicoproteína, pudiendo ser un elemento de reconocimiento general para las cadenas de carbohidratos de las proteínas humanas, puesto que todas

3.3 Resultados y discusión

ellas poseen una secuencia de azúcares similar. El método de selección descrito es una estrategia general para la selección de aptámeros dirigidos hacia a las estructuras de glicanos de las glicoproteínas.

CAPÍTULO 4

*Selección de aptámeros con
reconocimiento binario de la
glicoproteína PSA*

4.1 Introducción

Como se ha indicado en el capítulo 1, el número de aptámeros descritos capaces de reconocer los glicanos de glicoproteínas es muy reducido. La mayoría de ellos solamente reconocen algunos grupos funcionales presentes en los glicanos⁹⁷ o un epítipo particular del carbohidrato sin importar la proteína a la que están unidos. Hasta el momento, solo se conoce un aptámero capaz de reconocer simultáneamente la parte de glicano y aminoácidos del entorno de glicosilación en un glicopéptido pequeño, pero no fue ensayado en la proteína completa¹⁰⁰. También es posible modificar los aptámeros o anticuerpos artificialmente para que reconozcan la parte peptídica y la glicosilada de una glicoproteína al mismo tiempo, mediante la unión de dos aptámeros o anticuerpos (uno para cada parte de la glicoproteína) o conjugándolos con un grupo fotorreactivo que se pueda enlazar covalentemente a los azúcares previamente modificados con el grupo azida^{126,127}. Además, no hay ningún receptor sintético único (que no esté modificado o sea la unión de varios) capaz de integrar el reconocimiento binario de glicano y péptido en una glicoproteína intacta. Recientemente se ha descubierto una lectina de mamífero, Dectin-1, capaz de reconocer ciertos azúcares de la estructura glicosídica, así como aminoácidos del sitio de glicosilación en un anticuerpo IgG¹⁰¹.

En el capítulo 3 se describió el diseño un proceso de selección que permitió identificar un aptámero capaz de unirse a los glicanos de distintas glicoproteínas humanas. Este receptor sintético no permite discriminar entre glicoproteínas con estructuras de glicanos similares y podría considerarse comparable a las lectinas, aunque su afinidad es netamente superior.

Dado el buen resultado de este primer proceso de selección y el número limitado de receptores, tanto naturales como artificiales, disponibles para el reconocimiento binario de glicoproteínas, se decidió

llevar a cabo el diseño de un nuevo proceso SELEX que pudiera servir como protocolo general de selección de aptámeros capaces de reconocer un epítopo que englobe tanto la región de los glicanos como la parte peptídica de la proteína. Estos receptores, con capacidad de discriminar entre distintas glicoproteínas con estructuras de glicanos similares, podrían tener importantes aplicaciones tanto en el desarrollo de herramientas de diagnóstico como incluso en terapia.

4.2 Protocolos

4.2.1 Proceso de selección

Para la realización del proceso de selección se empleó la misma colección inicial de ácidos nucleicos e idéntico procedimiento de modificación de partículas magnéticas tosilactivadas con proteína utilizados en el Capítulo 3 (véase sección 3.2 y Tabla 3.1).

En las tres primeras etapas de selección se realizaron las rondas del SELEX de forma idéntica a las descritas en el capítulo 3 sección 3.2.3, exceptuando el tiempo de elución que se aumentó a 30 minutos y las unidades de enzima inmolasa *hot-start* ADN polimerasa utilizadas en la PCR, que en este caso fueron 2.8 U.

Para dirigir la selección hacia la fucosa del núcleo de la PSA se ensayaron dos estrategias diferentes a partir de la tercera ronda de selección. En la opción A se añadió una contra-selección extra, utilizando partículas magnéticas modificadas con la hPSA bloqueada con la lectina PhoSL. Tras la incubación (1 h a 25 °C y 1300 r.p.m) se recogieron las secuencias del sobrenadante y se hicieron interaccionar con la PSA humana. De esta forma se eliminan aquellas secuencias que reconocen a la proteína por zonas diferentes a donde se une la lectina, la fucosa del núcleo, región muy próxima a la proteína. Las etapas de elución, amplificación y separación se llevaron a cabo de la forma descrita

Selección de aptámeros con reconocimiento binario de la glicoproteína PSA

anteriormente. La opción B consistió en la elución de las secuencias enlazadas, tras la selección negativa (partículas modificadas con BSA), contra-selección (partículas modificadas con rPSA) y selección positiva (partículas modificadas con hPSA), empleando la lectina PhoSL en BS durante 1 h a 25 °C. Se espera que esta lectina compita con el ssADN por unirse a la fucosa del núcleo, desplazando preferentemente a las secuencias de ADN que involucran esta molécula en la interacción. A continuación, las secuencias de ssADN eluidas se amplificaron por PCR y se separaron para comenzar una nueva ronda de selección.

Tabla 4.1: Condiciones empleadas a lo largo de las diferentes rondas de selección.

Ronda	Tiempo incubación	Tiempo incubación hPSA+PhoSL	[PhoSL] usada para eluir	Número de lavados
1	60	-	-	2
2	60	-	-	2
3	30	-	-	2
4A	30	30	-	2
4B	30	-	1 µg/mL	2
5A	30	30	-	5
5B	30	-	1 µg/mL	5
6B	15	-	1 µg/mL	5
7B	15	-	2 µg/mL	5
8B	15	-	2 µg/mL	10
9B	10	-	2 µg/mL	10
10B	10	-	2 µg/mL	15

Para hacer las condiciones de selección más restrictivas se disminuyó el tiempo de incubación y se aumentó el número de lavados como se indica en la Tabla 4.1.

4.2.2 Clonación

Las secuencias de la última ronda de selección se amplificaron mediante PCR empleando los cebadores directo e inverso sin marcas y con las condiciones utilizadas en el SELEX. A continuación, el producto de PCR fue purificado con el Kit MinElute PCR Purification, para eliminar los cebadores no alargados y los reactivos de la PCR. Después de la purificación se realizó un gel de agarosa al 2 % para comprobar la pureza y el tamaño del producto amplificado. Este producto fue clonado utilizando el TA Cloning® Kit Dual Promoter y transformado en células competentes con One shot® Competent cells mediante las siguientes etapas:

Ligación: en esta etapa tiene lugar la unión del vector de clonación al producto de PCR. Para ello, se incubaron 1.03 ng del producto de PCR (en 1 μ L) con 50 ng del vector (2 μ L) proporcionado en el kit, 2 μ L del tampón que también se proporciona y 4 μ L de agua a temperatura ambiente durante 1 hora y 15 minutos. Tras el tiempo de reacción el producto de ligación, el denominado inserto, se conserva en hielo.

Transformación en células competentes: El inserto debe introducirse en una célula anfitriona. Para ello, se añadieron 2 μ L del producto de ligación a un vial de células competentes y se incubaron en hielo durante 30 minutos. A continuación, se calentó el vial a 42 °C durante 30 segundos y rápidamente se colocó en hielo. Después se añadieron 250 μ L del medio S.O.C. (medio de caldo superóptimo con represión por catabolito), incubándose a 37 °C durante 1 hora a 1300 r.p.m. En estas condiciones las células sólo incorporarán como máximo un inserto cada una.

Sembrado de las células competentes: La clonación exige la propagación de las células con el inserto en un cultivo. Sobre placas Petri modificadas con agar y LBS (medio selectivo de *Lactobacillus*) como medio de cultivo se añadieron 100 μ L de IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y 100 μ L de X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), repartiéndolos por toda la placa con movimientos circulares. A continuación, se añadieron 30 μ L del contenido del vial de las células competentes preparado en la anterior etapa, repartiéndolo también por toda la placa con movimientos circulares. Esta se incubó boca abajo en estufa a 37 °C durante toda la noche.

Detección y selección de las colonias que expresan el inserto: Las placas se analizaron en busca de colonias blancas, indicativo de que han incorporado el inserto. Se recogieron estas colonias pasando por encima de ellas una punta de micropipeta pequeña hasta que se observó que la colonia está en la punta. Después, esta se colocó en un pocillo de placa de PCR con 190 μ L de agua, y con unos pequeños golpes se forzó a que la colonia pasase al agua.

Lisis celular y obtención del inserto: Se calienta el contenido de cada pocillo a 95 °C durante 20 minutos para extraer el ADN de las células. A continuación, se amplifican las secuencias eluidas mediante PCR empleando los cebadores y siguiendo las condiciones y las etapas de amplificación especificadas en el kit.

Secuenciación: Por último, se cuantificó con un fluorímetro Qubit® la cantidad de ADN amplificado y se realizó una nueva PCR para introducir los cebadores de la secuenciación. Se secuenció el inserto con un analizador genético Biosystem-Hitachi 3130xl.

4.2.3 Ensayos de unión con detección electroquímica

Para los ensayos de unión con detección electroquímica se empleó el mismo protocolo descrito en el capítulo 3 (véase sección 3.2.4) a excepción de la etapa de bloqueo tras la unión covalente de la proteína a

la SAM mixta. En los ensayos del presente capítulo esta etapa se realizó con una disolución 1 mM de etanolamina en BS durante 15 minutos.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Proceso de selección

A partir de los resultados obtenidos en el proceso SELEX ya descrito en el capítulo 3, empleando selecciones positivas frente a la PSA glicosilada (hPSA) y contra-selecciones frente a la PSA recombinante (rPSA), se buscó refinar el proceso para conseguir receptores que integren en el reconocimiento tanto la parte de los azúcares como la región peptídica cercana de la PSA. Con este objetivo, se diseñaron dos estrategias posibles utilizando la lectina *Pholiota squarrosa* (PhoSL)¹²³, una lectina específica de la α 1-6-fucosa del núcleo, azúcar unido al residuo de azúcar más interno y por tanto más cercano a la región peptídica. De esta forma se pretende dirigir la selección hacia esa zona de la glicoproteína, aumentando la posibilidad de obtener aptámeros específicos para el sitio de glicosilación de la PSA (Figura 4.1).

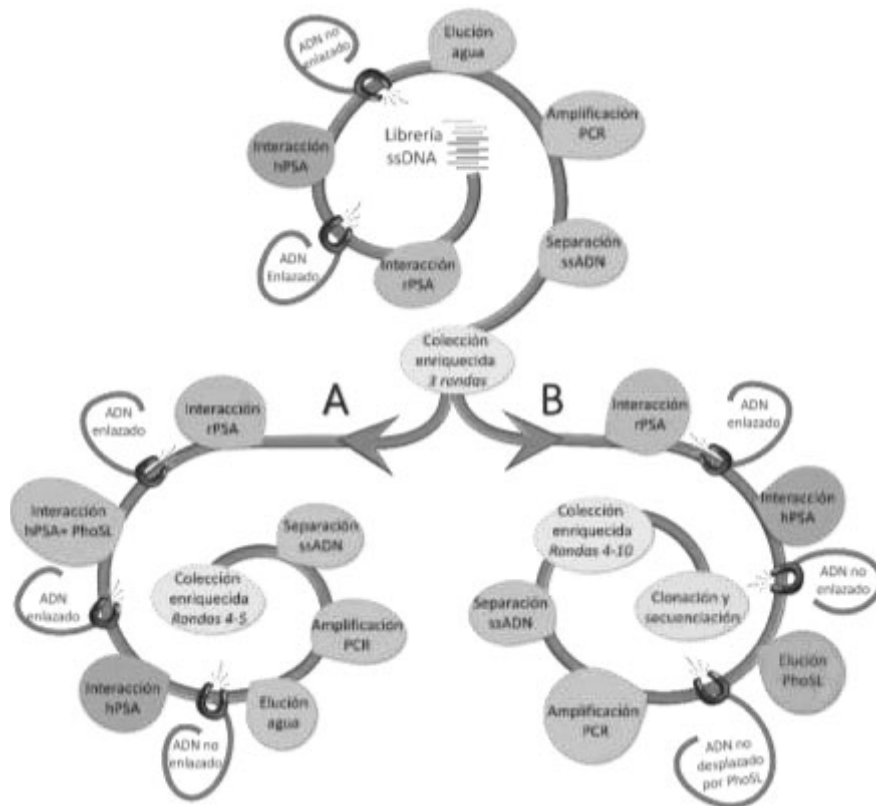


Figura 4.1: Esquema del proceso SELEX. La espiral de arriba muestra las etapas de las rondas 1-3, empleando la PSA glicosilada humana como diana. Tras la ronda 3, el SELEX se separa en dos rutas, la espiral de la izquierda muestra la estrategia A, que incluye una contra-selección extra frente a hPSA bloqueada con la lectina PhoSL (rondas 4 y 5), y la espiral de la derecha muestra la estrategia B, basada en la elución competitiva de las secuencias enlazadas con la lectina PhoSL (rondas 4-10).

El procedimiento SELEX implica la inmovilización de la hPSA y rPSA sobre partículas magnéticas, empleando BSA como bloqueante. Cada ronda de selección incluye una etapa de selección negativa frente a las partículas magnéticas modificadas con BSA, para eliminar aquellas secuencias que se unen a la BSA, seguida de una contra-selección frente a la rPSA, para eliminar las secuencias que se unen a la proteína por regiones diferentes a la zona de glicosilación, y una etapa de selección positiva frente a la hPSA, para enriquecer la colección inicial en secuencias que se unan a la zona de glicosilación de la proteína. Tras tres rondas comunes de

4.3 Resultados y discusión

selección, la colección de secuencias se dividió para realizar dos estrategias diferentes de selección.

La estrategia A incluye una contra-selección extra más exigente frente a partículas magnéticas modificadas con hPSA, que previamente fueron incubadas con la lectina PhoSL para bloquear la α 1-6 fucosa del núcleo. De esta forma se eliminan de la colección de secuencias aquellas que sean capaces de unirse a la proteína bloqueada y, por lo tanto, aquellas que reconozcan a la proteína PSA por una región diferente a la que reconoce la lectina.

La estrategia B se basa en la elución por competición de las secuencias enlazadas a la hPSA empleando la lectina PhoSL que desplazará a aquellas secuencias con las que comparte sitio de unión. Para comprobar que la presencia de la lectina en el medio de amplificación no influye en la realización de la PCR se llevó a cabo la amplificación de 2.5 nM de la colección inicial en presencia de 2 μ M de la lectina utilizando las condiciones de amplificación empleadas en el SELEX. Como se puede observar en el gel de agarosa al 2 % (Figura 4.2) el ADN amplificado muestra una sola banda del tamaño esperado (80 nt).

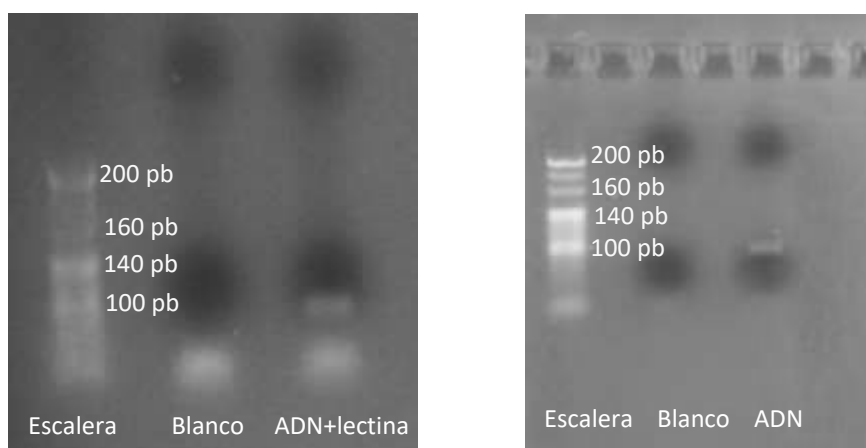


Figura 4.2: Geles del 2% de agarosa que muestran la escalera de tamaños, un blanco y el producto de PCR de la colección inicial en presencia de la lectina (izquierda) y en su ausencia (derecha).

Tras la realización en paralelo de las opciones A y B durante dos rondas de selección más (4 y 5), se evaluó el enriquecimiento de las colecciones de cada una de las opciones en secuencias con afinidad hacia la hPSA, mediante medidas de absorbancia y de espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie que se detallan a continuación.

En las medidas de absorbancia, 25 pmoles de cada una de las colecciones obtenidas después de los diferentes ciclos de selección se calentó a 98 °C durante 4 min y se enfrió en hielo durante 4 minutos antes de hacerlas interaccionar con partículas magnéticas modificadas con 25 pmoles de hPSA durante 10 minutos a 25 °C y 1300 r.p.m. Tras la separación magnética se recogieron las secuencias no enlazadas (sobrenadante) y se lavaron las partículas dos veces con 200 µL de BSL. Tras la elución con agua a 95 °C durante 30 minutos y la separación magnética, se recogieron aquellas secuencias que se habían unido a la PSA. La cantidad de secuencias de ADN (ssADN) en la fracción enlazada se midió mediante espectroscopia VIS-UV a 260 nm. Para saber la concentración de secuencias la absorbancia se refirió a una curva de calibrado externa, construida con una secuencia de ADN del mismo tamaño (80 bases).

Como se puede observar en la Figura 4.3, la cantidad de secuencias que se enlazan a la hPSA fue aumentando con los ciclos o rondas de selección cuando se emplea la modalidad B, mientras que en la modalidad A la cantidad de secuencias enlazadas disminuye de la ronda 4 a la 5.

4.3 Resultados y discusión

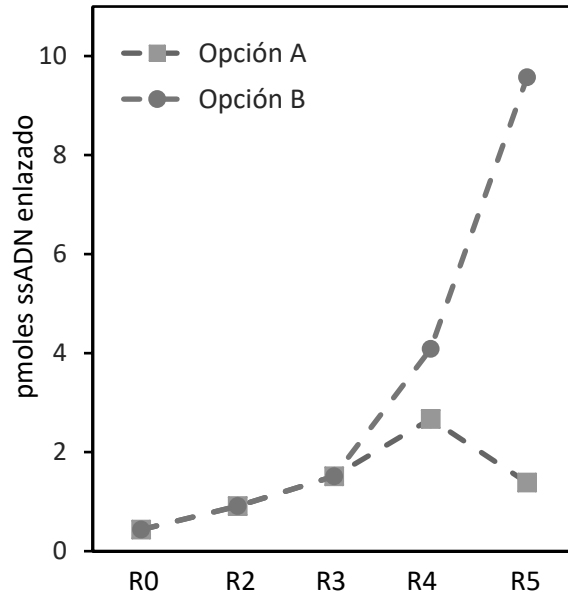


Figura 4.3: Evolución de la cantidad de ssADN enlazado a la hPSA a lo largo de las rondas de selección empleando la opción A (dorado) y B (verde).

Para las medidas de SPR se inmovilizó covalentemente la PSA sobre un disco de oro, como se indicó en el capítulo 3, y se hizo interactuar con concentraciones crecientes de ADN de cada ronda de selección. Los resultados obtenidos mediante esta metodología se resumen en la Figura 4.4, observándose un decrecimiento de la afinidad promedio hacia la hPSA de la colección al pasar de la ronda 4 a la 5 cuando se emplea la opción A, mientras que con la opción B se obtiene un incremento progresivo en la afinidad promedio en los ciclos sucesivos.

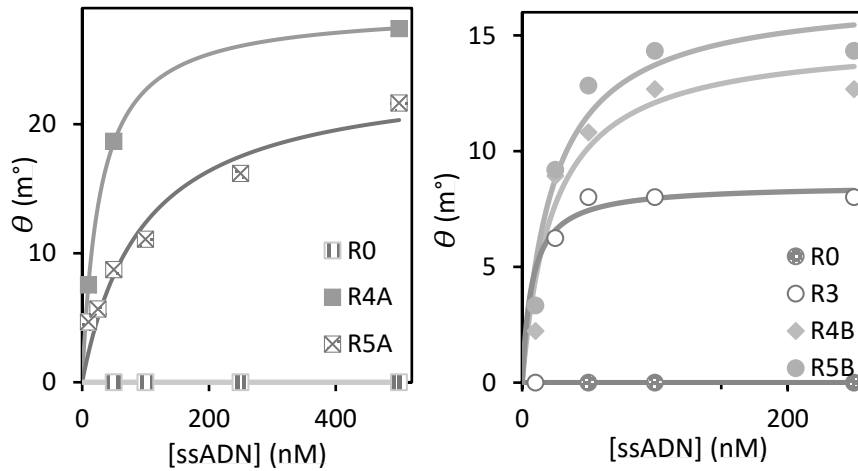


Figura 4.4: Curvas de enlace obtenidas mediante SPR para el ssADN de las rondas 4 y 5 de la opción A del SELEX (izquierda) y de las rondas 3, 4 y 5 de la opción B (derecha). En ambos casos se muestra como control la curva de enlace de la R0.

Los resultados obtenidos con ambas metodologías revelan que la opción A lleva a un decrecimiento en el número de secuencias capaces de unirse a la hPSA y con una menor afinidad, mientras que la opción B da lugar a un incremento progresivo en el número de secuencias y en la afinidad promedio de las mismas hacia la PSA. Por estos motivos se seleccionó la opción B como la mejor manera de dirigir la selección y se realizaron cinco rondas de selección más para maximizar la afinidad de las secuencias hacia la hPSA. Se monitorizó la capacidad de enlace de la colección de secuencias hacia la hPSA y rPSA tras la realización de cada ronda mediante espectroscopia VIS-UV.

En la décima ronda de selección se realizaron además medidas de SPR y curvas de *remelting*. Se evaluó también la capacidad de estas secuencias para reconocer la rPSA. Como se muestra en la Figura 4.5, a partir de medidas de la fracción de secuencias enlazadas mediante absorbancia se observó un aumento progresivo en secuencias con afinidad hacia la PSA humana a lo largo de las diferentes rondas, alcanzado un 78 % de secuencias enlazadas en la última ronda. Por el contrario, se observó un bajo número de secuencias capaces de unirse a la rPSA a lo largo de todas

4.3 Resultados y discusión

las rondas de selección, alcanzándose un valor mínimo de 3 % para la última ronda. Este resultado muestra la eficacia de la estrategia de selección llevada a cabo para diferenciar las formas glicosilada y no-glicosilada de la PSA.

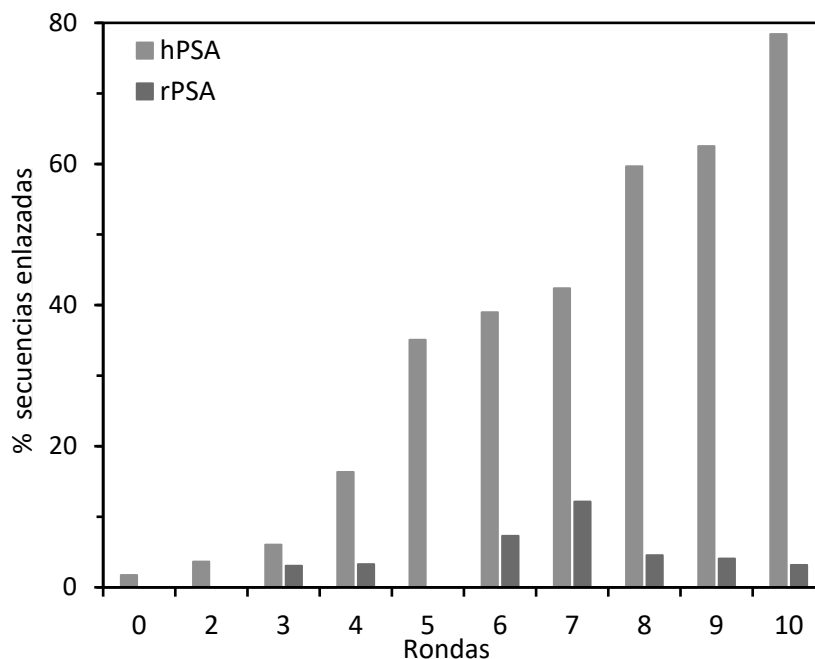


Figura 4.5: Evolución del porcentaje de ssADN que se une a la hPSA y rPSA a lo largo de las rondas del SELEX obtenido mediante medidas de absorbancia.

Estos resultados se confirmaron evaluando la afinidad promedio de cada colección hacia hPSA y rPSA mediante medidas de SPR. Para ello, se inmovilizó covalentemente la hPSA o la rPSA sobre un disco de oro del SPR, monitorizando en tiempo real su interacción con diluciones seriadas de la colección de secuencias de cada ronda. Los resultados que se recogen en la Figura 4.6 muestran cómo en las sucesivas rondas se produce un incremento en el ángulo de resonancia medido para la misma concentración de ssADN, cuando la colección interacciona con hPSA. Esto es indicativo de un aumento de la afinidad promedio de las secuencias hacia la hPSA en las sucesivas rondas de selección. Se estimó un valor de la afinidad promedio de las secuencias presentes en la ronda 10 de $7.6 \pm$

0.6 nM. Para las secuencias de la última ronda se estudió además su afinidad hacia la rPSA, observándose un desplazamiento en la curva de enlace hacia concentraciones mayores de ssADN, lo que evidencia la baja afinidad de las secuencias de esta ronda hacia la proteína sin glicanos (Figura 4.6).

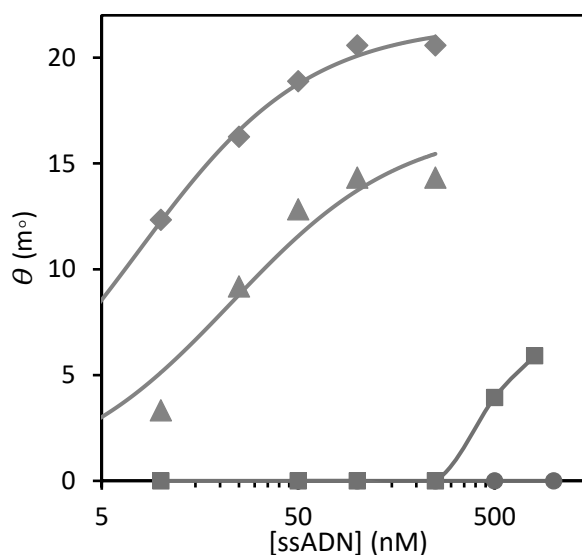


Figura 4.6: Curvas de enlace obtenidas mediante SPR para concentraciones crecientes del ssADN de la ronda 5B con la hPSA (naranja) y la ronda 10B para la hPSA (verde) y para la rPSA (azul). Como control se muestra la curva de enlace de las secuencias de la colección inicial (magenta) hacia la hPSA.

Finalmente se estudió la variación en la diversidad de secuencias a lo largo de las rondas de selección mediante el análisis de las curvas de *remelting*, siguiendo el protocolo detallado en el capítulo 3. En la Figura 4.7 se muestran las curvas de *remelting* para la colección inicial (R0) y tras la última ronda de selección (R10), observándose un aumento en la temperatura de fusión (*melting*) del ADN de 81.7 °C para la colección inicial a 84 °C para la colección de la ronda 10, lo que indica una disminución en la diversidad de esta última.

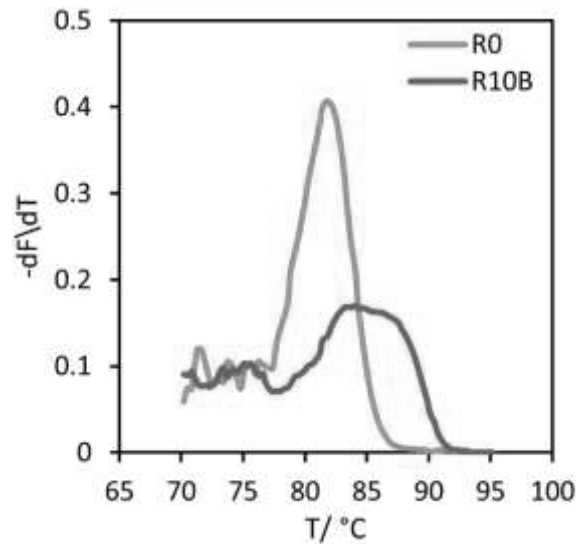


Figura 4.7: Curvas de remelting para el ssADN de la ronda 0 (dorado) y la ronda 10B (morado).

Dado los buenos resultados de enriquecimiento obtenidos tras diez ciclos de selección, se decidió dar por terminado el proceso de selección e identificar las secuencias que se encuentran en la colección obtenida tras esta última ronda. Para ello, se procedió a la clonación en *Escherichia coli* y se secuenciaron, se analizaron y se clasificaron en familias 38 clones escogidos al azar.

Las secuencias obtenidas se analizaron y clasificaron en tres familias empleando el software BioEdit (Figura 4.8). La familia I está formada por 15 secuencias que tienen el cebador directo en su extremo 5' y no poseen ninguna otra homología entre ellas. El número de secuencias que poseen el cebador es muy alto por lo que es probable que no se deba a un artefacto de la PCR y que el cebador pueda ser importante para el enlace. La familia II está formada por 3 secuencias que poseen similitud con el aptámero PSA-1 (descrito en el anterior capítulo). El resto de secuencias no tiene similitud entre ellas y se agrupan como familia III.

Selección de aptámeros con reconocimiento binario de la glicoproteína PSA

Familia I

	10	20	30	40	50	ΔG (kcal/mol)
1					
	GCAAGCAATGGCGACCCGAACAGTAGGATAGGGTTGATAGGTTAAGAG					-3.54
5	-----GGGA.ACGAGGAGC-CTAG.A.-----					-3.86
6	-ACTCAGTC.AT.AGAATTAC.G..G.....CTATATA					-2.30
10	-----TCTATCGAAATTGATTCCT.G.....					-1.72
13	----GG.GATTTCG..A.TGTTT.CCCT.....					-1.39
14	-----CCTT.GAGTAGTACCC.....					-3.91
16	-----CA.TCCTG.ACCTCCAT.AC.....C-----					-1.71
18	-----TA..G.CC.....CTATATA					-1.56
19	-AGCTGG.GCA.TCTAACT.G..TTCG.....C-----					-2.63
22	-----TA.GTG.GCAGTCGATC.....CTATAA-					-0.69
23	-----G..GGGATGAT..G..T.....C-----					+1.42
25	-A.CC.GTG..GTGTTGATCGGCCTCT.....C-----					-4.51
29	-----G.TGC..C.....C-----					-0.10
35	---CAGCTATCACGATGAGC-CT.GCAC.....					-3.76
36	-----AG...AG.GGTCC.....					-1.53

Familia II

	10	20	30	40	ΔG (kcal/mol)	
PSA-1					
	GGACGGTTGCGCTATATTAAACCAAAAGTCTGGAT-TAACA----					-3.07
3	.AG...GGTT...GGGA.G.TAAGGCOOCT.T...G.CTG----					-3.16
12	---TC.CATT..GGGGAG..GAT--TGC...TA..GGGAGTTC					-4.12
15C.CT.T...AG.G.----GA.....CG.....TT-					-3.41

Familia III

	10	20	30	40	ΔG (kcal/mol)	
4					
	GGATCAGAACTTCCACTCCCTGGCATTATTCATTGCCAA					-4.31
7	GTAAACTACTGAAGGGTCTCCTGGGATATGTCGAGTATG					-1.43
8	ACAGGCTAGTTCAAGGACAGCAGCCGCCATCAAATGCCG					-2.55
9	TGC GAAAGTGGGCTTCGTAACACTTTCATCTTGGGACCC					-3.13
11	CGGTATAGGTTAATGAGAGGATAGCGTTATCAGGACTAGT					-1.63
17	GTAGTCTCTAATCAACGTGAGTGTGTAAACCCGAGTACGCC					-1.96
20	TTAGCGGATTGGTCAATTCGACACTTGTGAGCATAGTG					-3.06
21	CTGATACATTACAAGTAGATCCTGGTCCACGAACTGTGGA					-2.78
24	TAGGAAGGACTCCATTTCAAGATACGGTGGCAAGGGACG					-3.12
26	CTCGGGTGGGTCAAGTATATGAGTACAGTTTTCGAGTCT					-0.57
27	CCAGGCAGATTCTCTAGAGCTAAACAATTGAGTAGGCTGT					-1.06
28	GATGTCAACTAGCTGTTGGGGAGATGAGGGATATGTT					-3.05
30	CCATTGGTTGCTAAGGATGACGAATTTCCATAAAGCGGTA					-0.46
31	TTAAGCGTATCTCTGATGGATGGATACGATACCGAACAT					-5.20
32	GGTAGCTGGGATACGGCATTATCCTACCOCGCCTGGAT					-3.61
33	GATGTCAACTAGCTGTTGGACTGGGATGTCTTAAATGCTC					-3.26
34	TTATGGCAGGGCAGTGGTATCTTAAACCTGAAAGTCAAGCTG					-4.87
37	ATATACGATGTCAACTAGCTGTTGGACGGTAGCTATAAAATTT					-3.05

Figura 4.8: Secuencias obtenidas de la ronda 10 agrupadas en tres familias tras la eliminación de las secuencias de los cebadores empleando el software BioEdit, y su correspondiente energía libre predicha con Mfold.

Se seleccionan para su posterior estudio tres secuencias representativas de las familias I y II. De la familia I se seleccionó el clon 35 (PSAG-3), ya que es el que posee una estructura secundaria más fuerte que comprende la mayoría de los nucleótidos. De la familia II se seleccionó el clon 15 (PSAG-2) puesto que es el que más similitud tiene con el

4.3 Resultados y discusión

aptámero PSA-1 y el clon 3 (PSAG-1) ya que se encontró dos veces en la clonación (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Secuencias de los aptámeros seleccionados.

Nombre	Secuencia 5'→3'
PSAG-1	GAGCGGGGTTGCTGGGATGATAAGGCCCTTTGATGTCTG
PSAG-2	GGACGGCTCTGTTATAAGTGACAGATCTGGACGTAACATT
PSAG-3	CAGCTATCACGATGAGCCTTGCACTAGGGTTGATAGGTTAAGAG

Se predijo la estructura secundaria de los potenciales aptámeros de cada familia utilizando Mfold, con una temperatura de 25 °C y una concentración de sales de 0.154 M de NaCl como condiciones de predicción (Figura 4.9).

