



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Título del Trabajo

***ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ESPECÍFICA DE MOLÉCULAS FRENTE A
UN MARCADOR TUMORAL MEDIANTE MICROBALANZA DE CUARZO
QCM – D (QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE WITH DISSIPATION
MONITORING).***

Autor: Carmen María Martínez Martínez

Tutor/es: Francisco Javier Arias Vallejo

Raquel Muñoz Martínez

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría aprovechar este espacio para mostrar mi agradecimiento a todas las personas que de alguna manera forman parte de este trabajo.

En primer lugar, agradecer a Javier y Raquel, tutores de este trabajo fin de Grado, su implicación y orientación a lo largo de todo el proyecto, así como la confianza depositada en mí. Del mismo modo, agradecer a Merche y Sofía sus propuestas, supervisiones y motivación para llevar el día a día.

También a todos los compañeros del laboratorio de Bioforge por el tiempo dedicado, consejos y generar, no sólo un clima de trabajo excelente, sino una especie de gran familia donde ha sido un placer desarrollar este trabajo.

Gracias a la Universidad de Valladolid y a su profesorado, personal de limpieza, personal de cafetería, de reprografía, biblioteca... porque ya sea de manera directa o indirecta, han hecho de estos años, unos GRANDES AÑOS.

Finalmente, gracias a mi familia y en especial a mis padres, por acompañarme, apoyarme y motivarme para continuar cada día sin tirar la toalla.

GRACIAS.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 ELRs (Elastin- like Recombiamers).....	5
2.2 Liberación dirigida de fármacos y agentes génicos mediante ELRs, fragmentos de anticuerpo y aptámeros.....	6
2.2.1 Terapia génica en cáncer de mama.....	8
2.2.1.1 Tenascina C.....	9
2.2.1.2 Aptámeros.....	10
2.3 QCM-D (Microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación).....	10
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Materiales.....	15
4.2 Métodos.....	19
4.2.1 Microbalanza de cuarzo.....	19
4.2.1.1 Q -Sense D-find.....	20
4.2.2 Plasma- Flow.....	20
4.2.3 Balanza de precisión.....	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1 Puesta a punto del método.....	28
5.1.1 Preparación del sensor de oro.....	29
5.1.1.1 Condiciones óptimas de limpieza.....	29
5.1.1.2 Condiciones óptimas de activación	30
5.1.2 Optimización de las condiciones de trabajo.....	31
5.1.2.1 Relación óptima de TTA1/MCH.....	32
5.1.2.2 Concentración de Tenascina-C (1nM, 2nM,5nM y 20nM).....	34
5.2 Estudio de la especificidad de la interacción entre la molécula de Tenascina-C y las moléculas de aptámeros GBI10 y TTA1.....	37
5.3 Estudio de la ausencia de la especificidad en la interacción entre la inmunoglobulina IgA con las moléculas de aptámero GBI10 y TTA1.....	42
5.4 Interpretación de la interacción entre el DSP con las moléculas de BSA, IgG y Tn-C.....	50
6. CONCLUSIONES	55
7. BIBLIOGRAFÍA	58
8. ANEXOS	61

ABREVIATURAS

Aptámeros: TTA1, GBI10 y 5TR1

Au : oro

BSA: Proteína sérica bovina

DSP: Ditiobis succinimidyl propionato

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

MCH: 6-mercapto-1-hexanol

QCM-D Microbalanza de cuarzo con monitoreo de disipación.

Tn-C: Tenascina-C

1.RESUMEN

El estudio se enmarca en el desarrollo de nuevos sistemas de dosificación controlada de fármacos mediante el uso de recombinámeros tipo elastina (ELRs), los cuales, son una familia de biopolímeros proteicos producidos mediante técnicas de ADN recombinante, inspirados en la elastina natural y cuyas propiedades (biocompatibilidad, capacidad de autoensamblado, comportamiento inteligente) han permitido su aplicación en distintos campos biomédicos, entre ellos, liberación dirigida y controlada de fármacos o agentes génicos, que es en el que se centra el proyecto.

Los ELRs pueden formar micro- o nanopartículas mediante autoensamblado y, de esta forma, encapsular fármacos o formar poliplexos (complejos polímero-ADN) con ácidos nucleicos.

Su direccionamiento se puede llevar a cabo mediante fusión recombinante de los ELRs a fragmentos de anticuerpo (conservan el sitio de unión al antígeno), como scFv, o mediante conjugación química con aptámeros (ssRNA o ssDNA seleccionados por su unión específica a una diana). En el presente trabajo, se evaluará esta última haciendo uso de una microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring), técnica a nanoescala en tiempo real para analizar fenómenos de superficie que incluyen formación de película delgada, mediante interacciones y/o reacciones.

Tras estudios recientes, ha podido considerarse una estrecha relación entre la Tenascina-C y la posibilidad de desarrollo de un cáncer de mama.

Los niveles de Tenascina-C son elevados en recién nacidos pero, al crecer, dichos niveles comienzan a disminuir; sin embargo, en pacientes que han desarrollado un cáncer de mama, se ha observado una sobreexpresión de dicha proteína, por lo que se puede decir que la Tenascina-C parece constituir una buena diana terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama metastásico.

Este trabajo se enmarca en el estudio de la interacción específica entre los aptámeros TTA1 y GBI10 y la Tenascina-C, con objeto de evaluar la posibilidad de utilizarlos como moléculas dirigidas frente a la Tenascina-C, y así direccionarlos en la terapia génica. Este trabajo también comprende la puesta a punto y optimización de las condiciones de trabajo y limpieza del sensor utilizado en el método de análisis.

The study is part of the development of new systems of controlled dosage of drugs through the use of elastin-type recombiners (ELRs), which are a family of protein biopolymers produced by recombinant DNA techniques, inspired by natural elastin and whose properties (biocompatibility, self-assembly capacity, intelligent behavior) have allowed its application in different biomedical fields, among them, directed and controlled release of drugs or gene agents, which is the focus of the project. ELRs can form micro- or nanoparticles by self-assembly and thus encapsulate drugs or form polypeptides (polymer-DNA complexes) with nucleic acids.

Its targeting can be carried out by recombinant fusion of the ELRs to antibody fragments (they preserve the antigen binding site), such as scFv, or by chemical conjugation with aptamers (ssRNA or ssDNA selected by their specific binding to a target). In the present work, the latter will be evaluated using QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring).

After recent studies, it has been possible to consider a close relationship between Tn-C and the possibility of developing breast cancer.

The levels of Tn-C are high in newborns, but when they grow, these levels begin to decrease; but nevertheless; in patients who have developed breast cancer, overexpression of this protein has been observed, so it can be said that Tn-C seems to be a good therapeutic target for the treatment of metastatic breast cancer.

This work is part of the study of the specific interaction between the aptamers TTA1 and GBI10, molecules directed against Tn-C, as well as the development and optimization of working conditions and cleaning of said method of analysis.

On the other hand; The dependence of the existing covalent interaction between the DSP (Ditiobis succinimidyl propionate) and a series of molecules of different molecular weights will be evaluated.

2.INTRODUCCIÓN

2.1 ELRs (Elastin-like Recombinamers)

Los recombinámeros de tipo elastina son una familia de biopolímeros proteicos inspirados en la elastina natural y producidos mediante técnicas de ADN recombinante. Su naturaleza recombinante permite un control estrecho sobre su composición aminoacídica y propiedades, además de facilitar su producción a gran escala, lo que supone una gran mejora respecto a los polímeros de tipo elastina sintetizados químicamente (Elastin-like Polymers) [1]. La mayoría de sus propiedades derivan de la elastina natural, entre ellas, biocompatibilidad, capacidad de deformación reversible, de autoensamblado y comportamiento inteligente, es decir, capacidad de respuesta a estímulos, siendo la temperatura la variable más estudiada.

Los ELRs experimentan un fenómeno de transición inversa con la temperatura (ITT), que consiste en que las cadenas poliméricas están hidratadas, desordenadas y relativamente extendidas por debajo de una temperatura específica (temperatura de transición, T_t), mientras que por encima de ella las cadenas se pliegan formando una estructura secundaria dinámica conocida como espiral- β , y se asocian entre sí mediante interacciones hidrofóbicas, produciéndose un cambio de fase (Fig 1). Este proceso es reversible y permite su purificación mediante ciclos de calentamiento y enfriamiento seguidos de centrifugación (Inverse Transition Cycling, ITC).

Las propiedades de estos polímeros y la versatilidad en el diseño han permitido su aplicación en distintos campos biomédicos, principalmente ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y liberación de fármacos o agentes génicos, que es en el que se centra el presente trabajo [1].

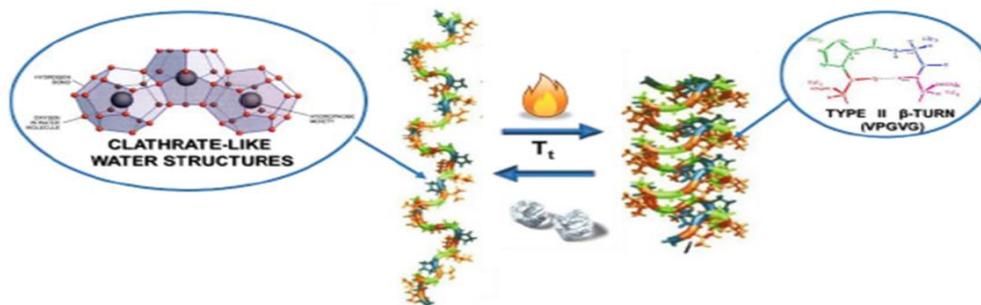


Figura 1. Representación esquemática de la transición térmica de los ELRs (ITT), de la conformación extendida ($T < T_t$, regiones hidrofóbicas desordenadas y rodeadas por estructuras de tipo clatrato formadas por el agua) a la conformación plegada de tipo espiral- β ($T > T_t$, regiones hidrofóbicas ordenadas con exclusión del agua)

2.2 Liberación dirigida de fármacos y agentes génicos mediante ELRs, fragmentos de anticuerpo y aptámeros.

Los principales objetivos en el campo de la liberación de fármacos son el direccionamiento a sitios diana y la liberación controlada en respuesta a estímulos, para reducir la toxicidad y mejorar el efecto terapéutico y el perfil de liberación. Los ELRs son biomateriales con alto potencial en este ámbito gracias a su comportamiento inteligente, entre otras propiedades. Aunque existen numerosas estrategias de diseño de sistemas de liberación de fármacos basados en ELRs, se señalan las tres más generales [2].

Una de ellas consiste en la fusión recombinante del ELR a una proteína terapéutica (ELPylation), lo que facilita la expresión y purificación de la misma, así como su farmacocinética, por ejemplo, aumentando la vida media en circulación.

La segunda clase de construcción se basa en la conjugación química entre el ELR y el fármaco que, por lo tanto, no tiene por qué ser proteico. Los grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos se modifican para la introducción de un sitio de unión al fármaco que pueda romperse en respuesta a estímulos concretos, permitiendo la liberación en el sitio adecuado y mejorando sus propiedades farmacocinéticas [3].

La última estrategia se fundamenta en la encapsulación del fármaco mediante formación de micro- o nanopartículas por autoensamblado de los ELRs. Este puede inducirse por el propio diseño del ELR, la conjugación a un fármaco, la adición de moléculas cargadas o mediante un estímulo externo como la temperatura. Por ejemplo, las interacciones electrostáticas entre ácidos nucleicos y ELRs catiónicos conducen a su autoensamblado y a la formación de complejos polímero-ADN (poliplexos), lo que permite su aplicación como vectores no virales en terapia génica [3]. Este tipo de carriers tienen las ventajas, respecto a los vectores virales, de que no son inmunogénicos, favorecen la producción a gran escala y no presentan limitaciones en el tamaño del ADN transportado ni posibilidad de recombinación con virus, aunque exhiben una eficiencia de transfección más baja. Además, dentro de los vectores no virales los polímeros catiónicos destacan por su habilidad para condensar el ADN, lo que aumenta la estabilidad de los poliplexos así como la interacción con la membrana plasmática, que es uno de los pasos limitantes de la transfección [4]. Estudios *in vitro* con ELRs como vectores no virales han mostrado resultados prometedores y ausencia de toxicidad [4, 5], a diferencia de otros polímeros catiónicos ampliamente utilizados para la construcción de poliplexos, como polietilenimina [5].

El direccionamiento de los sistemas de liberación de fármacos basados en ELRs se puede llevar a cabo mediante conjugación con aptámeros [5] o fusión recombinante a fragmentos de anticuerpo [6].

Estos últimos, están constituidos por las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, conectadas mediante un péptido; mientras que los aptámeros están formados por el dominio variable y un dominio de la región constante de ambas cadenas, unidas por el puente disulfuro.

Las principales diferencias entre dichos fragmentos de anticuerpo respecto a los anticuerpos convencionales son: mayor penetración en los tejidos diana por su pequeño tamaño y, debido a la ausencia del dominio constante (Fc), menor estabilidad y disminución de la vida media en circulación, que es elevada en el caso de los anticuerpos y puede implicar una mayor toxicidad limitante de la dosis [9, 10].

Los aptámeros son ácidos nucleicos de cadena sencilla (ssDNA ó ssRNA) seleccionados para su unión específica a una diana. Son capaces de formar estructuras tridimensionales complejas mediante enlaces no covalentes e interactuar con una diana con afinidad y especificidad comparables o superiores a los anticuerpos. Son más pequeños (8-15 kDa) que los fragmentos scFv (30 kDa) y ofrecen las ventajas, respecto a los anticuerpos, de poseer una estructura flexible que permite el reconocimiento de regiones inaccesibles para los anticuerpos, su producción y modificación son más sencillas, poseen elevada estabilidad y no son inmunogénicos.

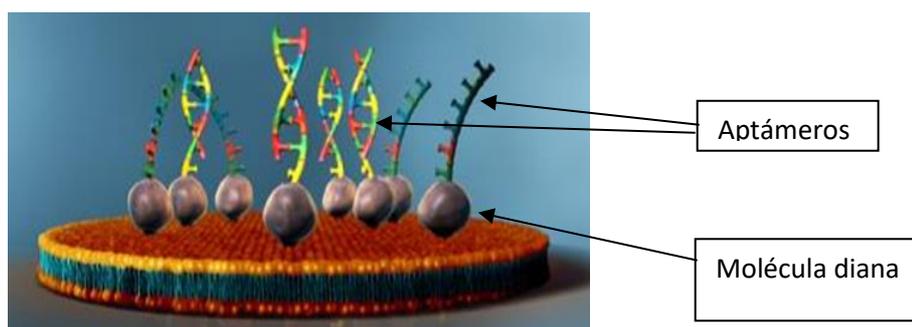


Figura 2. Representación de la interacción establecida entre moléculas de aptámero y molécula diana específica.

Su selección se realiza mediante un procedimiento conocido como SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) a partir de una librería de secuencias. Estas se someten a rondas iterativas de interacción con moléculas purificadas, células

e incluso animales vivos para incrementar la población con alta afinidad por la diana, hasta que se convierte en el pool dominante [11].

Este trabajo se engloba dentro del tratamiento por terapia génica de una enfermedad como el cáncer de mama, para la que se pretende desarrollar terapias dirigidas basadas en aptámeros frente a moléculas diana.

2.2.1 Terapia génica en cáncer de mama

El cáncer de mama es la principal enfermedad diagnosticada en mujeres en la sociedad occidental, ascendiendo a casi 250.000 los nuevos casos de cáncer detectados en la población femenina en USA durante 2016 [16].

En la búsqueda de alternativas, la terapia génica mediante siRNA, genes tóxicos o genes pro-apoptóticos, entre otros, ha surgido como una de las estrategias más prometedoras para el tratamiento del cáncer. Además, su combinación con radio o quimioterapia está mostrando resultados excelentes [5].

En el laboratorio se ha diseñado un ELR catiónico, rico en lisinas, formado por 72 repeticiones del pentapéptido VPGKG y se ha conjugado químicamente con un aptámero dirigido específicamente a MUC1, una glicoproteína de membrana que se sobreexpresa en tumores epiteliales, como cáncer de mama primario y metastático, y que es un marcador de mal pronóstico. Este ELR (VOKx72) se ha utilizado para formar poliplexos con el gen suicida PAP-S, codificante de una RIP (proteína inactivadora del ribosoma) de tipo I, y debido a los prometedores resultados obtenidos *in vitro* actualmente continúa su investigación [5]. En concreto, se está estudiando la combinación de VOKx72 con moléculas de interacción específica con la Tn-C, que es una glicoproteína de la matriz extracelular (estroma) que se sobreexpresa en la mayoría de tumores sólidos malignos, entre ellos cáncer de mama, y que se correlaciona con un mal pronóstico [13]. Las moléculas diana que se expresan en la matriz extracelular ofrecen las ventajas, respecto a las de la superficie celular, de ser más abundantes y estables, su perfil de liberación a la circulación (shedding) es bajo y son más accesibles a las moléculas procedentes de la circulación sanguínea, como los anticuerpos [14].

2.2.1.1 Tenascina C.

La Tenascina C (Tn-C) es una glicoproteína que en los seres humanos está codificada por el gen Tn-C . Se expresa en la matriz extracelular de varios tejidos durante el desarrollo, enfermedad o lesión, y en áreas neurogénicas restringidas del sistema nervioso central.

