



# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**

## **“CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIOSENSOR DE PHA-L PARA LA DETECCIÓN SELECTIVA DE N-GLICANOS CON RAMIFICACIÓN $\beta$ 1-6 ABERRANTE ASOCIADA A CARCINOMAS”**

### **T E S I S**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN QUÍMICA**

Presenta:

**Q.A. Cinthia Ramírez Martínez**

Directora de tesis:

**Dra. Maria Luísa Soares da Silva**

Mineral de La Reforma, Hidalgo, mayo 2020.



El presente trabajo de investigación tuvo lugar en el Área Académica de Química en los Laboratorios de Investigación 1 y 2, dentro del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería; teniendo como áreas de apoyo las instalaciones de los laboratorios generales del Área de Farmacia y un Laboratorio de Investigación del Área Académica de Biología, todos pertenecientes a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Avances del proyecto fueron presentados en el 5<sup>th</sup> Latin American Congress of Glycobiology and 2<sup>nd</sup> Meeting of the Glycoscience in Health Thematic Network, en Octubre de 2019, bajo el título “Selective detection of aberrant *N*-glycans associated to carcinomas through a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin biosensor” en presentación oral y cartel.



**“Nada en este mundo debe ser temido, sólo entendido”**

***-Maria Salomea Skłodowska-Curie-***

DEDICATORIA

*Para Laura Ileana*

*Con amor, mamá.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la vida, las oportunidades y experiencias llenas de enseñanzas.

A mi hija Laura Ileana, quien es mi familia y mi impulso para avanzar, por su comprensión y su manera amorosa de siempre darme apoyo en cada momento.

A mis padres, por todos sus consejos, su tiempo y su apoyo incondicional cuando más lo he necesitado.

A mis abuelos, mamá Cele y papá Iño (q.e.p.d.), pilares importantes en mi vida. Gracias por su amor y sabiduría compartida.

A mi directora de tesis, la Dra. Maria Luísa Soares da Silva, por darme la oportunidad de trabajar con ella y conocer un área tan extraordinaria de la ciencia.

A los doctores que integran mi comité tutorial, por todo su apoyo: Dra. Irma, Dra. Silvia y Dr. Israel.

En el camino he coincidido con personas con las cuales he podido contar incondicionalmente y a quienes también quiero agradecer por su amistad, su paciencia, su apoyo y sus consejos: Patricio, Elsa, Jesús, Eltonh y Carmen. Gracias.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Lupita Rangel, Tane, Juan Fi, Karla, y al Dr. Giaan, por los gratos momentos de convivencia.

A los doctores José Antonio Rodríguez y Alfredo Guevara por su ayuda y consejos.

Así como a los doctores del Área Académica de Química que en algún momento han sido parte de mi formación profesional.

## RESUMEN

En el presente trabajo se muestra la construcción y optimización de un biosensor impedimétrico *label-free* de leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), como elemento de biorreconocimiento, la cual presenta afinidad específica por la ramificación aumentada  $\beta$ 1-6 de estructuras de *N*-glicanos como consecuencia de una sobre-expresión de la enzima *N*-acetilglucosaminiltransferasa V (GnT-V). Esta modificación en la estructura de *N*-glicanos ha sido correlacionada con el desarrollo de diferentes tipos de carcinoma humano, por lo que puede considerarse como un biomarcador de la enfermedad, siendo útil para la detección de la misma, la elección de terapia y el monitoreo de un paciente oncológico.

El biosensor se construyó a partir de electrodos *screen-printed* de oro (SPE-Au), modificando su superficie para realizar la inmovilización de la lectina mediante la previa formación de una monocapa autoensamblada (SAM) que fue activada con una disolución entrecruzante de ECD + NHS. Finalmente, se bloquearon los grupos carboxilo de la SAM no ocupados con lectina con etanolamina (ETA) para evitar uniones inespecíficas durante el análisis. Para la confirmación de la formación del complejo entre la lectina y el *N*-glicano aberrante, se utilizó la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), en presencia de la sonda redox de ferricianuro/ferrrocianuro, tomando como señal analítica el porcentaje de variación de la resistencia a la transferencia de carga ( $\% \Delta R_{CT}$ ) que se relacionó con el número de complejos formados.