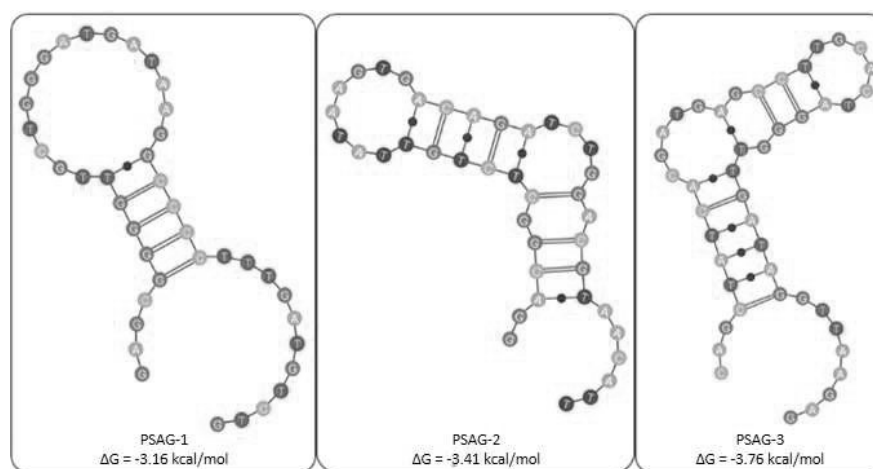


Figura 4.9: Estructura secundaria de los aptámeros seleccionados. Se utilizó el software VARNAGUI para obtener la estructura secundaria de los clones seleccionados de la ronda 10, mientras que su energía libre se calculó usando Mfold.

4.3.2 Caracterización de los aptámeros seleccionados

Para escoger el aptámero con las mejores características de reconocimiento hacia la zona de glicosilación de la PSA se evaluó la capacidad de las tres secuencias seleccionadas de enlazarse a la PSA glicosilada y a la no glicosilada, mediante un ensayo de unión con detección electroquímica empleando hPSA y rPSA unidas covalentemente a la superficie de electrodos serigrafiados de oro. Los electrodos se incubaron en una disolución 500 nM de cada uno de los aptámeros marcados con fluoresceína en su extremo 5', y tras la unión específica, se incorporó el conjugado anti-fluoresceína-peroxidasa. De esta forma, tras la adición de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno (sustratos de la peroxidasa) es posible obtener mediante cronoamperometría a -0.2 V una señal que depende de la cantidad de aptámero enlazado en la primera etapa (véase capítulo 3, sección 3.2.4).

Como se muestra en la Figura 4.10 los tres aptámeros seleccionados son capaces de unirse a la hPSA, aunque dan lugar a señales de diferente magnitud, lo que sugiere que existen diferencias en su afinidad hacia la PSA o de accesibilidad a su sitio de unión. El aptámero PSAG-1 presentó la mayor señal para la hPSA, mientras que para el aptámero PSAG-2 se obtuvo una señal que es el 37 % de la primera y para el PSAG-3 la señal se redujo hasta un 44 %. Por el contrario, el aptámero PSAG-1 mostró una señal mucho más pequeña para la rPSA, mientras que en el caso de los otros dos aptámeros la señal que se obtuvo es similar, dentro del error experimental, a la obtenida frente a la hPSA. De estos resultados se deduce que como sólo el aptámero PSAG-1 es capaz de diferenciar entre la proteína glicosilada y la no glicosilada, este aptámero debe involucrar la región glicosilada de la PSA en el reconocimiento molecular, y, por tanto, se seleccionó este aptámero para estudiar con mayor profundidad sus características de enlace.

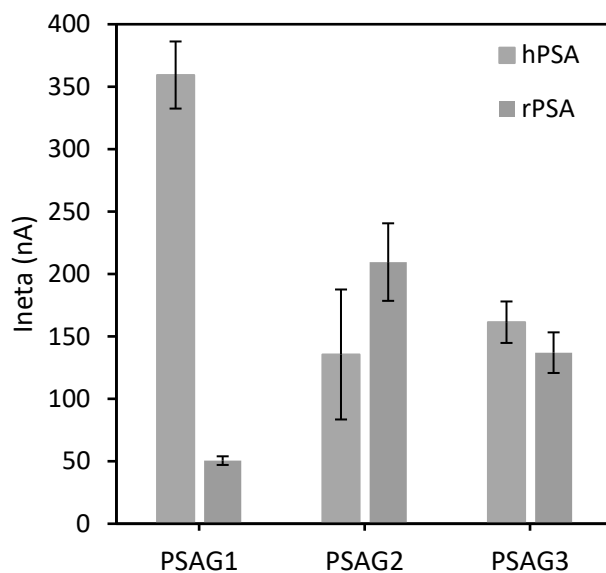


Figura 4.10: Intensidades de corriente netas obtenidas para la interacción de 500 nM de cada aptámero con la PSA humana (azul) y la PSA recombinante (naranja) inmovilizadas sobre electrodos de oro.

La afinidad del aptámero PSAG-1 se evaluó más en detalle construyendo una curva de enlace, haciendo interaccionar concentraciones crecientes del aptámero con la proteína hPSA inmovilizada sobre electrodos de oro. A medida que se aumentó la concentración de aptámero se observó un incremento en la intensidad de corriente medida, que se representó frente a la concentración de aptámero para obtener la curva de enlace (Figura 4.11). El ajuste de la curva al modelo de Langmuir permitió estimar una constante de disociación de 72 ± 8 nM, siendo por lo menos un orden de magnitud mejor que las descritas para las lectinas (1-10 μ M)⁵⁴. Por ejemplo, la afinidad del aptámero PSAG-1 es 160 veces mejor que la descrita para una lectina de algas que reconoce específicamente la fucosa α 1-6 de los N-glicanos¹²⁸, y 43 veces superior a la de la lectina PhoSL¹²³.

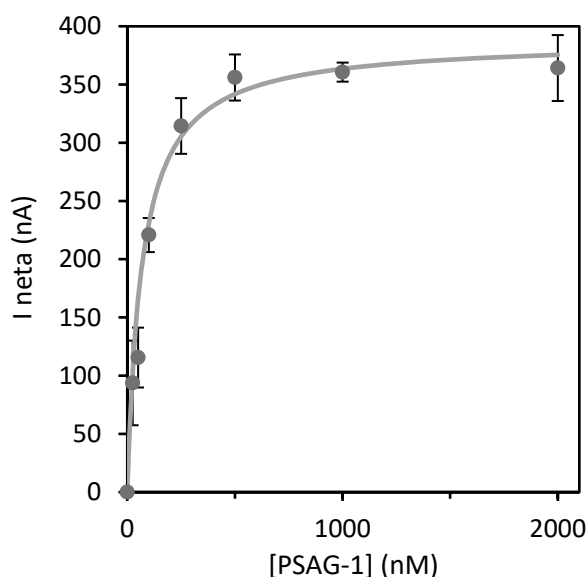


Figura 4.11: Curva de enlace del aptámero PSAG-1 en PBS-Na⁺ obtenida con electrodos de oro modificados con hPSA.

El aptámero PSAG-1 tiene en su secuencia un alto contenido en guaninas, lo que podría permitir que en su estructura secundaria se formasen cuartetos de guaninas. De ser así, la estabilidad de esta estructura, y con ello la afinidad hacia la hPSA y la magnitud de las señales de saturación, podría aumentar en un medio con iones potasio, ya que está descrito que estos iones estabilizan los cuartetos de guaninas. Por esta razón, se ensayó un nuevo medio para hacer las interacciones, idéntico al medio de selección pero en el que se cambian los iones sodio por iones potasio (PBS-K⁺), manteniendo la fuerza iónica constante.

Cuando se realizó la curva de enlace en el medio PBS-K⁺ se observó un incremento en la señal de saturación de 398 ± 14 nA para PBS-Na⁺ a 970 ± 17 nA en PBS-K⁺. Además, la constante de disociación estimada a partir de la curva de enlace pasó a ser de 34 ± 9 nM. También se estimó la constante de disociación mediante medidas de afinidad por SPR (véase capítulo 3 sección 3.2.4 para el protocolo detallado) obteniéndose una K_D de 1.9 ± 0.2 nM, confirmando la mejoría en la afinidad del aptámero en el medio con iones potasio (Figura 4.12).

4.3 Resultados y discusión

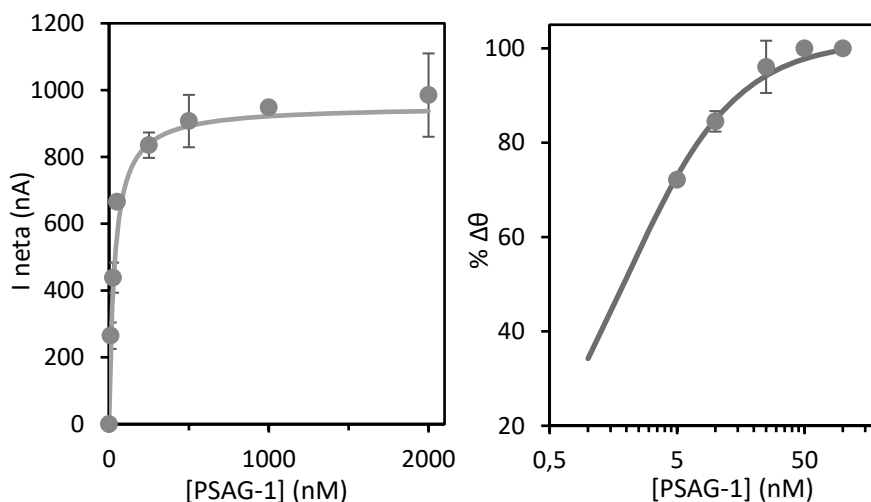


Figura 4.12: Curva de enlace del aptámero PSAG-1 obtenidas en el medio PBS-K⁺ mediante medidas electroquímicas (izquierda) y SPR (derecha), ambas ajustadas al modelo no lineal de Langmuir.

A continuación, se evaluó la selectividad del aptámero frente a otras dos glicoproteínas que poseen fucosa α 1-6 en el núcleo de su estructura: la lipocalina-2 o NGAL y la α -fetoproteína (AFP). Se inmovilizaron estas proteínas sobre electrodos de oro, haciéndolas interactuar con concentraciones crecientes del aptámero en PBS-Na⁺. Para ambas se observó una señal distinta del blanco para concentraciones altas de aptámero, pero al contrario que para la hPSA esta señal no aumenta significativamente al aumentar la concentración de aptámero. También se observó un comportamiento comparable para el enlace a la rPSA (Figura 4.13). Así mismo se evaluó la selectividad en PBS-K⁺ para una concentración de aptámero 500 nM, obteniéndose muy buena selectividad frente a la rPSA y NGAL, similar a la obtenida en PBS-Na⁺, con señales que corresponden aproximadamente al 15% de la señal medida para hPSA. Para la AFP se obtuvo el 31 % de la señal obtenida para hPSA en PBS-K⁺ y un 18 % en PBS-Na⁺.

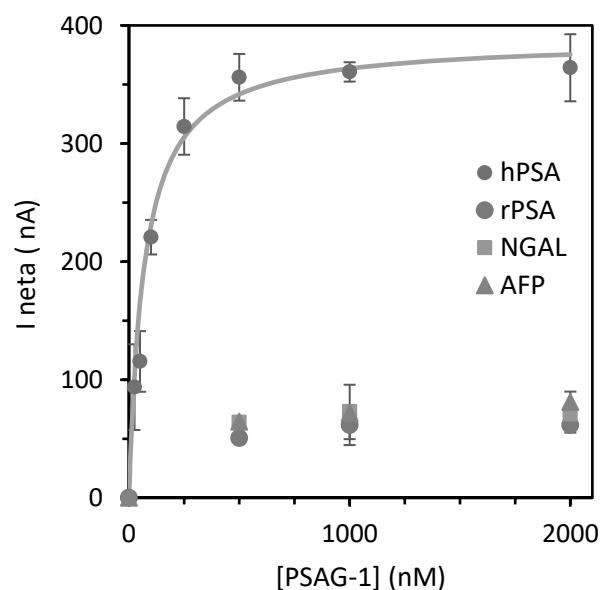


Figura 4.13: Selectividad del aptámero PSAG-1. Bajo las mismas condiciones de unión (PBS-Na⁺) el aptámero no muestra una unión significativa hacia la rPSA, NGAL y AFP.

Además, se evaluó la selectividad del aptámero PSAG-1 frente a la ovoalbúmina, una glicoproteína con un alto contenido en manosas y sin fucosa del núcleo. De nuevo, para esta proteína se observó un decrecimiento en la capacidad de enlace del aptámero. La señal obtenida para la unión de una concentración 500 nM de PSAG-1 es un 21 ± 2 % de la registrada para la hPSA, siendo solamente un poco mayor que la obtenida para la rPSA (13 ± 5 %). Incluso para una proteína como la transferrina, con más de un sitio de N-glicosilación pero sin fucosa del núcleo, se observa una menor capacidad de enlace del aptámero, con una señal para 500 nM de aptámero del 45 ± 5 % de la registrada para la hPSA. Los resultados obtenidos demuestran la excelente selectividad de este aptámero frente a otras glicoproteínas.

Si comparamos este aptámero con el obtenido en el anterior SELEX, el PSA-1, observamos que a diferencia del PSA-1 que no era capaz de distinguir entre la hPSA y la NGAL, este nuevo aptámero obtenido es capaz

de diferenciar entre glicoproteínas. Además, ambos aptámeros mantienen una baja unión a la PSA recombinante (Figura 4.14).

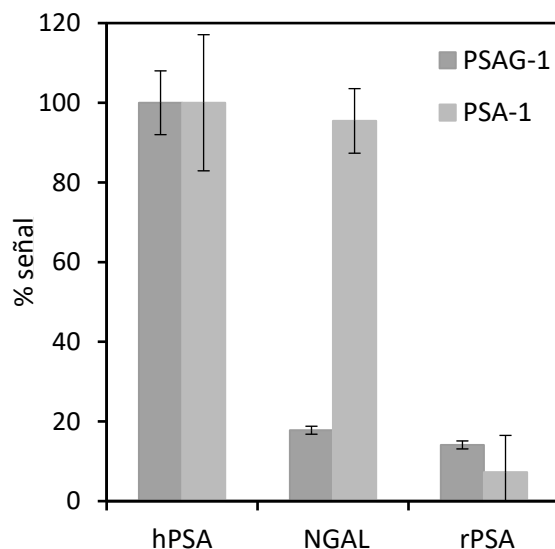


Figura 4.14: Comparación de la selectividad de los aptámeros PSAG-1 (azul) y PSA-1 (verde) hacia las proteínas hPSA, rPSA y NGAL mediante ensayos de unión con detección electroquímica.

4.3.2.1 Estudio estructural del aptámero PSAG-1

Los resultados de afinidad y selectividad del aptámero PSAG-1 obtenidos en el medio con iones potasio apuntan a la presencia de cuartetos de guanina en la estructura secundaria del aptámero, para corroborar la presencia de estos se realizó un estudio estructural del aptámero que se describe a continuación. Los cuartetos de guanina de los ácidos nucleicos son estructuras no canónicas estabilizadas por pares de bases G-G, en las que cuatro guaninas se unen en una conformación plana mediante enlaces de hidrógeno de Hoogsteen y las bases intermedias se posicionan formando bucles de cadena sencilla. Se pueden apilar dos o más tetraedros unos encima de otros, provenientes de la misma cadena o juntándose múltiples cadenas¹²⁹.

En primer lugar, se utilizó el programa QGRSMapper¹³⁰ para predecir los posibles cuartetos de guanina. Este programa analiza la secuencia e identifica las guaninas que forman el cuarteto y el resto de bases que formarían los bucles entre las guaninas. De este análisis se obtiene que en efecto la estructura podría presentar un cuarteto de guanina y que los residuos de guanina que formarían el cuádruplex son las guaninas en las posiciones 5, 6, 7, 8, 15, 16, 24 y 25 (en rosa, subrayadas), y el resto de bases entre ellas formarían los bucles (en azul).

GAGCGGGGTTGCTGGGATGATAAGGCCCCTTTGATGTCTG

Para corroborar si la estructura secundaria del aptámero es de cuartetos de guanina se realizó un estudio estructural del mismo mediante dos técnicas: la espectroscopia de dicroísmo circular y el *remelting* VIS-UV.

La espectroscopia de dicroísmo circular permite el estudio de la conformación de las moléculas y se basa en la diferente absorción de la luz polarizada. Las diferentes estructuras secundarias de los aptámeros se asocian con diferentes perfiles del espectro de dicroísmo circular. Para las estructuras secundarias de cuartetos de guaninas está descrito un máximo a 260 nm y un mínimo a 240 nm, mientras que para la estructura secundaria de horquilla o *hairpin* se describe un máximo sobre 280 nm y un mínimo sobre 245 nm^{131,132}. Se realizó el espectro de dicroísmo circular de una disolución 5 μ M del aptámero en ambos medios, con iones sodio y con iones potasio, a una temperatura de 25 °C controlada mediante un sistema Peltier en un espectropolarímetro JASCO J-815 con una cubeta de cuarzo de 2 mm de paso óptico. El espectro de dicroísmo se registró desde 500 nm hasta 200 nm con una velocidad de 200 nm/min y con una resolución de 1 nm. Cada espectro es la media de tres espectros realizados de forma consecutiva y tras la corrección de la línea base con el espectro de la disolución reguladora empleada para la medida. Como se observa en la Figura 4.15 los espectros de dicroísmo circular obtenidos en el medio con iones Na⁺ y K⁺ son idénticos, observándose un máximo a 276 nm y un

mínimo a 240 nm, que sugieren que la estructura secundaria del aptámero se trata de una horquilla y no de un cuarteto de guaninas.

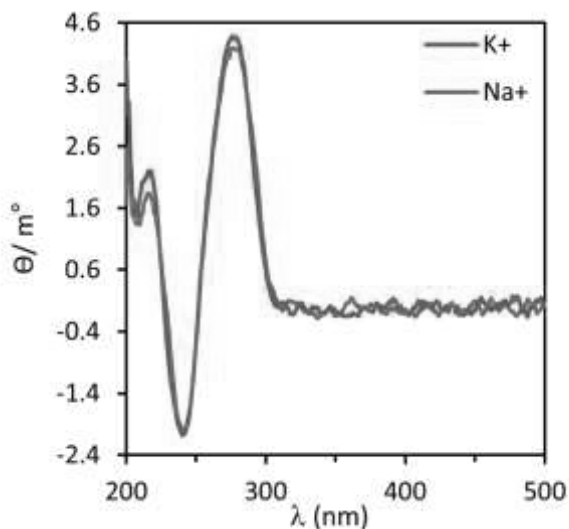


Figura 4.15: Espectro de dicrosimo circular de una disolución 5 μM del aptámero PSAG-1 obtenido en una disolución de fosfato 0.1 M pH 7.4 con una concentración 154 mM de iones Na^+ (azul) o iones K^+ (rosa).

Esta misma conclusión se obtiene de los estudios de *remelting* VIS-UV. Este estudio consiste en monitorizar la absorbancia del aptámero a 295 y 260 nm en función de la temperatura durante ciclos de calentamiento, en los que se produce la disociación o *melting* y posterior enfriamiento en el que se produce la reasociación o *annealing*. Este experimento se llevó a cabo en un espectrofotómetro Carry 60 UV-VIS equipado con un sistema Peltier para el control de temperatura. Se colocó una disolución 5 μM del aptámero en la disolución reguladora con iones potasio (PBS- K^+) en una celda de cuarzo y se calentó hasta 90 °C, enfriándose a continuación lentamente hasta los 25 °C y por último se calentó nuevamente hasta los 90 °C. La absorbancia se monitorizó entre 500 nm y 200 nm con una velocidad de barrido de 600 nm/min y las medidas se realizaron cada 10 °C excepto entre 25 y 30 °C. El espectro final a cada temperatura se obtuvo restando al espectro del aptámero el de la disolución reguladora para corregir la señal de fondo. Como se observa en la Figura 4.16, la

absorbancia del aptámero a 295 nm se mantiene prácticamente constante sin observarse una pendiente negativa para la curva de *melting* tal y como se describe para los cuartetos de guanina. Se obtiene un perfil de absorbancia a 260 nm normal para la estructura secundaria de horquilla, en la que la curva de *annealing* y *melting* son iguales y se observa un aumento de la absorbancia con la temperatura^{133,134}. Además, a longitudes de onda más altas (405 nm) la absorbancia se mantiene prácticamente constante y con valores bajos mostrando que no se han producido artefactos durante las medidas.

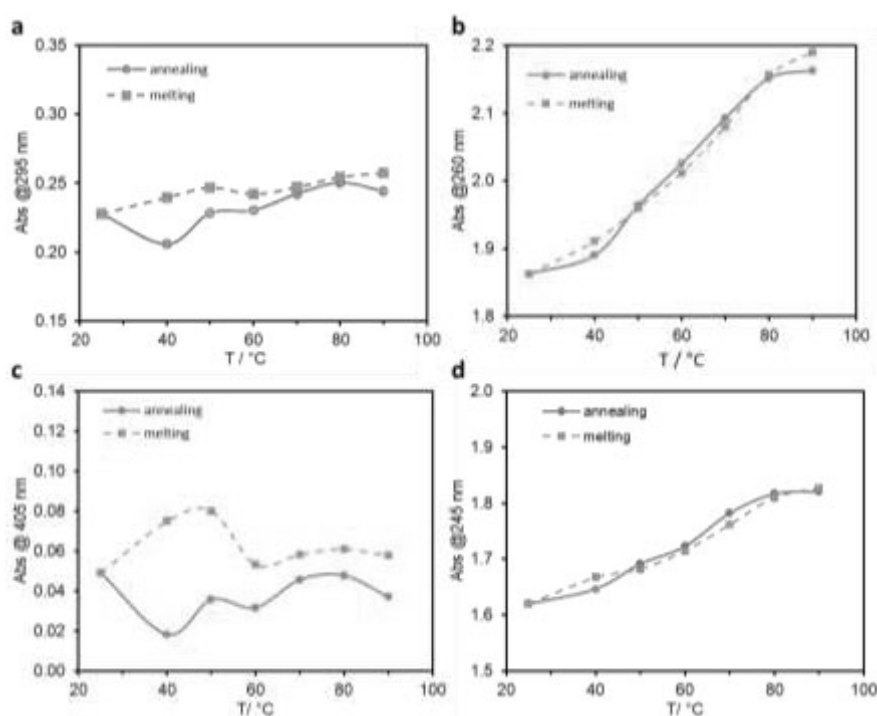


Figura 4.16: Curvas de remelting UV-VIS. Representación de la absorbancia frente a la temperatura a 295 nm (a), 260 nm (b), 405 nm (c) y 245 nm (d) de una disolución 5 μ M del aptámero PSAG-1 en PBS-K⁺. El ciclo de enfriamiento (*annealing*) se muestra en azul y el de calentamiento (*melting*) en dorado.

De ambos estudios se concluye que el aptámero no presenta una estructura secundaria de cuartetos de guanina si no una de horquilla como la predicha por el software Mfold.

En resumen, en este capítulo se ha descrito por primera vez una metodología generalizable para dirigir el proceso de selección de aptámeros con el fin de obtener un reconocimiento binario de glicoproteínas. Los aptámeros que se identifican mediante este proceso reconocen tanto los glicanos como la región peptídica de la glicoproteína, mejorando así la selectividad de los receptores sintéticos para glicoproteínas descritos hasta el momento. Mediante esta estrategia de selección se ha desarrollado un aptámero PSAG-1 capaz de reconocer selectivamente los glicanos de la PSA humana y con la capacidad de discriminar esta proteína de otras glicoproteínas.

CAPÍTULO 5

*Estudio empírico y computacional
del sitio de unión de los
aptámeros*

5.1 Introducción

En los capítulos 3 y 4 se han descrito dos aptámeros capaces de enlazarse a los glicanos de la PSA, el PSA-1 y el PSAG-1, con diferentes características de unión. Aunque se han discutido resultados que apuntan a que los azúcares de la glicoproteína están involucrados en el reconocimiento molecular, no se posee información sobre qué azúcares participan en su unión al aptámero. Con el fin de identificar los azúcares que reconocen los aptámeros y conocer si alguno de ellos son los que se ven alterados en presencia del cáncer de próstata, en el presente capítulo se describen los trabajos, tanto experimentales como mediante simulaciones computacionales, diseñados para identificar los azúcares que participan en el evento de reconocimiento del aptámero y predecir el sitio de unión de los aptámeros a las proteínas. Los trabajos experimentales se basan en estudios de eliminación de azúcares paso a paso para posteriormente estudiar la capacidad de interacción del aptámero¹³⁵. Mientras que mediante simulaciones computacionales se pretende determinar la estructura secundaria y terciaria de los aptámeros y estudiar su interacción con proteínas¹³⁶.

5.2 Protocolos

5.2.1 Estudio de desglicosilación

En la desglicosilación selectiva de la glicoproteína PSA se utilizaron enzimas glicosidasas específicas, que catalizan la hidrólisis de ciertos enlaces glucosídicos del glicano unido a la proteína¹³⁵. La interacción con las enzimas específicas se realizó sobre electrodos serigrafados de oro modificados con la hPSA como se ha descrito anteriormente (véase capítulo 3).

Se emplearon enzimas específicas para la eliminación sucesiva de los azúcares de la proteína en el siguiente orden: sialidasa-A, β -galactosidasa,

N-acetilhexosaminidasa, manosidasa, fucosidasa y péptido:N-glicosidasa F o PNGaseF, obtenidas de New England Biolabs (EEUU). Todas las enzimas se prepararon en el medio y en la concentración especificados en los protocolos proporcionados por la casa comercial.

Las interacciones se realizaron en un volumen de 10 μ L a 37 °C en atmósfera húmeda durante 2 horas, excepto la interacción con la enzima PNGaseF que fue de 24 horas. Tras la interacción con las enzimas, de forma sucesiva, se realizó un ensayo de unión con detección electroquímica, utilizando una concentración 100 nM de PSAG-1 en PBS-K⁺ o 500 nM de PSA-1 en BS durante 30 minutos. Se utilizaron los dos aptámeros marcados con fluoresceína en su extremo 5'. Para obtener información sobre la cantidad de aptámero enlazada a la PSA en los diferentes estados de desglucosilación, la superficie de trabajo se incubó a continuación con el conjugado enzimático: fragmento Fab de anti-fluoresceína-Peroxidasa, realizándose finalmente la medida electroquímica de la actividad de peroxidasa inmovilizada siguiendo el protocolo detallado en el capítulo 3.

5.2.2 Ensayo de desplazamiento

El ensayo de desplazamiento consiste en un ensayo de unión de los aptámeros a la proteína bloqueada con la lectina PhoSL, seguido de detección electroquímica. Para ello se inmovilizó covalentemente la proteína sobre electrodos serigrafiados de oro siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 3. Antes de la realización de la curva de enlace con concentraciones crecientes del aptámero PSA-1 o PSAG-1 marcados con fluoresceína y la detección electroquímica, tuvo lugar el bloqueo de la hPSA con la lectina.

Esta etapa de bloqueo consistió en la incubación del electrodo sobre el que se había inmovilizado la hPSA con 10 μ L de una disolución de la lectina PhoSL, a una concentración 1 μ g/mL preparada en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se lavó el electrodo con PBS y se secó con corriente de nitrógeno para llevar a cabo la unión del

aptámero, el marcaje enzimático y la medida electroquímica del aptámero capaz de unirse a la PSA, con un protocolo idéntico al utilizado para obtener las curvas de enlace de los aptámeros.

5.2.3 Ensayo de unión competitivo

Este ensayo también consiste en un ensayo de unión de los aptámeros a la hPSA pero en presencia de L(-)-fucosa en disolución, con detección electroquímica. En primer lugar, se inmovilizó la hPSA a la superficie de electrodos serigrafiados de oro siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 3. A continuación, se incubó esta superficie durante 30 minutos con tres concentraciones distintas (10, 50 y 500 nM) del aptámero PSAG-1, marcado con fluoresceína y en el medio de PBS-K⁺, en presencia de dos concentraciones de L(-)-fucosa en disolución (1 y 10 μM). Tras lavar el electrodo y secarlo con corriente de nitrógeno tuvo lugar el marcaje enzimático y la medida electroquímica del aptámero enlazado mediante el protocolo ya descrito.

5.2.4 Modelización computacional

5.2.4.1 Predicción de la estructura tridimensional de los aptámeros

Para predecir la estructura 3D de los aptámeros PSAG-1 y PSA-1 se partió de la estructura secundaria predicha mediante la herramienta bioinformática Mfold¹²² a 25 °C y con una fuerza iónica de 0.154 M. La estructura secundaria obtenida en formato Vienna (puntos y paréntesis) se transformó en una estructura 3D empleando el programa RNAComposer¹³⁷. Este programa reconoce la estructura secundaria y la transforma en una estructura tridimensional. Como se trata de un programa pensado para ARN, proporciona una estructura tridimensional en las que las timinas han sido cambiadas por uracilos y las bases son ribosas en vez de desoxirribosas. Para tener la estructura tridimensional del aptámero de ADN se empleó el programa de edición molecular Discovery Studio Visualizer. Con la herramienta “Built and Edit nucleic

acid” se cambiaron las bases uracilo por timinas y se añadió un grupo OH para transformar las ribosas en desoxirribosas. De esta forma, se obtuvo un primer modelo para la estructura tridimensional del aptámero de ADN, que finalmente se refinó mediante simulaciones de dinámica molecular en la escala de los μ s. Más en detalle, se utilizó la técnica de muestreo reforzado denominada GaMD (*Gaussian accelerated Molecular Dynamics*) para explorar distintas conformaciones del aptámero, ya que gracias a la introducción de potenciales armónicos, se suavizan las barreras energéticas para su interconversión. A partir de la simulación GaMD, se seleccionó entonces una estructura de baja energía para comenzar una simulación de dinámica molecular convencional, que finalmente proporcione un muestreo de equilibrio extenso de las características estructurales y dinámicas del aptámero en cuestión.

5.2.4.2 Adecuación de la estructura cristalina de la PSA

Se escogió como estructura en 3D de la PSA la estructura cristalina 3QUM obtenida mediante rayos-X¹³⁸, en la que la hPSA se encuentra formando un complejo tipo sándwich con dos anticuerpos monoclonales que se eliminaron de la misma empleando el programa de edición molecular Discovery Studio Visualizer. La estructura resultante, correspondiente solamente a la proteína PSA, está compuesta por dos moléculas de proteína, etiquetadas como P y Q en el archivo PDB. Ambas están glicosiladas con un carbohidrato triantenario con ácidos siálicos terminales (15 monosacáridos en total), unido mediante un enlace tipo N-glicosídico a la asparagina 69 de la cadena peptídica (Figura 1.9). La molécula P también contiene un pequeño disacárido con un enlace tipo O-glicosídico unido a la treonina 125, pero este se eliminó y solamente se incluyó el glicano unido a la asparagina 69 en el modelo molecular para la realización de los cálculos con el método de acoplamiento molecular o *docking* de la proteína con el aptámero. A pesar de que las coordenadas de la PSA en las moléculas P y Q tiene solamente pequeñas diferencias estructurales, la falta de similitud en los enlaces entre la manosa en la

posición 4 y la N-acetilglucosamina de la 5, y el entorno cristalino da lugar a una diferente orientación de los glicanos. Sin embargo, en la resolución de la estructura cristalina la forma de los carbohidratos se modeló a partir de la molécula P, ya que la interpretación de los glicanos de la forma Q es menos precisa. Por este motivo, solamente se tomaron las coordenadas de la molécula P para la realización de los cálculos del *docking*. El estado de protonación de los residuos de la hPSA se asignó de acuerdo con cálculos de pK_a realizados con la plataforma web H++ (versión 3.1). Como resultado de los valores obtenidos, se asignó una carga positiva a todas las lisinas y argininas, y una negativa a todos los ácidos aspártico y glutámico. Todas las histidinas son neutras y protonadas en el nitrógeno N_ϵ del anillo de imidazol, salvo la histidina 57 que se protonó en el nitrógeno N_δ del anillo de imidazol.

5.2.4.3 Docking rígido entre el aptámero y la PSA

En el análisis de *docking* se utilizaron las coordenadas del clúster más abundante obtenido del análisis de la simulación de dinámica molecular convencional del aptámero. Las coordenadas iniciales de la hPSA se obtuvieron de la estructura cristalina 3QUM refinada como se ha descrito anteriormente. Para la realización del *docking* se empleó el programa Autodock¹³⁹, en los que la proteína PSA fue el receptor que permaneció fijo, y el aptámero fue el ligando que se desplazó y rotó rígidamente alrededor de la proteína. Para explorar múltiples opciones de enlace se necesita disponer de los mapas de cuadrícula para el ligando (PSA) en los que se recoge la información sobre interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno y repulsiones estéricas de cada átomo. Los mapas se centraron sobre el átomo C1 del residuo fucosa. Debido al gran tamaño del ligando se definieron 256 puntos de cuadrícula a lo largo de cada eje cartesiano con un espaciado de 0.333 Å. Este mapa define un espacio de *docking* centrado sobre la superficie de los azúcares de la PSA pero lo suficientemente amplio para permitir al aptámero rotar y trasladarse alrededor de la PSA dando lugar a diferentes posiciones de enlace y

diferentes tipos de complejos hPSA/aptámero. Cada cálculo de Autodock generó 500 configuraciones para el complejo hPSA/aptámero, cuyas geometrías se relajaron mediante minimización de la energía con el fin de introducir cierta flexibilidad en el protocolo de *docking*. Finalmente, se reevaluó la estabilidad relativa de los distintos complejos mediante la función de *scoring* de Autodock y se visualizaron empleando el programa Chimera¹⁴⁰. La relevancia y estabilidad de las interacciones del complejo hPSA/aptámero más favorable energéticamente obtenido del *docking* fueron evaluadas con más detalle llevando a cabo simulaciones de dinámica molecular sin restricciones, usando el algoritmo convencional. El sistema hPSA/aptámero fue sujeto a minimización, termalización y presurizado empleando el programa SANDER/PMEMD, y se llevaron a cabo simulaciones en la escala de los μ s para relajar el complejo. Las poses resultantes fueron clusterizadas y se visualizaron empleando el programa Chimera.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Estudio empírico del sitio de unión de los aptámeros

Para estudiar el papel de los azúcares en el reconocimiento de los aptámeros PSA-1 y PSAG-1 hacia la PSA se realizó un estudio de desglicosilación selectiva de la proteína inmovilizada sobre electrodos de oro empleando diferentes enzimas glicosidasas. Estas enzimas tienen la capacidad de eliminar un azúcar específico de la estructura de glicanos dejando el resto intactos.