Tn-C es una proteína muy diversa. Puede producir diferentes funciones dentro del mismo tipo de célula. Esta miríada de funciones se logra mediante el empalme alternativo del ARNm.

Cabe destacar que Tn-C se clasifica como una proteína moduladora de la adhesión, porque se ha encontrado que inhibe la adhesión celular a la proteína fibronectina de la matriz extracelular.

Gran parte de los estudios funcionales sobre esta proteína se deducen de varios modelos de ratones knockout para Tn-C. Tn-C claramente desempeña un papel en la señalización celular, como lo demuestra su capacidad para ser inducida durante eventos como traumatismo, inflamación o desarrollo del cáncer. Además, la Tn-C es importante en la regulación de la proliferación y migración celular, especialmente durante la diferenciación del desarrollo y la curación de heridas.

Tras estudios recientes, ha podido considerarse que existe una estrecha relación entre la sobre-expresión de la proteína de la matriz extracelular Tn-C y la posibilidad de desarrollo de un cáncer de mama.

Los niveles de Tn-C son elevados en recién nacidos pero, al crecer, dichos niveles comienzan a disminuir; sin embargo, en pacientes que han desarrollado un cáncer de mama, se ha observado una sobreexpresión de dicha proteína, por lo que se puede decir que la Tn-C parece constituir una buena diana terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama metastásico.

Debido a que la Tn-C es esencial para la supervivencia de diversas formas de cáncer, incluido el cáncer de mama,, la expresión de la Tn-C podría ser un biomarcador potencial para la detección del cáncer. Además, los anticuerpos contra Tn-C se han utilizado para diagnosticar y crear terapias para muchos tipos diferentes de cánceres.

2.2.1.2 Aptámeros

Los aptámeros, tal como se ha indicado anteriormente (apartado 2.2), son ácidos nucleicos de cadena sencilla, ADN o ARN, que reconocen una gran variedad de moléculas. Cada aptámero posee una estructura tridimensional que le permite unirse con afinidad y especificidad altas a la molécula diana.

Los aptámeros pueden unirse a pequeñas secciones de macromoléculas tales como las proteínas, o pueden encerrar completamente una molécula pequeña.

Los aptámeros se presentan como una alternativa real a los anticuerpos monoclonales en la investigación biomédica, tanto en el ámbito del diagnóstico, debido a su aplicación como sensores moleculares, como en el terapéutico, ya que son capaces de interferir en las funciones biológicas de las moléculas diana. En cuanto a las propiedades químicas y biológicas, se presentan diversas ventajas en su utilización frente a los anticuerpos monoclonales, como pueden ser, su potencial de obtención frente a proteínas no inmunogénicas, su capacidad de regeneración, su mayor estabilidad a temperatura ambiente, las posibilidades de modificación de su estructura, el abaratamiento de sus costes de producción debido a que se pueden obtener mediante síntesis química, evitando el uso de animales o células, su alta reproducibilidad y su capacidad para ser marcados [15].

En el presente trabajo, se hará uso de tres aptámeros: TTA1, GBI10 y 5TR1.

Los aptámeros GBI10 y TTA1 están dirigidos hacia la molécula de Tn-C, la cual, se encuentra actuando como molécula diana.

Por otro lado, el aptámero 5TR1, es específico de mucinas (proteínas de alto peso molecular secretadas en la superficie de las mucosas o formando parte de fluidos biológicos tales como la saliva) y, por lo tanto, dirigido hacia dichas proteínas diana.

2.3 QCM-D (Microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación)

QCM-D es una técnica acústica, nanométrica, que permite el análisis en tiempo real y sin marcaje de fenómenos de superficie, como interacciones moleculares o reacciones. Se basa en la oscilación de un cristal de cuarzo piezoeléctrico a frecuencias específicas (fundamental y armónico), mediante la aplicación de pulsos eléctricos, y permite la

medida en tiempo real no sólo de la Frecuencia de Resonancia (f) sino también de la Disipación (D) de la energía, lo que le diferencia de la técnica convencional (QCM).

El acoplamiento de sustancias a la superficie del sensor, que implica un aumento de masa, se traduce en una disminución de la frecuencia de resonancia. Los cambios en la frecuencia se relacionan con los cambios en la masa total mediante la ecuación de Sauerbrey ($\Delta m = -C\Delta f$), donde $C=17.7\text{ng/Hz cm}^2$ es la constante de sensibilidad de masa. Sin embargo, esta relación sólo es válida si la capa formada sobre la superficie del sensor es rígida, fina y homogénea.

El factor de disipación se define como la energía disipada por ciclo de oscilación dividida por la energía total almacenada en el oscilador y proporciona información sobre las propiedades viscoelásticas de la nanocapa formada sobre el sensor. Las sustancias que forman películas de carácter viscoso, por ejemplo, aquellas con alto contenido en agua, se deforman durante la oscilación produciendo una disipación elevada, sucediendo lo contrario con las películas rígidas. Por lo tanto, este factor permite determinar cuándo no se puede aplicar la ecuación de Sauerbrey así como realizar un modelado viscoelástico, en su lugar, para conocer las propiedades y la masa depositada, que incluye la masa de disolvente [12, 13]. La principal diferencia de la QCM-D respecto a la técnica SPR (Surface Plasmon Resonance), es que esta última no incluye la masa del disolvente asociada a las biomoléculas depositadas debido a que la estimación se realiza en base a la variación en el índice de refracción entre las biomoléculas adsorbidas y el agua desplazada tras su adsorción. En definitiva, QCM-D es más sensible para películas con alto contenido en agua, mientras que SPR lo es más para películas compactas y densas y hasta un límite de espesor. Además, QCM-D proporciona una información más detallada porque permite identificar diferencias estructurales entre distintas moléculas o cambios estructurales dentro del mismo tipo de molécula [14]. Por ejemplo, se ha descrito un cambio conformacional de un aptámero tras la unión a L-tirosinamida [12] o se ha evaluado la interacción entre un aptámero y su proteína diana PSA (prostate-specific antigen).

3.OBJETIVOS

Debido a la necesidad del desarrollo de terapias dirigidas en enfermedades con alta incidencia, como el cáncer de mama, y en base al potencial de las combinaciones ELR/ aptámero como sistemas de liberación dirigida de fármacos, este trabajo se desarrolla con varios objetivos:

1. Puesto que la QCM-D se trata de un nuevo método de análisis, uno de los primeros objetivos será el estudio de la puesta en marcha del mismo, (preparación del sensor de Au, optimización de las condiciones de trabajo...).
2. En base a la relación existente entre la Tn-C y el desarrollo de cáncer de mama, se estudiará la especificidad en la interacción entre la molécula de Tn-C y los aptámeros GBI10 y TTA1.
3. Por otro lado, se estudiará la ausencia de especificidad en la interacción entre la inmunoglobulina IgA con los aptámeros 5TR1, GBI10 y TTA1. Este estudio será complementario al anterior y permitirá corroborar la existencia de especificidad entre la molécula de Tn-C con los aptámeros GBI10 y TTA1.
4. Además, se comparará qué interacción es más efectiva; si Tn-C sobre Au o Tn-C sobre DSP (Ditiobis succinimidyl propionato), actuando este último como un agente de interacción covalente.
5. Finalmente, un quinto objetivo será comprobar que la masa depositada sobre la molécula de DSP (Ditiobis succinimidyl propionato), depende del Peso Molecular de la molécula con la que interacciona.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES:

- Materiales de la QCM-D

Sensor de Au:

Sensores de cuarzo recubiertos de oro (dAu = 100nm) (QSX301, Biolin Scientific), con una frecuencia fundamental de 4.95 MHz.



Figura 3. Sensores de cuarzo recubierto de oro.

- Materiales Químicos

Tampón fosfato salino PBS (10x): (phosphate buffered saline). Gibco PBS (10X)

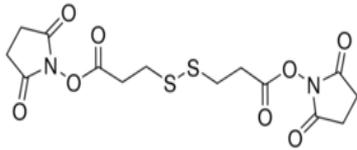
Phosphate-Buffered Saline (PBS) 10X, pH 7.2, 500mL, 10X Concentration, 7.1 to 7.3 pH, 2800 to 3200mOsm/kg Osmolality.

Disolución Piraña:

Solución piraña (70% (v/v) H_2SO_4 (Sigma Aldrich, Ref 258105) 30% (v/v) H_2O_2 (Sigma Aldrich, Ref.216763)).

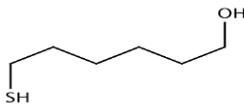
Debe realizarse *in situ*, justo en el momento previo a la realización del ensayo con QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring).

DSP (Ditiobis succinimidyl propionato)



Sigma Aldrich Ref.57757-57

MCH: (6-mercapto-1-hexanol)



Sigma Aldrich Ref. 451088

HS(CH₂)₆OH.

Peso Molecular: 134.24 g/mol

Debido a que se trabaja con concentraciones muy pequeñas, del orden de nanomolaridades, la preparación de las disoluciones es una etapa clave.

Se prepararon disoluciones seriadas de MCH en tampón PBS (x1) y, para ello, se partió de una disolución de MCH (7.00 M), a partir de la cual se preparó una disolución STOCK de concentración 100 mM. A partir de la disolución STOCK, se prepararon, por disoluciones seriadas, una disolución de 500 μM, 200 μM y de 100 μM.

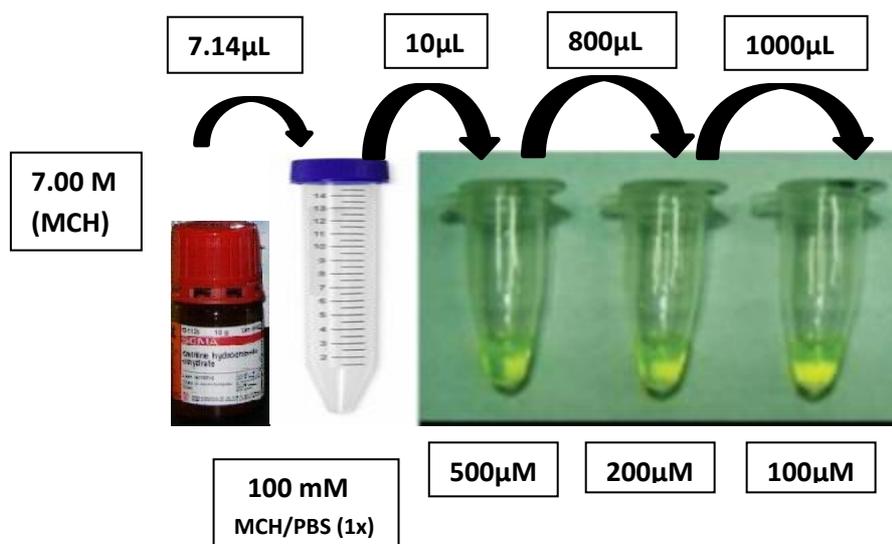


Figura 4. Representación de la preparación de las disoluciones seriadas.

- **Materiales biológicos**

Tenascina C: Proteína purificada humana Tenascina - C

(20nM, 280-300kDa) (Merck Millipore).

Aptámeros:

TTA1, GBI10 y 5TR1:

Aptámeros GBI10 y TTA1 presentan grupos tioles que permiten su inmovilización a el sensor mediante formación de un enlace covalente con el oro.

Ambos aptámeros han sido comprados en la empresa METABION y son específicos para la molécula de Tn-C.

- Aptámero TTA1. Presenta una modificación en 5' (5'-Thio-C3-),de tal forma que tiene la siguiente secuencia:

GGGAGGACGATGCGGAACAATGCACTGTGGCCGTAATGGATGTTTTGCTCCC
TG.

Nº de bases: 55

- GBI10. Nuevamente, presenta una modificación 5',tomando la siguiente secuencia:

CCCAGAGGGAAGACTTTAGGTTCCGGTTCACGTCC

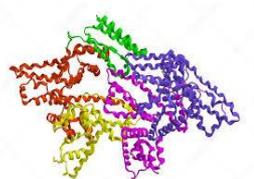
Nº de bases: 34

- 5TR1. También comprado en la empresa METABION.

Tiene la siguiente secuencia:

5'GAAGTGAAAATGACAGAACAACA'3

BSA Proteína de suero bovina.



Sigma Aldrich Ref. 9048-46-8.

Inmunoglobulina A: IgA

Antibodies ABIN 3119782



Inmunoglobulina G: IgG

Procedente de suero humano cedido por el centro de hemoterapia de Valladolid.



4.2 MÉTODOS:

4.2.1 Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring (QCM-D).

El trabajo presentado se basa en el análisis con la QCM-D, de las interacciones entre moléculas inmovilizadas a una superficie de Au y otras moléculas en disolución.

La microbalanza nos permite determinar la masa depositada en la superficie del sensor de oro mediante los cambios de frecuencia de un cristal de cuarzo piezoeléctrico, al ser perturbado por la adición de una pequeña masa.

La medida de frecuencias se hace con gran precisión y de forma sencilla lo que permite medir masas pequeñas. La correlación entre la masa y la frecuencia se obtiene por medio de la ecuación de Sauerbrey (apartado 4.2.1)

Además de medir la frecuencia, f (Hz), también mide la disipación de energía, D ($1E^{-6}$). La disipación es una cantidad adimensional con relación inversa a la frecuencia de resonancia y a la constante de tiempo de descenso (*decay time constant*). Como tal, da una medida cualitativa de la amortización (*damping*) del sistema.

En este trabajo, f y D se midieron a la frecuencia de resonancia fundamental (4,95 MHz), así como a los armónicos 3, 5 y 7 ($i = 3, 5, \text{ y } 7$), dichos armónicos deberán tomar unos determinados valores para saber que los resultados obtenidos son viables.

- Armónico 3 : < 35
- Armónico 5 : < 15
- Armónico 7 : < 10

Se presentan los cambios de frecuencia normalizados $\Delta f = \Delta f_i/i$ y los cambios de disipación $\Delta D = \Delta D_i$.

Los experimentos se realizaron en las siguientes condiciones:

- En un flujo continuo de tampón PBS (1x) con un caudal de $20\mu\text{L } \text{min}^{-1}$, utilizando una bomba peristáltica.
- La temperatura de la plataforma y todas las soluciones se estabilizaron para garantizar una operación estable a 23 °C. Todos los tampones se desgasificaron previamente para evitar la formación de burbujas en el sistema fluido.

- En el caso de películas homogéneas, casi rígidas (para un sensor de 4.95 MHz), los desplazamientos de frecuencia son proporcionales a la absorción de masa por unidad de área (ngcm^2) que se puede deducir de la relación Sauerbrey:

$$m_{QCM} = -C\Delta f$$

Donde la sensibilidad de la masa, c , es igual a $18 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$ en $f_1 = 4.95 \text{ MHz}$.

Debe tenerse en cuenta que si la película está solvatada, la densidad de masa acústica del área de la película estará compuesta por las densidades de masa por área del adsorbato, las partículas, y el disolvente acoplado hidrodinámicamente, el disolvente m_{solvent} :

$$m_{QCM} = m_{\text{ads}} + m_{\text{solvent}}$$

Las sustancias que forman películas de carácter viscoso, por ejemplo aquellas con alto contenido en agua, se deforman durante la oscilación produciendo una disipación elevada, sucediendo lo contrario con las películas rígidas. Por lo tanto, este factor permite determinar cuándo no se puede aplicar la ecuación de Sauerbrey así como realizar un modelado viscoelástico, en su lugar, para conocer las propiedades y la masa depositada, que incluye la masa de disolvente [12, 13]

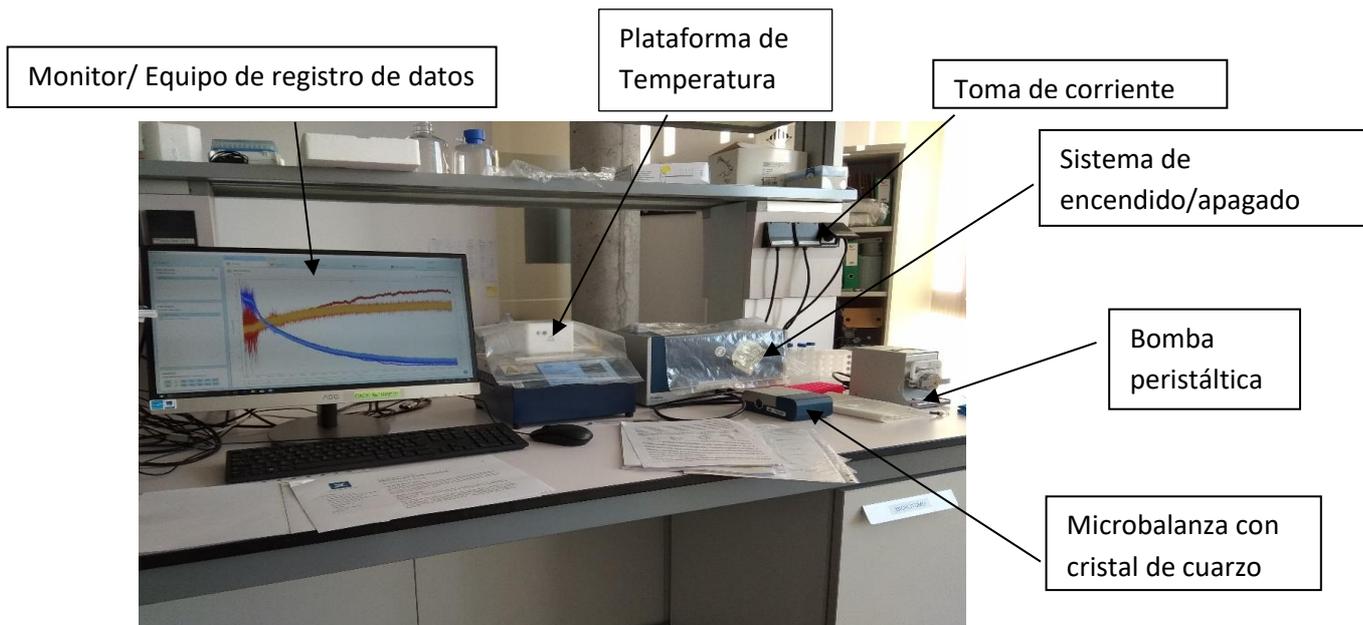


Figura 5. Imagen del equipo “Quartz Crystal Micobalance with Dissipation Monitoring” (QCM-D)