Los ensayos realizados mostraron una respuesta del biosensor directamente proporcional a la concentración de la glicoproteína Tg bovina (usada como modelo positivo ya que contiene *N*-glicanos con la ramificación  $\beta$ 1-6 en su estructura), con tendencia lineal en un intervalo de 0.05 a 2.0 mg ml<sup>-1</sup>, con un límite de detección de 0.695 mg ml<sup>-1</sup>.

También se realizó la recolección de las muestras sanguíneas control y oncológicas para evaluar la respuesta del dispositivo frente a una matriz real, teniendo un total de nueve tipos diferentes de carcinoma a analizar: piel, colon, pulmón, esófago, hígado, riñón, estómago, seno y próstata. Sin embargo, este análisis queda pendiente para efectuarse posteriormente, por lo que la presente sólo abarcará la construcción, optimización y caracterización analítica del dispositivo.

**ABSTRACT**

The present project shows the construction and optimization of a label-free impedimetric biosensor based on *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L), as the biorecognition element, which has specific affinity for the increased  $\beta$ 1-6 branching of *N*-glycans as a consequence of an upregulation of *N*-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) enzyme. This type of aberrant modification has been correlated with the development of different types of human carcinomas, so these abnormal structures are considered as disease biomarkers, being useful for detection of the disease, therapy selection and monitoring for an oncological patient.

The biosensor was built from gold screen-printed electrodes (SPE-Au), modifying their surface to immobilize the lectin by forming of a self-assembled monolayer (SAM) that was activated with a crosslinking solution (ECD + NHS). Finally, unoccupied carboxylic acids of the SAM were blocked with ethanolamine (ETA) to avoid unspecific binding during analysis. To assess complex formation between lectin and aberrant *N*-glycan, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was used, in the presence of the redox probe of ferricyanide/ferrocyanide, using as analytical signal the percentage of variation in charge transfer resistance ( $\% \Delta R_{CT}$ ) that was related to the number of complexes formed.

Tests showed a biosensor response directly proportional to the concentration of bovine Tg glycoprotein (used as positive model and presenting *N*-glycans with increased  $\beta$ 1-6 branching) with a linear tendency in the range from 0.05 to 2.0 mg ml<sup>-1</sup>, with a detection limit of 0.695 mg ml<sup>-1</sup>.

Control and oncological blood samples were collected to evaluate the response of device against a real matrix, with a total of nine different carcinoma types to analyze: skin, colon, lung, esophagus, liver, kidney, stomach, sinus and prostate. However, this analysis is pending, so the thesis presented herein will only describe the experimental work performed in the construction, optimization and analytical characterization of the device.



Mineral de la Reforma, Hgo., a 23 de abril de 2020

**Número de control:** ICBI-D/453/2020  
**Asunto:** Autorización de impresión de tesis.

**M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado a la Q.A. Cinthia Ramírez Martínez, alumna de la Maestría en Química con número de cuenta 139762, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado "Construcción y caracterización de un biosensor de PHA-L para la detección selectiva de N-glicanos con ramificación  $\beta$ 1-6 aberrante asociada a carcinomas" en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación, se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

PRESIDENTE Dra. Silvia Nieto Velázquez

SECRETARIO Dra. Irma Pérez Silva

VOCAL Dra. Maria Luísa Soares da Silva

SUPLENTE Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

Sin otro particular reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente  
 "Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval  
 Director del ICBI



del Consejo de Planeación  
 Carretera Tula-Tulancingo km 4.5 Colonia Carboneras  
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184  
 Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109  
 direccion\_icbi@uaeh.edu.mx



# ÍNDICE GENERAL



ÍNDICE GENERAL

SIGLAS Y ABREVIATURAS .....	v
SÍMBOLOS .....	viii
FIGURAS .....	x
TABLAS .....	xii
ECUACIONES .....	xii
<b>CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>1</b>
1.1. El cáncer .....	2
1.1.1. La biología del cáncer .....	2
1.1.2. Clasificación del cáncer .....	3
1.1.2.1. Carcinomas .....	3
1.1.3. Estadísticas del cáncer a nivel global y nacional .....	4
1.1.3.1. Estadísticas del cáncer a nivel global .....	4
1.1.3.2. Estadísticas del cancer en México .....	6
1.2. Biomarcadores .....	8
1.2.1. Uso de biomarcadores en oncología .....	9
1.3. Biomoléculas relacionadas con el desarrollo y progresión del cáncer .....	12
1.3.1. Glicosilación de proteínas .....	14
1.3.1.1. Glicosilación de proteínas en células humanas .....	16
1.3.1.2. Tipos de glicosilación de proteínas (O y N) .....	18
1.3.1.2.1. O-glicosilación .....	18