Las enzimas empleadas en la desglicosilación y su función se recogen en la Tabla 5.1 y la Figura 5.1. A excepción de la sialidasa-A y la PNGaseF, que son enzimas endonucleasas, el resto de enzimas empleadas son exonucleasas. Esto quiere decir que para poder hidrolizar el azúcar este tiene que ser un azúcar terminal. Por este motivo deben emplearse de

forma secuencial para eliminar previamente los azúcares que están unidos al azúcar que nos interesa eliminar.

Tabla 5.1: Enzimas empleadas en la hidrólisis de los azúcares de la PSA y azúcares que hidrolizan.

Enzima	Azúcar que hidroliza
Sialidasa-A	Ácidos siálicos con enlace α 2-3,6,8,9
β - galactosidasa	Galactosas con enlace β 1-3,4
N-acetil-hexosaminidasa	N-acetilglucosaminas con enlace β 1-3,4,6
Manosidasa	Manosas con enlace α 1-2,3,6
Fucosidasa	Fucosas con enlace α 1-2,3,4,6
PNGaseF	Todos los N-glicanos unidos a la proteína

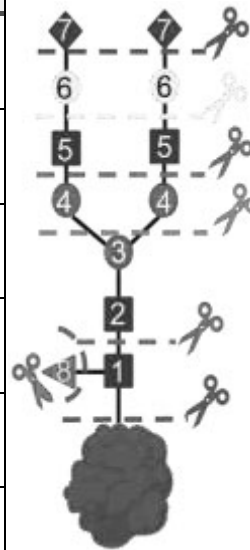


Figura 5.1: Cadena de azúcares de la hPSA en la que se identifica el sitio de hidrólisis de las diferentes enzimas glicosidasas.

Tras la eliminación de cada azúcar se estudió la capacidad de enlace de cada aptámero mediante un ensayo de unión con detección electroquímica. Con fines comparativos, la capacidad de unión se expresó como el porcentaje de señal obtenido para cada estado de glicosilación con relación a la señal electroquímica obtenida para la unión del aptámero a la PSA intacta.

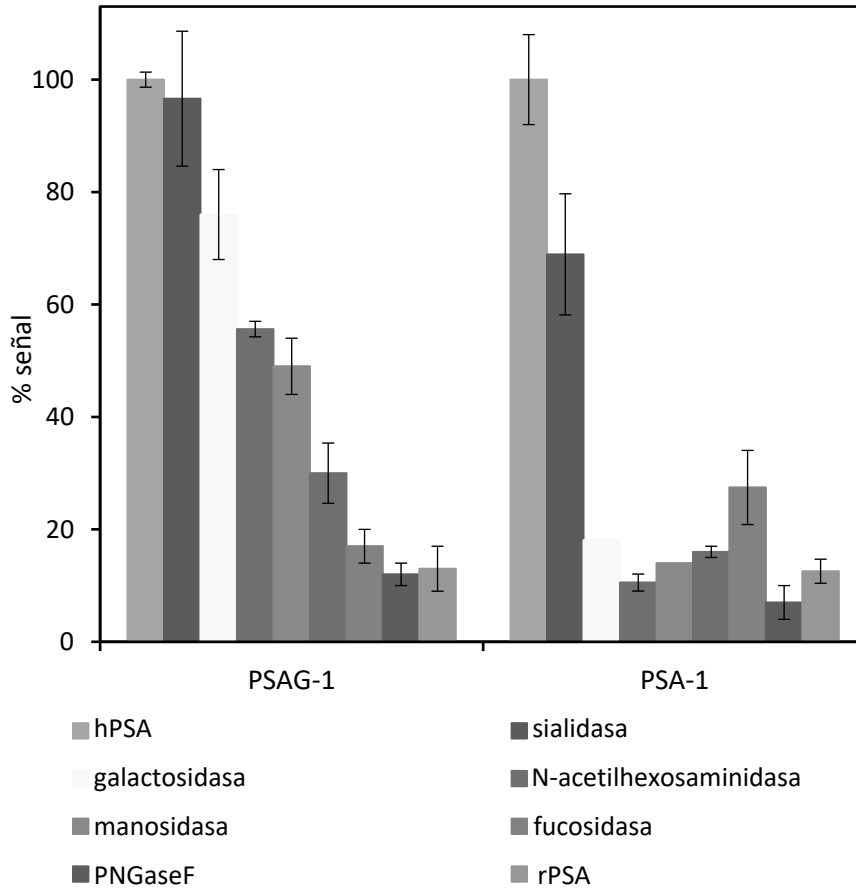


Figura 5.2: Resultados del experimento de desglicosilación. Se representa la capacidad de enlace de los aptámeros PSAG-1 y PSA-1 a la proteína intacta (hPSA), después de la eliminación de cada azúcar y a la PSA recombinante (rPSA). El % señal es la relación entre la señal obtenida tras cada desglicosilación y la que se obtuvo para la hPSA intacta.

Como se observa en la Figura 5.2 el patrón de unión es completamente diferente para ambos aptámeros, indicando que estos reconocen diferentes azúcares de la PSA. La eliminación del ácido siálico no afecta a la capacidad de enlace del aptámero PSAG-1 pero reduce en un 30 % la del aptámero PSA-1. Para el aptámero PSA-1, la eliminación de la galactosa supone una disminución del enlace a valores residuales (< 20 %), comparables a los obtenidos con la proteína recombinante (sin azúcares) o cuando se trata la hPSA con la enzima PNGaseF, que elimina todos los azúcares. Estos resultados indican que el aptámero PSA-1 reconoce la zona

externa del glicano, lo que concuerda con los resultados anteriores, en los que se había observado que el PSA-1 no reconoce la región peptídica de la PSA.

Por el contrario, el aptámero PSAG-1 mostró una disminución progresiva de la capacidad de enlace cuando se eliminaron secuencialmente los azúcares más cercanos a la región peptídica. Las disminuciones más importantes, entre el 13 % y el 21 % de decrecimiento, se observaron para la eliminación de la galactosa (azúcar 6 en la Figura 5.1), la N-acetilglucosamina (azúcares 5 y 2) y la fucosa α 1-6 del núcleo (azúcar 8). La señal obtenida tras la eliminación de todos los azúcares con la enzima PNGaseF fue comparable a la obtenida para la proteína PSA recombinante. Estos resultados sugieren que el aptámero PSAG-1 reconoce gran parte de los azúcares del glicano, especialmente los azúcares más internos y cercanos a la cadena peptídica, incluyendo a la fucosa α 1-6 del núcleo.

La importancia de la fucosa α 1-6 del núcleo en el reconocimiento de la hPSA por ambos aptámeros se estudió más en detalle mediante dos tipos de ensayo: de desplazamiento y competitivo. En el ensayo de desplazamiento se bloqueó la hPSA inmovilizada sobre electrodos de oro con la lectina PhoSL y después se hizo interaccionar con concentraciones crecientes de los aptámeros marcados con fluoresceína. Dado que la lectina PhoSL reconoce específicamente la fucosa α 1-6 del núcleo de los N-glicanos, se supuso que el enlace de esta a la hPSA podría inhibir la interacción del aptámero si este reconoce a la fucosa α 1-6 del núcleo. Además, si la afinidad del aptámero por este azúcar es mayor que la de la lectina, este debería ser capaz de desplazarla y unirse a la glicoproteína. En la interacción del aptámero PSA-1 con la hPSA bloqueada con la lectina se obtuvieron prácticamente las mismas señales que las obtenidas con la PSA sin bloquear (Figura 5.3). Este resultado indica que la lectina y el aptámero PSA-1 no comparten sitio de unión, ya que la presencia de esta no afecta a la unión del aptámero. Esta observación está en concordancia

con los resultados obtenidos en el estudio de desglicosilación, en los que se observó que el aptámero PSA-1 reconoce la región más externa del glicano.

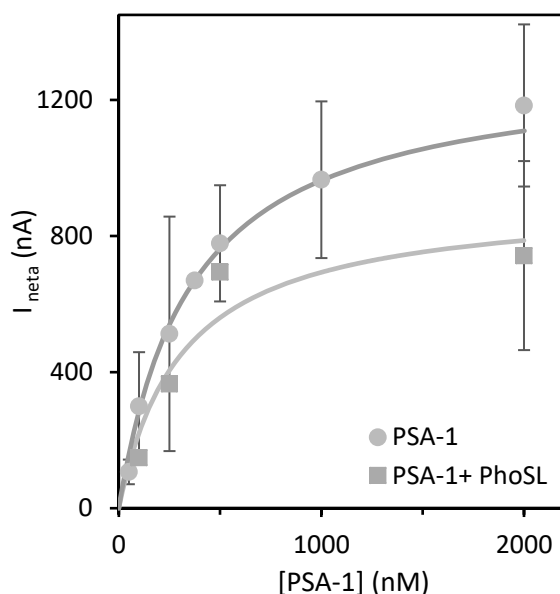


Figura 5.3: Curvas de enlace del aptámero PSA-1 a la hPSA (verde) y la hPSA bloqueada con la lectina PhoSL (naranja). Los ensayos se realizaron en PBS, midiendo cronoamperométricamente la cantidad de aptámero enlazado.

Sin embargo, para el aptámero PSAG-1 se observó un claro desplazamiento de la curva de enlace hacia concentraciones de aptámero mayores cuando la interacción se produjo con la hPSA bloqueada con la lectina PhoSL (Figura 5.4). Para concentraciones bajas de aptámero no se observó enlace a la hPSA bloqueada y a medida que se aumentó la concentración de aptámero, este fue capaz de desplazar a la lectina observándose unión a la proteína. Sin embargo, la señal de saturación en estas condiciones no llegó a alcanzar la obtenida para la hPSA, posiblemente debido a que parte de las moléculas de lectina aún permanecían unidas a la PSA, imposibilitando estéricamente la unión de más aptámero (Figura 5.4). Los resultados obtenidos apuntan a que ambos receptores, lectina PhoSL y PSAG-1, comparten sitios de unión.

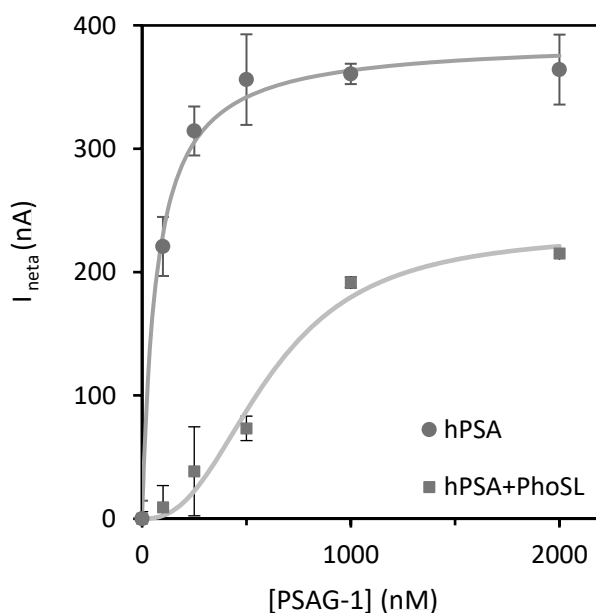


Figura 5.4: Curvas de enlace del aptámero PSAG-1 a la hPSA (azul) y la hPSA bloqueada con la lectina PhoSL (verde) en PBS-Na⁺ obtenidas mediante medidas electroquímicas.

La estructura cristalina de la lectina unida a diferentes glicanos muestra que además de la fucosa α 1-6 del núcleo también están involucrados en el enlace los azúcares N-acetilgalactosamina (azúcar 2) del cuerpo del glicano y los azúcares N-acetilgalactosamina (azúcar 5), galactosa (azúcar 6) y el ácido siálico terminal (azúcar 7) de la antena α 1-6 del glicano¹⁴¹. Estos azúcares son también posibles sitios de unión del aptámero, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo de desglicosilación.

Por otra parte, se estudió la capacidad del aptámero PSAG-1 de reconocer a la fucosa libre mediante un ensayo de unión a la proteína inmovilizada sobre electrodos de oro en presencia de L(-)-fucosa en disolución. Este ensayo competitivo se realizó con concentraciones crecientes del aptámero en ausencia de L(-)-fucosa y en presencia de dos concentraciones diferentes de la misma. Como puede observarse en la Figura 5.5, la presencia de fucosa en disolución produjo un pequeño desplazamiento en la curva de enlace a la hPSA, demostrando que el aptámero PSAG-1 se une a la fucosa del núcleo. Este desplazamiento

requiere concentraciones relativamente altas de fucosa en disolución, lo que es indicativo de que también otros azúcares están involucrados en el reconocimiento de la glicoproteína, como se había observado en el ensayo de desglucosilación.

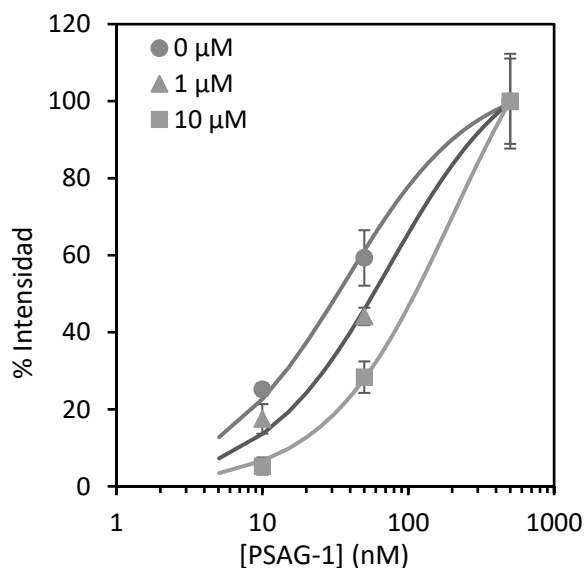


Figura 5.5: Enlace del aptámero PSAG-1 a la hPSA en ausencia (rosa) y en presencia de dos concentraciones diferentes de L-(-)-fucosa en disolución: 1 μM (gris) y 10 μM (naranja).

5.3.2 Estudio computacional del sitio de unión del aptámero PSA-1

Los métodos de modelización computacional son útiles a la hora de predecir la estructura tridimensional de los aptámeros. Una vez obtenida esta y junto con la estructura tridimensional de la proteína (véase sección 5.2), es posible utilizar cálculos de *docking* para predecir cómo es la unión del aptámero a la proteína. El estudio del modelo del complejo formado permite además conocer las bases del aptámero y las zonas de la proteína involucradas en el reconocimiento.

El programa Mfold solamente proporcionó una posible estructura secundaria del aptámero PSA-1, con una energía libre de Gibbs de - 3.07 kcal/mol. A partir de esta estructura se construyó la estructura 3D del

aptámero que se sometió a un protocolo de relajación mediante simulaciones de dinámica molecular. Las estructuras resultantes se agruparon en clústeres. Se encontró que los cuatro clústeres más poblados tienen una abundancia similar (18 %, 17 %, 15 % y 13 %) por lo que no es posible concretar cual de las cuatro estructuras es la más probable. En todas ellas se observó que el aptámero tiene poca estructura secundaria y adopta una conformación bastante abierta (Figura 5.6).

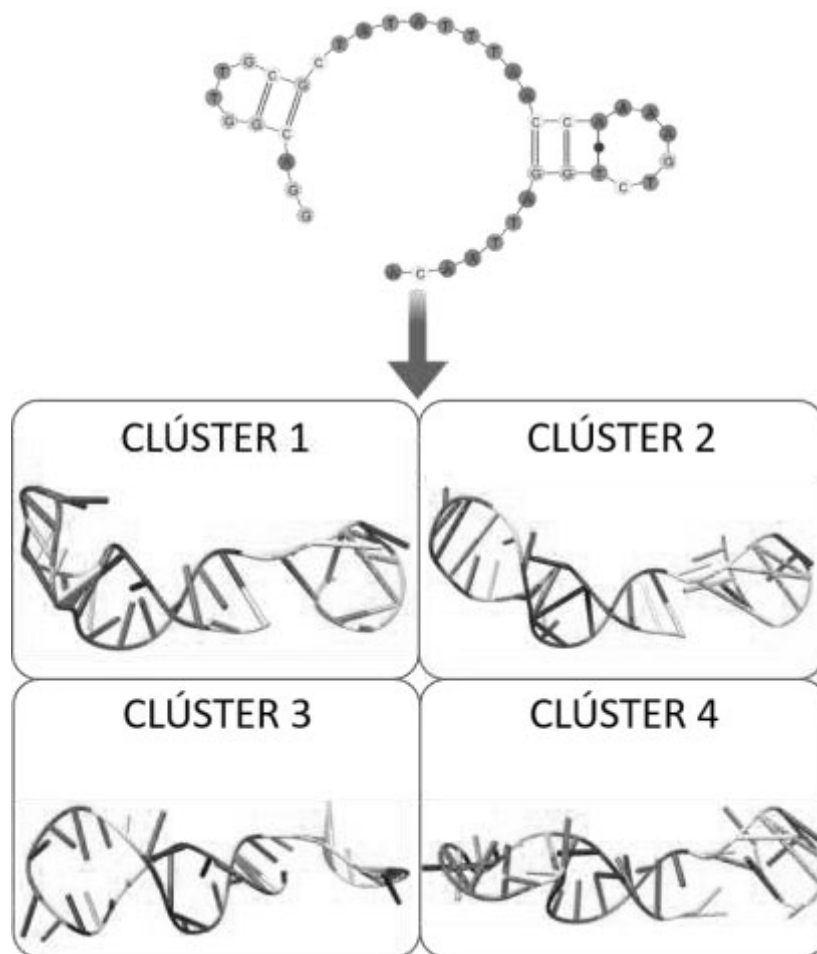
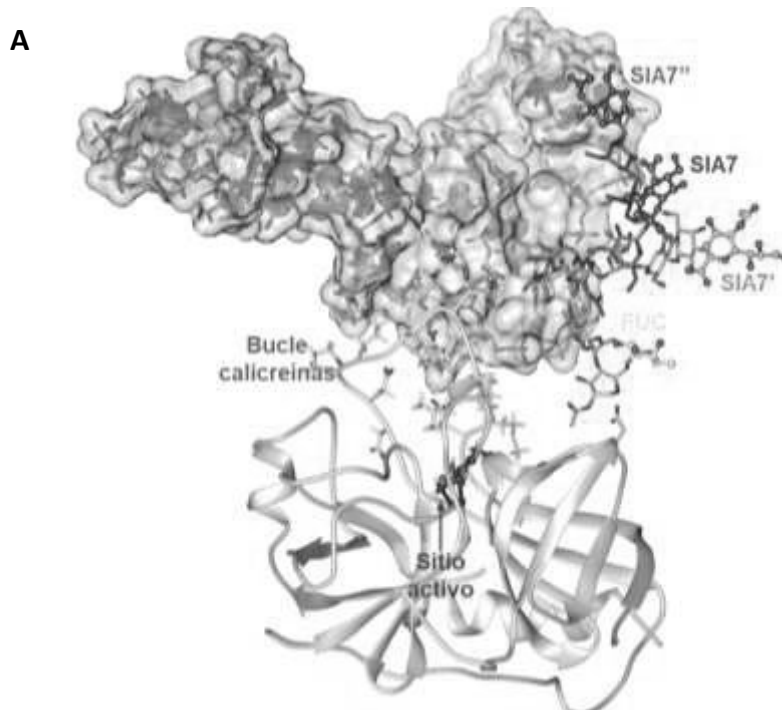


Figura 5.6: Estructura secundaria de partida del aptámero PSA-1, y las cuatro estructuras tridimensionales de los 4 clústeres más poblados.

Para obtener información sobre el modo de enlace entre el aptámero PSA-1 y la PSA se llevaron a cabo cálculos con Autodock en los que la

proteína se trató como el receptor fijo y el aptámero como el ligando rígido. Como no se pudo establecer una sola estructura tridimensional del aptámero, se partió de cada una de las estructuras representativas de cada clúster y junto con la estructura tridimensional de la proteína obtenida mediante rayos-X (3QUM) se llevó a cabo el *docking*. Los resultados obtenidos no son concluyentes ya que hay distintos complejos próximos en energía (≤ 1 kcal/mol) y es imposible predecir cual de ellos es el más favorable. Sin embargo, si se analizan dos de las conformaciones más favorables energéticamente, correspondientes a los complejos con la estructura tridimensional del aptámero del clúster 1 (- 16.46 kcal/mol) y del clúster 4 (- 15.64 kcal/mol), se observó que los ácidos siálicos intervienen en el reconocimiento, interaccionando con uno en el caso del aptámero del clúster 1 (Figura 5.7A) y con dos ácidos siálicos para el clúster 4 (Figura 5.7B). También tienen lugar contactos con algunos aminoácidos del bucle de las calicreínas. Además, en ninguno de ellos la fucosa interviene en el reconocimiento, quedando accesible al medio.



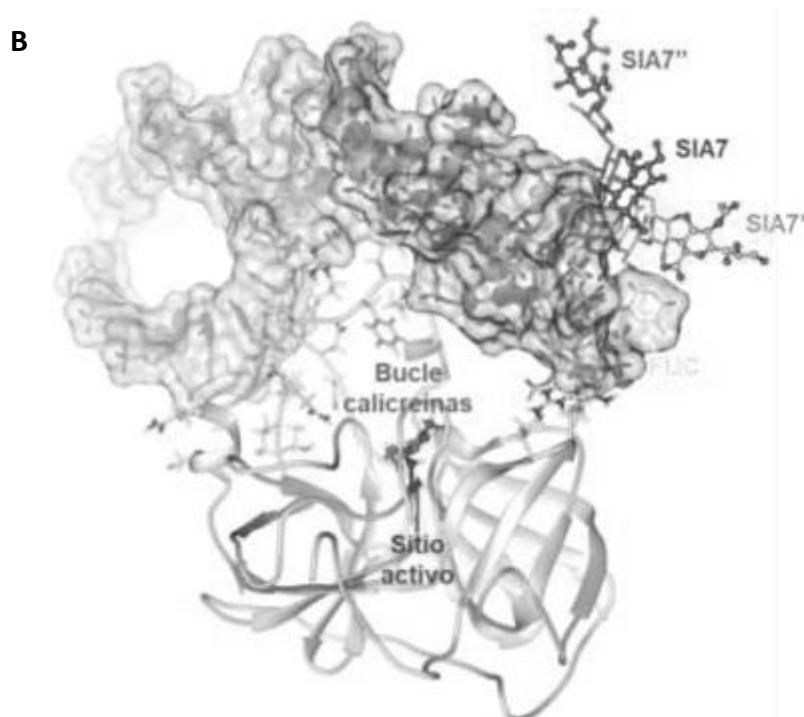


Figura 5.7: A) Representación del complejo más favorable energéticamente resultado de los cálculos de docking para la PSA y el aptámero PSA-1 (clúster 1). B) Representación del segundo complejo más favorable energéticamente resultado de los cálculos de docking para la PSA y el aptámero PSA-1 (clúster 4).

Para conocer cuál es la estructura tridimensional más favorable del complejo aptámero-proteína mediante estudios de *docking* sería necesario refinar la estructura tridimensional del aptámero. A pesar de esto, los resultados preliminares obtenidos están en concordancia con lo observado experimentalmente, es decir el aptámero PSA-1 parece involucrar en el reconocimiento solo azúcares de la parte externa del glicano.

5.3.3 Estudio computacional del sitio de unión del aptámero PSAG-1

5.3.3.1 Predicción de la estructura tridimensional del aptámero PSAG-1

Como se ha indicado anteriormente, es necesario disponer de la estructura en tres dimensiones del aptámero para poder realizar a

continuación el *docking* con una estructura en 3D de la proteína PSA. Para ello se utilizó el mismo protocolo que el utilizado para el aptámero PSA-1. El programa Mfold proporcionó tres estructuras secundarias para el aptámero PSAG-1 con valores similares de energía libre de Gibbs (ΔG) de -3.16, -3.16 y -2.72 kcal/mol. Con las tres estructuras secundarias (Figura 5.8) se construyeron tres estructuras 3D diferentes del aptámero que se sometieron al protocolo de relajación GaMD/MD.

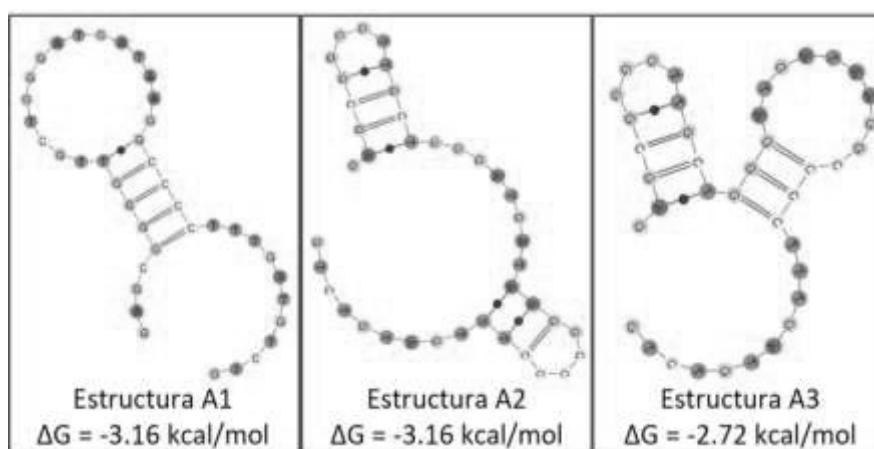


Figura 5.8: Estructuras secundarias del aptámero PSAG-1 obtenidas con el programa Mfold a 25 °C y con una concentración de Na^+ de 0.154 M.

Para discriminar entre los tres modelos, se calculó y promedió la energía de las distintas estructuras generadas a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular convencional, utilizando la técnica MM-PBSA (*Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area*). De este modo, se obtuvo que el modelo A1 es inequívocamente el más estable de los tres. La estructura secundaria de A1 (predicha con Mfold) se caracteriza por tener un bucle de horquilla (bases de la 13 a la 18 - TGGGAT-), una región helicoidal de seis bases constituida por emparejamientos canónicos, una pareja canónica aislada (C12 - G19) y tres parejas de bases no canónicas (T13 - T21, G14 - A17 y A17 - A20). El extremo final 3' de la cadena del aptámero muestra una conformación extendida monocatenaria. En la estructura tridimensional obtenida de las simulaciones se observa que la zona de los pares de bases

canónicas/oscilantes se encuentra bien conservada durante la simulación, pero la estructura helicoidal adyacente al bucle de horquilla se ve alterada tras la ruptura y formación de nuevos contactos de bases no canónicas. Los nuevos contactos que se forman son G14 - T21, G15 - A20 y G16 - G19. También se encontraron otras interacciones sin emparejamientos igualmente estabilizadas, especialmente en el caso de interacciones de p-apilamiento fuera del tronco, por ejemplo, entre los residuos 28 y 38 (Figura 5.9A). Estas interacciones son un compendio de las obtenidas para los tres clústeres representativos de la relajación mediante dinámica molecular de la estructura inicial (Figura 5.9B).

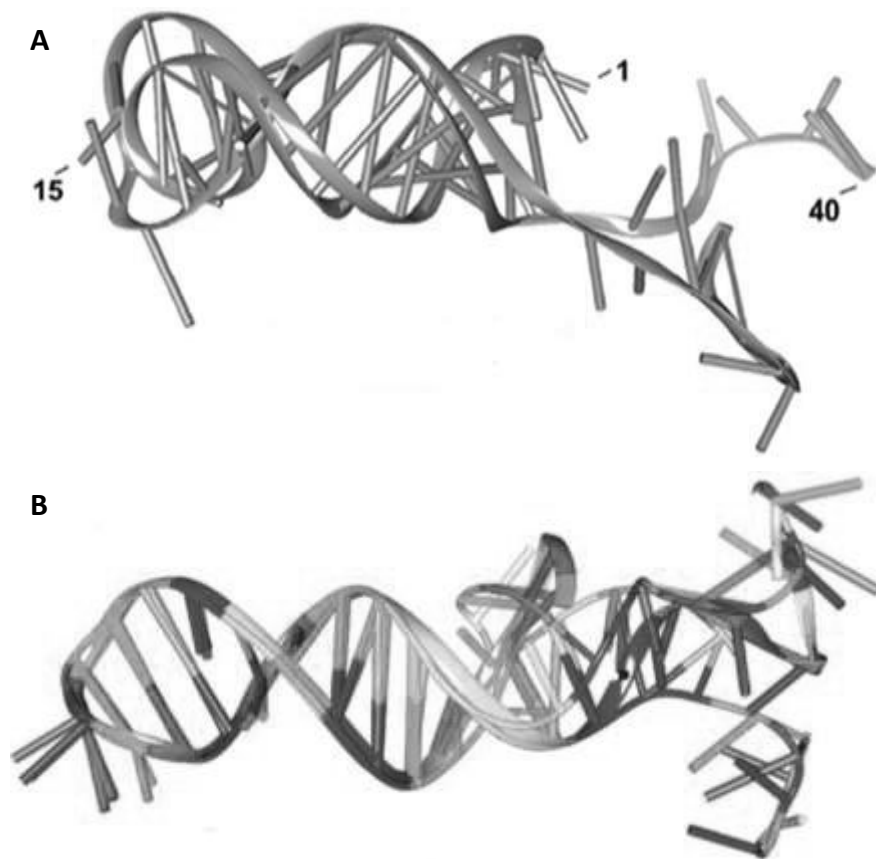


Figura 5.9: A) Comparación de la estructura tridimensional del aptámero PSAG-1 antes (gris) y después (dorado) de la relajación mediante MD. B) Apilamiento de tres estructuras tridimensionales representativas de los clústeres obtenidos tras la relajación por MD.

Claramente los surcos mayor y menor de la superficie molecular del bucle de horquilla y la región helicoidal del aptámero podrían adaptarse, constituyendo los sitios de unión selectiva de la glicoproteína PSA.

De la observación de la estructura tridimensional del aptámero y para validar el modelo computacional propuesto, se diseñó un truncamiento del aptámero PSAG-1, en el que se elimina la región 3' monocatenaria terminal, que no parece que vaya a jugar un papel crucial en el reconocimiento. El nuevo aptámero truncado (T-PSAG-1) carece de las últimas 8 bases del aptámero PSAG-1, teniendo, por tanto, una longitud de 32 bases.

Para este aptámero truncado también se obtuvo la estructura secundaria y la estructura tridimensional, que se relajó de igual modo mediante MD, de la forma descrita anteriormente. Las simulaciones confirmaron que el bucle de horquilla y la región helicoidal son también estables en el aptámero truncado (Figura 5.10).

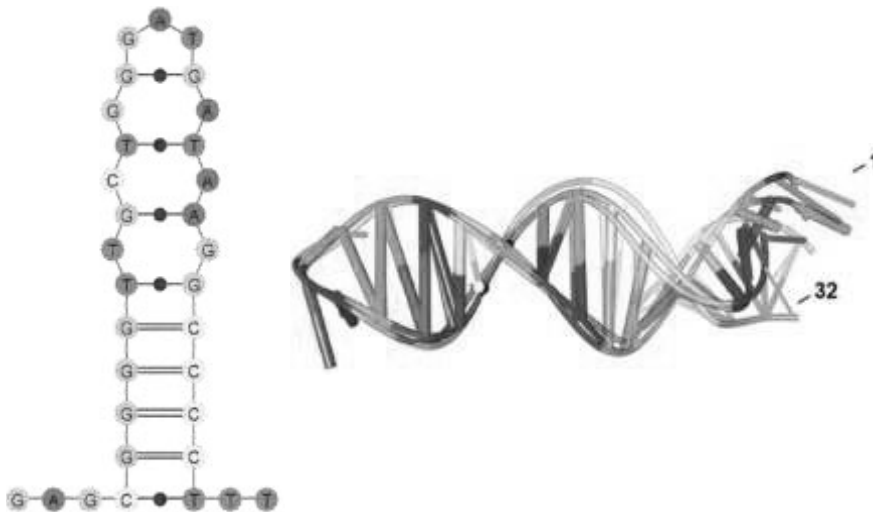


Figura 5.10: Estructura secundaria (izquierda) y tridimensional (derecha) del aptámero truncado T-PSAG-1.

En comparación con el aptámero PSAG-1, el truncado muestra el mismo patrón de contactos entre las bases en los mismos lugares a

excepción de algunos cambios que ocurren en el extremo superior del bucle de horquilla. Por ejemplo, los contactos entre las bases G14 - T21, G15 - A20 y G16 - G19 que aparecen en el PSAG-1 son remplazados por los contactos T13 - T21 y G15 - G21 en el T-PSAG-1. En consecuencia, el bucle de horquilla podría ser más sensible a los efectos de entorno mientras que la superficie de los surcos sobre la región helicoidal sería más rígida. Por consiguiente, las simulaciones realizadas avalan la hipótesis de que tanto el aptámero PSAG-1 como el aptámero truncado T-PSAG-1 podrían proporcionar complejos similares en el *docking* con la proteína PSA, facilitando las simulaciones computacionales.