Los datos dados por el equipo son visualizados en el monitor del siguiente modo:

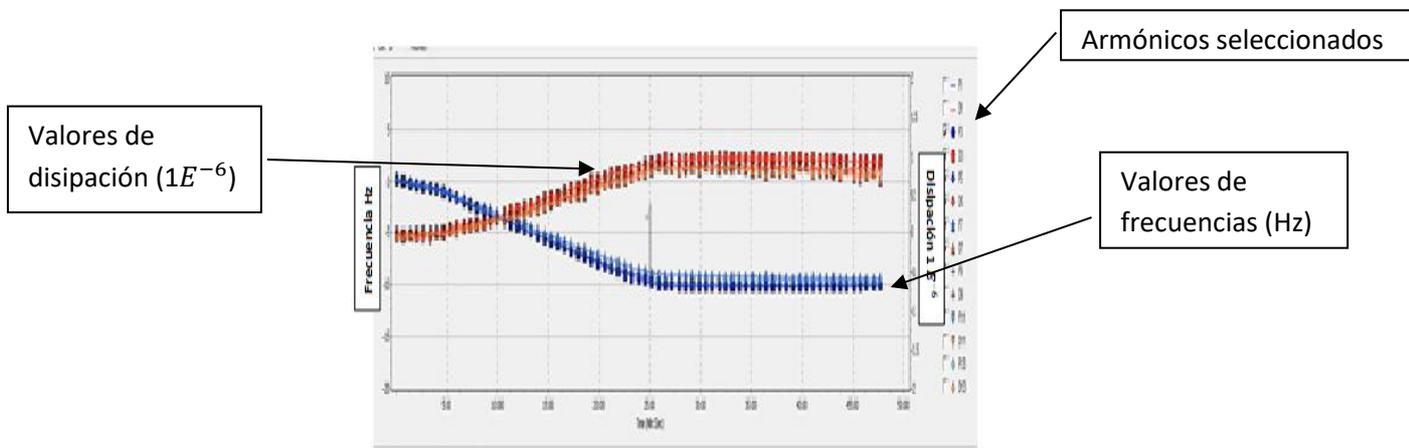


Figura 6. Representación gráfica de los resultados registrados a partir del programa “Q Soft” del equipo QCM-D. La línea azul, se corresponde con los valores de las frecuencias (Hz), mientras que la línea roja se corresponde con los valores de disipación ($1E^{-6}$). Del mismo modo, a la derecha del monitor aparecen hasta 13 armónicos pudiendo ser seleccionados aquellos de interés.

4.2.1.1 Programa Q Sense Dfind

El uso de este programa permite el tratamiento de los datos obtenidos, a partir del software interno del equipo, desde un enfoque cuantitativo, permitiendo conocer los ng depositados por cm^2 de superficie del sensor de Au.

Las herramientas inteligentes de Dfind ofrecen varios métodos de análisis.

Los datos obtenidos a través del equipo QCM-D son exportados al programa Q Sense Dfind permitiendo revisar, modelar y analizar múltiples conjuntos de datos de una sola vez; organizando sus experimentos en proyectos; realizando un seguimiento de las herramientas que se han utilizado y analizando conjuntos de datos simultáneamente o agregando rápidamente nuevos conjuntos de datos después.

Para la modelización hay que tener en cuenta que no todos los modelos se ajustan igual de bien a los valores registrados. No todas las nanocapas originadas presentan las mismas propiedades viscoelásticas.

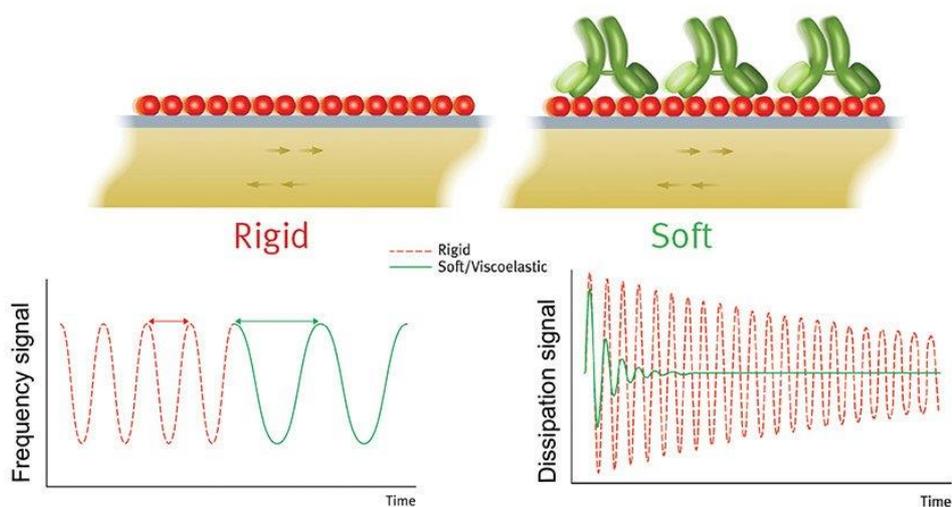


Figura 7. El diagrama superior ilustra cómo la frecuencia de la oscilación del cristal del sensor (oro) cambia cuando la masa aumenta con la adición de una capa molecular. La figura representa cómo los anticuerpos (verde) se agregan a una capa de proteína (rojo). El diagrama inferior ilustra la diferencia en la señal de disipación generada por una capa molecular rígida (roja) y suave (verde) en el sensor cristal.

Cuando las moléculas, (ya sea agua u otro líquido) quedan adsorbidos al cristal de cuarzo oscilante a través de un proceso de hidratación directa, la película adsorbida, se percibe como un viscoelástico, "hidrogel" compuesto por las moléculas y el agua acoplada; de este modo, midiendo la disipación, se puede determinar si el adsorbido es rígido o viscoelástico dependiendo de los valores que se obtengan de X^2 .

Este programa utiliza 3 modelos:

1. Sauerbrey: Aplicable cuando la nanocapa formada presenta rigidez (Valores de disipación ($1E^{-6}$) pequeños o nulos).
 2. Smartfit
 3. Broad Fit
- } Aplicable cuando la nanocapa formada presenta elasticidad

(Los valores que toma la disipación ($1E^{-6}$) son altos)

Al final del modelado, podrán obtenerse los resultados obtenidos en forma de histograma (Figura 8).

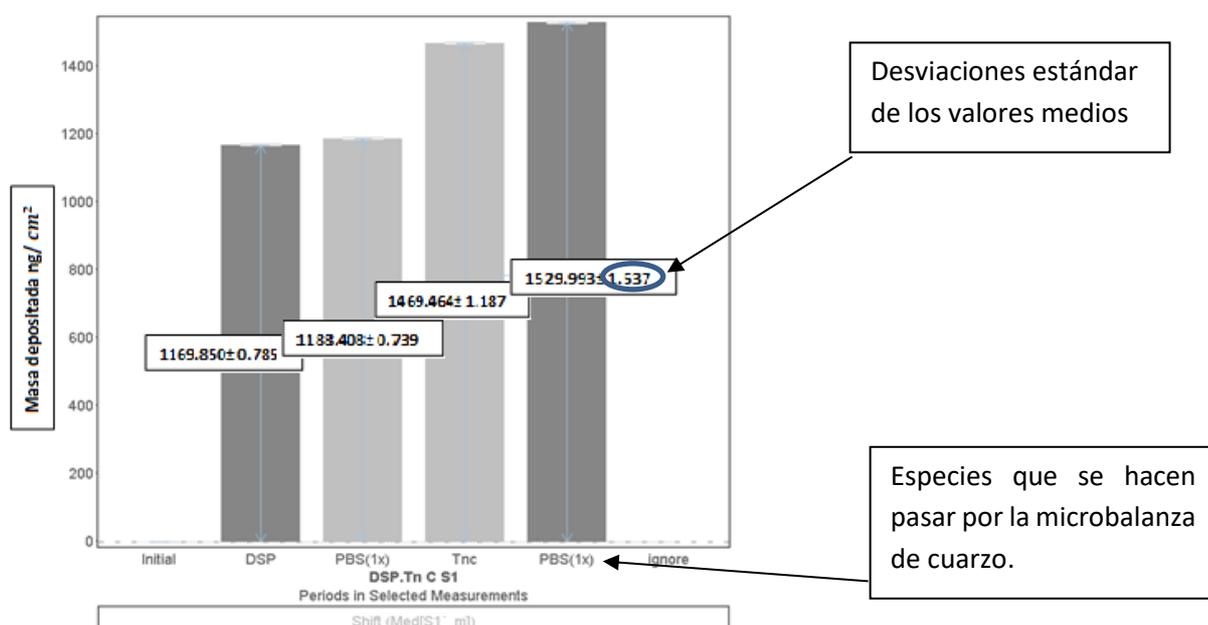


Figura 8. Imagen de un histograma de los resultados obtenidos donde se representa: en el eje de ordenadas, las masa depositada sobre la superficie de sensor de oro en ng/cm^2 y en el eje de abscisas, las distintas especies que puedan formar películas estables.

El resultado de los valores que se obtiene es el valor medio de la masa depositada. Del mismo modo, lleva asociado una desviación estándar, valor que indica cómo de dispersos están los datos con respecto a la media.

4.2.2 Equipo de ICP Plasma de acoplamiento inductivo.

El uso del ICP Plasma de acoplamiento inductivo (Plasma FLOW), es necesario en la etapa de limpieza y activación de la superficie de Au del sensor.

El plasma es lo que se conoce como el cuarto estado de la materia, y es el resultado de la ionización parcial de un gas. Se compone de toda una serie de partículas ionizadas y altamente reactivas, como iones, electrones, fotones, moléculas en estados electrónicos excitados, átomos y especies neutras. Para la obtención del plasma a baja presión, para ionizar el gas de forma cuantitativa y controlada, el proceso se lleva a cabo bajo condiciones de vacío (1 – 0,1 mbar), introduciendo el gas en la cámara de tratamiento e ionizándolo con la ayuda de un generador de alta frecuencia que utiliza la energía de un campo eléctrico.

Dependiendo del tipo de gas ionizado, el plasma muestra una luz brillante de color fluorescente azul (neón), rosa (hidrógeno) o violeta (argón).

Las partículas ionizadas interactúan con las superficies de los sustratos sin dañarlos, ya que la modificación es superficial y sólo afecta a una capa que oscila entre los 10 y 1000 Å. Esta técnica suave, sencilla y eficaz se utiliza para realizar activación, limpieza o polimerización de superficies, de manera controlada y reproducible.

Para llevar a cabo la activación de la superficie del sensor de oro con plasma se deben tener en cuenta una serie de variables, como son la presión de trabajo, la intensidad de la radiofrecuencia administrada, el tiempo de exposición al plasma y el caudal del gas utilizado. Así, el plasma sólo puede permanecer estable en un rango de presiones de trabajo definidas, presiones de trabajo demasiado altas o demasiado bajas conducen a un plasma inestable, lo cual reducirá la eficacia del proceso.

El tiempo de exposición al plasma, de la superficie del sustrato, aumenta su activación, en términos generales; si bien en algunos casos, exposiciones demasiado largas pueden producir sobretratamientos. El tiempo de exposición del sensor al plasma, es un valor que debe de ser optimizado, ya que la interacción del plasma con el sensor hace que éste se vaya desgastando.

Por último, el flujo del gas depende principalmente del volumen de la cámara, del sistema de bombeo y de la presión de operación.

Para la realización de este proyecto se ha utilizado un equipo Harrick Plasma-Cleaner PDC-002 (Figura 9).

La presión de trabajo óptima a la cual se han realizado los sucesivos ensayos, con el objetivo de conseguir un plasma estable, corresponde a valores comprendidos entre 450 y 500 torr, y siendo el tiempo de exposición de la muestra al plasma de 6 minutos.

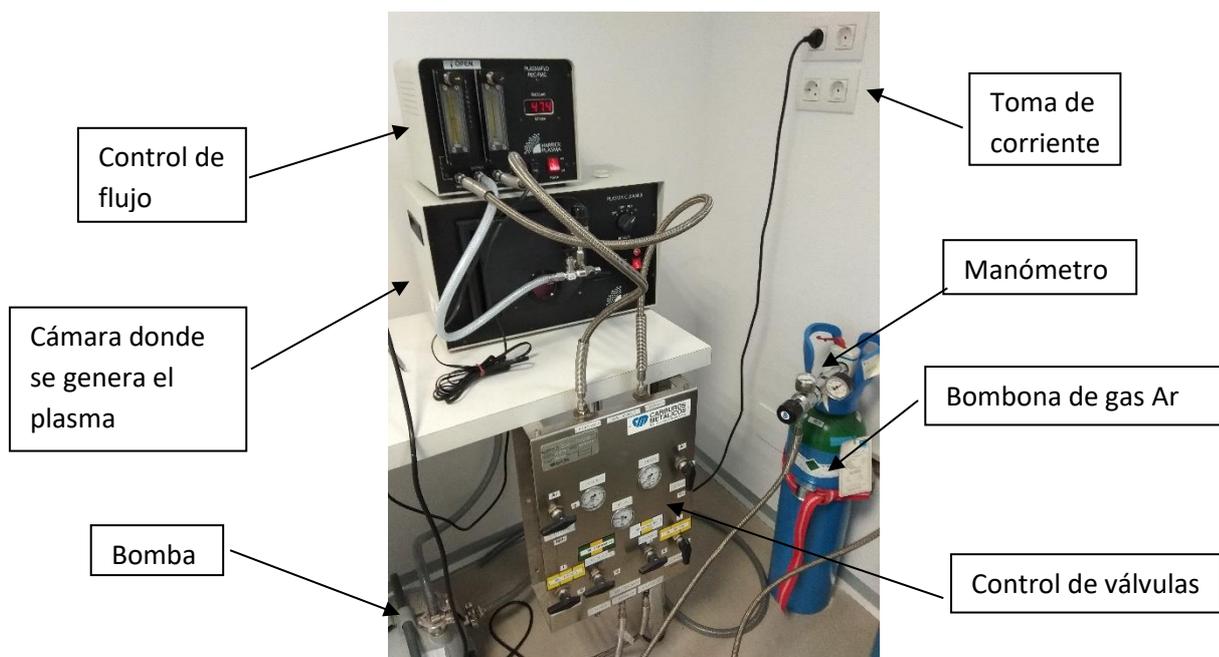


Figura 9: Fotografía de la cámara de generación de plasma flo Harrick Plasma-Cleaner presente en las dependencias del laboratorio de Bioforge.

La presión de trabajo óptima a la cual se han realizado los sucesivos ensayos, con el objetivo de conseguir un plasma estable, corresponde a valores comprendidos entre 450 y 500 torr, y siendo el tiempo de exposición de la muestra al plasma de 6 minutos.

El tiempo de exposición del sensor al plasma, también es un valor que debe de ser optimizado, ya que la interacción del plasma con el sensor hace que éste se vaya desgastando.