1.3.1.2.2. <i>N</i> -glicosilación .....	18
1.3.1.3. Biosíntesis de las <i>N</i> -glicoproteínas .....	20
1.3.1.3.1. Biosíntesis aberrante de <i>N</i> -glicanos en el proceso oncológico .....	21
1.3.1.4. <i>N</i> -glicanos aberrantes como biomarcadores .....	22
1.4. Detección de glicanos por medio de lectinas .....	24
1.4.1. Leucoaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	26
1.4.2. Detección de <i>N</i> -glicanos aberrantes por medio de la PHA-L .....	28
1.5. Biosensores y su aplicación en oncología .....	28
1.5.1. Estructura y funcionamiento general de un biosensor .....	28
1.5.2. Transductores empleados en los biosensores de lectinas .....	32
1.5.3. Aplicaciones de los biosensores de lectinas en el área del cáncer .....	38
1.6. Referencias bibliográficas .....	40
<b>CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
2.1. Justificación .....	46
2.2. Objetivos .....	47
2.2.1. General .....	47
2.2.2. Específicos .....	47
2.3. Referencias .....	48
<b>CAPÍTULO 3. ASPECTOS GENERALES DE LA PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>49</b>
3.1. Introducción .....	50
3.2. Reactivos y disoluciones .....	50

3.2.1. Disoluciones tampón .....	50
3.2.2. Monocapa autoensamblada (SAM; <i>self-assembled monolayer</i> ) .....	51
3.2.3. Disolución de agente entrecruzante ( <i>cross-linker</i> ) .....	51
3.2.4. Lectina .....	51
3.2.5. Disolución de bloqueo de superficie .....	51
3.2.6. Glicoproteína modelo positivo .....	52
3.2.7. Glicoproteínas modelo negativo .....	52
3.2.8. Sonda redox .....	54
3.3. Colecta y procesamiento de muestras sanguíneas .....	54
3.3.1. Colecta de muestras sanguíneas control y oncológicas .....	54
3.3.2. Procesamiento de muestras séricas control y oncológicas .....	61
3.3.2.1. Procesamiento de muestras séricas por CPLL .....	61
3.3.2.2. Cuantificación de proteínas en las muestras .....	62
3.4. Instrumentación .....	63
3.4.1. Equipos .....	63
3.4.2. Materiales .....	64
3.5. Construcción del biosensor de PHA-L .....	65
3.5.1. Formación de la monocapa autoensamblada (SAM) .....	66
3.5.2. Aplicación de la disolución de <i>cross-linker</i> .....	67
3.5.3. Aplicación de la lectina .....	67
3.5.4. Bloqueo de los grupos carboxilo no ocupados .....	68
3.6. Proceso de medición de la respuesta analítica .....	68
3.7. Optimización y tratamiento estadístico de los resultados .....	72

3.8. Referencias .....	73
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>76</b>
4.1. Optimización de la construcción del biosensor .....	77
4.1.1. Optimización de la monocapa autoensamblada .....	77
4.1.2. Optimización de la disolución de <i>cross-linker</i> .....	81
4.1.3. Optimización de la cantidad de PHA-L inmovilizada .....	84
4.1.4. Optimización del proceso de bloqueo .....	86
4.1.5. Optimización del tiempo de incubación de la glicoproteína modelo positivo .....	90
4.2. Pruebas de selectividad .....	91
4.3. Caracterización del biosensor .....	94
4.3.1. Modificación de la superficie del biosensor: EIS y CV .....	94
4.3.2. Caracterización analítica del biosensor .....	97
4.3.3. Estabilidad del biosensor en el almacenamiento .....	98
4.4. Análisis de muestras .....	99
4.4.1. Definición del factor de dilución de las muestras procesadas .....	99
4.4.2. Análisis de muestras procesadas usando el biosensor de lectina .....	100
4.5. Referencias .....	101
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>104</b>
5.1. Conclusiones .....	105