Antes de realizar el *docking* entre el aptámero truncado y la PSA se comprobó empíricamente si este nuevo aptámero mantiene las características de enlace y selectividad hacia la PSA del aptámero completo.

5.3.3.2 Caracterización del aptámero T-PSAG-1

Para validar el modelo de truncado propuesto para el aptámero PSAG-1 se sintetizó el aptámero T-PSAG-1 de 32 bases. Con el objetivo de obtener una curva de enlace de este nuevo aptámero a la hPSA y evaluar su selectividad frente a otras proteínas, se realizaron ensayos de unión con detección electroquímica similares a los descritos para el aptámero completo, empleando para ello el aptámero con una marca de fluoresceína en su extremo 5'.

Este aptámero truncado es capaz de reconocer con suficiente afinidad a la hPSA. En la Figura 5.11 se muestra la curva de enlace obtenida para el T-PSAG-1 frente a la hPSA inmovilizada sobre electrodos de oro en PBS-Na⁺. La cantidad de aptámero enlazada se representó como porcentaje de la señal obtenida para cada concentración de aptámero ensayada con respecto a la señal de saturación. El ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Langmuir permitió obtener una constante de disociación de 121 ± 25 nM. Este valor es menos del doble del valor obtenido para el

PSAG-1, demostrando que el aptámero truncado es capaz de mantener una alta afinidad de enlace frente a la PSA glicosilada (Figura 5.11).

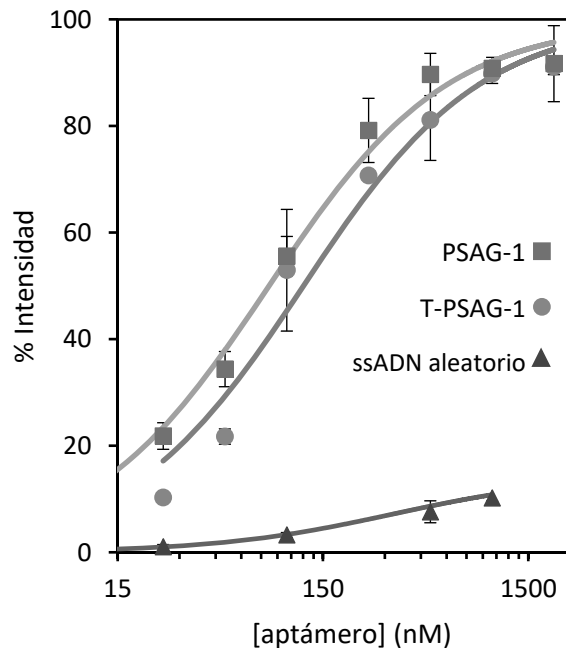


Figura 5.11: Comparación de la afinidad del aptámero truncado T-PSAG-1 (rojo) y PSAG-1 (azul) por la hPSA inmovilizada sobre electrodos de oro. Como control se utiliza una secuencia aleatorio de ssADN que no muestra enlace significativo a la hPSA (marrón).

A continuación, se estudió la selectividad del aptámero T-PSAG-1 frente a las proteínas rPSA y NGAL, inmovilizadas sobre electrodos de oro. Estas proteínas se hicieron interaccionar con una disolución 500 nM del aptámero en PBS-Na⁺, expresándose la cantidad de aptámero enlazado en términos relativos como el porcentaje de señal obtenida respecto a la señal para la interacción del aptámero con la hPSA. Como se muestra en la Figura 5.12 se obtienen unos valores de 19 ± 6 % para la interacción entre T-PSAG-1 y la rPSA y de 23 ± 3 % para la NGAL, estadísticamente iguales a los valores de selectividad obtenidos con el aptámero completo (PSAG-1).

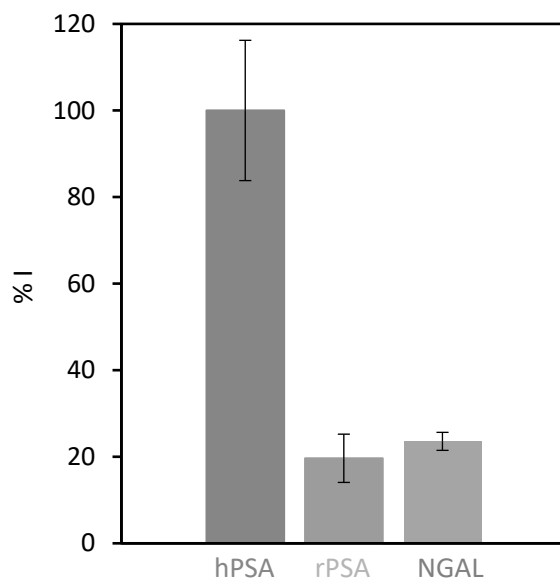


Figura 5.12: Selectividad del aptámero T-PSAG-1 frente a la rPSA (naranja) y a la NGAL (gris) en comparación con la respuesta obtenida para la hPSA (rojo).

En comparación con estos resultados, cuando se eliminaron de la secuencia completa de 40 bases del aptámero PSAG-1 algunas de las bases involucradas en el reconocimiento (parte del tronco) y se conservaron solamente los primeros 26 nucleótidos del extremo 5' del PSAG-1, se observó que esta nueva secuencia perdía por completo su capacidad de enlace selectivo a la hPSA, confirmando que la parte del tronco de la estructura del aptámero juega un papel crucial en la interacción.

Con estos experimentos se demostró que el aptámero T-PSAG-1 mantiene tanto la afinidad como la selectividad hacia la glicoproteína PSA con características comparables a las del PSAG-1. Por este motivo y con el fin de simplificar los cálculos computacionales se empleó el aptámero truncado para la realización del estudio de *docking* con la proteína.

5.3.3.3 Modelización del complejo aptámero/proteína

Para obtener información sobre el modo de enlace entre el aptámero T-PSAG-1 y la hPSA se llevaron a cabo en primer lugar cálculos con Autodock en los que la proteína se trató como el receptor fijo y el

aptámero como el ligando rígido. Del *docking* se obtuvieron un total de 500 poses que se agruparon en 35 clústeres y se relajaron en términos de minimización de energía. Las estructuras relajadas de los complejos obtenidos se clasificaron en función de la puntuación proporcionada por Autodock que estima la contribución de varias energías libres de enlace (electrostáticas, Van der Waals, puentes de hidrógeno y de solvatación). La energía libre de enlace resultante de los 35 clústeres está en el intervalo de - 15.8 a - 6.9 kcal/mol, observándose que el aptámero se une a la PSA a través de contactos muy persistentes.

En el complejo de *docking* más estable, el aptámero se une a la PSA manteniéndose alineado casi perpendicularmente al sitio activo de la hPSA. Esta orientación proporciona contactos favorables tanto entre el aptámero y la parte proteica como con el residuo de glicanos de la hPSA. Las simulaciones de dinámica molecular muestran que estos contactos son muy persistentes.

En las simulaciones realizadas, la estructura proteica de la PSA se mantiene estable mientras que la orientación relativa de los glicanos y la conformación interna de sus cadenas se ve alterada. Las antenas del glicano adoptan una forma más compacta que facilita la interacción con el aptámero y la proteína. Una de las antenas del glicano se acerca a la superficie de la proteína en la región circundante a la Asn69, con el ácido siálico terminal interaccionando de manera fluctuante con la Arg36 (según la numeración de los aminoácidos en el PDB). Las otras dos antenas del glicano interaccionan entre sí. En la estructura del aptámero T-PSAG-1, la región helicoidal se mantiene inalterada y está involucrada en la mayoría de las interacciones con la PSA. También se observa cierta plasticidad en la región del bucle de horquilla, en el que se están formando y rompiendo contactos de pares de bases no canónicos a lo largo de la simulación.

Por una parte, los aminoácidos Arg95G, Asn95F y Lys95E de la cadena lateral de la región del bucle de caliceínas se unen mediante puentes de hidrógeno/interacciones electrostáticas con los grupos fosfato del

esqueleto del aptámero, produciéndose las siguientes interacciones: Arg95G - C4, Arg95G - G5 y Lys95E - T32. Además, las cadenas laterales del bucle se acercan a las bases C4 y G5 dando lugar a la unión mediante puentes salinos entre la Arg95J y el grupo fosfato de la base T31. Otros aminoácidos del bucle de las calicreínas (Asp95, Met95A, Leu95D y Asn95F) también contribuyen al enlace del aptámero a través de contactos polares mediados por el agua y/o con interacciones de Van der Waals.

Por otro lado, el aptámero truncado está firmemente anclado a la región interna del cuerpo del glicano (Asn61-NAG1-NAG2-Man3-Man4-Man4') a través de puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals muy estables. Entre los contactos polares se encuentran las interacciones de los grupos hidroxilo de los azúcares tanto con los grupos fosfatos como con los grupos polares del surco principal del tallo del aptámero, produciéndose las siguientes interacciones: NAG1@O3H...OP2@G7, Man4'@O4H...OP2@G24, NAG2@O3H...N7@G8, Man3@O2H...O6@G7 y Man3@O4...HN4@C26. En particular, el azúcar fucosa que se encuentra en una posición central tiene una interacción estable de puente de hidrógeno (Fuc8@O3H...OP2@G6) e interacciones de Van der Waals con el anillo de azúcar de la base G6 (Figura 5.13).

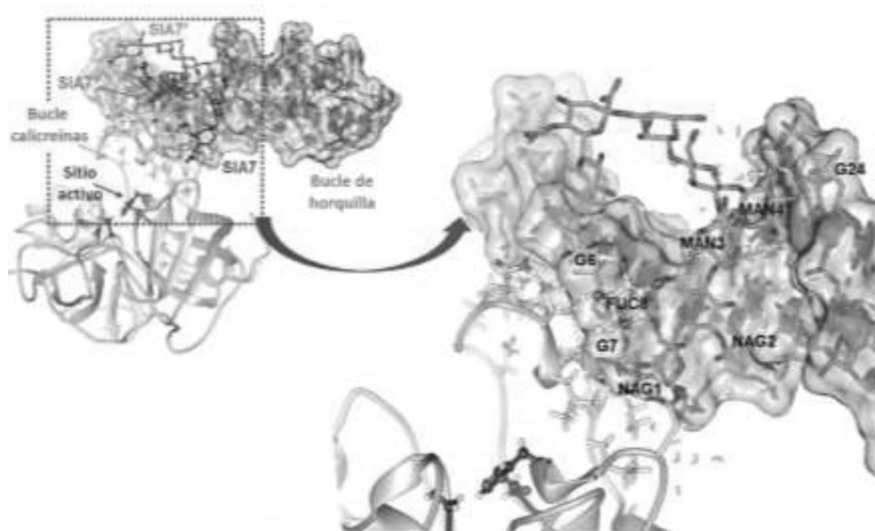


Figura 5.13: Representación de la unión del aptámero T-PSAG-1 a la proteína hPSA, en la que se resaltan los azúcares involucrados en la interacción.

Los contactos moleculares revelados en las simulaciones indican que todos los azúcares excepto los ácidos siálicos son importantes para la unión del aptámero. Los azúcares más internos, hasta la manosa 4 e incluyendo la fucosa del núcleo, juegan un papel directo en la unión al aptámero mediante contactos polares e interacciones de Van der Waals. Y a pesar de que los azúcares externos N-acetilglucosamina y galactosa no interactúan con el aptámero, los contactos entre las antenas NAG5 - NAG5' y NAG5 - Gal6' contribuyen a estabilizar los glicanos en una conformación más favorable para la unión del aptámero. Estas observaciones están en concordancia con los resultados empíricos obtenidos en el estudio de desglucosilación.

En conclusión, el modelo computacional propuesto para la interacción entre la hPSA y el aptámero T-PSAG-1 muestra claramente un patrón de reconocimiento binario, estando involucrados varios residuos de la parte proteica y azúcares del glicano, entre los que se encuentra la fucosa α 1-6 del núcleo.

CAPÍTULO 6

*Aptasensores electroquímicos
para detectar la PSA glicosilada*

En el desarrollo de ensayos analíticos para la detección de la PSA con capacidad para diferenciar sus patrones de glicosilación es necesario disponer de receptores con alta afinidad y selectividad hacia el sitio de glicosilación de la proteína. Una vez obtenidos estos receptores es posible diseñar métodos de detección potencialmente útiles en el diagnóstico precoz del cáncer de próstata, que podrían mejorar la especificidad diagnóstica de los inmunoensayos para PSA que actualmente se usan en los laboratorios clínicos. En este capítulo se propone utilizar como receptores específicos para la PSA los aptámeros descritos en los capítulos 3 y 4, que están dirigidos hacia los glicanos de la proteína con diferentes características de afinidad y selectividad.

Se emplearon estos aptámeros en el diseño, construcción y validación de aptasensores electroquímicos con dos formatos diferentes: ensayos tipo sándwich y directos. A continuación, se exponen las características de respuesta de los aptasensores desarrollados, así como la evaluación de su potencial diagnóstico mediante el análisis de muestras de suero de pacientes con diferentes patologías.

6-1 *Aptasensores con formato sándwich*

6-1.1 Introducción

Al igual que los métodos inmunoquímicos de análisis o inmunoensayos, los aptaensayos se basan en el estudio del complejo que se forma entre el analito y un aptámero como resultado de la reacción de reconocimiento molecular entre ambos. La distribución del analito entre las formas enlazada y libre se relaciona cuantitativamente con su concentración total en la muestra. Esta simple observación constituye el principio general de los aptaensayos. Cuando la reacción de reconocimiento molecular se produce directamente sobre la superficie de un transductor se habla de aptasensores.

Para poner de manifiesto que se ha producido la reacción aptámero-analito y medir la distribución del analito entre las formas enlazada y libre se puede aprovechar algún cambio producido directamente por la reacción de reconocimiento (ensayos directos) o añadir al medio de reacción una cantidad fija (en concentración conocida) del analito o de un aptámero unido a una molécula indicadora que facilite la etapa final de medida. Este reactivo marcado se denomina trazador o marcador. Los aptasensores con marcadores suelen dar lugar a métodos de análisis más sensibles, por lo que fue este el primer tipo de diseño que se exploró para evaluar el potencial diagnóstico de los aptámeros frente a la PSA descritos en los capítulos anteriores.

Como moléculas indicadoras se han utilizado en general moléculas que puedan medirse con elevada sensibilidad y de forma relativamente sencilla. Además, deben poder unirse al aptámero manteniendo su actividad, sin que, idealmente, se alteren sus características de reconocimiento (afinidad y selectividad). Las enzimas son las moléculas más utilizadas con este fin, tanto en el desarrollo de ensayos electroquímicos como ópticos. Su papel como catalizadores hace posible una amplificación previa a la detección, permitiendo el desarrollo de

métodos analíticos con excelente sensibilidad. Para evitar que su gran tamaño molecular pueda afectar a la reacción aptámero-analito, las enzimas se incorporan habitualmente tras esta reacción a través de una interacción de afinidad (biotina-estreptavidina o antígeno-anticuerpo). En este trabajo se ha optado por emplear los aptámeros marcados con una molécula de 6-FAM, incorporando la enzima peroxidasa mediante un conjugado de esta enzima a un fragmento Fab de un anticuerpo anti-fluoresceína.

Se pueden desarrollar aptasensores con marcadores utilizando un formato de ensayo con reactivo limitante (competitivo) o un formato de ensayo con reactivo en exceso (no competitivo). En general, estos últimos dan lugar a mejores características analíticas, tanto en términos de sensibilidad como de selectividad, y son el formato de ensayo seleccionado en este trabajo.

En el formato de ensayo no competitivo tipo sándwich se utilizan como reactivos analíticos dos aptámeros distintos capaces de unirse a la molécula diana a través de sitios de reconocimiento diferentes. El primer aptámero (aptámero de captura) enlaza todo el analito de la muestra. A continuación, se incorpora el segundo aptámero marcado (aptámero de detección), de manera que pueda detectarse fácilmente la cantidad de complejo aptámero-analito formado en la primera reacción. La cantidad de aptámero marcado capturado por el complejo, formando el sándwich, es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

El objetivo que se persigue es desarrollar aptasensores para detectar las fracciones de PSA en suero que muestren patrones de glicosilación alterados. Por esta razón, se propone utilizar en el diseño de aptasensores tipo sándwich un aptámero de captura que se enlace específicamente a la PSA y no a otras proteínas, permitiendo así capturar la PSA total de la muestra. Como aptámero de detección se utilizan los aptámeros seleccionados en esta Tesis Doctoral, que se enlazan a diferentes fracciones glicosiladas de la proteína.

En la presente sección se presentan los resultados obtenidos utilizando distintas combinaciones de los aptámeros descritos en los capítulos 3 y 4, junto con un aptámero ya descrito en la literatura para la PSA¹⁰⁴ (anti-PSA) para la construcción de aptasensores electroquímicos con formato sándwich empleando electrodos de oro y carbono como transductor.

6-1.2 Protocolos

6-1.2.1 Ensayo sándwich sobre electrodos de oro

Para la fabricación del sensor, se inmoviliza el aptámero de captura biotinilado sobre electrodos serigrafados de oro a través de la interacción estreptavidina-biotina. En primer lugar, los electrodos se modifican covalentemente con estreptavidina a través de una monocapa autoensamblada (SAM) mixta de ácido 11-mercapto-1-undecanoico (MUA) y mercaptohexanol (MH) (protocolo en capítulo 3, sección 3.2.4). Una vez modificados los electrodos con estreptavidina y bloqueados con etanolamina, se incuban con una disolución 1 μ M del aptámero anti-PSA biotinilado durante 30 minutos en TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂ pH 7.4).

El ensayo para detectar PSA tiene lugar en varias etapas. En primer lugar, se incuba la superficie sensora con diluciones seriadas del estándar de PSA durante 30 minutos. A continuación, se produce la interacción con el aptámero de detección (PSA-1) marcado con fluoresceína mediante incubación con una disolución 1 μ M en TBS durante 30 minutos. Después, tiene lugar el marcaje enzimático con el conjugado Fab-anti-fluoresceína-peroxidasa en una concentración 0.5 U/mL preparado en disolución TBS - 0.5 % caseína, dejando que la interacción con la superficie tenga lugar durante 30 minutos. Finalmente se procede a la detección electroquímica de la actividad enzimática inmovilizada mediante cronoamperometría del producto oxidado del TMB a -0.2 V, previa incubación con el sustrato de

peroxidasa (TMB + H₂O₂) durante 30 s (protocolo en sección 3.2.4 del capítulo 3).

Tras cada etapa, el sensor se lava con la disolución de la etapa siguiente y se seca con corriente de nitrógeno. En todas las etapas, se emplea un volumen de incubación de 10 µL y estas se realizan a temperatura ambiente. Los electrodos de referencia y contraelectrodos de los electrodos serigrafiados se bloquean con una capa transparente de esmalte y en consecuencia en las medidas electroquímicas se emplea un electrodo de referencia y un contraelectrodo externos. Cuando se utilizan a la vez un gran número de electrodos modificados, la etapa inicial se retrasa convenientemente para mantener un control estricto del tiempo.

6-1.2.2 Ensayo sándwich sobre electrodos de carbono

Para la fabricación del sensor, se enlaza el aptámero de captura biotinilado (btn-anti-PSA) a través de la interacción estreptavidina-biotina sobre electrodos serigrafiados de carbono. En primer, lugar se modifica el electrodo de trabajo con estreptavidina, incubando los electrodos limpios con una disolución de estreptavidina de 1 mg/mL durante toda la noche a 4 °C y en condiciones de atmósfera húmeda, para limitar la evaporación. A continuación, tiene lugar la unión del aptámero de captura haciendo interaccionar el electrodo de trabajo con una disolución 1 µM de btn-anti-PSA durante 30 min en PBS. Por último, se bloquea la superficie del electrodo con una disolución al 1 % de BSA en PBS durante 30 min.

En el análisis de PSA, se incuba el sensor con diluciones seriadas de PSA en PBS durante 30 minutos, y a continuación se lleva a cabo la interacción con el aptámero de detección marcado con fluoresceína (6FAM-PSAG-1) en PBS-K⁺ durante 30 minutos. Después se realiza el marcaje enzimático con una disolución 0.5 U/mL del conjugado Fab-antifluoresceína-peroxidasa preparado en PBS - caseína 0.5 % y la detección electroquímica mediante cronoamperometría a 0 V del producto oxidado del TMB.

Tras cada etapa, el electrodo se lava con la disolución de la etapa siguiente y se seca con corriente de nitrógeno. En cada etapa se emplea un volumen de 10 μL y la incubación se realiza a temperatura ambiente.

6-1.2.3 Análisis de muestras de suero

Se utilizaron muestras de suero de 35 hombres y una mezcla de sueros de mujer, que fueron proporcionados por el laboratorio de análisis clínico del Hospital de Cabueñes (Gijón, España). Se seleccionaron muestras de suero de hombre con distintos niveles de PSA medidos mediante el ensayo ELISA quimioluminiscente que se emplea en el Hospital de Cabueñes. Estas muestras procedían de pacientes en consulta por diferentes patologías, con un diagnóstico final confirmado mediante biopsia de próstata. El suero de mujer se utilizó como control negativo de PSA, estando certificado por el método ELISA con un contenido de PSA < 0.01 ng/mL.

6-1.3 Resultados y discusión

6-1.3.1 Selección y caracterización del aptámero de captura

Los aptasensores propuestos se basan en un ensayo tipo sándwich utilizando dos aptámeros, uno de captura y otro de detección. El objetivo que se persigue es la detección de los cambios en la glicosilación de la PSA que se producen en presencia de cáncer, de forma que se puedan detectar cambios específicos de cáncer y no de cualquier alteración de la próstata. Con este propósito es necesario disponer de un receptor para la PSA total y otro para los glicanos. Entre los aptámeros descritos en la literatura para PSA, se seleccionó el primero de ADN descrito para esta proteína, denominado anti-PSA y que en el momento de realización de la Tesis Doctoral era el aptámero más empleado en el diseño de aptaensayos para la detección de la PSA en suero humano. Se propone el empleo de este aptámero como aptámero de captura, del que se conoce que su afinidad está en el orden nM, pero se desconoce su capacidad de reconocer a los

azúcares de la PSA. Por tanto, antes de la construcción y caracterización del sensor se consideró necesario caracterizar este aptámero.

El aptámero de captura (anti-PSA) fue seleccionado mediante un proceso SELEX tradicional frente a la PSA humana sin ningún intento para dirigir la selección hacia el glicano de la proteína¹⁰⁴. No obstante, como no se encontró en la literatura información acerca de la parte de la molécula de PSA que participa en la interacción con este aptámero, se realizó un estudio de caracterización de su afinidad. Para ello se efectuaron medidas de SPR empleando discos de oro modificados tanto con PSA humana como recombinante (protocolo en sección 3.2.4 del capítulo 3).

Las superficies modificadas se hicieron interaccionar con concentraciones crecientes del aptámero anti-PSA. Como se observa en la Figura 6-1.1, los cambios en el ángulo de resonancia obtenidos con este aptámero son muy similares para la PSA humana y recombinante, demostrando que este aptámero reconoce la parte peptídica de la proteína. Además, el ajuste de las curvas obtenidas a la ecuación de Langmuir permitió estimar las constantes de disociación, muy similares para ambas proteínas, siendo de 177 ± 5 nM para la PSA humana, y 70 ± 5 nM para la recombinante.

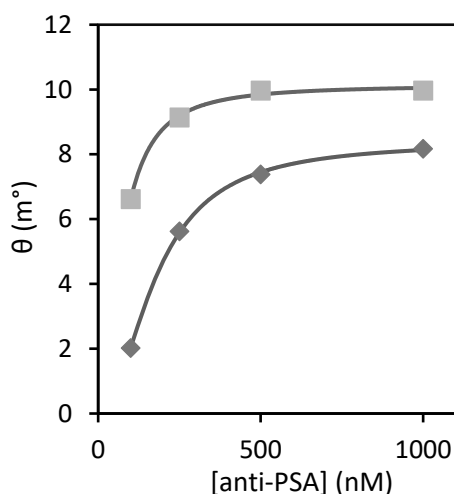


Figura 6-1.1: Curva de enlace del aptámero anti-PSA frente a la PSA humana (verde) y la PSA recombinante (naranja) obtenidas mediante medidas de SPR.

También se estimó la constante de afinidad mediante medidas con detección electroquímica, inmovilizando la hPSA sobre electrodos de oro y haciéndola interactuar con concentraciones crecientes del aptámero anti-PSA marcado con fluoresceína. A medida que se aumentó la cantidad de aptámero se observó un incremento en la señal medida, que da lugar a una curva de enlace que se ajuste al modelo de Langmuir, estimándose una constante de disociación de 229 ± 25 nM (Figura 6-1.2).

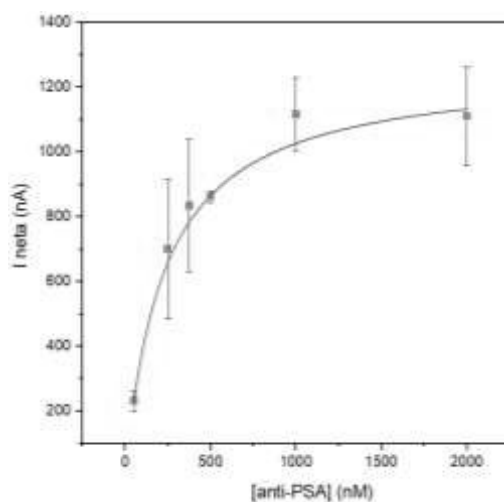


Figura 6-1.2: Curva de enlace del aptámero anti-PSA frente a la PSA humana obtenida mediante medidas electroquímicas y ajustada al modelo de Langmuir.

Por sus características de enlace a la PSA este aptámero es un excelente candidato para actuar como aptámero de captura en el ensayo sándwich. Además, otro punto importante en el diseño de sensores en formato sándwich basados en el empleo de aptámeros es la complementariedad entre las dos secuencias empleadas, que deberá ser lo menor posible para evitar hibridaciones no deseadas que aumentan las señales inespecíficas. Para los aptámeros anti-PSA y PSA-1 se estudió su complementariedad empleando el servidor web Mfold que estima la energía libre de la hibridación (ΔG) de las posibles combinaciones entre ellos, con las condiciones salinas del medio TBS. El dúplex formado por ambos aptámeros es poco estable energéticamente, teniendo una energía libre de -5.6 kcal/mol (Figura 6-1.3).

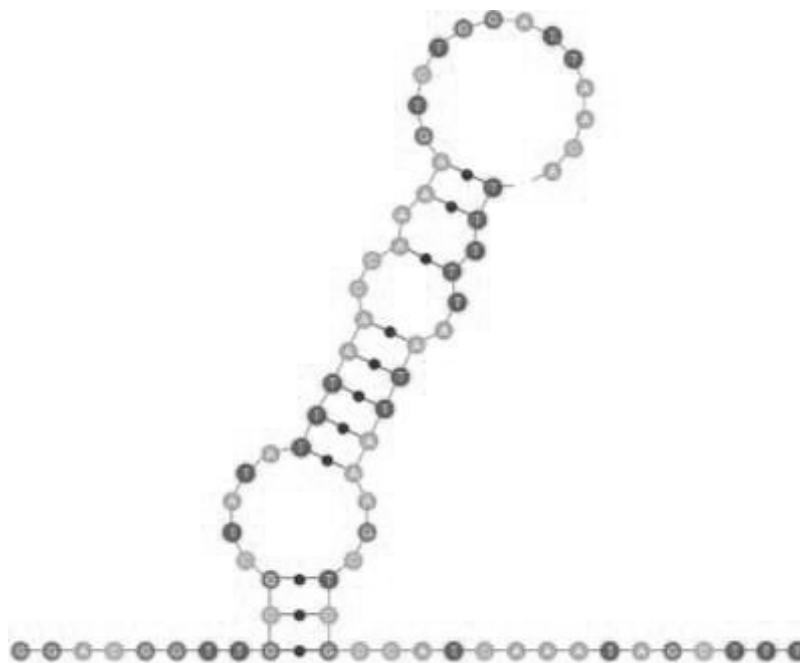


Figura 6-1.3: Representación de la hibridación entre los aptámero anti-PSA y PSA-1 obtenida con Mfold en el medio de TBS a 25 °C.

Por estas razones, se seleccionó el aptámero anti-PSA como aptámero de captura para el diseño de aptasensores con formato sándwich para la cuantificación de PSA.

6-1.3.2 Ensayo sándwich empleando el aptámero PSA-1

6-1.3.2.1 Caracterización del aptasensor

Para la construcción del sensor se inmovilizó covalentemente el aptámero anti-PSA marcado con biotina a la superficie de electrodos de oro modificados con estreptavidina. Tras la interacción con concentraciones crecientes de PSA, se empleó el aptámero PSA-1 marcado con fluoresceína como aptámero de detección y se llevó a cabo la medida cronoamperométrica tras el marcaje enzimático (Figura 6-1.4).

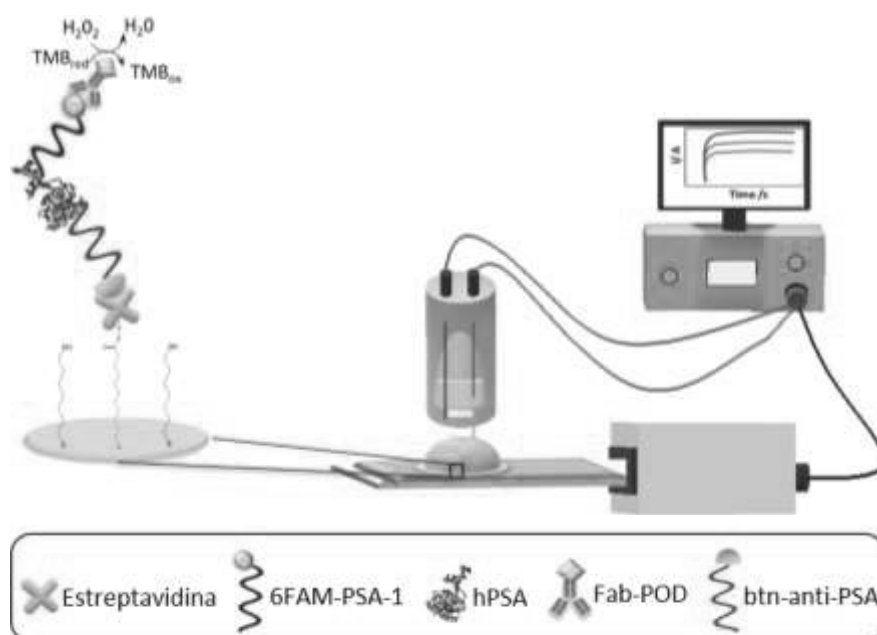


Figura 6-1.4: Esquema del ensayo sándwich realizado sobre electrodos de oro.

Para la realización de este ensayo con aptámeros es importante mantener las condiciones similares al proceso de selección. En este caso, el medio de interacción óptimo del aptámero PSA-1 es diferente al medio en el que se seleccionó el aptámero anti-PSA, lo que podría ser un inconveniente debido a la susceptibilidad de los aptámeros a la variabilidad del medio. Sin embargo, estudios preliminares de unión del aptámero PSA-1 a la PSA inmovilizada sobre electrodos de oro en TBS muestran que el aptámero mantiene la afinidad por la proteína en este medio. En la interacción de una disolución 500 nM del aptámero PSA-1 con la proteína se obtienen señales netas de 779 ± 133 nA y 1570 ± 415 nA, en PBS y TBS respectivamente, lo que demuestra la buena tolerancia del aptámero obtenido en esta Tesis a la variación de las condiciones de interacción. A la vista de los resultados se decidió utilizar el medio TBS, el óptimo para el aptámero anti-PSA, para maximizar la capacidad de captura de la PSA.

A continuación, se evaluó la respuesta del sensor a cantidades crecientes de PSA en TBS y en suero humano diluido 1:1 con TBS para

establecer una correlación entre la señal obtenida y la concentración de PSA. Se optó por normalizar la intensidad de corriente para minimizar las fluctuaciones debido a pequeñas variaciones en las condiciones experimentales (fundamentalmente temperatura) y poder comparar las curvas obtenidas en días sucesivos, observándose que prácticamente se superponen, lo que demuestra la robustez de este método. Como se observa en la curva de calibrado promedio (Figura 6-1.5) se obtiene una respuesta creciente en el intervalo de concentraciones entre 0.66 ng/mL y 62.5 ng/mL cuando la interacción se realiza en TBS, y este se reduce cuando la interacción se realiza en suero (diluido 1:1 con TBS) siendo de 0.66 ng/mL a 25 ng/mL, aunque en ambos casos se cubre la denominada zona gris (4 - 10 ng/mL). La curva de calibrado en suero se ajusta a la ecuación de Langmuir ($y = y_{\max} \cdot x / P + x$) con un valor de P de 1.06 ± 0.09 ng/mL e y_{\max} de 100 ± 2 % con una correlación de 0.998. El límite de detección del sensor es de 0.66 ng/mL de PSA, estimado como la concentración correspondiente a la señal que corresponde a tres veces la desviación estándar del blanco.