4.2.3 Pesada con balanza de precisión

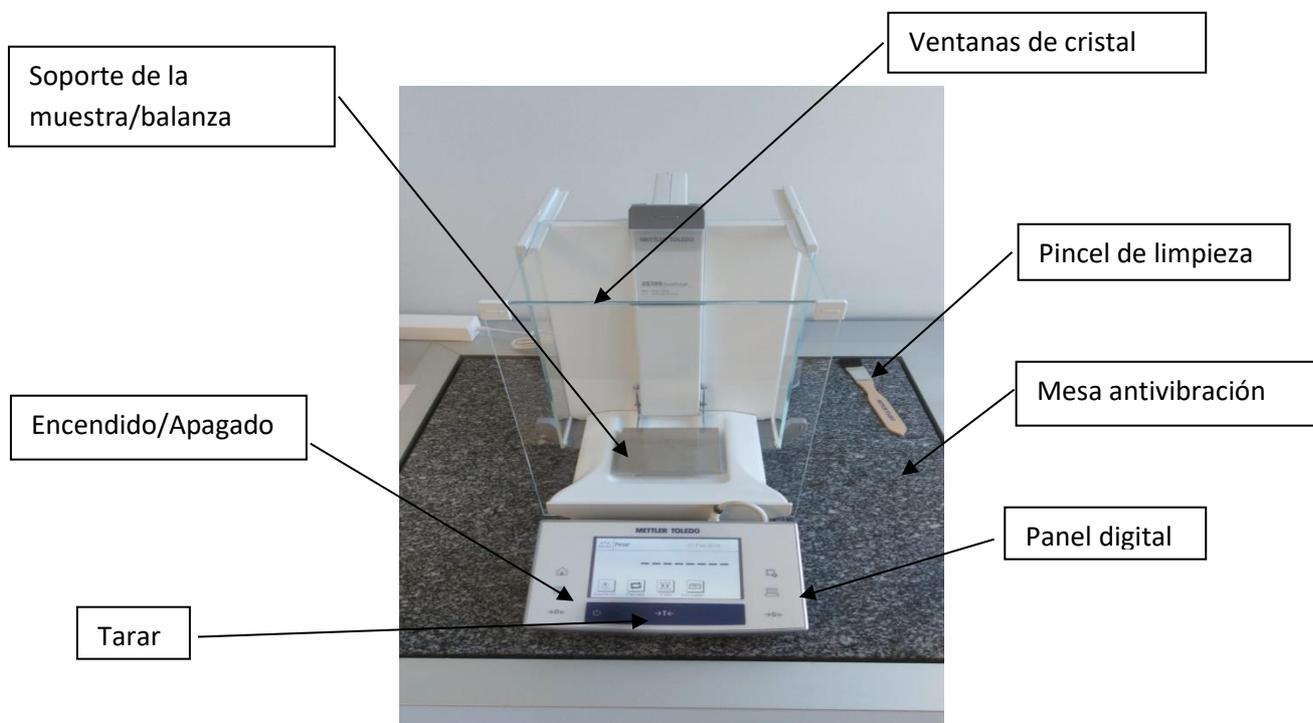


Figura 10. Imagen de una balanza de precisión (Mettler Toledo) presente en las dependencias del laboratorio Bioforge donde se representan las diferentes partes de las que dispone.

Debido a que el desarrollo de este trabajo implica cantidades muy pequeñas, concentraciones del orden de nM, la pesada a la hora de preparar las soluciones con las que se va a trabajar, es una etapa determinante; por ello, las pesadas se realizan en una balanza de precisión con cinco dígitos.

La balanza que se ha utilizado, es una balanza de precisión Mettler Toledo, la cual se encuentra soportada sobre una mesa que impide la vibración, obteniendo de este modo, unos resultados más precisos, sensibles y exactos.

Por otro lado, cuenta con una especie de recubrimiento de cristal a modo de ventanas, que permiten llevar a cabo la pesada de la muestra de interés, protegida de un mayor

5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Puesta a punto del método

5.1.1 Preparación del sensor de Au.

Debido a que se trata de un método con una elevada sensibilidad y precisión y las concentraciones con las que se trabaja son del orden de nanomolaridades la optimización de cada una de las etapas es imprescindible.

En este primer apartado, el objetivo será poner a punto las condiciones óptimas para la limpieza del sensor de Au, así como su activación.

5.1.1.1 Condiciones óptimas de limpieza.

Tal como se ha explicado en métodos, la superficie del sensor se limpió sumergiéndolo en solución piraña (70% (v/v) H_2SO_4 , 30% (v/v) H_2O_2 durante una hora sin agitación (apartado métodos 4.2.2) (Anexo 2). La preparación de la misma se llevó a cabo en una campana de extracción ya que se trata de una reacción muy exotérmica.

El sensor debe de estar completamente sumergido en la disolución, ya que de no ser así, la limpieza no será plena. Transcurrido ese tiempo, se lavó con agua desionizada dos veces durante 5 minutos cada una de ellas y finalmente se procedió a un lavado con etanol diluido en agua desionizada al 98% de pureza, con el objetivo de facilitar la etapa de secado [19].

El secado se llevó a cabo con una corriente de N_2 gas. Una vez limpio y seco se guardó en una placa Petri tapada para evitar la humedad y el polvo.

El proceso de limpieza del sensor es de gran importancia para la obtención de óptimos resultados porque al realizar los primeros ensayos, lo que se observó es que dependiendo del momento en que se llevara a cabo su limpieza, los resultados que se obtenían eran diferentes. Al comenzar con el desarrollo de este trabajo, la limpieza del sensor se llevaba a cabo el día previo al ensayo según las instrucciones de los fabricantes, obteniéndose unos valores de armónicos fuera del rango considerado como aceptables [apartado 4.2.1]. Por el contrario, cuando la limpieza se realizaba en momentos previos a la colocación del sensor en la microbalanza, los resultados que se obtenían eran adecuados. Una posible razón para explicar los resultados anómalos que se obtenían llevando a cabo la limpieza del sensor de Au el día antes a la realización del ensayo con la microbalanza, es que al tratarse de un método especialmente

sensible, pequeñas partículas de polvo podrían ocasionar problemas en los resultados.

5.1.1.2 Condiciones óptimas de activación.

Una vez completada la etapa de limpieza y secado, se procede a la etapa de activación del sensor con un equipo de Plasma Flo PDC – FMG tal y como se ha indicado en Métodos (apartado 4.1) y presente en las dependencias de los laboratorios Bioforge.

El gas usado para generar el plasma fue el Ar, al cual, se le aplica una energía de 1520.6 kJ/mol permitiendo su ionización y la formación del plasma (gas fuertemente ionizado). Los electrones liberados podrán moverse libremente, chocando con la superficie de Au del sensor con la energía suficiente como para completar la etapa de limpieza, rompiendo aquellos enlaces existentes entre las moléculas que se hacen pasar con la superficie del sensor de Au que pudieran permanecer tras la etapa de limpieza con la disolución piraña.

Cada vez que el sensor se somete a plasma, éste pierde masa por lo que, va a tener un tiempo de vida media eficaz. En algunos casos, se han observado modificaciones macroscópicas de la superficie del sensor, debidas a su reutilización y limpieza, pudiéndose establecer un número máximo de usos.

En esta etapa de activación, también hay que hacer hincapié en la limpieza. En el interior del equipo, se dispone de un cristal que actúa como soporte para el sensor, por lo que es conveniente que este, se encuentre perfectamente limpio. Para ello, con unas toallitas especiales que no dejan restos y con etanol de alta pureza diluido en agua desionizada al 70% se limpia el soporte.

Una vez limpio, con un nivel, se coloca el soporte completamente horizontal y se sitúa el sensor sobre este. De este modo, nos aseguramos que el plasma va a incidir de forma homogénea sobre la superficie del sensor de Au. Finalmente, se cierra la puerta se enciende la bomba del vacío y se genera el vacío. Cuando se consigue una presión de aproximadamente entre 500 y 600 mtorr, se genera el plasma y a partir de ese momento se dejará actuar durante 6 minutos.

Una vez finalizadas las etapas de limpieza y activación, el sensor de Au está listo para su utilización en los ensayos con la QCM- D.

5.1.2 Optimización de las condiciones de trabajo con la QCM-D

Es importante establecer las condiciones óptimas con las que se va a trabajar con la QCM-D.

- Temperatura
- Flujo

Basándose en datos bibliográficos, la temperatura a la que se han llevado a cabo los ensayos es de 23 ° C, mientras que el flujo es continuo y de 20 $\mu\text{L/s}$ [19].

Es necesario conocer las concentraciones óptimas de los reactivos / moléculas, que se van a utilizar.

- Relación óptima de MCH / TTA1
- Concentración óptima de Tn-C
- Concentración óptima de los aptámeros 5TR1, TTA1 y GBI10
- Concentración óptima de las inmunoglobulinas IgG e IgA.
- Concentración óptima del DSP
- Concentración óptima de BSA

5.1.2.1 Relación óptima de MCH / TTA1

Las moléculas de aptámero anti-Tenascina TTA1 presentan un plegamiento secundario formando bucles (Figura 11). El objetivo del uso del MCH (6-mercapto-1-hexanol) será recubrir de forma inespecífica los huecos generados por los aptámeros como consecuencia de las posibles repulsiones electrostáticas existentes entre las moléculas, así como evitar los posibles impedimentos estéricos.

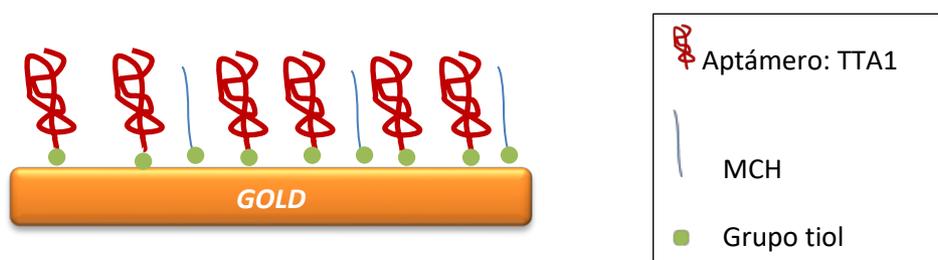


Figura 11. Representación de las moléculas de aptámero TTA1 (estructura secundaria formando bucles) y moléculas de MCH recubriendo de manera inespecífica los huecos generados por las moléculas de TTA1 a través de grupos tiol.

Se prepara en primer lugar 2ml de las soluciones 1:100 y 1:200 de APT /MCH respectivamente.

Una vez hecho el blanco con una disolución de PBS (1x) y comprobando que los armónicos se encontraban dentro de los valores registrados como aceptables mencionados en el apartado de métodos (4.2.1), los 2mL de la mezcla 1:100 APT/MCH se inyectaron a través de un capilar y se bombearon con la ayuda de una bomba peristáltica hacia la cámara que encierra el sensor. El equipo va registrando el proceso, monitorizándose la inmovilización a la superficie del sensor de la mezcla del aptámero TTA1 con la molécula espaciadora MCH. Los 2mL de la mezcla 1:200 se inyectaron seguidamente, siguiendo el mismo procedimiento.

Como el flujo es conocido, 20 $\mu\text{L/s}$, puede calcularse el tiempo muerto de la disolución hasta el sensor siendo este de 6 minutos.

Se observa una disminución de la frecuencias y un aumento de la disipación.



Figura 12. Representación de los valores de frecuencia y disipación obtenidos para una relación 1:100 TTA1 /MCH. La línea roja refleja un aumento de la disipación haciendo referencia a las propiedades viscoelásticas de la nanocapa formada, mientras que la línea azul refleja una disminución de la frecuencia,haciendo referencia a la deposición de masa.

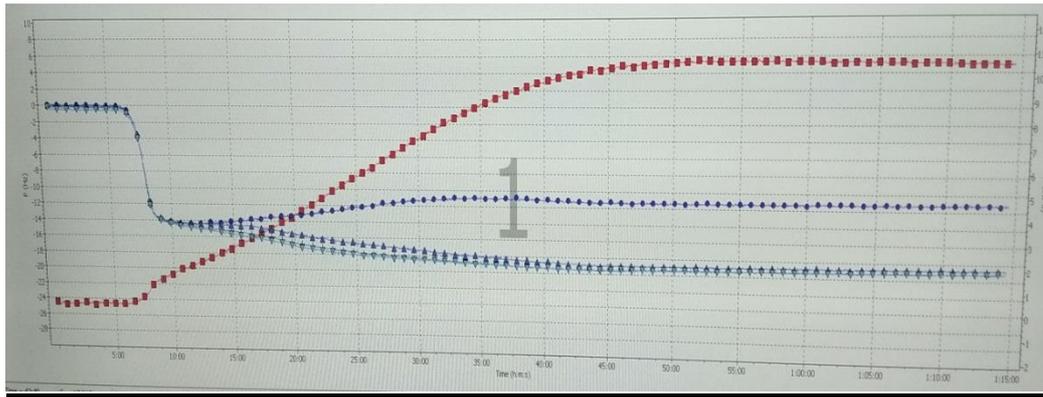


Figura 13. Representación de los valores de frecuencia y disipación obtenidos para una relación 1:200 TTA1 /MCH. La línea roja refleja un aumento de la disipación haciendo referencia a las propiedades viscoelásticas de la nanocapa formada, mientras que la línea azul refleja una disminución de la frecuencia,haciendo referencia a la deposición de masa.

Los valores de frecuencia y disipación obtenidos para ambas relaciones, 1:100 y 1:200 de TTA1 / MCH se muestran en la Tabla 1.

	Frecuencia (Hz)	Disipación ($1E^{-6}$)
Relación 1:100 TTA1 /MCH	-12	+ 0.6
Relación 1:200 TTA1 /MCH	-11	+0.8

Tabla 1. Valores de frecuencia y disipación obtenidos para evaluar las interacciones de las disoluciones de TTA1 /MCH 1:100 y 1:200 con la superficie de Au del sensor.

Los valores de frecuencia obtenidos en ambas situaciones, revelan la existencia de la formación de una nanocapa debida a la interacción establecida entre los grupos tioles de la molécula de MCH y el aptámero TTA1 con la superficie de Au del sensor.

El valor positivo que toma la disipación, una vez estabilizada la nanocapa formada tras el lavado con una solución de PBS (1x) , indica que la película que se ha formado sobre el sensor no es rígida, sino que posee propiedades viscoelásticas, por lo que, cuando se lleve a cabo el modelado de los resultados, no podrá emplearse Sauerbrey., sino que

será necesario evaluar cuál de los otros dos modelos se ajusta mejor a los datos obtenidos: Smat-fit o Broad-fit tal como se ha explicado en Métodos (apartado 4.2.1.1).

La disminución de la frecuencia es algo mayor para el caso de la relación 1: 100 que para la relación 1:200 de TTA1 / MCH, sin embargo, con los valores de la disipación, ocurre de manera inversa, se obtiene un valor mayor para el caso de una relación 1:200 frente a un menor valor para la relación 1:100.

Las moléculas de TTA1 presentan un mayor peso molecular que las moléculas de MCH. El hecho de que la relación 1:100 presente una mayor frecuencia es debido a que se produce una mayor deposición de TTA1 frente a MCH, mientras que la disipación es menor porque la nanocapa originada es más rígida que para la capa que posee más cantidad de MCH (1:200).

5.1.2.2 Evaluación de las masas depositadas de Tenascina-C sobre la capa del aptámero Anti Tenascina-C (TTA1)

Una vez que las moléculas de aptámero se han unido al sensor a través de los grupos tiol tal como se muestra en la Figura 14A, el siguiente paso consiste en la deposición específica de moléculas de Tn-C representadas en la Figura 14B.

Para la evaluación de las masas depositadas de Tn-C se hace uso de las disoluciones utilizadas previamente (apartado 5.1.2.1) y sobre estas, se estudiará lo que ocurre cuando se hacen pasar soluciones de Tn-C de diferentes concentraciones.

La manera de proceder es la siguiente:

Una vez fijado el MCH y el aptámero TTA1 al sensor de Au (soluciones del apartado anterior) ,y tras una etapa de lavado con 2mL de una disolución de PBS (1x), se pasan a través del circuito un volumen de 2 mL de varias disoluciones de Tn-C preparadas en PBS (1x) de concentraciones 1nM, 2nM, 5nM y 20nM. Se bombean en el orden creciente con el objetivo de evitar la saturación de los agentes ligantes.

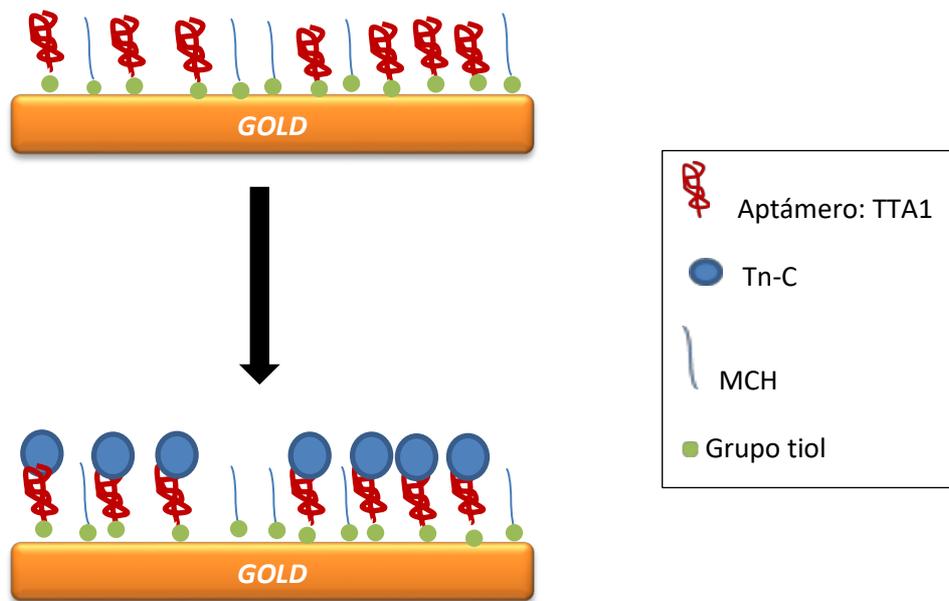


Figura 14. A) Representación de las moléculas de TTA1 y MCH interaccionando a través de sus grupos tioles con la superficie de Au del sensor. B) Representación de las moléculas de Tn-C fijadas de forma específica sobre la nanocapa de TTA1 y MCH.

En la figura 15 se muestra un histograma en el que se representa la masa depositada de la nanocapa originada cuando se hace uso de una relación TTA1 /MCH (1:100) y la masa registrada tras el depósito de las diferentes concentraciones de Tn-C.