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

16-MHDA	Ácido mercaptohexadecanoico
2-DE	Electroforesis en gel-bidimensional
6-MHA	Ácido mercaptohexanoico
AAL	Aglutinina de <i>Aleuria aurantia</i>
aBSM	Asialo-Mucina submaxilar bovina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aFet	Asialo-Fetuina
AFP	$\alpha$ -Fetoproteína
AG	Aparato de Golgi
Asn	Asparagina
aTrf	Asialo-Transferrina
AuNPs	Nanopartículas de oro
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
BSM	Mucina submaxilar bovina
<i>C. jejuni</i>	<i>Clostridium jejuni</i>
CA125	Antígeno del cancer 125
CA15-3 (MUC1)	Antígeno de cáncer 15-3
CA19-9	Antígeno de cáncer 19-9
CA27-29	Antígeno de cáncer 27-29
CEA (MUC16)	Antígeno carcinoembrionario
Con A	Concanavalina A
CPLL	Biblioteca Combinatoria de Ligandos de Péptidos
Cramoll	Aglutinina de <i>Cratylia mollis</i>
DVP	Voltametría diferencial de pulso
ECD	hidroclorohidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EG	Etilenglicol
EIS	Espectroscopía de Impedancia Electroquímica
ETA	Etanolamina

FDA	Food and Drug Administration
FET	Transistor de efecto de campo
Fet	Fetúina de suero de ternera
Fuc	Fucosa
Fut8	Fucosiltransferasa-8
Gal	Galactosa
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GCO	Global Cancer Observatory
Glc	Glucosa
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
GNL	Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>
GnT-V	<i>N</i> -acetilglucosaminiltransferasa V
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HE4	Proteína 4 de epidimia humana
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
IARC	International Agency for Research on Cancer
LCA	Aglutinina de <i>Lens culinaris</i>
MAL	Aglutinina de <i>Maackia amurensis</i>
Man	Manosa
Neu5Ac	Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
NHS	<i>N</i> -hidroxisulfosuccinimida
OMS	Organización Mundial de la Salud
OVA1, prueba	B-2 Microglobulina, CA125II (alta), apolipoproteína A1, prealbúmina y transferrina (baja).
PCB	Placas de circuito impreso
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenglicol
PHA-E	Eritroaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PHA-L	Leucoaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	Aglutinina de cacahuete
Pro	Prolina

PSA	Antígeno específico prostático
PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
PVA	Alcohol polivinílico
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo
RCA	Aglutinina de <i>Ricinus communis</i>
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
RER	Retículo endoplásmico rugoso
ROMA, prueba	HE4 y CA125.
rpm	Revoluciones por minuto
SAM	Monocapa autoensamblada
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Ser	Serina
SiA	Ácido siálico
SNA	Aglutinina de <i>Sambucus nigra</i>
SPE-Au	Electrodos serigrafados de oro
SPR	Resonancia de plasmón de superficie
STn	Antígeno sialil-Tn
Tg	Tiroglobulina (humana)
Tg bovina	Tiroglobulina bovina
Thr	Treonina
Trf	Transferrina humana
UDP	Uridina difosfato
UEA	Aglutinina de <i>Ulex europaeus</i>
VVA	Lectina de <i>Vicia villosa</i>
WGA	Aglutinina de <i>Wheat Germ</i>
μEIS	Espectroscopía de Impedancia Microeléctrica