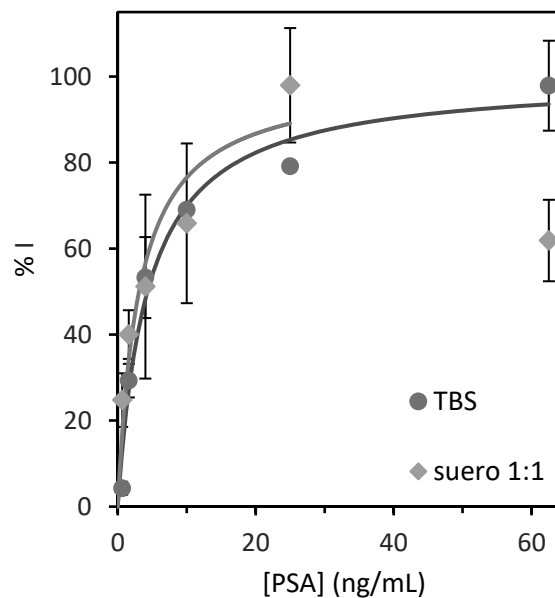


Figura 6-1.5: Curvas de calibrado del aptasensor con PSA realizadas en TBS (azul) y en suero diluido 1:1 con TBS (naranja).

Para concentraciones altas de PSA en suero (62.5 ng/mL) se observa una disminución de la señal, siendo este un fenómeno muy frecuente también en los inmunoensayos ELISA y que puede solventarse con la realización de diluciones (Figura 6-1.5).

También se evaluó la respuesta del sensor empleando diferentes patrones comerciales de PSA, debido a que se ha descrito la obtención de resultados discordantes en los laboratorios clínicos cuando se utilizan diferentes patrones de PSA en los métodos ELISA^{27,142}. Con el fin de estudiar la robustez del ensayo desarrollado se evaluó la respuesta del sensor utilizando un material de referencia certificado, BCR-613[®], el cual se reconstituyó en agua y se diluyó con suero 1:1 en TBS para realizar la curva de calibración (Figura 6-1.6). La curva de calibrado obtenida, expresada en tanto por ciento de señal, no es significativamente distinta a la obtenida con el patrón no certificado de PSA (BBI solutions), demostrando las prometedoras características del sensor para aplicaciones clínicas.

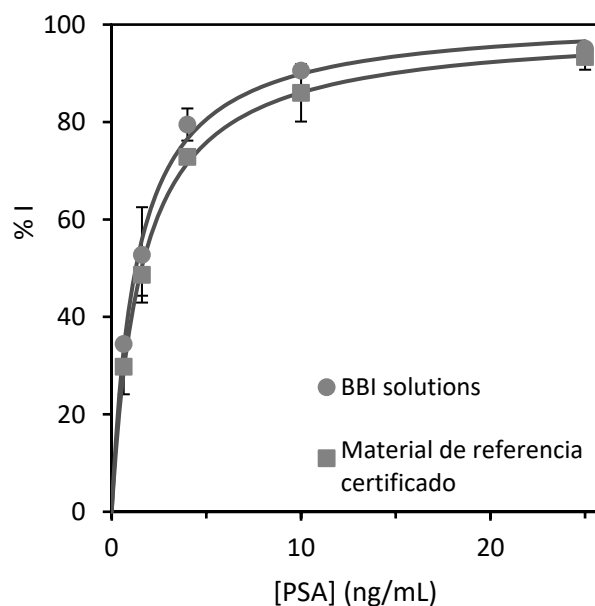


Figura 6-1.6: Comparación de las curvas de calibrado obtenidas empleando dos estándares distintos de PSA.

El aptasensor desarrollado muestra características analíticas similares e incluso superiores a las del único sensor tipo sándwich descrito en la literatura para la cuantificación de la PSA glicosilada. Este sensor emplea como elemento de captura el aptámero anti-PSA y como reactivo de detección una lectina, presentando un intervalo de trabajo entre 3 y 50 ng/mL de fPSA glicosilada y un límite de detección para la fPSA glicosilada de 3 ng/mL. Se demuestra así que el empleo del aptámero seleccionado en el capítulo 3 mejora las características analíticas de los ensayos basados en lectinas para detectar la fracción glicosilada de la PSA¹¹².

6-1.3.2.2 Selectividad del ensayo sándwich

En un principio se evaluó la selectividad del sensor frente a la PSA recombinante (no glicosilada) y a la NGAL (una glicoproteína con patrón de glicosilación similar a PSA) a una concentración de 25 ng/mL en suero humano diluido 1:1 con TBS. En ambos casos, la señal obtenida es significativamente menor que la obtenida para la misma concentración de PSA (Figura 6-1.7).

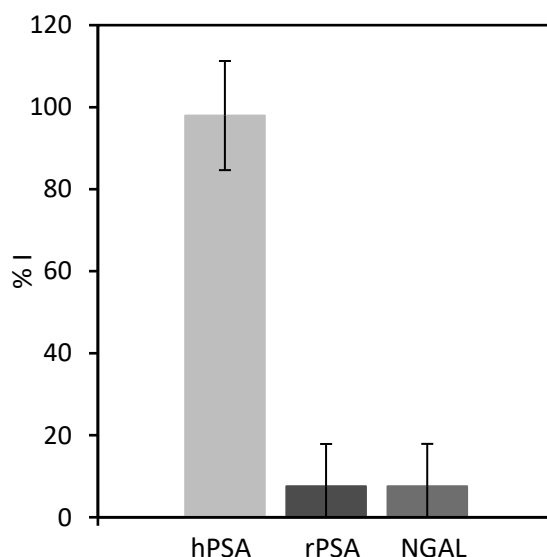


Figura 6-1.7: Respuesta del sensor a 25 ng/mL de PSA (verde), rPSA (azul) y NGAL (naranja).

A continuación, se diseñó un estudio de selectividad con un espectro de analitos más amplio, analizando dos disoluciones control utilizadas rutinariamente en los hospitales para verificar el ensayo ELISA (la composición se especifica en el anexo A1). Estas disoluciones contienen 92 analitos diferentes incluyendo la PSA total y la PSA libre a dos niveles de concentración. El control liofilizado se reconstituyó en agua, quedando en una matriz de suero y a continuación se diluyó 1:1 con TBS, y se analizó con el sensor.

Los resultados obtenidos, resumidos en la Tabla 6-1.1, muestran que el sensor proporciona una concentración de PSA que concuerda con los valores del control para la PSA total, indicando que el aptámero de captura atrapa tanto a la PSA libre como a la complejada, y que el aptámero de detección es capaz de unirse a ambas. Además, estos resultados demuestran que el sensor no presenta interferencias significativas en presencia de una amplia variedad de moléculas en concentraciones fisiológicas.

Tabla 6-1.1: Selectividad del ensayo sándwich. Comparación de los valores obtenidos con el aptasensor y los certificados por BIO-RAD.

Control	Concentración encontrada	Concentración BIO-RAD control	
		fPSA	tPSA
Nivel 2	1.9 ± 0.4 ng/mL	1.06 ± 0.05 ng/mL	1.9 ± 0.1 ng/mL
Nivel 3	14 ± 3 ng/mL	9.7 ± 0.5 ng/mL	15.5 ± 0.9 ng/mL

6-1.3.2.3 Análisis de PSA en muestras de suero

Para evaluar la aplicación del sensor al diagnóstico clínico, este se utilizó para analizar la concentración de PSA en 34 muestras de suero con diferentes niveles de PSA total y provenientes de pacientes con distintas patologías. Las muestras fueron proporcionadas por el Laboratorio Central

6-1.3 Resultados y discusión

del Hospital de Cabueñes y también fueron analizadas en el mismo utilizando el ensayo ELISA automático ADVIA Centaur® (Siemens) para la cuantificación de PSA total. La concordancia entre los valores obtenidos mediante el sensor y el método ELISA se muestra en la Figura 6-1.8, excluyendo de la gráfica las muestras con valores por debajo del límite de detección del ELISA, (muestras 1-5 Tabla 6-3.1) y el valor más elevado para mayor claridad.

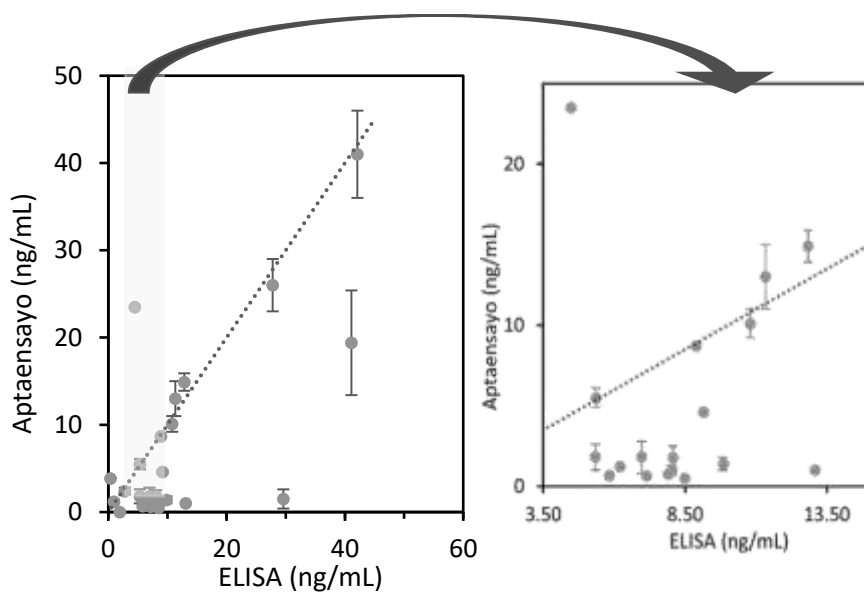


Figura 6-1.8: Izquierda) Correlación entre los niveles de PSA obtenidos con el aptasensayo y el método ELISA. Derecha) Ampliación de las muestras de la zona gris.

Los resultados proporcionados por el sensor para las muestras analizadas concuerdan en un 50 % con los obtenidos mediante el método ELISA. Las diferencias observadas pueden presumiblemente relacionarse con diferencias en las estructuras de los glicanos de la PSA de las muestras analizadas. Dentro de los 17 valores discordantes, en quince de ellos el aptasensor proporciona una concentración de PSA menor que con el ensayo ELISA, lo que apunta a que con el aptámero se está midiendo una fracción de la PSA total medida con el ELISA. Esto puede ser debido a que la concentración de PSA total en suero no solamente se eleva en hombres con cáncer de próstata si no también en aquellos que padecen hiperplasia

benigna de próstata o prostatitis, pero con patrones de glicosilación diferentes.

Los valores discordantes se analizaron con más detalle teniendo en cuenta la patología diagnosticada a cada paciente. Once de las muestras discordantes para las que el ELISA proporciona una concentración mayor que el aptasensor corresponden a muestras que dieron un falso positivo con el método ELISA, mientras que el aptasensor las clasifica correctamente con valores por debajo de la zona gris. Otro caso discordante se corresponde con un paciente con cáncer de próstata clasificado correctamente por ambos métodos, pero con valores muy diferentes: 19.4 ng/mL con el aptasensor y 41.1 ng/mL con el ELISA. Sin embargo, en otra muestra ambos métodos clasifican erróneamente al paciente, aunque el aptasensor muestra un valor cercano al de corte (4.6 ng/mL con el aptasensor vs. 9.15 ng/mL con el ELISA). Otro valor discordante corresponde a un valor de PSA cercano al límite de detección del método ELISA y que es indetectable por el aptasensor. Para otro paciente, el aptasensor proporciona un valor menor que el ELISA pero clasificando erróneamente al paciente ya que este padece cáncer de próstata (1.8 ng/mL con el aptasensor vs. 5.34 ng/mL con el ELISA).

Entre los valores discordantes con valores inferiores por el ensayo ELISA encontramos un paciente sin cáncer clasificado correctamente por ambos métodos, aunque el valor del aptasensor se aproxima al valor de corte (3.86 ng/mL con el ELISA vs. 0.37 ng/mL con el aptasensor) y a un paciente con prostatitis que el ELISA clasifica en la zona gris y el aptasensor lo clasifica incorrectamente con un valor elevado de PSA (4.48 ng/mL vs. 23.5 ng/mL). Meses después este paciente fue diagnosticado de cáncer de próstata, lo que podría interpretarse como una detección temprana de cáncer con el sensor. Sin embargo, esta afirmación debe tomarse con cuidado.

Estos resultados apuntan a que el nuevo ensayo basado en aptámeros puede mejorar la especificidad en el diagnóstico de cáncer con respecto al

método ELISA utilizado en la actualidad en los hospitales, proporcionando un menor número de falsos positivos y, por tanto, de biopsias innecesarias. Es importante destacar que el número de muestras analizadas es pequeño pero los resultados muestran el gran potencial que tiene el sensor desarrollado para mejorar la especificidad de los ensayos para la detección de PSA.

6-1.3.3 Ensayo sándwich empleando el aptámero PSAG-1

También se ha explorado el uso del aptámero PSAG-1 seleccionado en el capítulo 4 como aptámero de detección en un ensayo tipo sándwich. Como su sitio de enlace a la proteína es diferente al del aptámero PSA-1, la comparación de los resultados obtenidos en ensayos similares podría mejorar la utilidad clínica.

Al igual que para el formato anterior, se utilizó el aptámero anti-PSA como aptámero de captura. Sin embargo, en este formato se emplearon electrodos serigrafiados de carbono en vez de electrodos de oro para la construcción del sensor, con el fin de acortar el tiempo de preparación de la fase sensora. Para ello se inmovilizó covalentemente el aptámero de captura sobre electrodos de carbono sobre los que se adsorbió estreptavidina. Tras la interacción con concentraciones crecientes de PSA, se empleó el aptámero PSAG-1 marcado con fluoresceína como aptámero de detección y se llevó a cabo la medida cronoamperométrica a 0 V.

En primer lugar, se evaluó la respuesta del sensor a concentraciones crecientes de PSA preparadas en PBS-K⁺ o en suero diluido 1:1 con la misma disolución. En ambos medios se obtiene una intensidad de corriente creciente en el intervalo de concentraciones de 1.6 ng/mL a 62.5 ng/mL en PBS-K⁺, y de 1.6 ng/mL a 25 ng/mL cuando la interacción tiene lugar en suero diluido 1:1 (Figura 6-1.9).

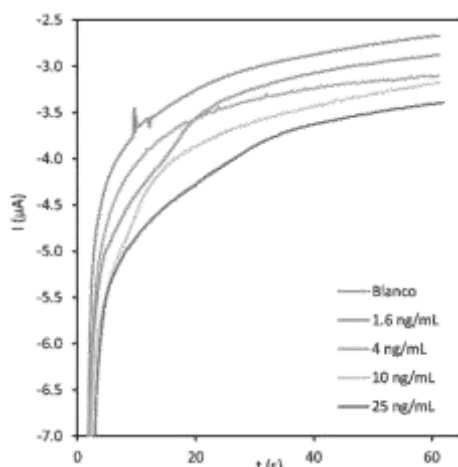


Figura 6-1.9: Cronoamperogramas obtenidos para concentraciones crecientes de hPSA en suero diluido 1:1 con PBS-K⁺.

Las curvas de calibrado normalizadas y expresadas en porcentaje respecto a la señal máxima en PBS y en suero son prácticamente iguales. La curva de calibrado en suero se ajusta a la ecuación de Langmuir ($y = y_{\max} \cdot x / P + x$) con un valor de P de 6.2 ± 0.8 ng/mL e y_{\max} de 123 ± 6 % con una correlación de 0.997 (Figura 6-1.10).

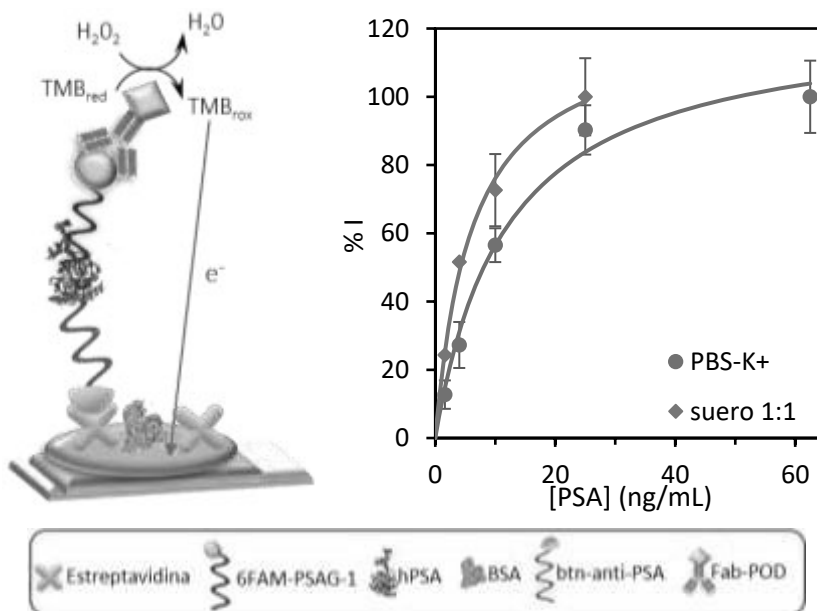


Figura 6-1.10: Izquierda) Esquema del ensayo sándwich con los aptámero anti-PSA y PSAG-1 sobre electrodos de carbono. Derecha) Curvas de calibrado obtenidas en PBS-K⁺ (azul) y en suero diluido 1:1 (verde).

El sensor desarrollado se empleó en el análisis de la concentración de PSA en 4 muestras de suero previamente analizadas con el ensayo sándwich con el aptámero PSA-1. Se escogieron 2 con resultados concordantes con el ELISA y 2 discordantes. Una de las muestras concordantes correspondía a un paciente con cáncer de próstata (verdadero positivo) mientras que la otra pertenecía a un paciente con prostatitis (falso positivo). El ensayo con PSAG-1 corroboró el diagnóstico de cáncer y clasificó acertadamente como negativo el falso positivo obtenido tanto por ELISA como con el ensayo sándwich con PSA-1. Entre las muestras discordantes, una de ellas mostró un valor de PSA muy superior mediante el aptaensayo con PSA-1 pero mostró un valor inferior al de corte con PSAG-1, clasificándolo correctamente como negativo. La otra muestra discordante en la que el aptasensor de PSA-1 había clasificado correctamente al paciente como negativo mostró un valor dudoso (4.4 ± 0.4) ng/mL, puesto que teniendo en cuenta la incertidumbre es difícil afirmar que sea negativo. Estos resultados apuntan a que el aptámero con reconocimiento binario puede discriminar mejor las enfermedades benignas de próstata del cáncer que el aptámero previamente descrito (PSA-1).

6-2 Aptasensor con formato directo

6-2.1 Introducción

Como se ha observado en la sección anterior, los resultados del análisis mediante los aptasensores tipo sándwich muestran que la medida de la PSA glicosilada puede mejorar la especificidad de los métodos actuales de diagnóstico del cáncer de próstata. La detección de los cambios en los glicanos de la PSA puede ser por tanto un biomarcador más específico para el diagnóstico del cáncer de próstata que la concentración total de la PSA en sangre, reduciendo el número de falsos positivos y la realización de biopsias innecesarias.

Antecedentes con otras proteínas, como la α -fetoproteína (AFP) avalan esta hipótesis. Esta proteína es también una glicoproteína y su concentración en suero se ve elevada en presencia de cáncer hepatocelular, pero al igual que para la PSA, la concentración también se eleva por enfermedades benignas del hígado, haciendo que la concentración total de esta proteína no sea un buen marcador y dé lugar a un elevado número de falsos positivos. Sin embargo, se descubrió que en presencia del cáncer se producen cambios en la fucosilación de la AFP y que la medida de estos cambios mediante la lectina *Lens culinaria* permite un diagnóstico más fiable del cáncer hepatocelular. En la actualidad ya se está empleando con éxito un test que mide la relación entre la fracción de la AFP reactiva a la lectina *Lens culinaria*, denominada AFP-L3, y la AFP total en una muestra¹⁴³. Este test ha sido aprobado por la FDA en 2005 para su uso clínico como biomarcador del riesgo de padecer cáncer hepatocelular pero no para su diagnóstico¹⁴⁴. Es importante resaltar que la FDA nunca llegó a aprobar la cuantificación de la proteína total AFP como biomarcador de cáncer¹⁴⁵.

En vista del éxito del diagnóstico del cáncer hepatocelular a partir de la medida de los cambios en la glicosilación de la AFP y los resultados obtenidos en el análisis de las muestras con los aptasensores tipo

sándwich descritos en la sección anterior, se plantea la medida de un índice de glicanos de la PSA para el diagnóstico del cáncer de próstata. Este índice de glicanos reflejará los cambios en los glicanos de la PSA mediante la medida de la fracción de PSA reactiva al aptámero PSAG-1 con respecto a la PSA total en una muestra de suero.

Con este fin se propone el diseño de un ensayo dual basado en aptámeros para la medida de la PSA total y la PSA glicosilada en una muestra. Para simplificar el proceso de medida, se plantea evaluar aptasensores con un formato de ensayo directo, en los que el aptámero se encuentra inmovilizado directamente sobre el transductor y el evento de reconocimiento aptámero-proteína produce un cambio en las propiedades de la capa selectiva. Este cambio debe dar lugar a una señal que se relaciona con la cantidad de proteína atrapada por el aptámero.

Como método de detección se propone el uso de la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), concretamente de impedancia faradaica, porque es una técnica muy sensible, que no requiere el marcaje de los aptámeros. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada como sistema de detección en la construcción de ensayos basados en aptámeros o anticuerpos para la detección de proteínas. La espectroscopia de impedancia faradaica es muy sensible a cambios producidos en la interfase electrodo/electrolito como consecuencia del evento de reconocimiento molecular en superficie. Estos procesos conducen a cambios en la resistencia a la transferencia de carga medida para una molécula electroactiva utilizada como sonda, que se relacionan con la cantidad de proteína atrapada por el aptámero^{146,147}. Esta técnica ya ha sido empleada con éxito para el diseño de aptasensores impedimétricos para la detección de la PSA^{148,149}.

En el ensayo propuesto se emplearán electrodos de oro nanoestructurados con nanopartículas de oro (AuNPs). Estas se emplean en el diseño de sensores por su excelente biocompatibilidad, baja toxicidad y sus propiedades catalíticas y conductoras, que dan lugar a una

amplificación de la señal eléctrica resultante. Además, la respuesta del biosensor se puede ver incrementada debido al aumento de la relación área/volumen que hace que se puedan unir a la superficie sensora un mayor número de receptores^{150,151}.

En la presente sección se presenta una plataforma dual impedimétrica, con dos sensores nanoestructurados con AuNPs y modificados con los aptámeros PSAG-1 y anti-PSA, para la detección simultánea de la fracción de PSA glicosilada reactiva al aptámero PSAG-1 y de la PSA total, respectivamente. Aunque se dispone de dos aptámeros para detectar una determinada fracción glicosilada de la PSA (PSA-1 o PSAG-1), se seleccionó el aptámero PSAG-1 porque además de mostrar una excelente selectividad frente a otras glicoproteínas, este aptámero está dirigido contra la zona del glicano donde se ubica la fucosa del núcleo. En la bibliografía se han descrito variaciones en el porcentaje de fucosa del núcleo asociada a la PSA en el proceso de transformación tumoral de las células de próstata^{66,43}.

6-2.2 Protocolos

6-2.2.1 *Fabricación de los electrodos de oro*

Los electrodos de trabajo de oro se fabricaron en el laboratorio mediante evaporación térmica sobre portaobjetos de vidrio, previamente recubiertos de cromo para facilitar la adhesión del oro. En primer lugar, se limpiaron los portaobjetos sumergiéndolos en una disolución de H₂O/NH₄OH/H₂O₂ 5:1:1 durante 30 minutos. A continuación, se limpiaron de forma secuencial con acetona, isopropanol y agua, y se secaron con nitrógeno. Por último, se limpiaron con plasma de oxígeno a una presión de 0.2 mbar y un voltaje de 10 mV durante 10 minutos.

Antes de llevar a cabo la evaporación térmica, se limpiaron las perlas de oro y cromo de un tamaño entre 1 y 3 mm con acetona e isopropanol.

Los portaobjetos de vidrio se cubrieron con una máscara para definir la forma del electrodo de trabajo (círculo de 4 mm de diámetro). En primer lugar, se creó una capa de adhesión de 10 nm de espesor de cromo y a continuación se depositó una capa de oro de 100 nm. Estas capas se prepararon de manera secuencial empleando el evaporador térmico BOC Edwards.

Una vez fabricados los electrodos de oro, se limpiaron 4 o 5 veces con vapor de acetona y con UV-ozono durante 15 minutos antes de utilizarlos (Figura 6-2.1).

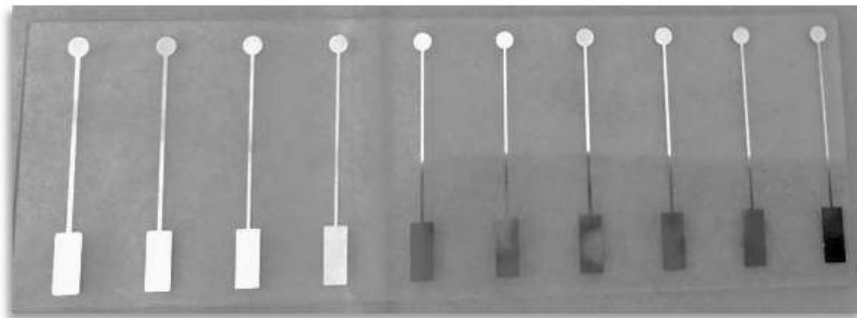


Figura 6-2.1: Electrodo de oro obtenido mediante evaporación térmica sobre vidrio.

6-2.2.2 Fabricación del aptasensor

Los sensores impedimétricos se fabricaron empleando un protocolo previamente establecido¹⁵². En primer lugar, los electrodos de oro se nanoestructuraron con AuNPs. Con este propósito fue necesario formar una SAM de 11-amino-1-undecanotiol, incubando los electrodos durante toda la noche a 4 °C con 50 μ L de una disolución 1 mM de este compuesto preparada en etanol puro, en atmósfera saturada de este alcohol. A continuación, la superficie de los electrodos se limpió con etanol, se secó con nitrógeno y se llevó a cabo la etapa de bloqueo con una disolución 1 mM de 6-mercaptohexanol (MH) en etanol durante 1 hora a temperatura ambiente. Después los electrodos se limpiaron con etanol y agua y se secaron con nitrógeno. Por último, se incubaron durante toda la noche a

temperatura ambiente con 50 μL de una disolución de AuNPs de 20 nm, que se unen a los grupos amino de la SAM.

Sobre la nueva superficie de oro se formó una nueva SAM mixta de aptámero tiolado (anti-PSA o PSAG-1) y MH, incubando los electrodos con una disolución de aptámero/MH 1:100 en PBS-EIS (PBS 1 \times + 2.7 mM KCl, pH 7.4) durante 1 hora a temperatura ambiente. La concentración total de los tioles en la disolución fue 100 μM . A continuación, los electrodos se lavaron con PBS-EIS y se incubaron en PBS-EIS durante 3 horas para estabilizar la SAM antes de realizar las medidas de impedancia.

6-2.2.3 Detección de PSA

A partir del patrón de PSA se prepararon mediante diluciones seriadas las disoluciones de PSA a emplear en el ensayo, en PBS-EIS o en suero diluido 1:5 con PBS-EIS. Para la detección de PSA con los sensores, se incubaron 50 μL de cada disolución sobre los electrodos modificados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, los electrodos se lavaron con PBS-EIS y se registró el espectro de impedancia.

6-2.2.4 Medidas de EIS

Las medidas electroquímicas de impedancia se realizaron en una disolución 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ y 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ en PBS-EIS aplicando un potencial de 0.22 V vs. Ag|AgCl, el potencial formal del par redox medido mediante voltamperometría cíclica. La frecuencia se varió en el intervalo entre 100 kHz y 100 mHz con una amplitud de 0.01 V. Como electrodos de referencia y contraelectrodo se emplearon un electrodo externo de Ag|AgCl|KNO₃ y de platino, respectivamente.

6-2.2.5 Medidas de SPR

Los discos de oro del SPR se limpiaron con disolución piraña (70 % H₂SO₄ + 30 % H₂O₂) durante 2 minutos, a continuación se lavaron con agua y etanol y se secaron con corriente de nitrógeno. Sobre la superficie de los

discos se formó un monocapa autoensamblada mixta compuesta por el aptámero tiolado (anti-PSA o PSAG-1) y MH, incubando el disco durante toda la noche a 4 °C con una mezcla del aptámero/MH 1:100, con una concentración total de tioles 100 μM en PBS-EIS. A continuación, se limpió el disco con PBS-EIS, se secó con nitrógeno y se colocó sobre un prisma semicilíndrico limpio, previamente cubierto con una capa de aceite con el mismo índice de refracción que el prisma (1.518 ± 0.002). Finalmente, se bloqueó la superficie con 50 μL de una disolución 1 mM de MH en PBS-EIS durante 1 hora.

La medida de la unión de la PSA a los aptámeros se realizó mediante las siguientes etapas: i) adquisición de la línea base en ambos canales mediante la inyección por triplicado de PBS-EIS durante 5 min; ii) etapa de asociación en la que se añadieron concentraciones crecientes de PSA en un canal y de NGAL en el canal de referencia, ambas preparadas en PBS-EIS y durante 10 minutos; iii) tras el lavado con PBS-EIS se registró la etapa de disociación durante 10 minutos también en PBS-EIS. La diferencia entre el ángulo de resonancia después de la etapa de disociación y el de la línea de base inicial se relaciona con la unión de la proteína al aptámero tras la sustracción de la señal inespecífica obtenida en el canal de referencia. A continuación, se realizó un nuevo ciclo con una concentración más alta de PSA sin regenerar la superficie.

Todas las inyecciones se realizaron automáticamente con el automuestreador y secuenciador del equipo ESPRIT. Durante cada inyección las disoluciones se agitaron de forma continua y todas ellas se realizaron a una temperatura de 25 ± 1 °C.

6-2.3 Resultados y discusión

6-2.3.1 Preparación y caracterización de la fase sensora

Para obtener información sobre la fracción glicosilada de la PSA es necesario utilizar el aptámero PSAG-1 dirigido específicamente hacia el sitio de glicosilación de la proteína y compararla con el contenido de PSA total, empleando el aptámero anti-PSA, que únicamente reconoce la fracción proteica. Ambos aptámeros se inmovilizaron a través de un grupo tiol sobre electrodos de oro nanoestructurados con AuNPs. Las nanopartículas de oro se unen a la superficie de oro a través de la interacción con el extremo amino de la SAM mixta de 11-amino-1-undecanotiol. El mercaptohexanol se utiliza como bloqueante para prevenir interacciones no específicas. El incremento del área activa que tiene lugar al nanoestructurar el electrodo permite aumentar la cantidad de aptámero inmovilizado no sólo por la mayor disponibilidad de superficie sino por la esfericidad que reduce las interacciones repulsivas entre las hebras de ADN polianiónicas y el impedimento estérico en el reconocimiento de la diana (Figura 6-2.2A).

Las diferentes etapas del proceso de fabricación se monitorizaron mediante medidas de espectroscopia de impedancia faradaica tras la realización de cada etapa (Figura 6-2.2B). La resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) de los electrodos de oro sin modificar ($759 \pm 20 \Omega$) decrece tras la formación de la primera monocapa ($117 \pm 19 \Omega$), debido a las cargas positivas de los grupos amino que atraen electrostáticamente a las moléculas electroactivas en disolución. El recubrimiento con AuNPs provoca un incremento en el valor de R_{ct} ($420 \pm 47 \Omega$) pero se mantiene en valores menores que el valor inicial de los electrodos de oro. Este resultado demuestra los beneficios de la creación de una superficie de oro nanoestructurada que conlleva un incremento en las propiedades de transferencia de electrones y en el área superficial favoreciendo las modificaciones posteriores. Finalmente, tras la inmovilización del

6-2.3 Resultados y discusión

aptámero se observa un incremento de R_{ct} ($2864 \pm 155 \Omega$) debido a la repulsión electrostática de las moléculas electroactivas en disolución por las cargas negativas del oligonucleótido presente en la superficie del electrodo.

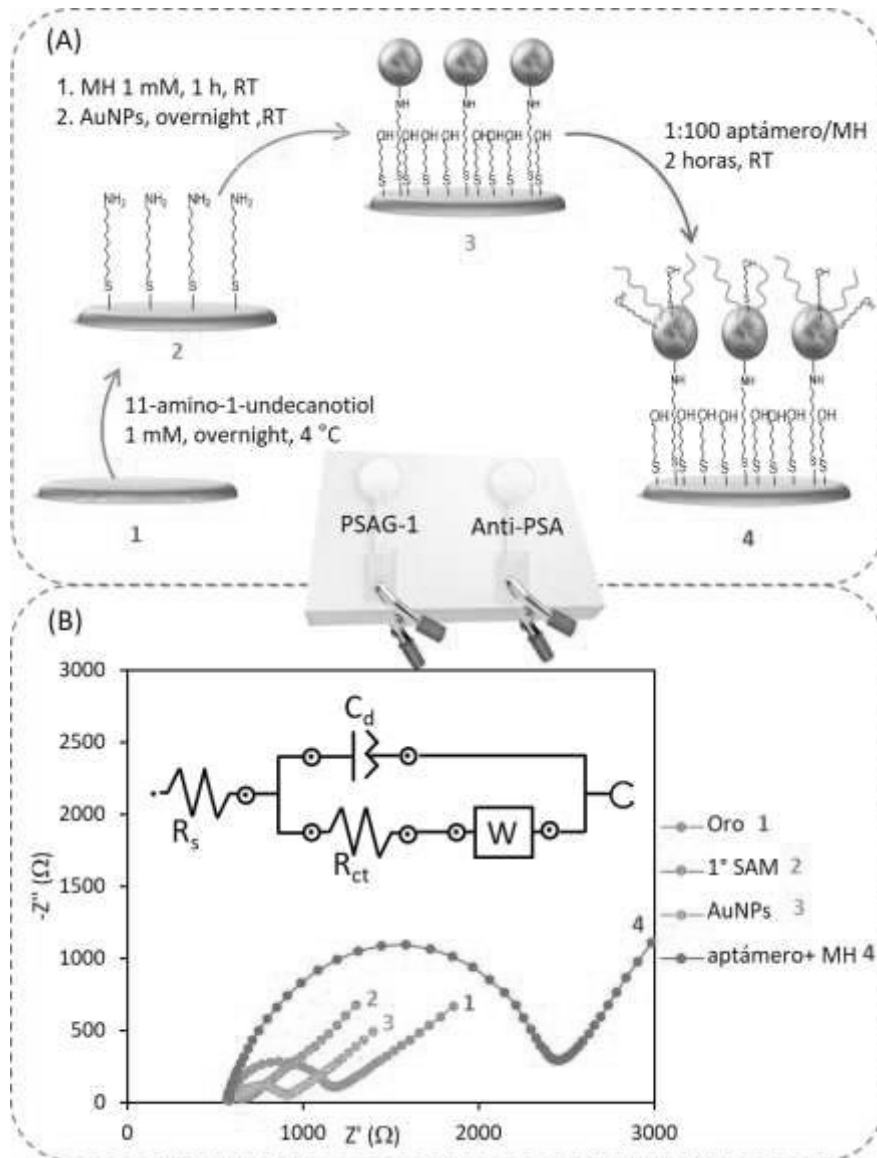


Figura 6-2.2: A) Etapas de la construcción de la plataforma dual impedimétrica basada en aptasensores. B) Diagramas de Nyquist obtenidos tras las distintas etapas del proceso de fabricación y el circuito equivalente de Randles al que se ajustaron.