Del mismo modo, en la figura 16 se muestra un histograma en el que se representa las masas depositadas de las diferentes concentraciones de Tn-C y la masa depositada de la nanocapa originada cuando se hace uso de una relación TTA1 /MCH (1:200).

Para poder obtener este tipo de representaciones ha sido necesario modelar los datos a través del programa Qsense Dfind (apartado 4.2.1.1), donde a partir de las características y propiedades viscoelásticas que presentan las distintas nanocapas formadas, se hace uso del tipo de modelo más adecuado.

En este caso y como se mencionó en el apartado anterior (apartado 5.1.2.1), debido a los valores obtenidos para la frecuencia, y disipación, se concluyó que la capa originada por la adición de TTA1/MCH no era rígida, por lo que no podía utilizarse el modelo Sauerbrey. Hemos optado por la utilización del modelo Smart-fit, el cual, tiene en cuenta las propiedades viscoelásticas de dicha nanocapa.(apartado 5.1.2.1).

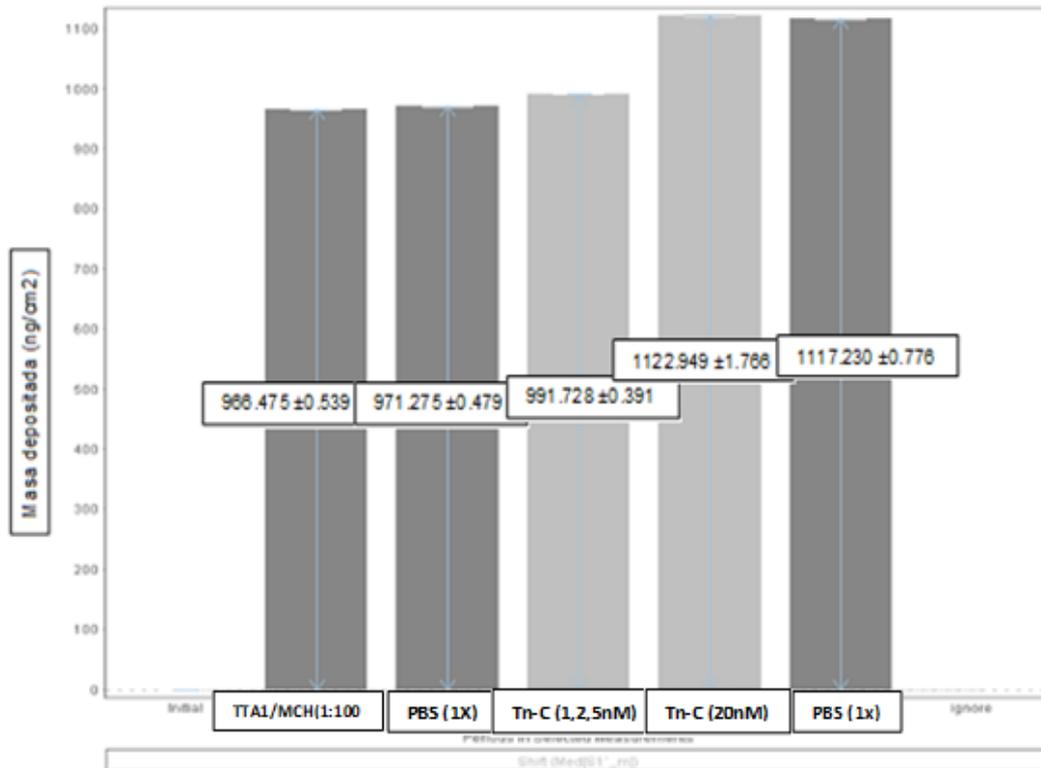


Figura 15. Representación de la masa depositada en ng/cm^2 según se van añadiendo capas al sensor incluyendo una etapa de lavado en PBS (1x) previa al paso de las disoluciones de las distintas concentraciones de Tn-C.

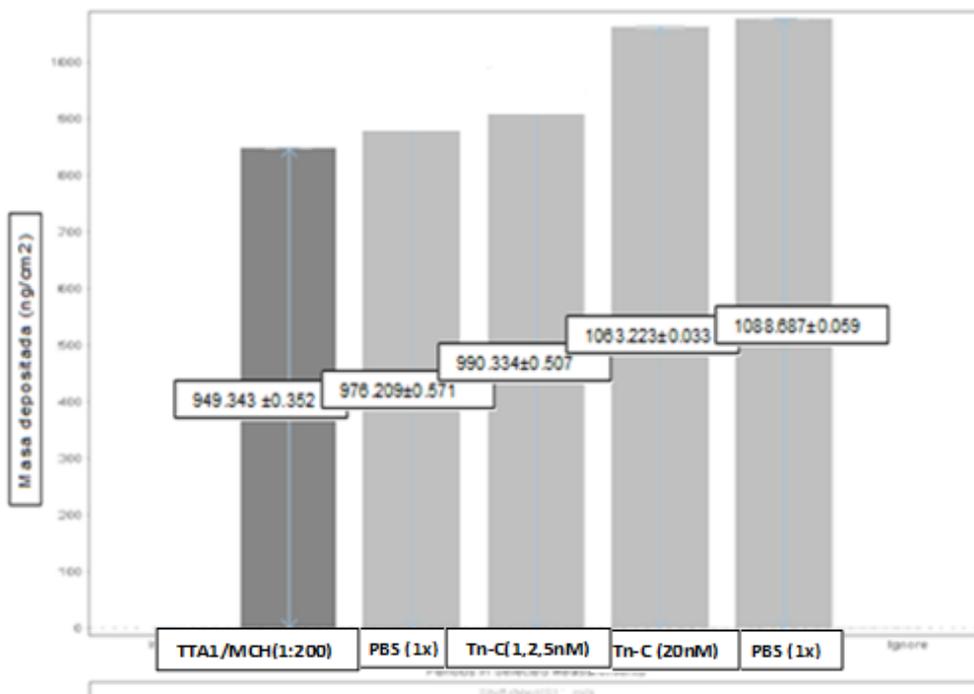


Figura 16. Representación de la masa depositada en ng/cm^2 según se van añadiendo capas al sensor

incluyendo una etapa de lavado en PBS (1x) previa al paso de las disoluciones de las distintas concentraciones de Tn-C.

Teniendo en cuenta los resultados representados en los histogramas de las Figuras 15 y 16, se observa como la masa depositada en cada una de las nanocapas originadas, sigue prácticamente la misma tendencia tanto para una relación 1:100 como para una relación 1:200 de MCH /TTA1.

En la tabla 1 se mostraron los valores de frecuencia de -12 Hz para la relación 1:100 MCH /TTA1 y de -11 Hz para la relación 1:200 MCH/TTA1, cabría suponer un mayor valor de masa depositada, tras la adición de Tn-C, para el caso de la relación 1:100 y efectivamente, esto se corrobora en el histograma, tomando un valor de 966.475 ng/cm^2 frente a 949.342 ng/cm^2 para el caso de una relación 1:200, por lo que se llegó a la conclusión de que en una relación 1:100 de MCH/TTA1 la superficie del sensor de Au ya estaba saturada.

Al evaluar la masa depositada de las distintas concentraciones de Tn-C sobre el sensor de Au funcionalizado con MCH/TTA en una relación 1:100 y 1:200, pudo llegarse a la conclusión que para valores de concentraciones de 1nM, 2nM y 5nM la deposición de masa no es significativa, pero para una concentración de 20 nM hay un cambio notorio tanto para una relación 1:100 MCH/TTA1 como para una relación 1:200 MCH/TTA1, por lo que, de este modo, se optimizó la concentración de Tn-C a 20 nM, considerando que el aumento de masa es suficiente para evaluar adecuadamente las modificaciones de masa depositada.

5.2 Estudio de la especificidad de la interacción entre la molécula de Tenascina C y las moléculas de aptámeros GBI10

El siguiente apartado se centra en el estudio de la especificidad de la interacción entre la molécula de Tn-C y el aptámero GBI10, debido a su posible utilización terapéutica; si bien en este caso será la Tn-C la que forme la nanocapa sobre la que se deposite de manera selectiva el aptámero GBI10.

En la Figura 17 se muestra la unión del sensor funcionalizado con Tn-C al aptámero GBI10 así como la propia unión del aptámero a la superficie de Au del sensor.

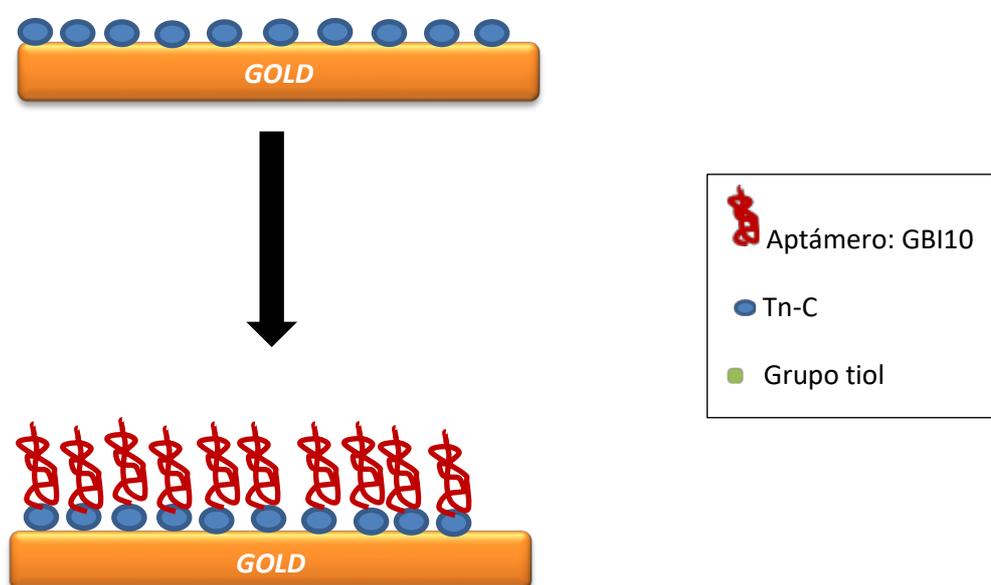


Figura 17: A) Representación de la interacción entre las moléculas de Tn-C con la superficie del sensor de Au a través de los grupos tiol. B) Representación de la interacción específica entre las moléculas de Tn-C y las moléculas de aptámero GBI10 a través de una interacción específica encima- sustrato.

Para el estudio de la especificidad de la unión Tn-C/ GBI10 se utilizó el aptámero 5TR1 como control negativo (apartado 4.1), ya que no debería interaccionar con las moléculas de Tn-C que recubren la superficie del sensor de Au por ser específico de mucinas. De esta manera, si posteriormente se comprobase una interacción entre Tn-C/ GBI10, se podría justificar que la interacción es específica (si previamente comprobamos la no interacción con el aptámero 5TR1).

El experimento comienza según el protocolo (Anexo 1), efectuando un blanco con el sensor de Au y comprobando que los armónicos se encuentran dentro de los valores registrados como aceptables (apartado 4.1.2.2). Posteriormente se hace pasar un volumen de 2 mL de una disolución de Tn-C 20nM, en PBS (1x), la cual tarda en llegar a la celda aproximadamente 7 minutos siendo el flujo de aspiración de 20 μ L/s, formándose una película estable tras el lavado con 2mL de una solución de PBS(1X) que queda registrada en el monitor a través de una disminución de la frecuencia hasta valores de -10 Hz, y un aumento en la disipación hasta valores de +1 ($1E^{-6}$), tal como se observa en Figura 18. La capa se forma por interacción covalente entre los grupos tioles de la Tn-C y la superficie de Au del sensor.

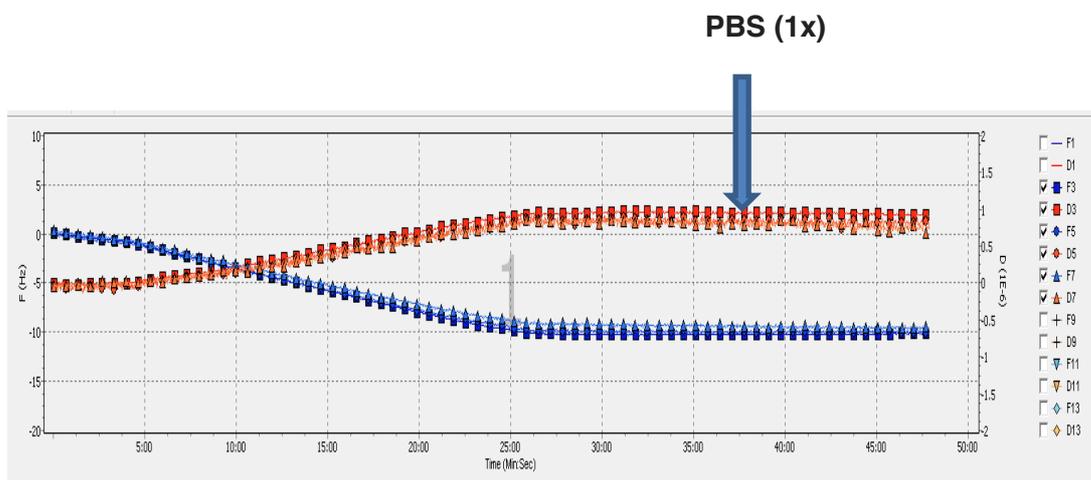


Figura 18. Representación de la disminución en los valores de frecuencia (Hz) y aumento de la disipación ($1E^{-6}$) registrados por el equipo QCM-D cuando se hace pasar una disolución de Tn-C 20nM y posterior lavado con una solución de PBS (1X) indicando la formación de una película estable.

El siguiente paso consistió en comprobar si el aptámero 5TR1 interaccionaba (de manera no específica) con la monocapa de Tn-C, para lo cual se hizo pasar un volumen de 2 mL de una solución del aptámero 5TR1 (10 μ M) en PBS (1x) sobre el sensor funcionalizado con la Tn-C (20nM); tardando aproximadamente 5 minutos en llegar a la celda, siendo en flujo de 20 μ L/s, donde se encontraba el sensor de Au. Tal como se puede observar en la Figura 19, no se produjeron cambios significativos en los valores de las frecuencias ni en las disipaciones, lo que demostró que no había interacción

existente entre la Tn-C y el aptámero 5TR1 tal como era de esperar, pudiendo considerar que la superficie del sensor de Au estaba saturada de moléculas de Tn-C, ya que de no ser así, se podrían haber establecido interacciones a través de los grupos tiol del aptámero 5TR1 con la superficie del sensor de Au. Sin embargo; no se observaron cambios ni en los valores de la frecuencia ni la disipación. Seguidamente, se lavó con un volumen de 2mL de PBS (1x) con el fin de eliminar aquellas moléculas que no hubieran interaccionado.

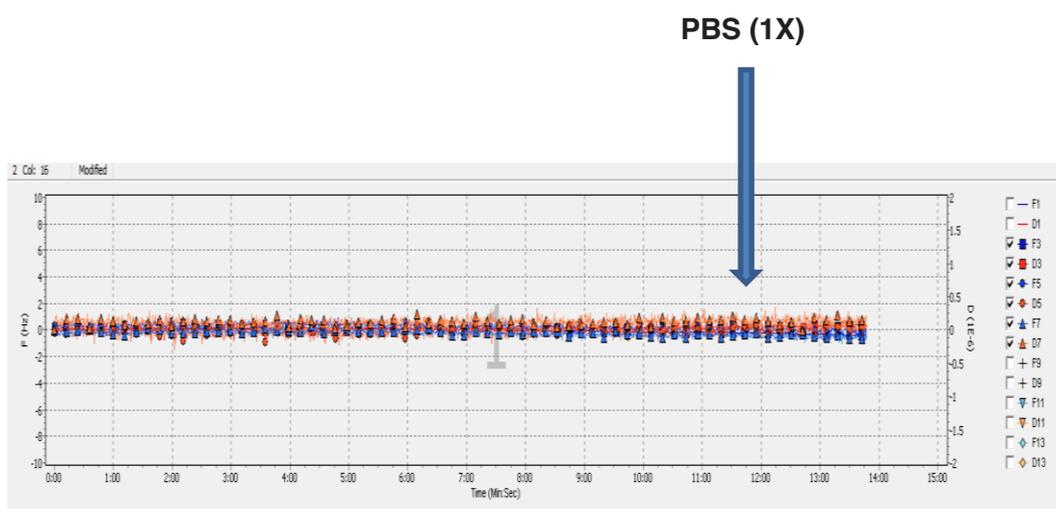


Figura 19. Representación de los valores de la frecuencia y de la disipación registrados por el equipo QCM-D cuando se hace pasar una disolución 10 μ M de aptámero 5TR1 y posterior lavado con una solución de PBS (1X).

A continuación se procedió a evaluar la interacción entre el aptámero GBI10 y la Tn-C. Para ello se pasó un volumen de 2 mL de una disolución del aptámero GBI10 (10 μ M), formándose una película que quedó registrada por el equipo (Figura 20). Los cambios registrados de las frecuencias y disipaciones de dicha película fueron de -15Hz y +2 (1E⁻⁶) respectivamente (Figura 20). Seguidamente se lavó con una disolución de PBS (1x) con el fin de eliminar las moléculas de GBI10 que no hubieran interaccionado específicamente, observándose que permanecían constantes tanto los valores de frecuencia como los de disipación, lo que demuestra una interacción fuerte específica entre ambos GBI10/Tn-C.