## SÍMBOLOS

%p/p	Porcentaje peso de soluto/peso de la solución
% $\Delta R_{CT}$	Porcentaje de la diferencia de la resistencia a la transferencia de carga
Ag	Plata
Ag/AgCl	Cloruro de plata
aM	Attomolar; factor $10^{-18}$ M (unidad de concentración)
Au	Oro
C1	Primer átomo de carbono
Ca <sup>2+</sup>	Ion divalente de calcio
COOH	Grupos carboxilo
CPE	Capacitancia de la doble capa
fM	Femtomolar; factor $10^{-15}$ M (unidad de concentración)
Hz	Hertz (unidad de frecuencia del Sistema Internacional de Unidades (SI))
KCl	Cloruro de potasio
K <sub>D</sub>	Constante de disociación
kDa	Kilodaltons (unidad de masa molecular)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio monobásico
l	Litro (unidad de volumen)
M	Molar (unidad de concentración)
mg	Miligramo (unidad de peso)
Mg <sup>2+</sup>	Ion divalente de magnesio
ml	Mililitro (unidad de volumen)
mM; mmol	Milimolar (unidad de concentración)
Mn <sup>2+</sup>	Ion divalente de manganeso
mV	Milivolt (medida de tensión eléctrica)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Fosfato de sodio dibásico dihidratado
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo (unidad de peso)

OH-	Grupo hidroxilo
PBS	Disolución buffer de fosfatos
pM	Picomolar; factor $10^{-12}$ M (unidad de concentración)
$R_{CT}$	Resistencia a la transferencia de carga
$R_{CT\text{ fin}}$	Resistencia a la transferencia de carga final (después de incubar la muestra)
$R_{CT\text{ in}}$	Resistencia a la transferencia de carga inicial (antes de incubar la muestra)
$R_p$	Resistencia a la polarización
$R_s$	Resistencia de la solución de electrolito
s	Segundo (unidad de tiempo del SI)
SH	Grupo tiol
V	Volt (medida de tensión eléctrica)
$Z'$	Impedancia imaginaria
$Z''$	Impedancia real
$Zn^{2+}$	Ion divalente de zinc
$Z_w$	Coefficiente de Warburg
$\mu g$	Microgramo (unidad de masa)
$\Omega$	Ohm (unidad derivada de resistencia eléctrica en el SI)

**FIGURAS**

Figura 1.1 Mapa global de la clasificación de la mortalidad prematura del cáncer .....5

Figura 1.2 Pronóstico del incremento de defunciones por cáncer a nivel global .....6

Figura 1.3 Pronóstico del incremento de defunciones por cáncer en México .....7

Figura 1.4. Estructuras naturales de *N*- y *O*-glicanos .....19

Figura 1.5. Modificación de los *N*-glicanos en el AG .....20

Figura 1.6. Alteraciones más comunes de *N*-glicanos en tumorigénesis .....22

Figura 1.7. Puntos de contacto multivalente entre el carbohidrato y la proteína .....25

Figura 1.8. Estructuras tridimensionales de las dos isolectinas PHA .....27

Figura 1.9. Esquema general de la estructura de un biosensor .....29

Figura 1.10. Diagrama de *Nyquist* en análisis por EIS .....36

Figura 1.11. Esquema de un circuito de equivalencia en EIS .....37

Figura 3.1. Distribución de las muestras de sangre control por intervalos de edad .....54

Figura 3.2. Distribución de las muestras sanguíneas de pacientes con carcinomas por tipo e intervalo de edades .....56

Figura 3.3. Proceso para la reducción de las diferencias de concentración en proteínas (CPLL) .....62

Figura 3.4. Esquema de construcción del biosensor de PHA-L .....66

Figura 3.5. Esquema general del diagrama de *Nyquist* .....69

Figura 3.6. Circuito de Randles equivalente al sistema del biosensor .....69

Figura 3.7. Diagrama de *Nyquist*. Curvas sinusoidales obtenidas en las dos mediciones en le biosensor .....71

Figura 4.1. Proceso de formación de la SAM sobre la superficie de oro .....78

Figura 4.2. Diagramas de <i>Nyquist</i> utilizando 6-MHA y 6-MHA+16-MHDA .....	80
Figura 4.3. Diagramas de <i>Nyquist</i> utilizando 16-MHDA .....	81
Figura 4.4. Activación con ECD de la SAM inmovilizada en la superficie de oro .....	82
Figura 4.5. Diagrama de <i>Nyquist</i> correspondiente a la concentraciones seleccionadas como óptimas de ECD y NHS .....	84
Figura 4.6. Bloqueo de grupos carboxilo sin reaccionar de la SAM vía ETA .....	87
Figura 4.7. Diagrama de <i>Nyquist</i> del biosensor optimizado .....	90
Figura 4.8. Diagramas de <i>Nyquist</i> de la respuesta del biosensor después de cada etapa de modificación .....	95
Figura 4.9. Voltamperograma cíclico después de cada etapa de modificación .....	96
Figura 4.10. Curva de calibración para el biosensor de PHA-L .....	97
Figura 4.11. Evaluación de la estabilidad del biosensor a diferentes días de almacenamiento .....	98