Además, se comprobó la correcta nanoestructuración de la superficie mediante medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM). Para ello se emplearon electrodos de oro con un tamaño de 10x10 mm y se realizaron las medidas antes y después de la inmovilización de las nanopartículas de oro a través de la SAM. Como se observa en la Figura 6-2.3 la superficie inicial del electrodo de oro evaporado es bastante plana y poco rugosa. Tras la unión de las AuNPs se observa un cambio importante en la morfología de la superficie con un aumento de su rugosidad, lo que confirma una distribución relativamente homogénea de las nanopartículas en la superficie.

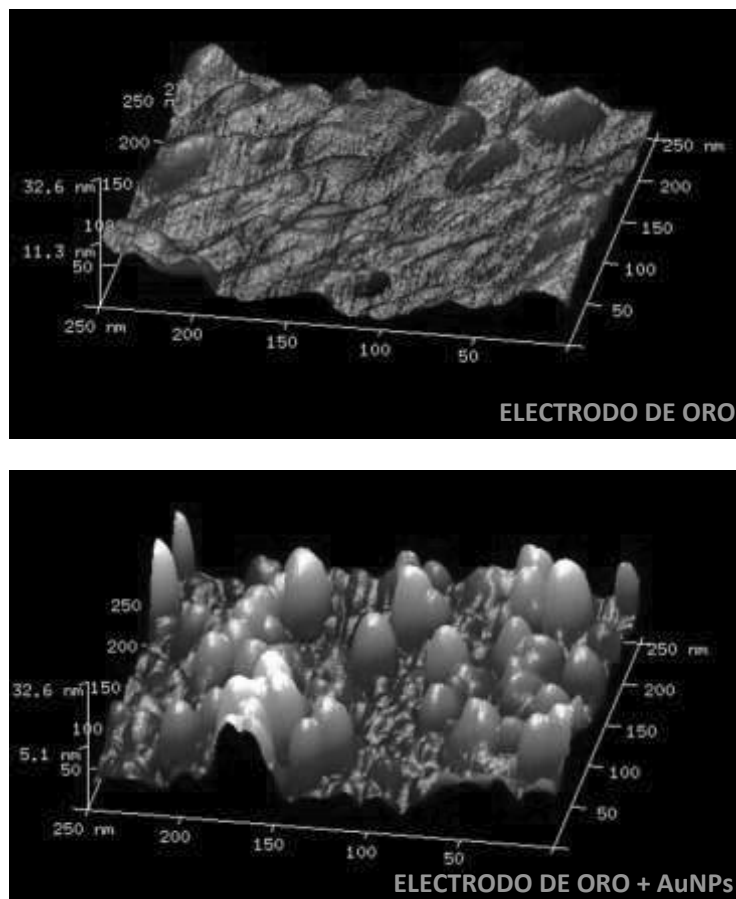


Figura 6-2.3: Imágenes de AFM de la superficie de oro sin modificar (arriba) y tras ser nanoestructurada con nanopartículas de oro (abajo).

Los resultados observados con ambas técnicas sugieren una correcta fabricación del aptasensor.

6-2.3.1 Caracterización de la afinidad de los aptámeros inmovilizados

En los capítulos anteriores se estudió la afinidad de los aptámeros hacia la PSA inmovilizando dicha proteína sobre una superficie adecuada (electrodos de oro o discos de oro de SPR). Los aptámeros seleccionados para la construcción del sensor han demostrado tener distinta afinidad hacia la glicoproteína PSA inmovilizada, estimando sus constantes de disociación en 177 ± 5 nM para anti-PSA y 1.9 ± 0.2 nM para PSAG-1 mediante medidas de SPR. Sin embargo, estudios previos han demostrado que la interacción aptámero-proteína depende de cuál de las moléculas participantes se encuentra inmovilizada debido a variaciones en las interacciones con la superficie¹⁵³⁻¹⁵⁵ y a que la inmovilización puede alterar la conformación del aptámero y su capacidad de enlace. En el sensor propuesto los aptámeros se encuentran anclados a la superficie, al contrario que en los ensayos de afinidad, y esto podría modificar su afinidad de enlace hacia la PSA debido a impedimentos estéricos que dificulten la accesibilidad de la proteína al aptámero o a repulsiones estéricas entre aptámeros cercanos, que impidan el reconocimiento y unión de la proteína¹⁵⁴.

Por esta razón se estudió la afinidad de ambos aptámeros hacia la PSA en el formato propuesto en el diseño del sensor: los aptámeros inmovilizados y la proteína en disolución. Para ello se inmovilizaron los aptámeros tiolados en discos de oro de SPR estableciendo en primer lugar una línea de base con PBS-EIS, y a continuación se hicieron interaccionar con concentraciones crecientes de PSA. La variación del ángulo de resonancia para cada concentración permitió construir las curvas de enlace que se ajustaron al modelo de Langmuir. Se estimó una constante de disociación de 223 ± 65 nM para el PSAG-1 y 336 ± 63 nM para el anti-PSA (Figura 6-2.4).

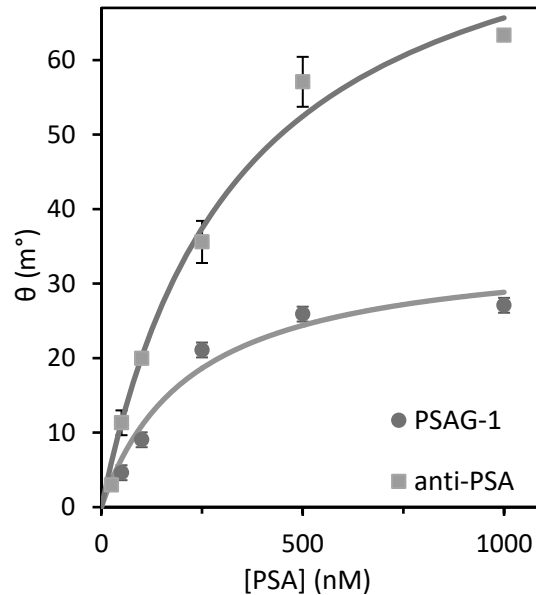


Figura 6-2.4: Curvas de enlace de los aptámeros anti-PSA (verde) y PSAG-1 (azul) frente a la PSA humana, obtenidas mediante medidas de SPR y ajustadas al modelo de Langmuir.

Al comparar estos valores con los obtenidos en el formato inverso se observa un decrecimiento en la afinidad hacia la PSA para ambos aptámeros, aunque la magnitud de la reducción es diferente para cada aptámero. Mientras que la afinidad del aptámero anti-PSA es dos veces menor, para el PSAG-1 esta es cien veces menor. Esto puede ser debido a varios motivos: el reconocimiento por los aptámeros de epítopos distintos de la proteína que pueden tener distinta accesibilidad, y la presencia de distintas glicofomas en el patrón de PSA. Sin embargo, las afinidades obtenidas con esta nueva configuración siguen encontrándose en el intervalo nM, en principio suficiente para permitir la medida de PSA en el intervalo de concentraciones con utilidad clínica.

6-2.3.2 Caracterización analítica de la plataforma dual impedimétrica

Para obtener información simultánea sobre la fracción de la PSA que es reactiva al aptámero PSAG-1 y de la PSA total en una muestra, se prepararon dos superficies sensoras adyacentes, inmovilizando sobre cada

6-2.3 Resultados y discusión

una de ellas uno de los aptámeros. La plataforma dual así obtenida se incubó con concentraciones crecientes de PSA en PBS-EIS. El enlace de la proteína a los aptámeros produjo un incremento en el valor de R_{ct} obtenido del ajuste del diagrama de Nyquist al circuito de Randles (Figura 6-2.5).

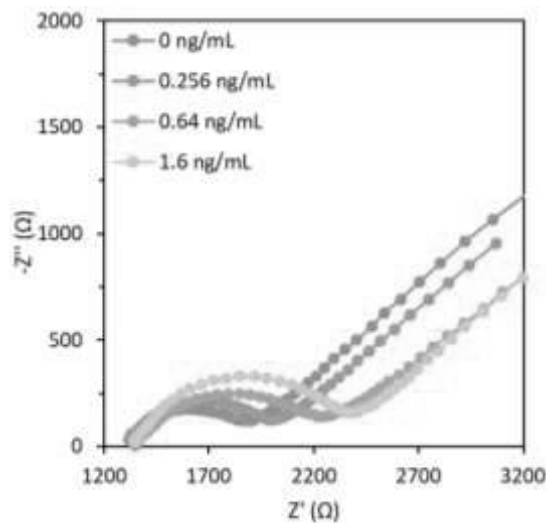


Figura 6-2.5: Diagramas de Nyquist obtenidos para la interacción de la fase sensora modificada con PSAG-1 con concentraciones crecientes de PSA.

Para corregir las variaciones debidas a diferencias microscópicas en el área de los electrodos y al empaquetado de los aptámeros en superficie, se normalizó la señal como el porcentaje de cambio en el valor de R_{ct} respecto al valor inicial en ausencia de la proteína ($R_{ct,0}$) empleando la fórmula $[(R_{ct} - R_{ct,0}) / R_{ct,0}] \times 100$.

Con ambos aptasensores la señal crece al aumentar la concentración de PSA hasta que se alcanza la saturación, obteniéndose unos porcentajes de aumento mayores para el aptámero PSAG-1 que para el anti-PSA para la misma concentración de PSA. Por ejemplo, en la saturación se obtiene una señal de $39.7 \pm 0.5 \%$ con el PSAG-1, mientras que con el anti-PSA se obtiene un $26.5 \pm 0.9 \%$. Esta diferencia es más acentuada a concentraciones bajas de PSA, así para una concentración de PSA de 0.64 ng/mL la respuesta del sensor con el aptámero PSAG-1 es 2.7 veces mayor

que la del anti-PSA. En consecuencia, el intervalo de concentraciones de PSA en el que la señal analítica crece con la proteína abarca desde 0.64 hasta 62.5 ng/mL para el aptámero anti-PSA, y desde 0.26 hasta 62.5 ng/mL para el PSAG-1. Esto puede ser debido a dos efectos: diferencias en las constantes de afinidad de ambos aptámeros y la diferente orientación de la proteína atrapada en la capa de reconocimiento debido a que los aptámeros la reconocen por distintas zonas, lo que puede ocasionar mayor o menor impedimento a la transferencia electrónica de las moléculas electroactivas en disolución.

La fase sensora con PSAG-1, produce un cambio mucho menor de la señal cuando se emplea la rPSA; mientras que con la fase sensora con anti-PSA se alcanzan cambios en la señal similares con la hPSA y la rPSA. Para el anti-PSA, la señal de saturación con la rPSA es el 96 % de la señal para la hPSA, mientras que para el PSAG-1 esta es solamente del 37 %. Estas observaciones vuelven a confirmar que los aptámeros reconocen distintas zonas de la proteína, siendo el PSAG-1 el que reconoce los azúcares (Figura 6-2.6).

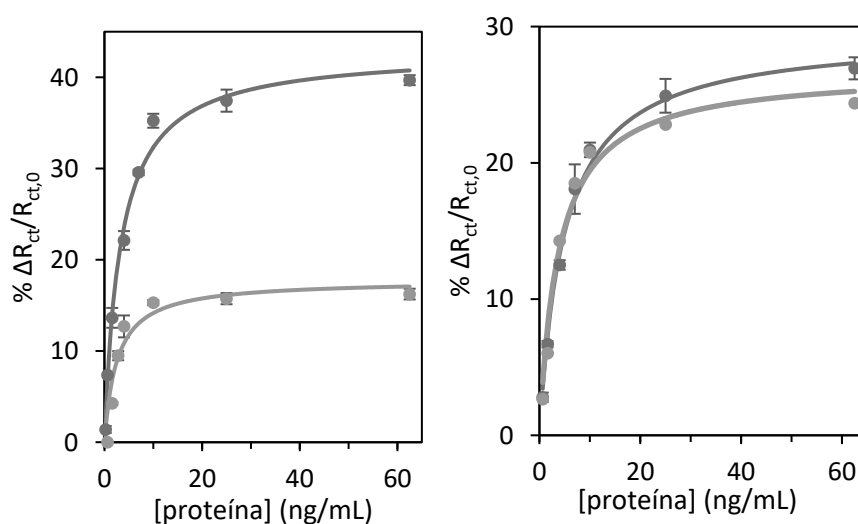


Figura 6-2.6: Curvas de calibrado obtenidas con la PSA humana (azul) y la PSA recombinante (verde) con el aptámero PSAG-1 (izquierda) y anti-PSA (derecha).

Para demostrar la selectividad de la plataforma dual esta se expuso a la albúmina de suero humano (HSA), la proteína más abundante en suero humano. Tras la incubación de ambos aptasensores con 10 ng/mL de HSA en PBS-EIS durante 30 minutos se observa que el porcentaje de cambio en la R_{ct} (0.4 ± 0.3 % para PSAG-1 y 2.9 ± 0.5 % para anti-PSA) es significativamente menor que el obtenido para la misma concentración de hPSA (36 ± 2 % para PSAG-1 y 21.0 ± 0.5 % para anti-PSA) e iguales o ligeramente superior a los valores del blanco (0.8 % para PSAG-1 y 0.4 % para anti-PSA).

Además, el sensor también es capaz de detectar efectivamente la PSA en muestras de suero. Cuando se trabaja con medios tan complejos es importante minimizar las adsorciones no específicas de otros componentes de la matriz sobre la superficie sensora. Por ello, se realizó un acondicionamiento previo de la fase sensora incubándola durante 30 minutos con suero de mujer diluido 1:5 con PBS-EIS, con un contenido de PSA menor de 0.01 ng/mL certificado por el ensayo ELISA quimioluminiscente. El valor de la R_{ct} obtenido tras esta etapa se utiliza como referencia ($R_{ct,0}$) para calcular el porcentaje de cambio de la señal en muestras de suero. Tras esta etapa la fase sensora se incubó con concentraciones crecientes de PSA observándose un incremento de la señal con la concentración similar al observado en PBS-EIS para el intervalo de concentraciones bajas, siendo el intervalo de trabajo el mismo en suero que en PBS-EIS. Sin embargo, las señales de saturación son menores que las observadas en PBS-EIS probablemente debido a que el número de sitios de reconocimiento se ve reducido por la adsorción de otras proteínas presentes en la matriz del suero a la superficie durante el acondicionamiento (Figura 6-2.7).

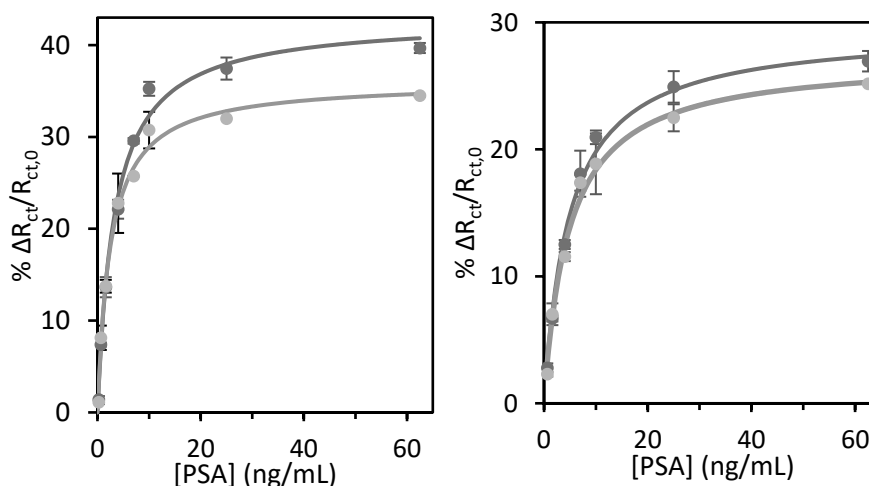


Figura 6-2.7: Curvas de calibrado obtenidas sobre la plataforma dual impedimétrica. Izquierda) en PBS-EIS (azul) y suero diluido 1:5 (naranja) con el aptámero PSAG-1. Derecha) en PBS-EIS (azul) y suero diluido 1:5 (naranja) con el aptámero anti-PSA.

Las curvas de calibrado obtenidas en suero diluido se ajustaron a la ecuación de Langmuir ($y = y_{\max} \cdot x / P + x$) con un valor de y_{\max} de 27.2 ± 0.8 % y P de 4.8 ± 0.5 ng/mL con una correlación de 0.996 para el aptámero anti-PSA, y un valor de y_{\max} de 36 ± 2 % y P de 2.3 ± 0.4 ng/mL con una correlación de 0.993 para el aptámero PSAG-1.

6-2.3.3 Análisis de PSA en muestras reales

Para explorar la utilidad clínica de la plataforma diseñada, esta se empleó para detectar las alteraciones en los glicanos de la PSA asociadas al cáncer de próstata. Las muestras de suero, proporcionadas por el Hospital de Cabueñes, corresponden a 12 pacientes clasificados en tres grupos: pacientes con hiperplasia benigna de próstata, con cáncer de próstata y sanos. Las muestras tienen unos niveles de PSA total en la zona gris o por encima (> 4 ng/mL), cuantificadas con el ensayo ELISA automatizado ADVIA Centaur® (Siemens) realizado en el laboratorio central del hospital.

En el análisis de las muestras, en primer lugar, se acondicionó la plataforma sensora con suero de mujer y después se incubó con las

6-2.3 Resultados y discusión

muestras de suero de pacientes diluidas cinco veces con PBS-EIS. El porcentaje de cambio de R_{ct} obtenido con cada fase sensora se interpola en la curva de calibrado correspondiente para obtener la concentración de PSA. Los resultados obtenidos con la fase sensora modificada con el aptámero anti-PSA concuerdan perfectamente con los obtenidos en el hospital con el ensayo ELISA (Figura 6-2.8A y Tabla 6-2.1), mientras que con la fase sensora con el aptámero PSAG-1 se obtienen valores de PSA menores que los obtenidos con el sensor con anti-PSA. Esto concuerda con el hecho de que solo una fracción de PSA en la muestra es reactiva al aptámero PSAG-1.

Tabla 6-2.1: Niveles de PSA total y glicosilada, valor del Glycan Score, el valor proporcionado por el ELISA y el diagnóstico de cada muestra.

Muestra	ELISA (ng/mL)	[tPSA] (ng/mL)	[gPSA] (ng/mL)	Glycan score	Diagnóstico
24	9.83	9.2 ± 0.2	2.6 ± 0.5	28 ± 5	Diabetes tipo II (DMII), hipertensión
25	5.36	5.6 ± 0.3	1.22 ± 0.01	22 ± 1	DMII
27	9.15	9.1 ± 0.4	2.7 ± 0.2	29 ± 2	Gonalgia
35	7.2	8 ± 1	1.83 ± 0.08	24 ± 3	Obesidad mórbida
19	12.83	12.7 ± 0.3	10 ± 1	82 ± 9	Cáncer de próstata
21	42.11	42 ± 2	35 ± 2	83 ± 6	Cáncer de próstata
10	5.34	5.6 ± 0.6	4.8 ± 0.1	86 ± 10	Cáncer de próstata
14	10.83	10.4 ± 0.2	8.8 ± 0.4	84 ± 3	Cáncer de próstata
9	4.48	5.48	2.0 ± 0.8	37 ± 13	Prostatitis
13	8.89	7.6 ± 0.9	2.6 ± 0.5	30 ± 6	Cáncer de próstata
20	29.59	29 ± 1	8.8 ± 0.4	30 ± 2	HBP
18	93.57	92.6 ± 0.2	25 ± 2	27 ± 2	HPB

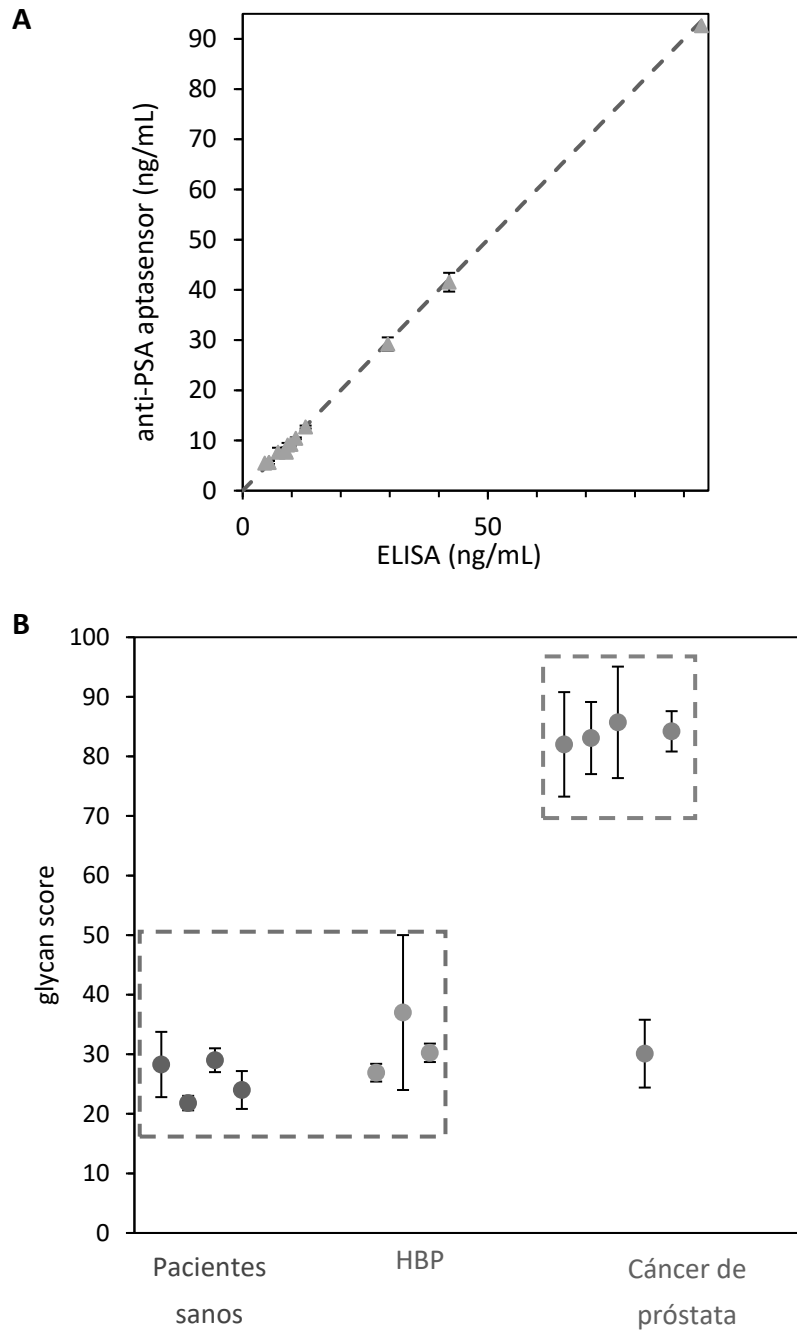


Figura 6-2.8: Resultado del análisis de muestras de suero con la plataforma dual impedimétrica. A) Correlación entre los niveles de PSA total obtenidos con el método ELISA y con el sensor impedimétrico con el aptámero anti-PSA. B) Correlación entre el valor de Glycan Score y el diagnóstico.

Con el fin de evaluar el valor diagnóstico de la plataforma dual desarrollada se define el índice de glicanos o “*Glycan score*” (GS) como la relación entre la concentración de PSA medida con el aptámero PSAG-1 y la concentración de PSA medida con el anti-PSA (tPSA) y multiplicado por cien. Si se compara las concentraciones de PSA obtenidas con ambos sensores y los valores de GS con el diagnóstico final se observa que los valores de las concentraciones no concuerdan con el estado de salud del paciente. Por el contrario, el valor de GS se correlaciona con el diagnóstico final siendo posible distinguir entre pacientes sin cáncer de próstata y pacientes que lo tienen (Figura 6-2.8B).

Los valores de GS obtenidos permiten diferenciar dos grupos. El primero incluye valores de GS entre 22 y 37 y corresponde a pacientes sin cáncer de próstata, entre los que se incluyen individuos sanos y pacientes con patologías benignas de la próstata (prostatitis o HBP). El otro grupo, con valores de GS en general más altos corresponde a pacientes con cáncer de próstata. Se observa un grupo claro con GS entre 82 y 86, en el que se encuentran cuatro de las cinco muestras analizadas correspondientes a pacientes con cáncer, y solo una muestra de este grupo con GS de 26 se asignaría incorrectamente con este criterio (falso negativo) (Figura 6-2B y Tabla 6-2.1). Estos resultados concuerdan con un incremento significativo en la PSA reactiva al aptámero PSAG-1 en pacientes con cáncer, que pueden ser asociados a cambios en los niveles de fucosilación del núcleo¹⁵⁶ o a un incremento en estructuras muy ramificadas¹⁵⁷.

De esta forma, la plataforma dual impedimétrica desarrollada y el parámetro *Glycan Score* tienen el potencial para mejorar el diagnóstico del cáncer de próstata, debido a la capacidad de GS de separar a los pacientes con cáncer de pacientes sin cáncer con un 80 % de sensibilidad y un 100 % de especificidad clínicas. Aunque es necesaria la validación y el análisis de más muestras, los resultados obtenidos demuestran que la

implementación del índice GS podría reducir el número de biopsias innecesarias sin comprometer el diagnóstico de cáncer de próstata.

6-3 Utilidad clínica de los aptasensores

Los resultados obtenidos con los tres aptasensores desarrollados pueden ser una herramienta útil para la detección de la fracción de la PSA glicosilada que se ve alterada en presencia del cáncer de próstata, y por tanto, podrían ser una alternativa al inmunoensayo ELISA para el diagnóstico del cáncer de próstata, si mejoran su utilidad clínica (selectividad y especificidad diagnósticas).

Todos los resultados obtenidos para el análisis de las muestras con los diferentes sensores, junto con el valor proporcionado por el ELISA y el diagnóstico final se recogen en la Tabla 6-3.1. Para facilitar la interpretación de los resultados se representan en verde los verdaderos negativos, en azul los verdaderos positivos, en rojo los falsos positivos y en naranja los falsos negativos. Se ha considerado un valor de corte de 4 ng/mL por debajo del cual se consideraría que el individuo no tiene cáncer para todos los ensayos excepto para el *Glycan Score*. En este último caso el valor de corte fue de 59.5, obtenido a partir del análisis de la curva ROC (*receiver operating characteristics*, características operativas del receptor) en la que se representa la sensibilidad en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad) para distintos puntos de corte (Figura 6-3.1).

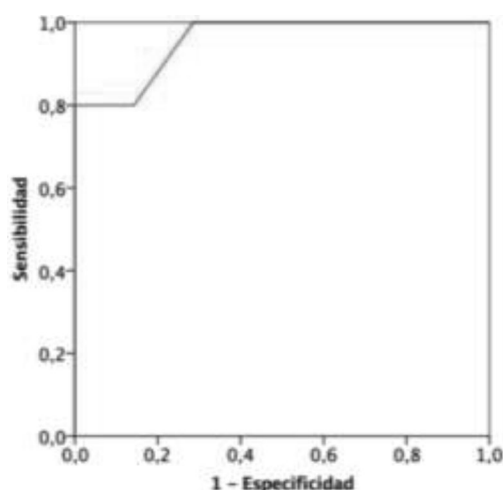


Figura 6-3.1: Curva ROC obtenida con las muestras analizadas con el sensor dual impedimétrico tras el cálculo del *Glycan Score*

La curva ROC realizada con las 12 muestras analizadas proporciona una sensibilidad diagnóstica del 80 % y especificidad diagnóstica del 100 % para un valor de corte de 59.5. Para evaluar la capacidad discriminativa (o bondad) del *Glycan Score* se estimó el área bajo la curva, obteniéndose un valor de 0.957 ± 0.056 con un intervalo de confianza del 95 %. Este valor está muy próximo a 1 (discriminación perfecta), mostrando la gran capacidad de discriminación del *Glycan Score* entre pacientes con y sin cáncer. Mientras que un valor del área bajo la curva de 0.5 indicaría un poder nulo de discriminación, equivalente a un diagnóstico al azar.

El ensayo sándwich con el aptámero PSA-1 reduce el número de falsos positivos de 20 proporcionados por el ELISA a solamente 7, para las 34 muestras analizadas por ambos métodos. De esta forma se mejora la especificidad del método ELISA, siendo del 65 % para el ensayo sándwich y del 23 % para el ensayo ELISA. La sensibilidad de ambos métodos es muy similar, aunque un poco mejor la del ELISA (75 % para el ELISA vs. 70 % para el sándwich con PSA-1). Hay que tener en cuenta que las muestras están sesgadas hacia aquellas que son falsos positivos en ELISA. De ahí la baja especificidad que debe circunscribirse al subconjunto de muestras analizadas pero que no se corresponde con la especificidad general del ensayo ELISA.

Con el ensayo sándwich con el aptámero PSAG-1 se analizó un menor número de muestras (4), pero los resultados obtenidos mejoran tanto la sensibilidad (100 % para el sándwich con PSAG-1 vs. 75 % para el ELISA) como la especificidad (50 % para el sándwich con PSAG-1 vs. 23 % ELISA), al proporcionar un menor número de falsos positivos, solamente uno para el aptasensor frente a tres del ensayo ELISA, y ningún falso negativo.

El uso del índice de glicanos ("*Glycan Score*"), en el que se relaciona una fracción reactiva de la PSA al aptámero PSAG-1 con la cantidad de PSA total, medido mediante la plataforma dual impedimétrica clasifica correctamente 11 de las 12 muestras ensayadas. Solamente proporciona un falso negativo. Por tanto, la especificidad es del 100 % mientras que la

sensibilidad es del 80 %. El GS mejoraría la especificidad respecto al ELISA, su punto débil, pero empeoraría la sensibilidad. Sin embargo, debido al exiguo número de muestras ensayadas es prematuro afirmarlo con rotundidad. Se requieren más variedad de muestras para establecer un punto de corte adecuado y determinar así la verdadera selectividad y especificidad del nuevo índice.

Tabla 6-3.1: Resultados obtenidos para el análisis de las muestras con el ensayo ELISA, los aptasensores desarrollados, el valor del Glycan Score y el diagnóstico final.