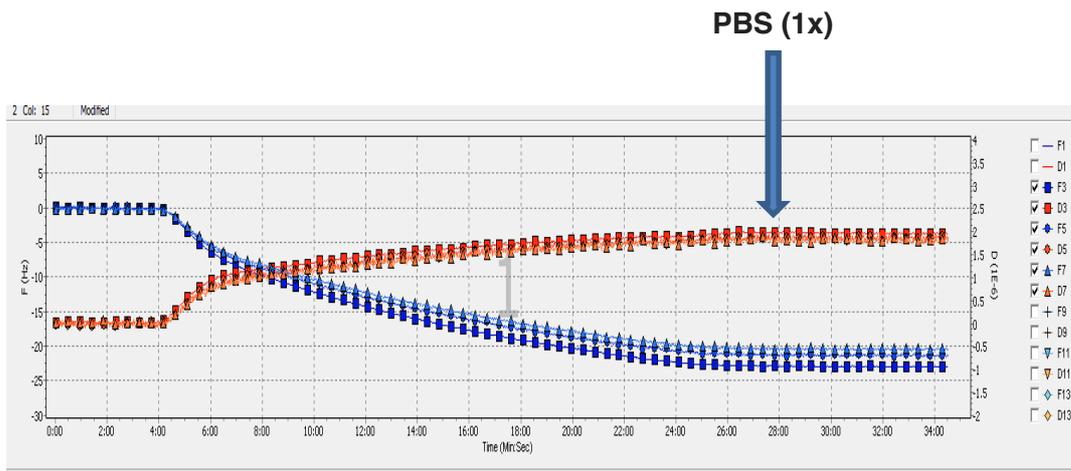


Figura 20. Representación de los valores de la frecuencia y de la disipación registrados por el equipo QCM-D cuando se hace pasar una disolución $10\mu\text{M}$ del aptámero GBI10 y posterior lavado con PBS (1x), indicando la formación de una película estable.

El siguiente paso realizado consistió en hacer pasar sobre el sensor funcionalizado con Tn-C y unido al aptámero GBI10, un volumen de 2mL de una solución del aptámero TTA1, que también se une a Tn-C, a una concentración de ($10\mu\text{M}$). En la Figura 21 se muestra el resultado, no produciéndose cambios significantes ni en la frecuencia ni en la disipación.

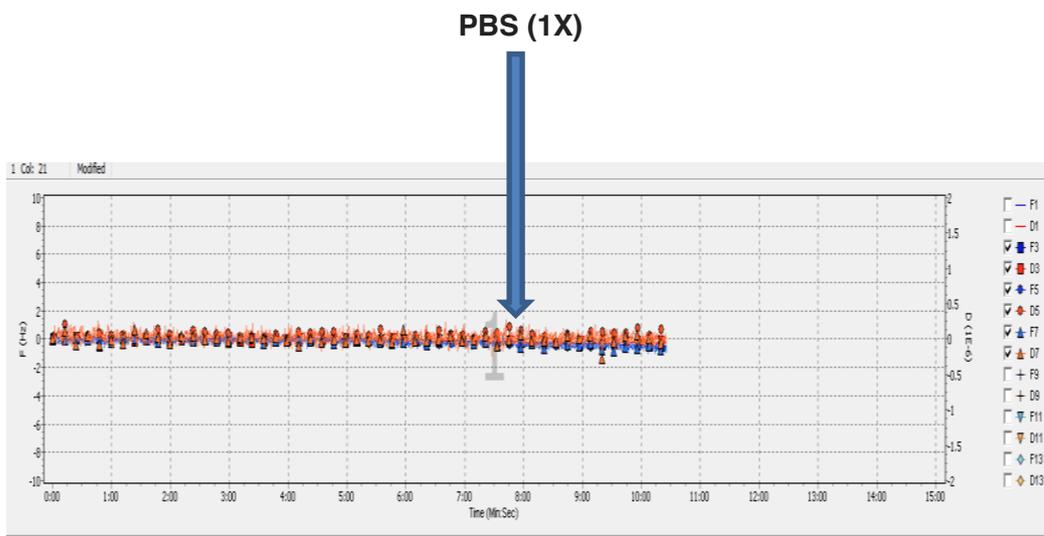


Figura 21. Representación de los valores de la frecuencia y de la disipación registrados por el equipo QCM-D al hacer pasar una disolución $10\mu\text{M}$ del aptámero TTA1 sobre el sensor funcionalizado con Tn-C y unido al aptámero GBI10 .

El resultado mostrado en la Figura 21 puede ser debido a la existencia de competencia entre ambos aptámeros debido a la diferencia de carga.

El análisis de los resultados se realizó con el software Q sense Dfind (apartado 5.1.1). Para ello, hemos considerado los armónicos tercero, quinto y séptimo ($n = 3, 5, 7$); se descartó la frecuencia fundamental debido a que es más inestable, y se ignoraron armónicos superiores porque su área de sensibilidad es inferior [19].

Teniendo en cuenta los análisis, se representó un histograma (Figura 22) mostrando la masa depositada en cada una de las nanocapas originadas en las distintas etapas de deposición de material sobre la superficie de Au del sensor.

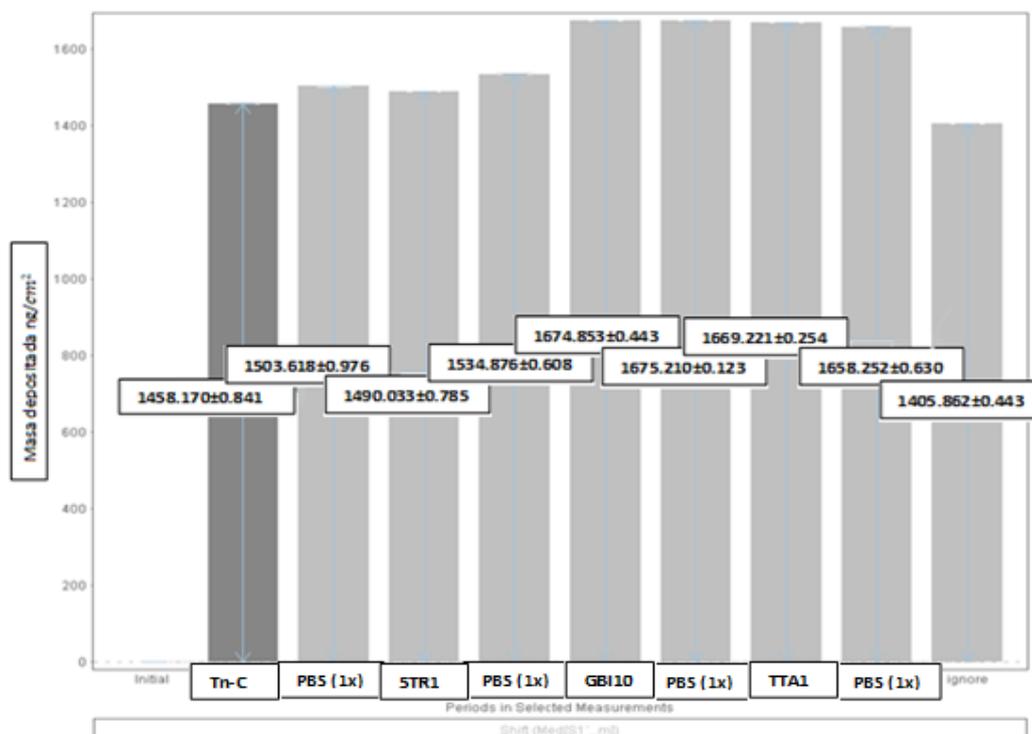


Figura 22. Representación de la masa depositada en ng/cm^2 según se van añadiendo capas al sensor, incluyendo cuatro etapas de lavado con PBS (1x).

Puede calcularse el valor de masa depositada en ng/cm^2 en cada una de las nuevas nanocapas originadas, restando el valor de cada una de ellas, frente al valor de la nanocapa previa. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

	Tenascina c	5TR1	GBI10	TTA1
ng/cm ²	1458.170	± 0	139.977	± 0

Tabla 2. Resultados en ng/cm² de las nanocapas formadas de Tn-C y GBI10.

De estos resultados se deduce que se ha formado una película estable de Tn-C sobre la superficie desnuda del sensor de Au. No se deposita el aptámero 5TR1 sobre dicha capa de Tn-C, mientras que sí se forma una nanocapa estable de moléculas de aptámero GBI10 sobre la capa previa de Tn-C. Este resultado muestra la unión específica de este aptámero GBI10 a la Tn-C, mientras que la unión no específica queda descartada cuando se comprueba la no adsorción del aptámero 5TR1 (control negativo). Por otra parte, la unión del aptámero GBI10 a la Tn-C bloquea la posible unión del aptámero TTA1; sin embargo, para abordar el tema de la especificidad será necesario realizar otro ensayo.

5.3 Estudio de la ausencia de la especificidad en la interacción entre la IgA con las moléculas de aptámeros GBI10 y TTA1.

El objetivo de este ensayo es demostrar la especificidad de la interacción entre la Tn-C y los aptámeros TTA1 y GBI10. Para ello, se efectúa un ensayo de control negativo en el que se formará una nanocapa con una molécula como la Ig A, de peso similar a la Tn-C (300KD), pero que no tiene posibilidad de interaccionar de manera específica con dichos aptámeros TTA1 y GBI10.

Del mismo modo, se utilizará como segundo control negativo, el aptámero 5TR1, ya utilizado previamente en el ensayo anterior, el cual interacciona de manera específica con las mucinas y, por lo tanto, lo que cabría esperar es que al igual que no interaccionaba con la Tn-C, tampoco lo haga con la Ig A.

Debe destacarse que en este apartado se estudiará la unión de las moléculas de Ig A sobre la superficie del sensor de Au recubierta de grupos succinimidil propionatos grafeados a la superficie por enlace Au-S. Estas superficies se preparan a partir de moléculas de Ditiobis(succinimidilpropionato), DSP; las cuales se unen a través de enlace tiolato-Au cuando se ponen en contacto con la superficie de Au, previa ruptura del enlace disulfuro y en un proceso dirigido por la elevada energía liberada de la unión tiolato-Au (50 Kcal/mol) (Figura 23). Este tipo de monocapas actúan como “atrapadores”

de proteínas debido a la presencia de los grupos NHS-éster capaces de reaccionar con los grupos amino presentes en la Ig A.

La reacción de amidación utiliza los grupos amino de la Ig A como nucleófilos que atacan al grupo ester, en una reacción de amidación favorecida por la activación del derivado carboxílico y la eliminación de un buen grupo saliente. (Figura 23).

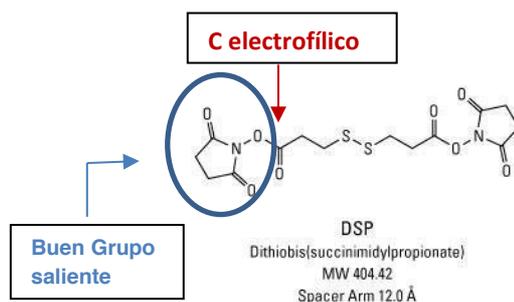


Figura 23. Ataque electrofílico del grupo amino de la Ig A al carbono electrofílico del DSP.

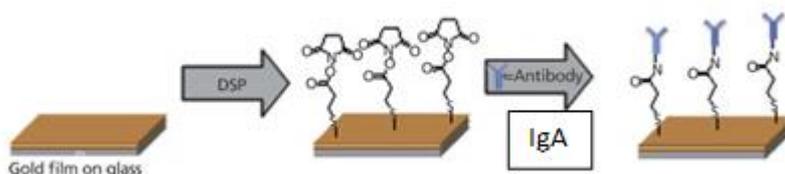


Figura 24. Reacción de amidación del grupo amino de la IgA sobre el grupo éster del DSP.

En este experimento, una vez hecho el blanco y comprobando que los armónicos se encontraban dentro de los valores registrados como aceptables, se hizo pasar una solución de DSP en PBS (1x), la cual tardó en llegar aproximadamente 6 minutos siendo el flujo de $20\mu\text{L}/\text{s}$, formándose una película estable, donde se midieron los cambios en la frecuencia y en la disipación producidos, obteniéndose unos valores de -8 Hz y $+1$ ($1E^{-6}$), respectivamente (Figura 25). A continuación se pasó una solución de lavado de PBS (1x), no observándose variación ni en la frecuencia ni en la disipación, lo que determinó la formación de la monocapa estable a través de la unión covalente de los tiolatos al Au.

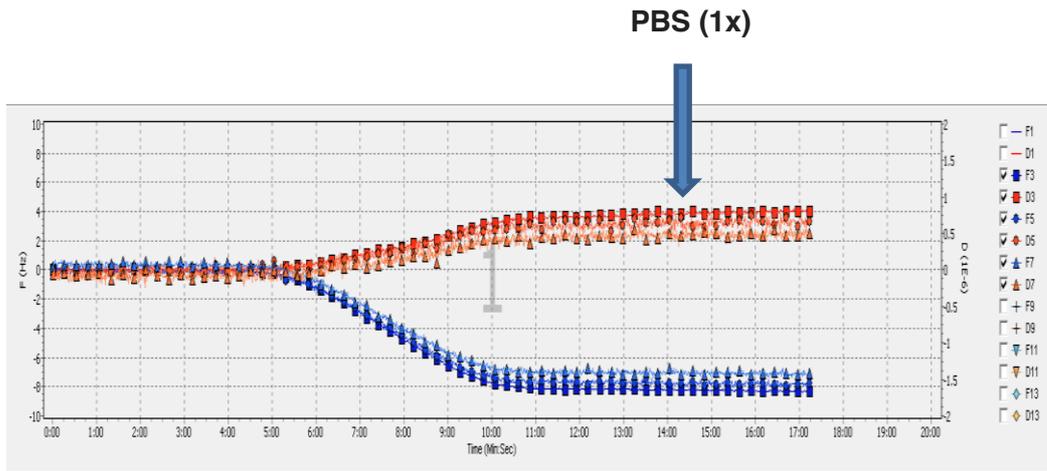


Figura 25. Representación de la disminución de la frecuencia en Hz y el aumento de la disipación ($1E^{-6}$) registrados por el equipo QCM-D al pasar una disolución de DSP y posterior lavado con una solución de PBS (1X), indicando la formación de una película estable.

Seguidamente se pasó una solución de IgA (20nM), la muestra tardó aproximadamente 6 minutos en llegar, formando una nanocapa estable; pudiéndose medir de este modo los cambios de frecuencia y disipación originados, obteniéndose unos valores de -60Hz y +5 ($1E^{-6}$) (Figura 26). Una vez formada la capa, se lava con una solución PBS (1x), no observándose cambios significativos ni para las frecuencias ni para las disipaciones, lo que muestra la estabilidad de dicha capa

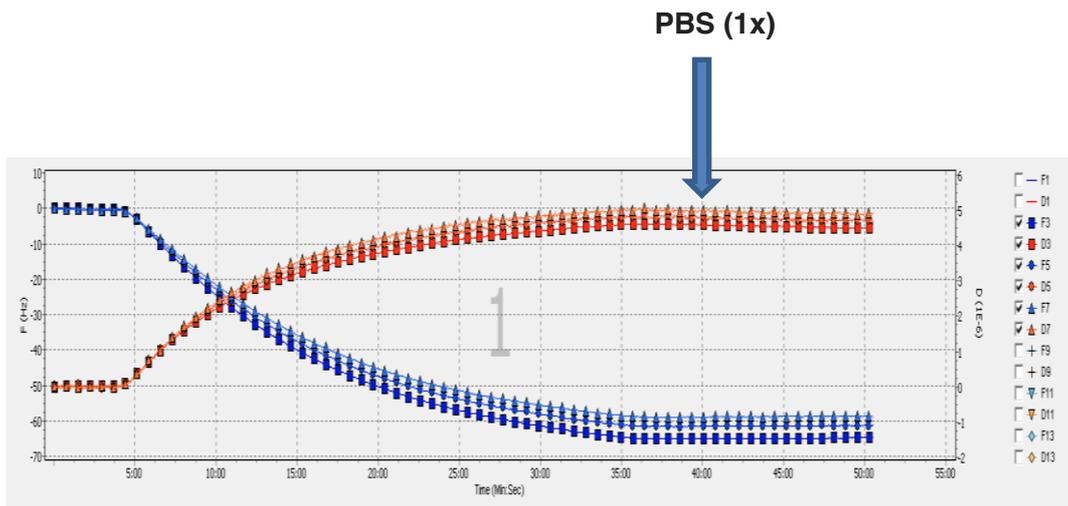


Figura 26. Representación de la disminución de la frecuencia en Hz y el aumento de la disipación ($1E^{-6}$) cuando se hace pasar una disolución de IgA (20nM), indicando la formación de una película estable.

A continuación, se hizo pasar una solución de 5TR1 ($10\mu\text{M}$), actuando como control negativo, sobre el sensor funcionalizado con la IgA (20nM); tardando aproximadamente 5 minutos en llegar, y no apreciándose cambios significativos ni en las frecuencias ni en las disipaciones, es decir, no hay existencia de interacción específica entre la Tn-C y el aptámero 5TR1, ni se deposita de manera inespecífica. Al igual que en las etapas anteriores, se pasó una solución de PBS (1x) de lavado, no observándose ningún cambio significativo ni en las frecuencias ni en la disipación, con objeto de eliminar las moléculas de 5TR1 que hubieran podido quedar en las proximidades.