Muestra	ELISA (ng/mL)	Sándwich PSA-1 (ng/mL)	Sándwich PSAG-1 (ng/mL)	Impedimétrico anti-PSA (ng/mL)	Impedimétrico PSAG-1 (ng/mL)	Glycan Score	Diagnóstico	Verdadero positivo		Verdadero negativo		Falso positivo		Falso negativo	
1	< 0.01	< LD					Otras patologías no relacionadas								
2	< 0.01	< LD					HBP								
3	< 0.01	< LD					Cáncer de próstata								
4	< 0.01	< LD					HBP. Biopsia negativa								
5	0.37	3.86 ± 0.02					Elevación de PSA/2 biopsias negativas								
6	0.96	1.2 ± 0.2					Cáncer de próstata								
7	1.94	< LD					Hipercolesterolemia								
8	2.79	2.4 ± 0.4					Otras patologías no relacionadas								
9	4.48	23.5	1.5 ± 0.6	5.48	2.0 ± 0.8	37 ± 13	Prostatitis								

6.3 Utilidad clínica de los aptasensores

10	5.34	1.8 ± 0.8		5.6 ± 0.6	4.8 ± 0.1	86 ± 10	cáncer de próstata
11	6.34	4.7 ± 0.6					elevación PSA
12	8.03	1.0 ± 0.3					hipertiroidismo
13	8.89	8.7		7.6 ± 0.9	2.6 ± 0.5	30 ± 6	Cáncer de próstata
14	10.83	10.1 ± 0.9		10.4 ± 0.2	8.8 ± 0.4	84 ± 3	Cáncer de próstata
15	11.33	13 ± 2					Rectorragia
16	41.1	19.4 ± 6					Cáncer de próstata
17	27.79	26 ± 3	3 ± 1				Hipertensión arterial
18	93.57	91 ± 8		92.6 ± 0.2	25 ± 2	27 ± 2	HBP
19	12.83	14.9 ± 1	10 ± 1	12.7 ± 0.3	10 ± 1	82 ± 9	cáncer de próstata
20	29.59	1.5 ± 1.1	4.4 ± 0.4	29 ± 1	8.8 ± 0.4	30 ± 2	HBP
21	42.11	41 ± 5		42 ± 2	35 ± 2	83 ± 6	cáncer de próstata
22	8.49	< L.D.					diabetes tipo II (DMII), hipertensión
23	13.08	1					neoplasia de recto
24	9.83	1.4 ± 0.4		9.2 ± 0.2	2.6 ± 0.5	28 ± 5	DM II, hipertensión

6.3 Utilidad clínica de los aptasensores

	5.36	5.5 ± 0.6	5.6 ± 0.3	1.22 ± 0.01	22 ± 1	DMII
25						Otras patologías no relacionadas
26	6.96	1.8 ± 1				
27	9.15	4.6 ± 0.2	9.1 ± 0.4	2.7 ± 0.2	29 ± 2	Gonalgia
28	6.20	1.23 ± 0.2				prótesis aorta
29	7.15	0.63 ± 0.07				biopsia negativa/ poliposis
30	7.90	0.7 ± 0.2				hipertensión arterial
31	7.85	9.2 ± 0.8				secuelas traumatismo craneocéfálico
32	5.83	0.7 ± 0.2				sin importancia
33	5.51	5 ± 2				sin importancia
34	8.07	1.8 ± 0.7				sin importancia
35	7.20		8.1 ± 1	1.83 ± 0.08	24 ± 3	no biopsia, obesidad mórbida

CAPÍTULO 7

*Conclusiones y perspectivas
de futuro*

7.1 Conclusiones

Las principales conclusiones que se extraen de la presente Tesis Doctoral se presentan a continuación:

1. Se ha diseñado una estrategia de selección de aptámeros frente a la región de los glicanos de la PSA basada en la incorporación de contra-selecciones frente a su forma recombinante (sin glicanos). Tras seis rondas de selección, de las cuales dos fueron contra-selecciones, se ha identificado un aptámero, PSA-1, capaz de discriminar la PSA de la PSA recombinante. Este aptámero muestra gran afinidad hacia la proteína humana, con una constante de disociación de 357 ± 42 nM obtenida a través de ensayos de unión con detección electroquímica y de 177 ± 65 nM, mediante medidas de SPR. PSA-1 reconoce también a otras glicoproteínas humanas con patrones de glicosilación similares al de la PSA, de lo que se deduce que este aptámero se une fundamentalmente a los glicanos de las proteínas y no a la región peptídica.
2. Se han explorado dos opciones para dirigir el proceso SELEX para obtener aptámeros capaces de reconocer la PSA tanto a través de la región de los glicanos como de la zona peptídica. De las dos metodologías propuestas, la opción basada en la elución competitiva con la lectina PhoSL es la que proporciona un enriquecimiento de la colección inicial en secuencias con afinidad hacia la PSA.
3. Se ha identificado un aptámero, el PSAG-1, capaz de distinguir entre la PSA recombinante y la humana, con una afinidad por la PSA glicosilada de 34 ± 9 nM, obtenida mediante ensayos de unión con detección electroquímica, y de 1.9 ± 0.2 nM mediante medidas de SPR. Ambas constantes son al menos un orden de magnitud mejores que las descritas para lectinas naturales. Este aptámero también es capaz de reconocer la región peptídica cercana al sitio de glicosilación, siendo capaz de discriminar la PSA

de otras glicoproteínas con una estructura de glicanos similar (NGAL, AFP, ovoalbúmina y transferrina).

4. Mediante un ensayo de desglicosilación selectiva de la PSA se pudo obtener información sobre los azúcares involucrados en la interacción entre los aptámeros y la proteína. Con este estudio se concluye que ambos aptámeros presentan un perfil de reconocimiento de los azúcares de la PSA completamente distinto. El aptámero PSA-1 reconoce los azúcares externos, principalmente los ácidos siálicos y las galactosas, lo que concuerda con la falta de reconocimiento de la parte peptídica por este receptor; mientras que el aptámero PSAG-1 reconoce los azúcares más internos del glicano (galactosa, N-acetilglucosamina y fucosa α 1-6 del núcleo).
5. Se estudió la influencia de la fucosa α 1-6 del núcleo en el enlace de ambos aptámeros mediante ensayos de desplazamiento de la lectina PhoSL unida a la PSA y competitivos con fucosa en disolución. Ambos muestran que la fucosa α 1-6 del núcleo no interviene en el enlace del PSA-1 a la PSA, mientras que si es importante para el enlace del PSAG-1, aunque también están involucrados otros azúcares.
6. Se ha desarrollado un método para obtener un modelo de la estructura tridimensional de los aptámeros. Se parte de la estructura secundaria predicha por el programa Mfold, que se transforma en tridimensional empleando el programa de predicción RNAcomposer. De esta forma se obtiene una estructura tridimensional para el aptámero como si de un ARN se tratase. Esta estructura se transforma en ADN empleando el programa de edición molecular Discovery Studio Visualizer y finalmente se relaja con simulaciones de dinámica molecular, empleando un muestreo mejorado y algoritmos convencionales. El modelo que mejor define la estructura tridimensional del aptámero PSAG-1 muestra que este aptámero posee unos

elementos estructurales bien definidos, un bucle de horquilla y dos segmentos helicoidales de pares de bases.

7. El modelo tridimensional del aptámero PSAG-1 obtenido permitió diseñar de manera racional una nueva secuencia más corta, el aptámero truncado T-PSAG-1 de 32 bases, que resulta de la eliminación de las últimas 8 bases del extremo 3' del aptámero completo. Este aptámero truncado mantiene similares características de afinidad (121 ± 25 nM) hacia la hPSA y selectividad frente a otras glicoproteínas que el aptámero completo.
8. El modelo tridimensional del aptámero T-PSAG-1 y la estructura cristalina de la proteína (3QUM) fueron el punto de partida para la construcción de un modelo molecular del complejo aptámero-PSA. Mediante el método de acoplamiento molecular o *docking* seguido de simulaciones de dinámica molecular se obtuvo un modelo del complejo que predice que el aptámero se enlaza simultáneamente a residuos del bucle de las calicreínas (zona peptídica de la PSA) y de la región interna de su glicano, incluyendo la fucosa α 1-6 del núcleo.
9. Se comprobó mediante medidas de afinidad con SPR que uno de los aptámeros ya descritos para la PSA, el anti-PSA, no reconoce la fracción glicosilada de la misma ya que se une de igual forma a la PSA glicosilada y a la recombinante. Se estimó mediante ensayos de unión con detección electroquímica y ajuste al modelo de Langmuir una constante de disociación de 229 ± 25 nM.
10. La combinación de los aptámeros anti-PSA y PSA-1 permitió obtener un aptasensor electroquímico con formato tipo sándwich sobre electrodos de oro para cuantificar la PSA glicosilada en suero humano. Este dispositivo se caracteriza por un límite de detección de 0.66 ng/mL y un intervalo de trabajo desde 0.66 ng/mL hasta 25 ng/mL para medidas en muestras de suero con una mínima dilución, lo que abarca el intervalo de concentraciones de PSA en

suero con relevancia clínica en el diagnóstico del cáncer de próstata. Además, el sensor muestra una excelente selectividad frente a otras glicoproteínas y componentes de la sangre. La validación del sensor mediante la medida de PSA en muestras de suero de pacientes con diferentes patologías mostró que este método presenta una mejor capacidad de discriminación entre cáncer de próstata e hiperplasia benigna de próstata que el ELISA utilizado como referencia.

11. Los aptámeros PSAG-1 y anti-PSA se han utilizado para construir una plataforma sensora dual impedimétrica, que no requiere marcas, para la cuantificación de la PSA total y glicosilada en suero tras una simple dilución de la muestra. Los sensores incorporados en esta plataforma presentan un intervalo dinámico útil entre 0.26 y 62.5 ng/mL para el basado en PSAG-1 y 0.64 y 62.5 ng/mL para el que utiliza anti-PSA.
12. Con la plataforma impedimétrica dual descrita se obtiene un índice empírico, "*Glycan Score*", calculado a partir de las concentraciones de PSA obtenidas con los dos sensores del sistema dual. Este índice mide la relación entre la cantidad de PSA reactiva al PSAG-1 y la concentración de PSA total. La correlación de este parámetro con el diagnóstico permite la diferenciación en dos grupos claramente separados entre pacientes con cáncer y pacientes sanos o con patologías benignas de la próstata.
13. Los dispositivos desarrollados en esta Tesis Doctoral podrían ser una alternativa para la detección de PSA, con potencial para mejorar los resultados clínicos del test ELISA de PSA y reducir el número de biopsias innecesarias que se llevan a cabo para diagnosticar el cáncer de próstata.

7.2 Perspectivas de futuro

La investigación llevada a cabo y los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral abren la puerta a nuevas propuestas de investigación, desarrollo e innovación, como las que se recogen a continuación:

1. Por las características que presenta el aptámero PSA-1 este podría ser empleado como reactivo genérico para la detección de glicanos de cualquier glicoproteína, imitando de esta forma a los receptores naturales, las lectinas, pero con una mayor afinidad y con las ventajas de estabilidad y síntesis que presenta un receptor sintético.
2. La estrategia para obtener aptámeros descrita en el capítulo 4 no se restringe solamente a las proteínas con un solo sitio de glicosilación y con fucosa del núcleo, si no que se podrían emplear otras lectinas específicas para dirigir la selección a diferentes azúcares de una proteína que hayan sido asociados con la aparición del cáncer.
3. La adaptación de los sensores descritos a un formato miniaturizado, portátil, fácil de usar y de bajo coste, podría utilizarse como método analítico en el laboratorio de los hospitales y también en la realización de análisis a la cabecera del paciente (POC, point-of-care), acoplando estos dispositivos a móviles o pantallas donde se muestren los resultados.

7.3 Conclusions

From this Doctoral Thesis we can draw the following conclusions:

1. We have designed a strategy to direct the selection of aptamers toward prostate-specific antigen (PSA)-glycans, which is based on the incorporation of counter-selection steps against the recombinant form of PSA (without glycans). After six rounds of selection with two counter-selections, we have identified an aptamer, PSA-1, which can discriminate between human and recombinant PSA. This aptamer shows a great affinity for human PSA with a dissociation constant of 357 ± 42 nM obtained with electrochemical binding assays, and 177 ± 65 nM with SPR measurements. PSA-1 also recognizes other human glycoproteins with glycan patterns similar to PSA. Therefore, we deduced that this aptamer fundamentally binds to the glycan moiety and not to the peptide region of the protein.
2. We have explored two options to direct the SELEX procedure to obtain aptamers with the ability to recognize PSA through both the glycans and the peptide region. The strategy based on the competitive elution with the lectin PhoSL gives an enrichment of the initial library in sequences with affinity for PSA.
3. We have identified an aptamer, PSAG-1, that can distinguish between human and recombinant PSA, with an affinity for the glycosylated PSA of 34 ± 9 nM, obtained with electrochemical binding assays, and 1.9 ± 0.2 nM with SPR measurements. Both dissociation constants are at least one order of magnitude better than the ones described for natural lectins. This aptamer is also able to recognize the peptide region near to the glycosylation site, being able to distinguish between PSA and other glycoproteins with a similar glycan structure (NGAL, AFP, ovalbumin and transferrin).

4. We were able to get information about the sugars involved in the interaction between the aptamers and the protein with a selective deglycosylation assay. From this study, we observed that both aptamers present a completely different recognition profile of PSA sugars. PSA-1 aptamer recognizes the external sugars, mainly the sialic acids and galactose, which is in concordance with its lack of recognition of the peptide part. On the contrary PSAG-1 aptamer recognizes the innermost sugars of the glycan (galactose, N-acetylglucosamine, and α 1-6 core fucose).
5. We have studied the influence of α 1-6 core fucose in the binding of both aptamers to the protein using displacement assays of the PSA-bound PhoSL and competitive assays with fucose in solution. Both assays show that core fucose is not involved in the binding of PSA-1 to PSA, while it is important for the binding of PSAG-1, although other sugars are also involved.
6. We have developed a methodology to obtain a model of the 3D structure of aptamers. It started with the secondary structure predicted by Mfold that is transformed into 3D with the prediction software RNAcomposer. In this way, we obtained a 3D structure like an RNA aptamer that is transformed into a DNA aptamer with the molecular edition software Discovery Studio Visualizer. Finally, the structure was relaxed with molecular dynamics simulations using refined sampling and conventional algorithms. The best model that describes the 3D structure of PSAG-1 shows that the aptamer has very well-defined structural elements: a hairpin loop and two base-pairs helicoidal segments.
7. The 3D model obtained for PSAG-1 allows us to rationally design a new shorter sequence, the truncated T-PSAG-1 aptamer containing only 32 bases, which results from the elimination of the last 8 bases at the 3' end of the complete aptamer. This truncated aptamer keeps similar affinity characteristics to PSA (121 ± 25 nM)

and selectivity against other glycoproteins as the complete aptamer.

8. The 3D model of T-PSAG-1 aptamer and the crystalline structure of PSA (3QUM) were the starting point for building a molecular model of the aptamer-protein complex. Using the molecular docking method, followed by molecular dynamics simulations we have obtained a model of the complex predicting that the aptamer simultaneously binds to the kallikrein loop (peptide region of the PSA) and the innermost region of the glycans, including the α 1-6 core fucose.
9. We have proved by SPR measurements that an already described aptamer for PSA, anti-PSA, is not able to recognize the glycosylation moiety of PSA because it binds with similar affinity to the glycosylated and recombinant PSA. We estimated a dissociation constant of 229 ± 25 nM by electrochemical binding assays.
10. Combining anti-PSA and PSA-1 aptamers we have designed and electrochemical sandwich aptasensor for the quantification of glycosylated PSA in human serum using gold electrodes as a support. This device has a detection limit of 0.66 ng/mL and a working concentration range between 0.66 ng/mL and 25 ng/mL in serum samples with minimal dilution, covering the range of serum PSA concentrations with clinical relevance in the diagnosis of prostate cancer. Moreover, the sensor has an excellent selectivity against other glycoproteins and compounds of the serum. We have validated the sensor by measuring PSA in serum samples from patients with different pathologies, showing that the sensor has a better discrimination capacity between prostate cancer and benign prostate hyperplasia than the ELISA test used as a reference.
11. We have used PSAG-1 and anti-PSA aptamers for building an impedimetric label-free dual sensor platform for the

quantification of total and glycosylated PSA in serum after a simple dilution. The sensors of this platform have a working concentration range between 0.26 and 62.5 ng/mL for PSAG-1, and between 0.64 and 62.5 ng/mL for anti-PSA.

12. Using the impedimetric platform we have obtained an empiric index, "Glycan score", calculated from the concentrations of PSA obtained with both sensors of the dual platform. This index measures the relation between the concentration of PSA reactive to PSAG-1 aptamer and the total PSA concentration. The correlation between the Glycan score and the diagnoses allows us to differentiate two groups that clearly separate patients with prostate cancer from healthy patients or with a benign pathology of the prostate.
13. The devices developed in this Doctoral Thesis could be an alternative for the detection of PSA, with the potential to improve the clinical outcomes of the ELISA test for PSA and reduce the number of unnecessary biopsies performed to diagnose prostate cancer.

7.4 Future perspectives

The investigation carried out and the results obtained in this Doctoral Thesis opens the door to new research, development and innovation proposals to be addressed in the future. We highlight the following ones:

1. Due to the characteristics of PSA-1 aptamer, it could be employed as a generic reagent for the detection of the glycans of any glycoprotein, mimicking the natural receptors (lectins). This aptamer has a higher affinity than the lectins and the stability and synthesis advantages of a synthetic receptor.
2. The strategy to obtain the aptamers described in chapter 4 is not restricted to proteins with one glycosylation site and with core fucose. Otherwise, other specific lectins could be used to direct the selection of aptamer against other sugars of a protein that are associated with cancer.
3. The described sensors could be adapted to a miniaturized, portable, easy-to-use and low-cost device that could be used as an analytical method in the hospital laboratories and also as a point-of-care device, coupling the device with mobile phones or screens where the results are displayed.

BIBLIOGRAFÍA

1. National Cancer Institute: Diccionario de cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario> (último acceso el 18 de marzo de 2020).
2. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
3. Rawla, P. Epidemiology of prostate cancer. *World J. Oncol.* **2019**, *10*, 63–89, doi:10.14740/wjon1191.
4. El cáncer en España, datos y estadísticas. <https://www.epdata.es/datos/cancer-espana-datos-estadisticas/289> (último acceso el 24 de marzo de 2020).
5. Damborský, P.; Damborská, D.; Belický, Š.; Tkáč, J.; Katrlík, J. Sweet strategies in prostate cancer biomarker research: Focus on a Prostate Specific Antigen. *Bionanoscience* **2018**, *8*, 690–700, doi:10.1007/s12668-017-0397-z.
6. Simoes, G.F.; Sakuramoto, P.; Santos, C.B. dos; Furlan, N.K.C.; Augusto, T.M. An overview on prostate pathophysiology: New insights into prostate cancer clinical diagnosis. *Pathophysiol. - Altered Physiol. States* **2018**, doi:10.5772/intechopen.74269.
7. Lee, C.H.; Akin-Olugbade, O.; Kirschenbaum, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2011**, *40*, 565–575, doi:10.1016/j.ecl.2011.05.012.
8. Taylor, R.A.; Risbridger, G.P. Prostatic tumor stroma: A key player in cancer progression. *Curr. Cancer Drug Targets* **2008**, *8*, 490–497, doi: 10.2174/156800908785699351.
9. Chiarugi, P.; Paoli, P.; Cirri, P. Tumor microenvironment and metabolism in prostate cancer. *Semin. Oncol.* **2014**, *41*, 267–280, doi:10.1053/j.seminoncol.2014.03.004.

10. Madu, C.O.; Lu, Y. Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *J. Cancer* **2010**, *1*, 150-77, doi: 10.7150/jca.1.150.
11. Grossmann, M.; Cheung, A.S.; Zajac, J.D. Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *27*, 603–616, doi:10.1016/j.beem.2013.05.001.
12. Waldron, N.; Chowdhury, S. Prostate cancer. *Medicine* **2019**, *48*, 119–122, doi:10.1016/B978-1-4557-2865-7.00084-9.
13. Leitzmann, M.F.; Rohrmann, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates. *Clin. Epidemiol.* **2012**, *4*, 1–11, doi:10.2147/CLEP.S16747.
14. Nelson, W.G.; Antonarakis, E.S.; Carter, H.B.; De Marzo, A.M.; De Weese, T.L. Prostate cancer. In *Abeloff's clinical oncology*; Elsevier, 2020; 1401-1432.e7, ISBN 978-0-323-47674-4.
15. FDA-NIH Biomarker working group *BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools)*; Silver Spring, 2016.
16. Sharma, S.; Zapatero-Rodríguez, J.; O'Kennedy, R. Prostate cancer diagnostics: Clinical challenges and the ongoing need for disruptive and effective diagnostic tools. *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35*, 135–149, doi:10.1016/j.biotechadv.2016.11.009.
17. Wang, M.C.; Valenzuela, L.A.; Murphy, G.P.; Chu, T.M. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol.* **1979**, *17*, 159–163, doi:10.1097/00005392-200203000-00005.
18. Lundwall, Å.; Clauss, A.; Olsson, A.Y. Evolution of kallikrein-related peptidases in mammals and identification of a genetic locus encoding potential regulatory inhibitors. *Biol. Chem.* **2006**, *387*, 243–249, doi:10.1515/BC.2006.032.
19. Balk, S.P.; Ko, Y.J.; Bubley, G.J. Biology of prostate-specific antigen.

- J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 383–391, doi:10.1200/JCO.2003.02.083.
20. Gilgunn, S.; Conroy, P.J.; Saldova, R.; Rudd, P.M.; O’Kennedy, R.J. Aberrant PSA glycosylation - A sweet predictor of prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2013**, *10*, 99–107, doi:10.1038/nrurol.2012.258.
 21. Sävbom, C.; Malm, J.; Giwercman, A.; Nilsson, J.-Å.; Berglund, G.; Lilja, H. Blood levels of free-PSA but not complex-PSA significantly correlates to prostate release of PSA in semen in young men, while blood levels of complex-PSA, but not free-PSA increase with age. *Prostate* **2005**, *65*, 66–72, doi:10.1002/pros.20254.
 22. Lilja, H.; Ulmert, D.; Vickers, A.J. Prostate-specific antigen and prostate cancer: Prediction, detection and monitoring. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 268–278, doi:10.1038/nrc2351.
 23. Christensson, A.; Laurell, C-B.; Lilja, H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 755–763, doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb19466.x.
 24. Stephan, C.; Ralla, B.; Jung, K. Prostate-specific antigen and other serum and urine markers in prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2014**, *1846*, 99–112, doi:10.1016/j.bbcan.2014.04.001.
 25. Catalona, W.J. Prostate cancer screening. *Med. Clin. North Am.* **2018**, *102*, 199–214, doi:10.1016/j.mcna.2017.11.001.
 26. Saini, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell. Oncol.* **2016**, *39*, 97–106, doi:10.1007/s13402-016-0268-6.
 27. Stephan, C.; Bangma, C.; Vignati, G.; Bartsch, G.; Lein, M.; Jung, K.; Philippe, M.; Semjonow, A.; Catalona, W.J. 20–25% lower concentrations of total and free Prostate-Specific Antigen (PSA) after calibration of PSA assays to the WHO reference materials – analysis of 1098 patients in four centers. *Int. J. Biol. Markers* **2009**,

- 24, 65–69, doi:10.1177/172460080902400201.
28. Macefield, R.; Metcalfe, C.; Lane, J.; Donovan, J.; Avery, K.; Blazeby, J.; Down, L.; Neal, D.; Hamdy, F.; Vedhara, K. Impact of prostate cancer testing: an evaluation of the emotional consequences of a negative biopsy result. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 1335–1340, doi:10.1038/sj.bjc.6605648.
29. Catalona, W.J.; Smith, D.S.; Wolfert, R.L.; Wang, T.J.; Rittenhouse, H.G.; Ratliff, T.L.; Nadler, R.B. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *J. Am. Med. Assoc.* **1995**, *274*, 1214–1220, doi:10.1001/jama.274.15.1214.
30. Benson, M.C.; Whang I. S.; Pantuck, A.; Ring, K.; Kaplan, S.A.; Olsson, C.A.; Cooner, W.H. Prostate specific antigen density: A means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J. Urol.* **1992**, *147*, 815–816, doi:10.1016/s0022-5347(17)37393-7.
31. Mydlo, J.H.; Godec, J. *Prostate cancer science and clinical practice. Second Edition*; Elsevier, 2016; ISBN: 978-0-12-800077-9.
32. Smith, D.S.; Catalona, W.J. Rate of Change in serum Prostate Specific Antigen levels as a method for prostate cancer detection. *J. Urol.* **1994**, *152*, 1163–1167, doi:10.1016/S0022-5347(17)32528-4.
33. American Cancer Society: Tests to diagnose and stage prostate cancer <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html> (último acceso el 11 de mayo de 2020).
34. Efesoy, O.; Bozlu, M.; Çayan, S.; Akbay, E. Complications of transrectal ultrasound-guided 12-core prostate biopsy: A single center experience with 2049 patients. *Turk Urol. Derg.* **2013**, *39*, 6–

- 11, doi:10.5152/tud.2013.002.
35. Gordetsky, J.; Epstein, J. Grading of prostatic adenocarcinoma: Current state and prognostic implications. *Diagn. Pathol.* **2016**, *11*, 25, doi:10.1186/s13000-016-0478-2.
36. Gleason, D.F. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.* **1966**, *50*, 125–128.
37. Humphrey, P.A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod. Pathol.* **2004**, *17*, 292–306, doi:10.1038/modpathol.3800054.
38. Marrugo-Ramírez, J.; Mir, M.; Samitier, J. Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2877, doi:10.3390/ijms19102877.
39. Catalona, W.J.; Partin, A.W.; Sanda, M.G.; Wei, J.T.; Klee, G.G.; Bangma, C.H.; Slawin, K.M.; Marks, L.S.; Loeb, S.; Broyles, D.L.; et al. A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J. Urol.* **2011**, *185*, 1650–1655, doi:10.1016/j.juro.2010.12.032.
40. Becerra, M.F.; Atluri, V.S.; Bhattu, A.S.; Punnen, S. Serum and urine biomarkers for detecting clinically significant prostate cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2020**, 1–5, doi:10.1016/j.urolonc.2020.02.018.
41. Filella, X.; Fernández-Galan, E.; Bonifacio, R.F.; Foj, L. Emerging biomarkers in the diagnosis of prostate cancer. *Pharmgenomics. Pers. Med.* **2018**, *11*, 83–94, doi:10.2147/PGPM.S136026.
42. Punnen, S.; Pavan, N.; Parekh, D.J. Finding the wolf in sheep's clothing: The 4Kscore is a novel blood test that can accurately

- identify the risk of aggressive prostate cancer. *Rev. Urol.* **2015**, *17*, doi:10.3909/riu0668.
43. Peracaula, R.; Tabarés, G.; Royle, L.; Harvey, D.J.; Dwek, R.A.; Rudd, P.M.; de Llorens, R. Altered glycosylation pattern allows the distinction between Prostate-Specific Antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology* **2003**, *13*, 457–470, doi:10.1093/glycob/cwg041.
44. Meany, D.L.; Zhang, Z.; Sokoll, L.J.; Zhang, H.; Chan, D.W. Glycoproteomics for prostate cancer detection: Changes in serum PSA glycosylation patterns. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 613–619, doi:10.1021/pr8007539.
45. Filella, X.; Foj, L. Prostate cancer detection and prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to exosomal biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17111784.
46. Groskopf, J.; Aubin, S.M.J.; Deras, I.L.; Blase, A.; Bodrug, S.; Clark, C.; Brentano, S.; Mathis, J.; Pham, J.; Meyer, T.; et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: Development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 1089–1095, doi:10.1373/clinchem.2005.063289.
47. ExoDx prostate cancer test patient information: ExosomeDx. <https://www.exosomedx.com/patients/exodx-prostate-test> (último acceso el 12 de mayo de 2020).
48. Lomas, D.J.; Ahmed, H.U. All change in the prostate cancer diagnostic pathway. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 372–318, doi:10.1038/s41571-020-0332-z.
49. Zhang, Y.; Liu, Y.; Liu, H.; Tang, W.H. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* **2019**, *9*, doi:10.1186/s13578-019-0282-2.
50. SelectMDx for prostate cancer | MDxHealth.

- <https://mdxhealth.com/selectmdx-physician/> (último acceso el 11 de mayo de 2020).
51. Glavey, S. V.; Huynh, D.; Reagan, M.R.; Manier, S.; Moschetta, M.; Kawano, Y.; Roccaro, A.M.; Ghobrial, I.M.; Joshi, L.; O'Dwyer, M.E. The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis. *Blood Rev.* **2015**, *29*, 269–279, doi:10.1016/j.blre.2015.01.003.
 52. Pinho, S.S.; Reis, C.A. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 540–555, doi:10.1038/nrc3982.
 53. Marth, J.D.; Grewal, P.K. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 874–887, doi:10.1038/nri2417.
 54. Varki, Ajit; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W.; Etzler, M.; E. *Essentials of glycobiology*; 3rd edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015; ISBN 978-1-621821-32-8.
 55. Engelking, L.R. Glycoproteins and glycolipids. In *Textbook of veterinary physiological chemistry*; Elsevier, 2015; 130–135, ISBN 978-0-12-391909-0.
 56. Stowell, S.R.; Ju, T.; Cummings, R.D. Protein glycosylation in cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2015**, *10*, 473–510, doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040438.
 57. Meezan, E.; W U, H.C.; Black, P.H.; Robbins, P.W. Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts II. Separation of glycoproteins and glycopeptides by sephadex chromatography. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2518–2524, doi: 10.1021/bi00834a039.
 58. Kim, Y.J.; Varki, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj. J.* **1997**, *14*, 569–576, doi: 10.1023/a:1018580324971.

59. Tanaka, F.; Otake, Y.; Nakagawa, T.; Kawano, Y.; Miyahara, R.; Li, M.; Yanagihara, K.; Inui, K.; Oyanagi, H.; Yamada, T.; et al. Prognostic significance of polysialic acid expression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1666–70.
60. Schneider, M.; Al-Shareffi, E.; Haltiwanger, R.S. Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology* **2017**, *27*, 601–618, doi:10.1093/glycob/cwx034.
61. Dennis, J.W.; Laferté, S.; Waghorne, C.; Breitman, M.L.; Kerbel, R.S. β 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science.* **1987**, *236*, 582–585, doi:10.1126/science.2953071.
62. Kudelka, M.R.; Ju, T.; Heimbürg-Molinario, J.; Cummings, R.D. Simple sugars to complex disease-mucin-type O-glycans in cancer. *Adv. Cancer Res.* **2015**, *126*, 53–135, doi:10.1016/bs.acr.2014.11.002.
63. Kannagi, R.; Izawa, M.; Koike, T.; Miyazaki, K.; Kimura, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 377–384, doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03219.x.
64. Drake, P.M.; Cho, W.; Li, B.; Prakobphol, A.; Johansen, E.; Anderson, N.L.; Regnier, F.E.; Gibson, B.W.; Fisher, S.J. Sweetening the pot: Adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clin. Chem.* **2010**, *56*, 223–236, doi:10.1373/clinchem.2009.136333.
65. Munkley, J.; Elliott, D.J. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 35478–35489, doi:10.18632/oncotarget.8155.
66. Tkac, J.; Gajdosova, V.; Hroncekova, S.; Bertok, T.; Hires, M.; Jane, E.; Lorencova, L.; Kasak, P. Prostate-Specific Antigen glycoprofiling as diagnostic and prognostic biomarker of prostate cancer. *Interface Focus* **2019**, *9*, 20180077, doi:10.1098/rsfs.2018.0077.

-
67. White, K.Y.; Rodemich, L.; Nyalwidhe, J.O.; Comunale, M.A.; Clements, M.A.; Lance, R.S.; Schehammer, P.F.; Mehta, A.S.; Semmes, O.J.; Drake, R.R. Glycomic characterization of Prostate-Specific Antigen and prostatic acid phosphatase in prostate cancer and benign disease seminal plasma fluids. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 620–630, doi:10.1021/pr8007545.
68. Leymarie, N.; Griffin, P.J.; Jonscher, K.; Kolarich, D.; Orlando, R.; McComb, M.; Zaia, J.; Aguilan, J.; Alley, W.R.; Altmann, F.; et al. Interlaboratory study on differential analysis of protein glycosylation by mass spectrometry: The ABRF glycoprotein research multi-institutional study 2012. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12*, 2935–2951, doi:10.1074/mcp.M113.030643.
69. Song, E.; Hu, Y.; Hussein, A.; Yu, C.Y.; Tang, H.; Mechref, Y. Characterization of the glycosylation site of human PSA prompted by missense mutation using LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 2872–2883, doi:10.1021/acs.jproteome.5b00362.
70. Prakash, S.; Robbins, P.W. Glycotyping of prostate specific antigen. *Glycobiology* **2000**, *10*, 173–176, doi: 10.1093/glycob/10.2.173.
71. Tabarés, G.; Radcliffe, C.M.; Barrabés, S.; Ramírez, M.; Aleixandre, N.; Hoesel, W.; Dwek, R.A.; Rudd, P.M.; Peracaula, R.; de Llorens, R. Different glycan structures in Prostate-Specific Antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA. *Glycobiology* **2006**, *16*, 132–145, doi:10.1093/glycob/cwj042.
72. Drake, R.R.; Jones, E.E.; Powers, T.W.; Nyalwidhe, J.O. Altered glycosylation in prostate cancer. *Adv. Cancer Res.* **2015**, *126*, 345–382, doi:10.1016/bs.acr.2014.12.001.
73. Chen, Z.; Gulzar, Z.G.; St. Hill, C.A.; Walcheck, B.; Brooks, J.D. Increased expression of GCNT1 is associated with altered O-glycosylation of PSA, PAP, and MUC1 in human prostate cancers.

- Prostate* **2014**, *74*, 1059–1067, doi:10.1002/pros.22826.
74. Kim, H.; Kim, K.; Jin, J.; Park, J.; Yu, S.J.; Yoon, J.H.; Kim, Y. Measurement of glycosylated alpha-fetoprotein improves diagnostic power over the native form in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **2014**, *9*, doi:10.1371/journal.pone.0110366.
75. Banazadeh, A.; Veillon, L.; Wooding, K.M.; Zabet-moghaddam, M.; Mechref, Y. Recent advances in mass spectrometric analysis of glycoproteins. *Electrophoresis* **2017**, *38*, 162–189, doi:10.1002/elps.201600357.
76. Svarovsky, S.A.; Joshi, L. Cancer glycan biomarkers and their detection-past, present and future. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 3918–3936, doi:10.1039/c3ay42243g.
77. Mulloy, B.; Dell, A.; Stanley, P.; Prestegard, J.H. Structural analysis of glycans. In *essentials of glycobiology*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
78. Bănică, F.G. *Chemical sensors and biosensors: Fundamentals and applications*; John Wiley and Sons, Reino Unido, 2012; ISBN 9780470710661.
79. Pihíková, D.; Kasák, P.; Tkac, J. Glycoprofiling of cancer biomarkers: Label-free electrochemical lectin-based biosensors. *Open Chem.* **2015**, *13*, 636–655, doi:10.1515/chem-2015-0082.
80. Springsteen, G.; Wang, B. A detailed examination of boronic acid-diol complexation. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5291–5300, doi:10.1016/S0040-4020(02)00489-1.
81. Wu, X.; Li, Z.; Chen, X.X.; Fossey, J.S.; James, T.D.; Jiang, Y.B. Selective sensing of saccharides using simple boronic acids and their aggregates. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8032–8048, doi:10.1039/c3cs60148j.