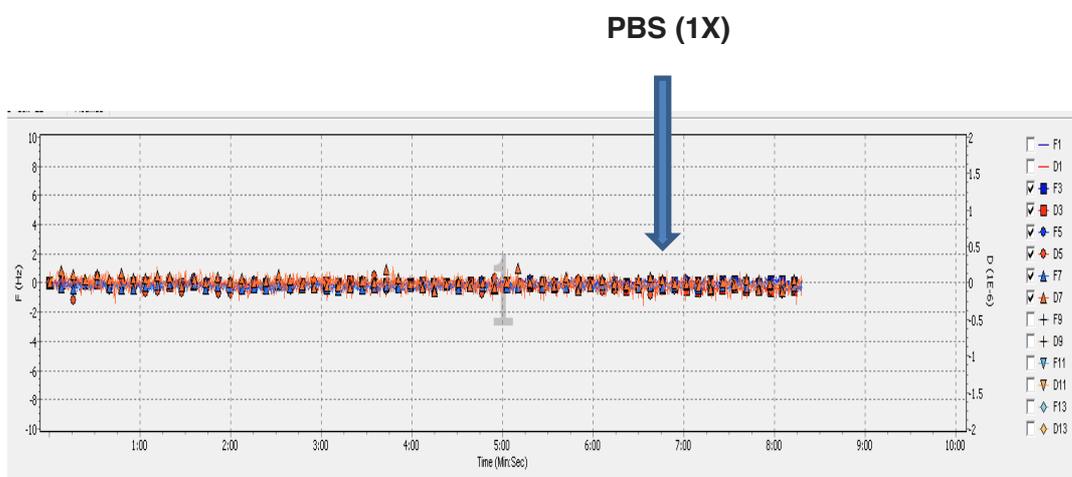


Figura 27. Representación de los valores tomados para la frecuencia (Hz) y la disipación ($1E^{-6}$) registrados por el equipo QCM-D cuando se hace pasar una disolución de 5TR1 ($10\mu\text{M}$) y posterior lavado con una solución de PBS (1X).

Finalmente, se procedió a evaluar la interacción del aptámero GBI10 con la inmunoglobulina A, IgA, y para ello, se hizo pasar una solución de dicho aptámero con una concentración ($10\mu\text{M}$) sobre la superficie previamente recubierta de IgA, no apreciándose cambios significativos ni en los valores de frecuencia ni en los de la disipación. Al igual que en el resto de etapas, se pasó una solución de PBS (1X) con el objetivo de arrastrar todas aquellas moléculas que no hubieran interactuado.

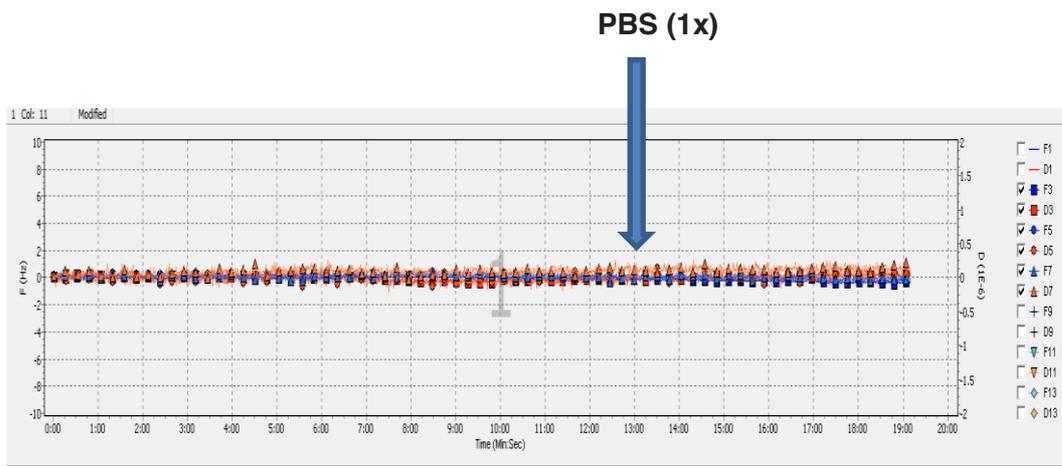


Figura 28. Representación de los valores tomados para la frecuencia (Hz) y la disipación ($1E^{-6}$) cuando se hace pasar una disolución de GBI10 ($10\mu\text{M}$), y posterior lavado con una disolución de PBS (1X).

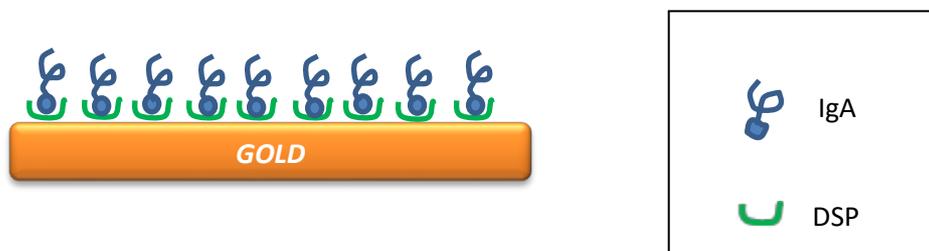


Figura 29. Interacción establecida entre los grupos amino de las moléculas Ig A con los carbonos electrofílicos del NHS-éster, el cual se encuentra recubriendo la superficie desnuda de Au.

El análisis de los resultados se realizó con el software Q sense Dfind (apartado 5.1.1) considerando los armónicos tercero, quinto y séptimo ($n = 3, 5, 7$). Se descartó la frecuencia fundamental debido a que es más inestable y se ignoraron armónicos superiores porque su área de sensibilidad es inferior [19].

A continuación, se representa un histograma con la masa total depositada hasta cada una de las nanocapas originadas sobre la superficie de Au del sensor (figura 30).

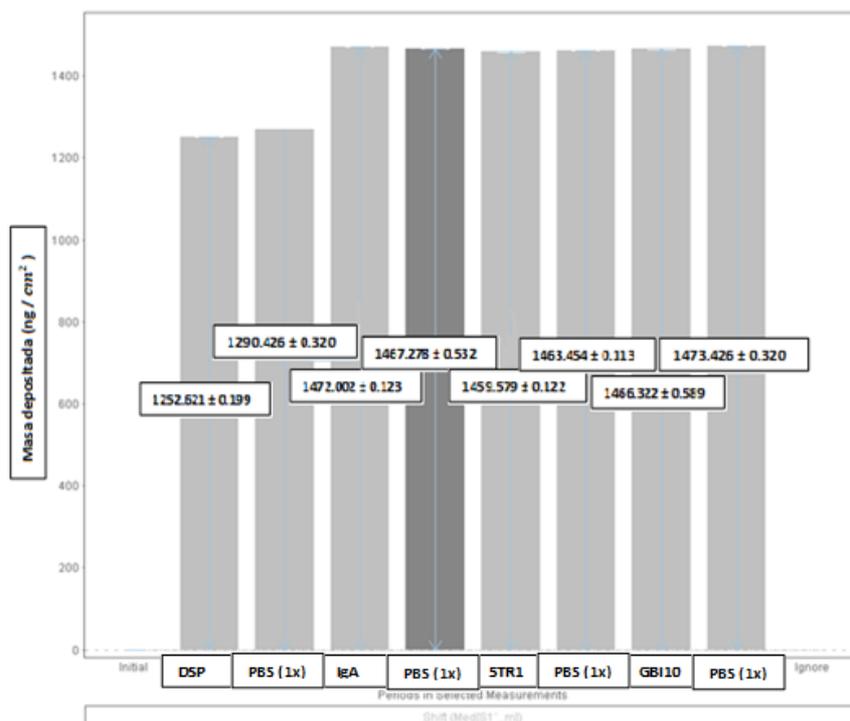


Figura 30. Representación de la masa depositada en ng/cm^2 según se van añadiendo capas al sensor incluyendo cuatro etapas de lavado con PBS (1x).

De este modo, puede conocerse el valor de masa depositada en ng/cm^2 de cada una de las nanocapas originadas, restando el valor de cada una de ellas, frente al valor de la nanocapa previa.

	DSP	IgA	5TR1	GBI10
ng/cm^2	1252.621	181.576	±0	±0

Tabla 3. Resultados en ng/cm^2 de las nanocapas formadas a partir de DSP e IgA.

El valor de masa depositada en ng/cm^2 de IgA sobre la nanocapa de NHS-éster que se encuentra interaccionando con la superficie desnuda del sensor de oro es de 181.576 ng/cm^2 de superficie del sensor.

Por otro lado, en el apartado anterior, se formaba una nanocapa estable de Tn-C de 1458.170 ng/cm^2 ; sin embargo, en este experimento la capa que se deposita de IgA (que estaría actuando como la Tn-C del ensayo anterior, la cual interaccionaba directamente sobre el oro), es de 181.576 ng/cm^2 , por lo que, se obtiene una mayor

interacción entre la Tn-C y la superficie desnuda del sensor de manera directa, sin hacer uso del DSP.

5.4 Interpretación de la interacción entre el DSP con las moléculas de BSA, IgG y Tn-C.

Finalmente, en este último apartado se estudia la interacción existente entre las moléculas de la capa formada a partir de la unión al Au de DSP, con otras moléculas de distintos pesos moleculares como son: la BSA (Proteína de suero bovina, 66KD), la IgG (Inmunoglobulina G, 150 KDa) y la Tn-C (280-300 KDa).

El DSP, al unirse al Au a través de los grupos tiol, genera una nanocapa estable de moléculas que actúan como “atrapadoras” de proteínas. Lo que se va a estudiar en este apartado es cómo varía la masa depositada en las nanocapas formadas en función del peso molecular de las moléculas.

Para los tres ensayos el modo de proceder fue el mismo:

Una vez hecho el blanco y comprobando que los armónicos se encontraban dentro de los valores registrados como aceptables, se procedió a su análisis.

En primer lugar, se hizo pasar una solución de DSP en PBS (1x), la cual tardó en llegar aproximadamente 6 minutos, siendo el flujo de 20 μ L, y formándose una película estable, donde se midieron los cambios en la frecuencia y en la disipación producidos, obteniéndose unos valores de aproximadamente -10 Hz y +1.5 ($1E^{-6}$), respectivamente, tras el paso de 2mL una solución de PBS (1X) como etapa de lavado. En una segunda etapa, sobre el sensor funcionalizado con DSP se procedió a evaluar la interacción con las moléculas de BSA, IgG y Tn-C, obteniéndose los siguientes resultados:

5.4.1 Interpretación de la interacción entre el DSP y la BSA (66KDa).

Sobre la superficie del sensor de Au funcionalizada con DSP, se hicieron pasar 2mL de una solución de BSA (10 μ M); y tras la etapa de lavado con PBS (1X) se obtuvo una nanocapa estable, pudiéndose medir los cambios de frecuencia y disipación originados, obteniéndose unos valores de -24Hz y +1.4 ($1E^{-6}$) respectivamente.

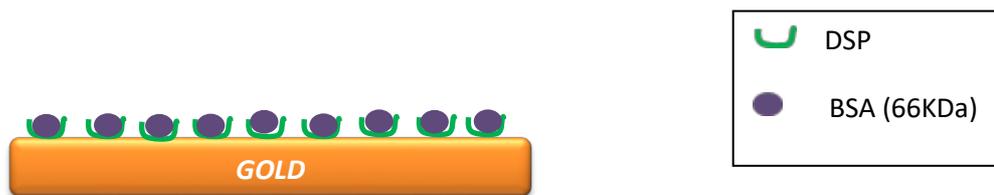


Figura 31. Interacción establecida entre la BSA (66KDa) y la superficie del sensor de Au funcionalizada con DSP.

Teniendo en cuenta esto, a continuación se representó en un histograma los ng/cm^2 depositados de cada una de las nanocapas originadas sobre la superficie de Au del sensor.

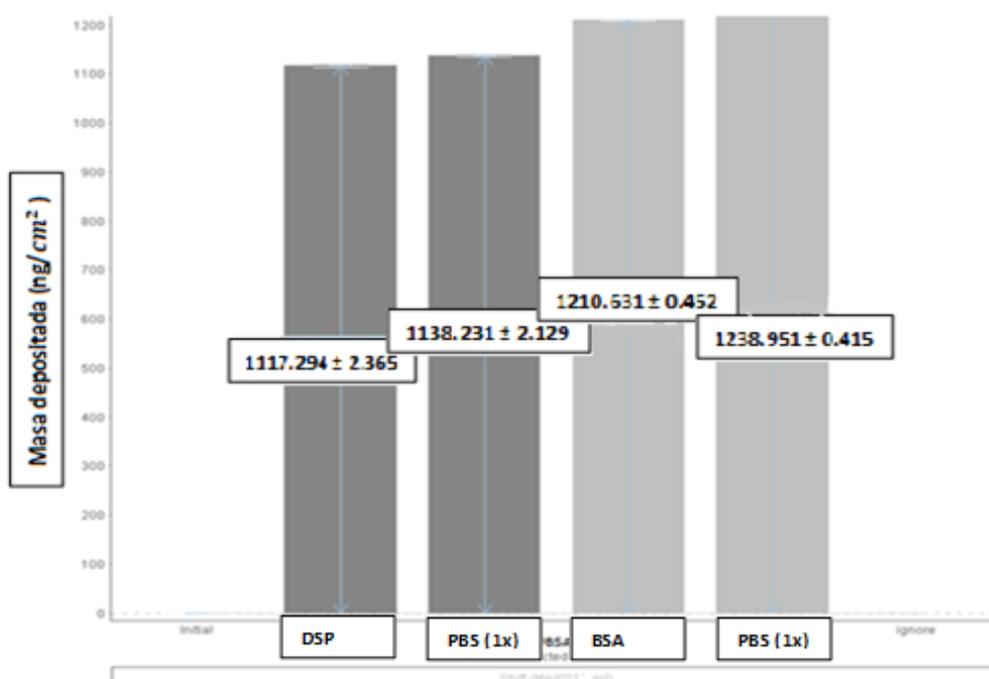


Figura 32. Representación en ng/cm^2 de las nanocapas originadas de DSP y BSA (66KDa) sobre la superficie del sensor de Au.

De este modo, pudo conocerse el valor de masa depositada en ng/cm^2 de BSA, al restar el valor obtenido para la misma del valor obtenido una vez lavada la capa de DSP con PBS (1x).

	DSP	BSA
ng / cm^2	1117.294	72.300

Tabla 4. Resultados en ng/cm^2 de las nanocapas formadas de DSP y BSA sobre la superficie del sensor de Au.

5.4.2 Interpretación de la interacción entre el DSP y la IgG (150KDa).

Se pasaron 2 mL de una solución de IgG ($10\mu\text{M}$) en PBS (1x) sobre la superficie de Au. La muestra tardó aproximadamente 7 minutos en formar una nanocapa estable tras una etapa de lavado con una solución de PBS (1X), pudiéndose medir los cambios de frecuencia y disipación originados, tomando unos valores de -40Hz y $+1 (1E^{-6})$ respectivamente.



Figura 33. Interacción establecida entre la IgG (150KDa) y la superficie del sensor de Au funcionalizada con DSP.

Los datos fueron representados en un histograma con la masa depositada de cada una de las nanocapas originadas sobre la superficie de oro del sensor.

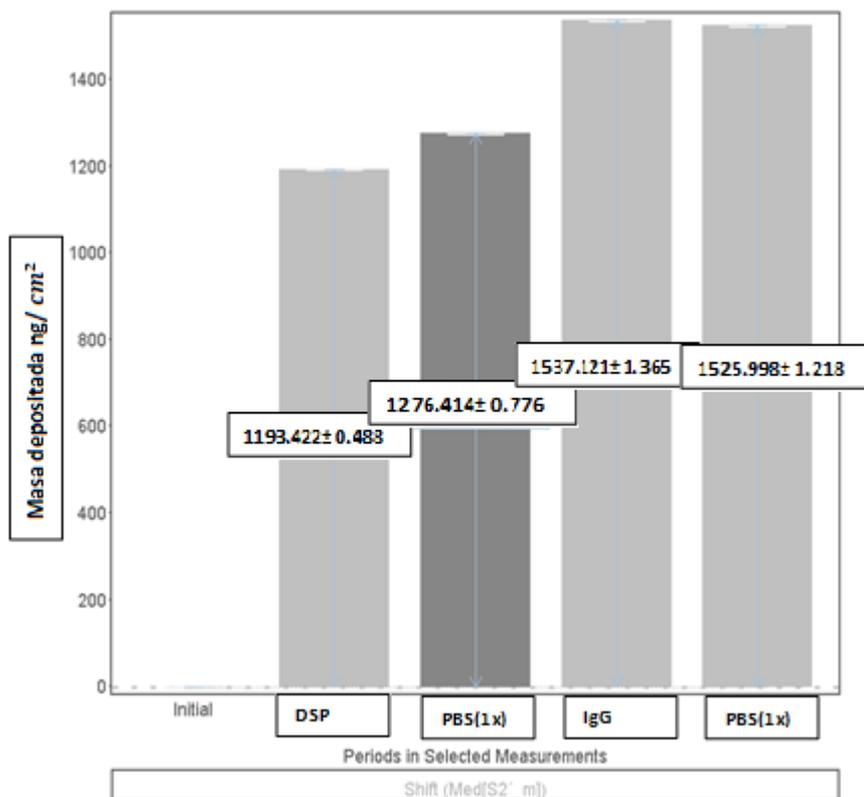


Figura 34. Representación de la masa depositada en ng/cm^2 de cada una de las nanocapas originadas de DSP e IgG (150 KDa) sobre la superficie de Au del sensor.

De nuevo, pudo conocerse el valor de masa depositada en ng/cm^2 de IgG, al restar el valor obtenido para la misma del valor obtenido una vez lavada la capa de DSP con PBS (1x).

	DSP	IgG
ng / cm^2	1193.422	260.707

Tabla 5. Resultados en ng/cm^2 de las nanocapas formadas de DSP e IgG sobre la superficie de Au del sensor.

5.4.3 Interpretación de la interacción entre el DSP y la Tn-C (300KDa).

Se pasaron 2mL de una solución de Tn-C (20nM) en PBS (1x), la muestra tardó aproximadamente 9 minutos en formar una nanocapa estable una vez lavado con una

solución de PBS (1X), pudiéndose medir los cambios de frecuencia y disipación originados, obteniéndose unos valores de -80Hz y +25 ($1E^{-6}$) respectivamente.

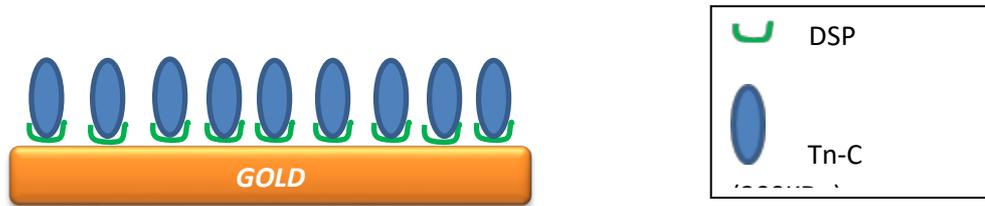


Figura 35. Interacción establecida entre la Tn-C (300KDa) con la superficie de oro del sensor funcionalizada con DSP.

Al restar el valor de masa depositada en ng/cm^2 de Tn-C del valor obtenido una vez lavada la capa de DSP con PBS (1x), puede conocerse el valor de masa depositada a través de los resultados representados en el histograma (Figura 36).

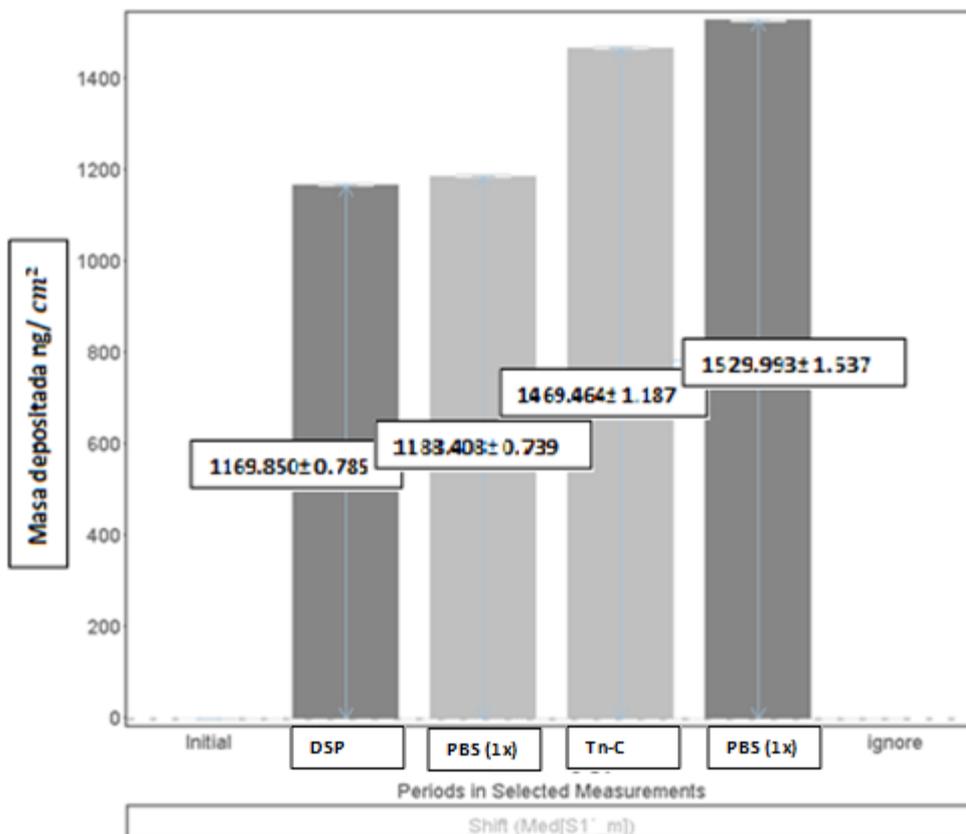


Figura 36. Representación de la masa depositada en ng/cm^2 de cada una de las nanocapas originadas de DSP y Tn-C (300 KDa).

	DSP	Tn C
ng / cm^2	1169.850	286.056

Tabla 6. Resultados en ng/cm^2 de las nanocapas formadas de DSP y Tn-C sobre la superficie de Au de sensor.

De los resultados obtenidos, lo que se observa es que a medida que aumenta el peso molecular de las moléculas que interaccionan con el DSP que cubre la superficie desnuda del sensor de Au, aumenta la masa depositada en ng/cm^2 sobre el DSP.

De este modo, con la Tn-C aumentan los ng/cm^2 depositados frente a la BSA e IgG.

Sin embargo, la diferencia en ng/cm^2 que se depositan disminuye a medida que aumenta el peso molecular, es decir, que el aumento no es lineal, no son directamente proporcionales.

	BSA	IgG	Tn C
ng / cm^2 sobre DSP	72.300	260.707	286.056

Tabla 7. Resultados en ng/cm^2 de las nanocapas de BSA, IgG y Tn-C formadas sobre el DSP que se encuentra funcionalizando el sensor de Au.

Este hecho, podría explicarse debido a que a medida que aumenta el peso molecular, también aumentan los impedimentos estéricos y las mayores repulsiones electroestáticas entre los grupos cargados de las moléculas.

Por otro lado, los ng/cm^2 depositados de DSP toman un mayor valor frente a los ng/cm^2 de por ejemplo la Tn-C de mayor peso molecular que el DSP, el cual es muy pequeño en peso. Este hecho se debe a que la QCM-D valora lo que se deposita y no distingue pegado covalentemente o si se encuentra formando una esfera de hidratación, incluye el agua, por ello cada capa es diferente (pesa diferente).

Además, otro dato importante a evaluar es la disipación. En estos experimentos con DSP la disipación toma unos valores elevados y sin embargo, sólo de 0,5 cuando se pega directamente la Tn-C al Au directamente.

Este hecho, se explica teniendo en cuenta las propiedades viscoelásticas de las nanocapas originadas. En este segundo caso, cuando no se hace uso de DSP la película originada es más rígida, menos agua.

6. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta los objetivos planteados, se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1- La concentración de Tn-C mínima necesaria para formar una nanocapa estable, fue la de la disolución más concentrada estudiada, 20nM.
- 2- La relación MCH/TTA1 seleccionada como óptima fue la de 1:100 ya que para esta relación la superficie de Au del sensor estaba saturada.
- 3- La medida de la disipación de la energía en paralelo con la medida de la frecuencia de resonancia por la QCM-D permitió conocer que las películas formadas por la Tn-C y el aptámero GBI10 eran de carácter viscoelástico, probablemente debido a la estructura flexible e hidratada del aptámero y al tamaño de la proteína, respectivamente, permitiendo de este modo, hacer uso para el tratamiento de los datos el modelado con Smart-fit y pudiéndose determinar los ng/cm^2 depositados de cada una de las capas generadas. Además, permitió determinar que la Tn-C y los aptámeros TTA1 y GBI10 interaccionaban de forma específica.
- 4- La combinación de la medida de la disipación de la energía y la medida de la frecuencia de resonancia por la QCM-D permitió conocer que, tanto la película de DSP como de IgA formadas sobre el sensor de Au son de carácter viscoelástico; ello es posiblemente debido a la esfera de solvatación que puede generar el DSP y al tamaño de la proteína. Haciendo uso nuevamente de un modelado Smart-fit pudimos obtener los ng depositados por cm^2 de superficie del sensor de Au. Además, permitió corroborar que la IgA y los aptámeros TTA1 y GBI10 no interaccionaban de forma específica.
- 5- La disipación obtenida para la nanocapa originada por la Tn-C directamente sobre la superficie desnuda del sensor de Au es menor que los valores obtenidos cuando la superficie del sensor de Au fue funcionalizada con DSP y Tn-C. Este hecho se debe a que en el primer caso la nanocapa que se originó era más rígida.

6- La masa y el espesor de las nanocapas generadas sobre la superficie de DSP, determinaron que la interacción entre la BSA, IgG y Tn-C, dependía del peso molecular de las mismas, aunque no de manera lineal; obteniéndose un mayor número de ng/cm^2 de superficie del sensor, para el caso de la Tn-C.

El hecho de que el aumento de ng/cm^2 no fuera lineal con el aumento de peso molecular pudo explicarse debido a que a medida que aumentaba el peso molecular, también aumentaban los impedimentos estéricos y las mayores repulsiones electroestáticas entre los grupos cargados de las moléculas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Arias FJ, Santos M, Ibáñez-Fonseca A, Piña MJ, Serrano S.** Elastin-like recombinamers as smart drug delivery systems. *Current Drug Targets*. 2016; 17:1-20.
- 2 Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ, Alonso M, Girotti A.** Elastin-like polypeptides in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 97:85-100.
- 3 Rodríguez-Cabello JC, Piña MJ, Ibáñez-Fonseca A, Fernández-Colino A, Arias FJ.** Nanotechnological approaches to the therapeutic delivery using elastin-like recombinamers. *Bioconjug Chem*. 2015; 26(7):1252– 65.
- 4 Piña MJ, Alex SM, Arias FJ, Santos M, Rodríguez-Cabello JC, Ramesan RM, et al.** Elastin-like recombinamers with acquired functionalities for gene-delivery applications. *J Biomed Mater Res Part A*. 2015; 103(10):3166–78.
- 5 Piña MJ, Girotti A, Santos M, Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ.** Biocompatible ELR-based polyplexes coated with MUC1 specific aptamers and targeted for breast cancer gene therapy. *Mol Pharm*. 2016; 13(3):795–808.
- 6 Conrad U, Plagmann I, Malchow S, Sack M, Floss DM, Kruglov AA, et al.** ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. *Plant Biotechnol J*. 2011; 9:22–31.
- 7 Groff K, Brown J, Clippinger AJ.** Modern affinity reagents : recombinant antibodies and aptamers. *Biotechnol Adv*. 2015; 33(8):1787–98.
- 8 Crivianu-Gaita V, Thompson M.** Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: an overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosens Bioelectron*. 2016; 85:32–45.
- 9 Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, Chang YF, Lynott CK, Heil J, et al.** Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med*. 2006; 47(4):668–78.
- 10 Nelson AL.** Antibody fragments. *MAbs*. 2010; 2(1):77–83.
- 11 Zhou J, Rossi J.** Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2017; 16(3):181–202.
- 12 American Cancer Society.** *Cancer Facts and Figures 2016*, 1-66.
- 13 Orend G, Chiquet-ehrisman R.** Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett*. 2006; 244(2):143–63.

14 Brack SS, Silacci M, Birchler M, Neri D. Tumor-targeting properties of novel antibodies specific to the large isoform of tenascin-C. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(10):3200–8. 30

15 Dr. Luis Álvarez-Vallina (Hospital Universitario Puerta de Hierro) – Dr. Ignacio Casal (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas) – Dr. Francisco Sánchez-Madrid (Hospital Universitario de la Princesa-Universidad Autónoma de Madrid). Anticuerpos monoclonales terapéuticos. Informe de vigilancia tecnológica.2007;

16 Osypova A, Thakar D, Dejeu J, Bonnet H, Van der Heyden A, Dubacheva G V, Richter RP, et al. Sensor based on aptamer folding to detect low-molecular weight analytes. *Anal Chem.* 2015; 87(15):7566– 74.

17 Lee H, Contarino M, Umashankara M, Schön A, Freire E, Smith III AB, et al. Use of the quartz crystal microbalance to monitor ligand-induced conformational rearrangements in HIV-1 envelop protein gp120. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 396(3):1143–52.

18 Reimhult E, Larsson C, Kasemo B, Höök F. Simultaneous Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring measurements of biomolecular adsorption events involving structural transformations and variations in coupled water. 2004; 76(24):7211–20.

19 Formisano N, Jolly P, Bhalla N, Cromhout M, Flanagan SP, Fogel R. Optimisation of an electrochemical impedance spectroscopy aptasensor by exploiting quartz crystal microbalance with dissipation signals. *Sensors Actuators B Chem.* 2015; 220:369–375.

20 Alina Osypova, Dhruv Thakar, Jérôme Dejeu, Hugues Bonet, Angeéline Van der Heyden, Galina V. Dubacheva, Ralf P. Ritcher, Eric Defrancq, Nicolas Spinelli, Liliane Coche – Guérente, and Piere Labbé. Sensor Base on aptamer folding to detect low – molecular weight analytes. *Analytical Chemistry*, American Chemical Society, 2015, 87 (15).7566 - 74.

21 M^a Isabel Sanchez de Rojas, M^a Pilar de Luxon, Moisés Frías. La espectrometría de emission con fuente de plasma de acoplamiento inductivo. 2015

8.ANEXOS

ANEXO 1



PROCOLO NORMALIZADO EN EL USO DE LA MICROBALANZA DE CUARZO (BIOFORGE)

1. Encender el equipo (software y bomba).
2. Abrir el programa Q-soft.
 - Acquisition
 - Set up measurement /find all (con el objetivo de comprobar los armónicos).
Los armónicos se considerarán adecuados para continuar con el ensayo cuando tomen los siguientes valores:
 - Primer armónico < 36
 - Segundo armónico < 15
 - Resto de armónicos < 10
 - Se comprueban las condiciones óptimas de trabajo. (flujo: 20µL, T =23 °C).
 - Se coloca un tubo con PBS (1x) en el capilar de entrada.
 - Adquisiton / Start measurement (Sin encender la bomba).
 - Se pasa aire durante 2 minutos.
 - Se enciende la bomba y comienza a pasar el PBS (1x). (El PBS (1x) tarda en llegar aproximadamente 15 minutos).
 - Set up measurement.
 - Stop bomba / stop measurement.
 - Se cambia el tubo de PBS (1x) por un tubo que contenga la disolución de interés.
 - Set up measurement / Start bomba.
 - Después de cada etapa se realizará un lavado con 2mL de una solución de PBS (1x) durante 15 minutos.
 - Una vez realizados los ensayos de interés se dejará pasar una solución de PBS (1x) y posterior agua desionizada con el objetivo de limpiar el equipo así como los capilares utilizados.
3. Finalmente, se apaga el equipo (software y bomba).
4. Se desconectan los capilares utilizados y se recogen en su caja perfectamente etiquetada para posteriores usos.

5. Se saca el sensor de Au de la cámara,
6. Se seca la cámara con papel adsorbente y se vuelve a montar para posteriores usos.

El lavado del sensor con “Piraña” ($H_2SO_4 : H_2O_2$ en una proporción 7:3 respectivamente), es preferible realizarlo previamente a la activación con plasma, ya que realizando la limpieza con plasma el día antes, los armónicos y posteriores resultados obtenidos con la QCM-D son peores.

ANEXO 2



PROTOCOLO NORMALIZADO DEL LAVADO CON PIRAÑA.

Con el objetivo de la limpieza y activación de la superficie del sensor de Au, se procede a un lavado con una disolución piraña.

A continuación, se expone el protocolo normalizado del mismo.

1. En un vaso de precipitados de vidrio pírex se prepara la disolución de piraña, la cual consiste en una disolución de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno en una relación de H_2SO_4 / H_2O_2 (7:3) respectivamente.

INCISO: Siempre el ácido sobre la base, ya que si no la reacción es muy exotérmica corriendo el riesgo de una posible explosión.

Con una pipeta de medición se toman 3 ml del peróxido de hidrógeno al 94% de pureza y se vierten en el vaso de precipitados.

Del mismo modo, y haciendo uso de otra pipeta diferente, se toman 7ml de una disolución de ácido sulfúrico al 98% de pureza y se vierten sobre el peróxido de hidrógeno.

2. A continuación, con unas pinzas metálicas de punta redonda, para evitar de este modo rayar la superficie del sensor de interés, se introduce dicho sensor en la mezcla piraña durante 1 hora.
3. Una vez transcurrido el tiempo estipulado, se saca el sensor con mucha precaución de la disolución piraña y se traspasa a otro vaso de precipitados con agua miliQ durante 15 min.
4. Se hará un segundo lavado de otros 15 minutos con agua desionizada.
5. Finalmente, se sumergirá durante un tiempo de 5 minutos en una disolución de etanol de alta pureza diluido en agua desionizada al 95% con el objetivo de facilitar la etapa de secado. Se retira el sensor con las pinzas de punta redonda

y se transportará en una placa Petri, sobre la cual se ha depositado papel de celulosa que absorberá parte del etanol, antes de ser secado o bien con nitrógeno gas o con aire a presión.