82. Tommasone, S.; Allabush, F.; Tagger, Y.K.; Norman, J.; Köpf, M.; Tucker, J.H.R.; Mendes, P.M. The challenges of glycan recognition with natural and artificial receptors. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 5488–5505, doi:10.1039/c8cs00768c.
83. Sterner, E.; Flanagan, N.; Gildersleeve, J.C. Perspectives on anti-glycan antibodies gleaned from development of a community resource database. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 1773–1783, doi:10.1021/acscchembio.6b00244.
84. Hong, X.; Ma, M.Z.; Gildersleeve, J.C.; Chowdhury, S.; Barchi, J.J.; Mariuzza, R.A.; Murphy, M.B.; Mao, L.; Pancer, Z. Sugar-binding proteins from fish: Selection of high affinity “lambodies” that recognize biomedically relevant glycans. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 152–160, doi:10.1021/cb300399s.
85. MacKenzie, C.R.; Hiramata, T.; Deng, S.J.; Bundle, D.R.; Narang, S.A.; Young, N.M. Analysis by surface plasmon resonance of the influence of valence on the ligand binding affinity and kinetics of an anti-carbohydrate antibody. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 1527–1533, doi:10.1074/jbc.271.3.1527.
86. Berg, M.J.; Tymoczko, L.J.; Stryer, L. Lectins are specific carbohydrate-binding proteins. In *Biochemistry*; W H Freeman: New York, 2002; 477–480, ISBN-10: 0-7167-3051-0.
87. Santos, A.F.S.; Da Silva, M.D.C.; Napoleão, T.H.; Paiva, P.M.G.; Correia, M.T.S.; Coelho, L.C.B.B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. *Curr. Top. Pept. Protein Res.* **2014**, *15*, 41–62.
88. Mody, R.; Joshi, S.H. antara.; Chaney, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **1995**, *33*, 1–10, doi:10.1016/1056-8719(94)00052-6.
89. Hirabayashi, J.; Arai, R. Lectin engineering: The possible and the

- actual. *Interface Focus* **2019**, *9*, 20180068, doi:10.1098/rsfs.2018.0068.
90. Tuerk, C.; Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **1990**, *249*, 505–510, doi:10.1126/science.2200121.
91. Ellington, A.D.; Szostak, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–822, doi:10.1038/346818a0.
92. Mascini, M.; Palchetti, I.; Tombelli, S. Nucleic acid and peptide aptamers: Fundamentals and bioanalytical aspects. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51*, 1316–1332, doi:10.1002/anie.201006630.
93. Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 381–403, doi:10.1016/j.bioeng.2007.06.001.
94. Sun, W.; Du, L.; Li, M. Aptamer-based carbohydrate recognition. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 2269–2278, doi:10.2174/138161210791792877.
95. Dunn, M.R.; Jimenez, R.M.; Chaput, J. Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1*, doi:https://doi.org/10.1038/s41570-017-0076.
96. Jeong, S.; Eom, T.Y.; Kim, S.J.; Lee, S.W.; Yu, J. In vitro selection of the RNA aptamer against the sialyl lewis X and its inhibition of the cell adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281*, 237–243, doi:10.1006/bbrc.2001.4327.
97. Li, M.; Lin, N.; Huang, Z.; Du, L.; Altier, C.; Fang, H.; Wang, B. Selecting aptamers for a glycoprotein through the incorporation of the boronic acid moiety. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12636–12638, doi:10.1021/ja801510d.

98. Lao, Y.H.; Chiang, H.Y.; Yang, D.K.; Peck, K.; Chen, L.C. Selection of aptamers targeting the sialic acid receptor of hemagglutinin by epitope-specific SELEX. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8719–8722, doi:10.1039/c4cc03116d.
99. Ferreira, C.S.M.; Cheung, M.C.; Missailidis, S.; Bisland, S.; Gariépy, J. Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 866–876, doi:10.1093/nar/gkn967.
100. Rose, C.M.; Hayes, M.J.; Stettler, G.R.; Hickey, S.F.; Axelrod, T.M.; Giustini, N.P.; Suljak, S.W. Capillary electrophoretic development of aptamers for a glycosylated VEGF peptide fragment. *Analyst* **2010**, *135*, 2945–2951, doi:10.1039/c0an00445f.
101. Manabe, Y.; Marchetti, R.; Takakura, Y.; Nagasaki, M.; Nihei, W.; Takebe, T.; Tanaka, K.; Kabayama, K.; Chiodo, F.; Hanashima, S.; et al. The core fucose on an IgG antibody is an endogenous ligand of Dectin-1. *Angew. Chemie* **2019**, *58*, 18697–18702, doi:10.1002/ange.201911875.
102. Jeong, S.; Han, S.R.; Lee, Y.J.; Lee, S.W. Selection of RNA aptamers specific to active Prostate-Specific Antigen. *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 379–385, doi:10.1007/s10529-009-0168-1.
103. Svobodova, M.; Bunka, D.H.J.; Nadal, P.; Stockley, P.G.; O'Sullivan, C.K. Selection of 2'F-modified RNA aptamers against Prostate-Specific Antigen and their evaluation for diagnostic and therapeutic applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 9149–9157, doi:10.1007/s00216-013-7350-y.
104. Savory, N.; Abe, K.; Sode, K.; Ikebukuro, K. Selection of DNA aptamer against Prostate Specific Antigen using a genetic algorithm and application to sensing. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1386–1391, doi:10.1016/j.bios.2010.07.057.

105. Park, J.W.; Lee, S.J.; Ren, S.; Lee, S.; Kim, S.; Laurell, T. Acousto-microfluidics for screening of ssDNA aptamer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep27121.
106. Li, M.; Guo, X.; Li, H.; Zuo, X.; Hao, R.; Song, H.; Aldalbahi, A.; Ge, Z.; Li, J.; Li, Q.; et al. Epitope binning assay using an electron transfer-modulated aptamer sensor. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 341–349, doi:10.1021/acsami.7b17324.
107. Damborska, D.; Bertok, T.; Dosekova, E.; Holazova, A.; Lorencova, L.; Kasak, P.; Tkac, J. Nanomaterial-based biosensors for detection of Prostate Specific Antigen. *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 3049–3067, doi:10.1007/s00604-017-2410-1.
108. Ghorbani, F.; Abbaszadeh, H.; Dolatabadi, J.E.N.; Aghebati-Maleki, L.; Yousefi, M. Application of various optical and electrochemical aptasensors for detection of human Prostate Specific Antigen: A review. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *142*, doi:10.1016/j.bios.2019.111484.
109. Negahdary, M.; Sattarahmady, N.; Heli, H. Advances in Prostate Specific Antigen biosensors-impact of nanotechnology. *Clin. Chim. Acta* **2020**, *504*, 43–55, doi:10.1016/j.cca.2020.01.028.
110. Chang, Y.; Wang, M.; Wang, L.; Xia, N. Recent progress in electrochemical biosensors for detection of Prostate-Specific Antigen. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**, *13*, 4071–4084, doi:10.20964/2018.05.24.
111. Jolly, P.; Formisano, N.; Estrela, P. DNA aptamer-based detection of prostate cancer. *Chem. Pap.* **2015**, *69*, 77–89, doi:10.1515/chempap-2015-0025.
112. Jolly, P.; Damborsky, P.; Madaboosi, N.; Soares, R.R.G.; Chu, V.; Conde, J.P.; Katrlík, J.; Estrela, P. DNA aptamer-based sandwich microfluidic assays for dual quantification and multi-glycan

- profiling of cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 313–319, doi:10.1016/j.bios.2015.12.058.
113. Xia, N.; Deng, D.; Zhang, L.; Yuan, B.; Jing, M.; Du, J.; Liu, L. Sandwich-type electrochemical biosensor for glycoproteins detection based on dual-amplification of boronic acid-gold nanoparticles and dopamine-gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *43*, 155–159, doi:10.1016/j.bios.2012.12.020.
114. Glycanostics Ltd. <https://www.glycanostics.com/> (último acceso el 13 de octubre 2020).
115. Johnsson, B.; Lofas, S.; Lindquist, G. Immobilization of proteins to a carboxymethyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* **1991**, *198*, 268–277, doi:10.1016/0003-2697(91)90424-R.
116. Dong, Y.; Wang, Z.; Wang, S.; Wu, Y.; Ma, Y.; Liu, J. Introduction of SELEX and important SELEX variants. In *Aptamers for Analytical Applications; The role of glycans in the development and progression of prostate cancer* Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2018; 1–25, ISBN: 9783527342679.
117. Vanbrabant, J.; Leirs, K.; Vanschoenbeek, K.; Lammertyn, J.; Michiels, L. ReMelting curve analysis as a tool for enrichment monitoring in the SELEX process. *Analyst* **2014**, *139*, 589–595, doi:10.1039/c3an01884a.
118. Afgan, E.; Baker, D.; Batut, B.; van den Beek, M.; Bouvier, D.; Čech, M.; Chilton, J.; Clements, D.; Coraor, N.; Grüning, B.A.; et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W537–W544, doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gky379>.
119. Thiel, W.H.; Giangrande, P.H. Analyzing HT-SELEX data with the Galaxy Project tools - A web based bioinformatics platform for

- biomedical research. *Methods* **2016**, *97*, 3–10, doi:10.1016/j.ymeth.2015.10.008.
120. Hoinka, J.; Backofen, R.; Przytycka, T.M. AptaSUITE: A full-featured bioinformatics framework for the comprehensive analysis of aptamers from HT-SELEX experiments. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2018**, *11*, 515–517, doi:10.1016/j.omtn.2018.04.006.
121. Carothers, J.M.; Oestreich, S.C.; Szostak, J.W. Aptamers selected for higher-affinity binding are not more specific for the target ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7929–7937, doi:10.1021/ja060952q.
122. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406–3415, doi:10.1093/nar/gkg595.
123. Kobayashi, Y.; Tateno, H.; Dohra, H.; Moriwaki, K.; Miyoshi, E.; Hirabayashi, J.; Kawagishi, H. A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33973–33982, doi:10.1074/jbc.M111.327692.
124. Damborský, P.; Zámorová, M.; Katrlík, J. Determining the binding affinities of Prostate-Specific Antigen to lectins: SPR and microarray approaches. *Proteomics* **2016**, *16*, 3096–3104, doi:10.1002/pmic.201500466.
125. Reynolds, M.; Pérez, S. Thermodynamics and chemical characterization of protein-carbohydrate interactions: The multivalency issue. *Comptes Rendus Chim.* **2011**, *14*, 74–95, doi:10.1016/j.crci.2010.05.020.
126. Robinson, P. V.; Tsai, C.T.; De Groot, A.E.; McKechnie, J.L.; Bertozzi, C.R. Glyco-seek: Ultrasensitive detection of protein-specific glycosylation by proximity ligation polymerase chain reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10722–10725,

doi:10.1021/jacs.6b03861.

127. Li, J.; Liu, S.; Sun, L.; Li, W.; Zhang, S.Y.; Yang, S.; Li, J.; Yang, H.H. Amplified visualization of protein-specific glycosylation in Zebrafish via proximity-induced hybridization chain reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 16589–16595, doi:10.1021/jacs.8b08442.
128. Do Nascimento, A.S.F.; Serna, S.; Beloqui, A.; Arda, A.; Sampaio, A.H.; Walcher, J.; Ott, D.; Unverzagt, C.; Reichardt, N.C.; Jimenez-Barbero, J.; et al. Algal lectin binding to core (α 1-6) fucosylated N-glycans: Structural basis for specificity and production of recombinant protein. *Glycobiology* **2015**, *25*, 607–616, doi:10.1093/glycob/cwv002.
129. Bochman, M.L.; Paeschke, K.; Zakian, V.A. DNA secondary structures: Stability and function of G-quadruplex structures. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 770–780, doi:10.1038/nrg3296.
130. Kikin, O.; D'Antonio, L.; Bagga, P.S. QGRS Mapper: A web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W676–W682, doi:10.1093/nar/gkl253.
131. Vorlíčková, M.; Kejnovská, I.; Bednářová, K.; Renčiuk, D.; Kypr, J. Circular dichroism spectroscopy of DNA: From duplexes to quadruplexes. *Chirality* **2012**, *24*, 691–698, doi:10.1002/chir.22064.
132. del Villar-Guerra, R.; Trent, J.O.; Chaires, J.B. G-Quadruplex secondary structure obtained from circular dichroism spectroscopy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57*, 7171–7175, doi:10.1002/anie.201709184.
133. Mergny, J.L.; Lacroix, L. UV melting of G-quadruplexes. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2009**, doi:10.1002/0471142700.nc1701s37.
134. Mergny, J.-L.; Phan, A.-T.; Lacroix, L. Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.* **1998**, *435*, 74–78,

doi:10.1016/S0014-5793(98)01043-6.

135. Wang, W.; Soriano, B.; Chen, Q. Glycan profiling of proteins using lectin binding by surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* **2017**, *538*, 53–63, doi:10.1016/j.ab.2017.09.014.
136. Krüger, A.; Zimbres, F.; Kronenberger, T.; Wrenger, C. Molecular modeling applied to nucleic acid-based molecule development. *Biomolecules* **2018**, *8*, 83, doi:10.3390/biom8030083.
137. Popena, M.; Szachniuk, M.; Antczak, M.; Purzycka, K.J.; Lukasiak, P.; Bartol, N.; Blazewicz, J.; Adamiak, R.W. Automated 3D structure composition for large RNAs. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e112–e112, doi:10.1093/nar/gks339.
138. Stura, E.A.; Muller, B.H.; Bossus, M.; Michel, S.; Jolivet-Reynaud, C.; Ducancel, F. Crystal structure of human prostate-specific antigen in a sandwich antibody complex. *J. Mol. Biol.* **2011**, *414*, 530–544, doi:10.1016/j.jmb.2011.10.007.
139. Morris, G.M.; Ruth, H.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791, doi:10.1002/jcc.21256.
140. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612, doi:10.1002/jcc.20084.
141. Cabanettes, A.; Perkams, L.; Spies, C.; Unverzagt, C.; Varrot, A. Recognition of complex core-fucosylated N-glycans by a mini lectin. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57*, 10178–10181, doi:10.1002/anie.201805165.
142. McJimpsey, E.L. Molecular form differences between Prostate-

- Specific Antigen (PSA) standards create quantitative discordances in PSA ELISA measurements. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–8, doi:10.1038/srep22050.
143. Leerapun, A.; Suravarapu, S. V.; Bida, J.P.; Clark, R.J.; Sanders, E.L.; Mettler, T.A.; Stadheim, L.M.; Aderca, I.; Moser, C.D.; Nagorney, D.M.; et al. The utility of lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2007**, *5*, 394–402, doi:10.1016/j.cgh.2006.12.005.
144. Füzéry, A.K.; Levin, J.; Chan, M.M.; Chan, D.W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: Issues and challenges. *Clin. Proteomics* **2013**, *10*:13, doi:10.1186/1559-0275-10-13.
145. Gish, R.G. Early detection of hepatocellular carcinoma through surveillance using biomarkers. *Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *10*, 121–3.
146. Lasia, A.; Lasia, A. Definition of impedance and impedance of electrical circuits. In *Electrochemical impedance spectroscopy and its applications*; Springer New York, 2014; 7–66, ISBN 978-1-4614-8933-7.
147. Lisdat, F.; Schäfer, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1555–1567, doi:10.1007/s00216-008-1970-7.
148. Ibañ, C.; Md Arshad, M.K.; Subash C.B., G.; Nuzaihan, M.; M. Fathil, M.F.; Estrela, P. Gold interdigitated triple-microelectrodes for label-free prognostic aptasensing of prostate cancer biomarker in serum. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *136*, 118–127, doi:10.1016/j.bios.2019.04.048.

149. Jolly, P.; Formisano, N.; Tkáč, J.; Kasák, P.; Frost, C.G.; Estrela, P. Label-free impedimetric aptasensor with antifouling surface chemistry: A prostate specific antigen case study. *Sensors Actuators B Chem.* **2015**, *209*, 306–312, doi:10.1016/J.SNB.2014.11.083.
150. Zeng, S.; Yong, K.T.; Roy, I.; Dinh, X.Q.; Yu, X.; Luan, F. A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications. *Plasmonics* **2011**, *6*, 491–506, doi:10.1007/s11468-011-9228-1.
151. Saha, K.; Agasti, S.S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V.M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2739–2779, doi:10.1021/cr2001178.
152. Jolly, P.; Zhuravski, P.; Hammond, J.L.; Miodek, A.; Liébana, S.; Bertok, T.; Tkáč, J.; Estrela, P. Self-assembled gold nanoparticles for impedimetric and amperometric detection of a prostate cancer biomarker. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, *251*, 637–643, doi:10.1016/j.snb.2017.05.040.
153. Amaya-González, S.; López-López, L.; Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Miranda-Ordieres, A.J.; Lobo-Castañón, M.J. Affinity of aptamers binding 33-mer gliadin peptide and gluten proteins: Influence of immobilization and labeling tags. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *873*, 63–70, doi:10.1016/j.aca.2015.02.053.
154. Daniel, C.; Roupioz, Y.; Gasparutto, D.; Livache, T.; Buhot, A. solution-phase vs. surface-phase aptamer-protein affinity from a label-free kinetic biosensor. *PLoS One* **2013**, *8*, e75419, doi:10.1371/journal.pone.0075419.
155. Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M.J. Characterization of aptamer-ligand complexes. In *Aptamers for analytical applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2018; 127–172, ISBN: 9783527342679.

156. Li, Q.K.; Chen, L.; Ao, M.H.; Chiu, J.H.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Chan, D.W. Serum fucosylated Prostate-Specific Antigen (PSA) improves the differentiation of aggressive from non-aggressive prostate cancers. *Theranostics* **2015**, *5*, 267–276, doi:10.7150/thno.10349.
157. Munkley, J.; Mills, I.G.; Elliott, D.J. The role of glycans in the development and progression of prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2016**, *13*, 324-33, doi: 10.1038/nrurol.2016.65.

ANEXOS

A1. Reactivos e instrumentación

A1.1 Reactivos

Las secuencias de ADN fueron sintetizadas por Metabion (Alemania) en formato liofilizado y purificadas por HPLC, excepto la colección inicial de secuencias que fue sintetizada por Sigma-Life Science (España), purificada por PAGE y suministrada en formato desalado. Todas las secuencias de ADN empleadas en la presente Tesis Doctoral se recogen en la Tabla A1.1.

Tabla A1.1: Secuencias de ADN empleadas en la Tesis Doctoral.

Nombre	Secuencia
Colección inicial	AGGGTTGATAGGTTAAGAGC(N) ₄₀ CGATGTCAACTAGCTGTTGG
Cebador directo	AGGGTTGATAGGTTAAGAGC
Cebador inverso	CCAACAGCTAGTTGACATCG
PSA-1	GGACGGTTGCGCTATATTTAACCAAAAGTCTGGATTAACA
PSA-2	TGACGGTGATGGATGCCATCGCTGTACGATATTTGTGACA
PSA-3	GCTATCTGGTGGTTGGTGTAGTTGCGTGGGTTTGTTAATG
PSA-4	AAACAGCGGTCCCCATGGGGTCATGCACCACCGGGTCT
PSA-5	GGTCAAGTCTCGTTAAGTCGACTGTATTCTTCAGGCGCCT
PSAG-1	GAGCGGGGTTGCTGGGATGATAAGGCCCTTTGATGTCTG
PSAG-2	GGACGGCTCTGTTATAAGTGACAGATCTGGACGTAACATT
PSAG-3	CAGCTATCACGATGAGCCTTGCACTAGGGTTGATAGGTTAAGAG
T-PSAG-1	GAGCGGGGTTGCTGGGATGATAAGGCCCTTT
Anti-PSA	TTTTTAATTAAGCTCGCCATCAAATAGCTTT
Secuencia irrelevante	GGTCCTGGGAGACGAACAACCCCGTCACAAGCCTCGTAG

A1.1: Reactivos

El Antígeno Específico de la Próstata (PSA) de fluido seminal se compró a BBI Solutions (Reino Unido). La proteína humana PSA recombinante obtenida en *Escherichia coli* (ab126692) y la Lipocalina-2 humana (NGAL) obtenida de células HEK 293 (ab167728) se obtuvieron de Abcam (Reino Unido). La alfa-fetoproteína humana (AFP) purificada de suero de cordón umbilical humano (PRO-406) se compró a Prospec (Israel).

La lectina PhoSL fue una donación del Prof. Rafael de Llorens. Esta proteína se puede obtener de forma recombinante mediante síntesis química, manteniendo las propiedades de reconocimiento, con la siguiente secuencia:

NH₂- APVPVTKLVCDGDTYKCTAYLDFGDGRWVAQWDTNVFHTG-OH

Las enzimas glicosidasas: neuraminidasa-A (P0722S), β-galactosidasa (P0746S), N-acetilhexosaminidasa (P0744), manosidasa (P0768S), fucosidasa (P0748S) y PNGaseF (P0704S) se compraron en New England Biolabs (EEUU).

Los nucleótidos (dNTPs), la ADN polimerasa immolasa, la disolución tamponada y la sal de magnesio para la PCR se obtuvieron de Bioline (Reino Unido). El tampón TBE 5× (0.45 M Tris-Borato, 0.01 M EDTA pH 8.3) se adquirió en 5 Prime (Maryland, EEUU) y el tampón de carga de ADN en geles 6× se adquirió de Novagen (San Diego, EEUU).

El reactivo de Bradford 5× se compró en SERVA Electrophoresis (Alemania).

El etanol absoluto (100%) y el fluoróforo EVAgreen se obtuvieron de VWR (España y Reino Unido).

Los reactivos de Merck (Alemania) se recogen en la Tabla A1.2.

Tabla A1.2: Lista de reactivos de Merck.

Reactivos de Merck (Alemania)	
K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
Acetato de sodio	Ácido acético

Los reactivos comprados en Sigma-Aldrich se recogen en la Tabla A1.3.

Tabla A1.3: Lista de reactivos de la casa comercial Sigma-Aldrich.

Reactivos de Sigma-Aldrich (España y UK)	
Patrón certificado de PSA (BCR [®] -613)* [PSA] = 71 ± 7 µg/mL	NaH ₂ PO ₄ *
Buffer de fosfato PBS 10× pH 7.4*	Na ₂ HPO ₄ *
Tris-HCl 10× pH 7.4*	(NH ₄) ₂ SO ₄ *
Hidróxido de sodio 1 M*	NaCl*
Albúmina de suero bovino (BSA)*	KCl*
ARN de transferencia (tRNA)*	MgCl ₂ 1 M*
3,3,5,5-tetrametilbencidina (TMB)	Etanolamina
Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC)	N-hidroxisuccinimida (NHS)
fragmento Fab-antifluoresceína-peroxidasa (Roche)	Suero humano de plasma de hombre AB
Ácido 11-mercapto-1-undecanoico	Estreptavidina
L-(-)-fucosa 99% grado puro	Tween-20
Hidrocloreto de 11-amino-1-undecanotiol *	Nanopartículas de oro (20 nm de diámetro, estabilizadas)
Pastillas de PBS*	6-mercapto-1-hexanol
Hexacianoferrato de potasio (III)	Peróxido de hidrógeno 30 %
Hexacianoferrato de potasio (II)	Hidróxido de amonio 30 %
Acetona	Transferrina
Albúmina de suero humano (HSA)	Ovoalbumina

* Reactivos con grado de biología molecular

A1.1: Reactivos

Los reactivos que se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific se recogen en la Tabla A1.4.

Tabla A1.4: Lista de reactivos de Thermo-Fisher Scientific.

Reactivos de Thermo-Fisher Scientific (España)	
Partículas magnéticas Dynabeads™ MyOne™ estreptavidina C1 (1 µm diámetro) (Invitrogen)	Partículas magnéticas tosilactivadas M-280 (2.8 µm diámetro) (Invitrogen)
Caseína al 1 % en PBS	Caseína al 1 % en TBS
Fluoróforo ROX	Fluoróforo SYBRGreen
Ácido sulfúrico (95-98 %) (J.T.Baker)	

Los controles multianálito en suero Lyphochek® Immunoassay Plus Control 4 para inmunoensayos (niveles 2 y 3) fueron donados por el Dr. Eloy Fernández-Rodríguez del laboratorio de análisis clínico del Hospital de Cabueñes (Gijón, España). Los 92 analitos que componen los controles se recogen en la Tabla A1.5.

Tabla A1.5: Composición de los controles BIO-RAD.

Analitos del control BIO-RAD		
25-Hidroxi Vitamina D	Estrógeno (Total)	Fenitoína (Libre)
11-Desoxicortisol	Etosuximida	Primidona
17-α-Hidroxiprogesterona	Ferritina	Procainamida
Paracetamol	Flecainida	Progesterona
ACTH	Folato	Prolactina
Aldosterona	Fructosamina	Propranolol
α-fetoproteína (AFP)	FSH	PSA

Amikacina	Gastrina	PSA (Libre)
Amiodarona	Gentamicina	PTH (Intacto)
Amitriptilina	Glucagón	Quinidina
Androstenediona	hCG	Salicilato
Angiotensina I	Subunidad hCG- β	Globulina fijadora de hormonas sexuales
Anti-Tiroglobulina (Anti-Tg)	hGH	Somatomedina-C
Anti-Tiroperoxidasa (Anti-TPO)	Imipramina	T3 (Libre)
Péptido-C	Inmunoglobulina A (IgA)	T3 (Total)
Cafeína	Inmunoglobulina E (IgE)	T3 captado/T-captado
Calcitonina	Inmunoglobulina G (IgG)	T4 (Libre)
Carbamazepina	Inmunoglobulina M (IgM)	T4 (Total)
Carbamazepina (Libre)	Tripsinógeno inmunoreactivo	TBG
CEA	Insulina	Testosterona
Cloranfenicol	Hierro	Testosterona (Libre)
Cortisol	Hierro (TIBC)	Teofilina
Ciclosporina	LH	Tiroglobulina (Tg)
Desipramina	Lidocaína	Tobramicina
DHEA	Litio	Antidepresivos tricíclicos
Sulfato DHEA	N-Acetilprocainamida (NAPA)	TSH
Digoxina	Netilmicina	Ácido valproico
Disopiramida	Nortriptilina	Ácido valproico (Libre)
Estradiol	PAP	Vancomicina

A1.1: Reactivos

Estriol (Libre)	Fenobarbital	Vitamina B12
Estriol (Total)	Fenitoína	

A1.2 Disoluciones

Todas las disoluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura obtenida con un sistema MilliQ (Millipore, España). En la Tabla A1.6 se recogen todas las disoluciones reguladoras empleadas, su composición y la abreviatura que se usa en el texto.

Tabla A1.6: Composición y nombre de las disoluciones reguladoras empleadas a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

Nombre	Composición
BLmod	PBS 1× + 0.5 % BSA
BLmod2	PBS 1× + 0.1 % BSA
BLstrep	10 mM Tris-HCl, 2 M NaCl + 0.01 % Tween-20
BM	19 mM NaH ₂ PO ₄ , 81 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
BM2	3 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , pH 7.4
BS / PBS / PBS-Na ⁺	PBS 1× + 0.154 M NaCl, pH 7.4
BSL	BS+ 0.01 % Tween-20
NaAc	10 mM acetato sódico, pH 5.5
TBS	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 7.4
PBS-K ⁺	0.01 M fosfato + 0.154 M KCl, pH 7.4
PBS-EIS	PBS 1× + 2.7 mM KCl, pH 7.4

A1.3 Instrumentos y equipos

Las medidas electroquímicas se realizaron en un μ Autolab tipo III/FRA2, un μ Autolab tipo II y un Autolab Pgstat-12 con un módulo FRA2 para las medidas de impedancias, conectados a un ordenador con el software NOVA 2.1 (Methrom, Países Bajos). Los electrodos serigrafados de oro (DRP-220BT) y carbono (DRP-110) se compraron en Metrohm-Dropsens (España).

Las medidas de resonancia de plasmón superficial (SPR) se llevaron a cabo utilizando un equipo de SPR Autolab ESPRIT (Methrom, Países Bajos) equipado con una cubeta con dos canales y un automuestreador, controlado con el Software Data Acquisition (versión 4.4) La temperatura de la celda se controló con un termostato HaakeD1 (Alemania). Los discos de oro del SPR se obtuvieron de XanTec bioanalytics (Alemania).

Para la separación magnética de las partículas se empleó un imán DynaMag-2 de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) y para las etapas de incubación se utilizó un Thermomixer (Eppendorf Ibérica, España).

Las medidas de absorbancia se realizaron en un equipo Carry 60 UV-VIS (Agilent Technologies) y Genesys 10 S UV-VIS (Thermo Fisher) equipado con una cubeta ultra-micro de cuarzo (Sigma-Aldrich).

La PCR se realizó en un sistema GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems, Life Technologies). Las curvas de *remelting* se realizaron en un sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Las medidas fluorescentes se realizaron en un fluorímetro Qubit® 2.0 de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) y en un fluorímetro con lector de microplacas (Biotek Instrument FLx800, Biotek, VT).

La secuenciación masiva se realizó en un secuenciador IonTorrent™ Personal Genome Machine® (PGM) (Thermo Fisher Scientific).

Para purificar el producto de PCR se utilizó un kit de purificación MinElute (Qiagen). Para la clonación se empleó el kit Cloning® Dual

Promoter y las células competentes One Shot[®] de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). La secuenciación se realizó el analizador genético Applied Biosystem-Hitachi 3130xl.

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco, Alemania) en una cubeta de cuarzo de 2 mm y a temperatura controlada con un sistema Peltier.

La limpieza con plasma de oxígeno se llevó a cabo en una cámara Diener Plasma (Zepto, Alemania). Para la fabricación de los electrodos evaporados de oro se empleó el evaporador térmico BOC Edwards (EEUU).

A2. Producción científica

Los resultados obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral se han publicado en revistas internacionales revisadas por pares y se han presentado en congresos científicos tanto internacionales como nacionales.

A2.1 Artículos científicos

- A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón & P. Estrela. Impedimetric Aptamer-based Glycan PSA Score for Discrimination of Prostate Cancer from other Prostate Diseases. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, enviado.
- A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. Díaz, D. Suárez, N. de-los-Santos-Álvarez & M. J. Lobo-Castañón. Aptamers targeting protein-specific glycosylation in tumor biomarkers: general selection, characterization and structural modelling. *Chemical Science*, 2020, 11, 9402-9413.
<https://doi.org/10.1039/D0SC00209G> **Seleccionado como contraportada.**
- A. Díaz-Fernández, R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez & M. J. Lobo-Castañón. Electrochemical aptasensors for cancer diagnosis in biological fluids - A review. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1124, 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.022>
- A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, E. Fernández-Rodríguez & M. J. Lobo-Castañón. Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 128, 83-90.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.040> **Premio San Alberto Magno al mejor trabajo de investigación en 2020** (otorgado por el Colegio Oficial de químicos de Asturias y León).

- A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez & M.J. Lobo-Castañón. Post-translational modifications in tumor biomarkers: the next challenge for aptamers? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410, 2059-2065.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-0861-9>

A2.2 Participación en congresos

A2.2.1 Congresos internacionales

- **1st International Electronic Conference on Biosensors (IECB)** (2-17 noviembre 2020, Online). “*Catching the sugars: electrochemical aptasensors for the detection of cancer-related glycosylation changes in Prostate Specific Antigen*” (A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, P. Estrela, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**
 - ❖ Artículo de conferencia: A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, P. Estrela, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón. *Proceedings*, 2020.
- **71st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry** (31 de agosto- 4 de septiembre de 2020, Online). “*Detection of cancer-related glycosylation changes in prostate specific antigen using electrochemical label-free aptasensors*” (A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, P. Estrela, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**
- **C3Bio Bath Conference on Biosensors, Bioelectronics and Biodevices 2019 & C3Bio/IBST Joint Event.** (9-10 de septiembre de 2019, Bath). “*Electrochemical aptasensor for the detection of cancer-related glycosylation changes in prostate specific antigen*”. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**

- **XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica** (17-19 de julio de 2019, Valladolid). *“Aptámeros para el reconocimiento del patrón de glicosilación en proteínas: aplicación a la detección del cáncer de próstata”*. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**
- **6th ECBS/LS EuChem S.** (3-5 de abril de 2019, Madrid) *“Selection of aptamers recognizing the glycosylation site of PSA: aptasensors for detection of cancer-related glycosylation changes”*. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón) **Presentación flash.**
- **2nd European Biosensor Symposium.** (18-21 de febrero de 2019, Florencia). *“Aptamer based electrochemical sensors for the analysis of tumor biomarkers”*. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**
- **VII seminarios de doctorado internacionales** (4-5 de julio de 2018, Mieres). *“Selection of molecules that adapt to proteins for the early diagnosis of prostate cancer”*. (A. Díaz-Fernández). **Presentación oral y póster.**
- **17th ESEAC 2018 International Conference on Electroanalysis** (3-7 de junio de 2018, Rodas). *“Detection of cancer-related glycosylation changes in Prostate Specific Antigen using aptasensors”*. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**
- **I Workshop on Electrochemistry devices. II Workshop electrobionet- University of Oviedo** (9-10 de noviembre de 2017, Mieres). *“Selection of aptamers recognizing aberrant PSA glycosylation”*. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón). **Póster.**
- **Mátrafüred 2017- International Conference on Electrochemical Sensors** (12 de junio de 2016, Visegrado). *“Aptasensors for*

glycoprotein tumor markers: new tools for cancer diagnostics". (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**

A2.2.1 Congresos nacionales

- **VI seminarios de doctorado del G-9** (11-13 de abril de 2018, Santander). "*Selection of molecules that adapt to proteins for the early diagnosis of prostate cancer*". (A. Díaz-Fernández). **Póster.**
- **VI seminarios de doctorado** (7 de julio de 2018, Mieres). "*Selection of molecules that adapt to proteins for the early diagnosis of prostate cancer*". (A. Díaz-Fernández). **Póster.**