## TABLAS

Tabla 1.1. Biomarcadores tumorales aprobados por la FDA para la práctica clínica.....	11
Tabla 1.2. Nomenclatura de monosacáridos y su estructura .....	13
Tabla 1.3. Transductores utilizados en biosensores basados en lectinas .....	32
Tabla 3.1. Glicoproteínas modelo utilizadas en la evaluación de selectividad .....	53
Tabla 3.2. Muestras control y sus respectivos datos demográficos, clínicos y antecedentes familiares .....	57
Tabla 3.3. Muestras de casos oncológicos y sus respectivos datos demográficos y clínicos .....	58
Tabla 4.1. Reactivos de la SAM, concentraciones y resultados obtenidos .....	79
Tabla 4.2. Mezclas de los reactivos del <i>cross-linker</i> a diferentes concentraciones y resultados .....	83
Tabla 4.3. Cantidades de lectina testadas para su optimización en el biosensor .....	85
Tabla 4.4. Reactivos evaluados para la etapa de bloqueo y resultados .....	87
Tabla 4.5. Tiempos de incubación evaluados de la glicoproteína modelo positivo .....	91
Tabla 4.6. Glicoproteínas evaluadas con el biosensor y resultados .....	92
Tabla 4.7. Diluciones testadas de la muestra control y resultados .....	100

## ECUACIONES

Ecuación 1.1. Impedancia electroquímica basada en la Ley de Ohm .....	36
Ecuación 3.1. Cálculo del porcentaje de la resistencia a la transferencia de carga .....	71

# Capítulo 1

MARCO  
TEÓRICO



## 1.1. EL CÁNCER

Se denomina “cáncer” a una diversidad de enfermedades relacionadas, de naturaleza genética, que pueden ocurrir en cualquier sistema de órganos en todo el reino animal [1,2]. La principal característica del cáncer es la proliferación de células distintas o aberrantes a la evolución ordinaria, que han perdido la habilidad de ensamblar y crear tejidos de forma y función normal [2,3]. Esta proliferación puede ser rápida o lenta, donde la acumulación de células puede ser masiva o minúscula [2].

El cáncer es ocasionado por cambios en los genes que controlan el funcionamiento celular, especialmente el crecimiento y la división, estos cambios pueden ser heredados por ascendencia familiar, ser el resultado de errores propios que ocurren al dividirse las células o causados por daño del ADN, cuando hay exposición a agentes ambientales cancerígenos como compuestos químicos (ej. humo del tabaco), radiación (ej. rayos ultravioleta del sol), entre otros [1].

### 1.1.1. LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER

De manera normal, en un ser vivo multicelular se da una coexistencia de células y tejidos de múltiples tipos que componen cada parte del organismo, cada uno con una división celular y ubicación anatómica precisa para poder cumplir con la función fisiológica programada, como el reemplazo de células que han sufrido desgaste durante sus funciones [2,3].

Al contrario, una célula cancerosa no sigue el patrón de programación celular [2,3]. A medida que las células anormales (aberrantes) envejecen o se dañan, sobreviven cuando deberían morir (mediante el proceso conocido como muerte celular programada o apoptosis), nuevas células se crean cuando no son necesarias (ignorando la programación que generalmente detiene la división celular), formando un tejido que ignora las barreras anatómicas de las membranas celulares adyacentes, matando y usurpando células normales [1,2]. Las células cancerosas son capaces de evadir el sistema inmunitario, o bien lo usan para continuar con vida y seguir creciendo, haciendo que éste no destruya las células anormales [1].

### 1.1.2. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER

Existen más de 100 tipos de cáncer, los cuales generalmente reciben el nombre de los órganos o tejidos en donde se forman. También pueden describirse de acuerdo con el tipo de célula que los forma, como célula epitelial o célula escamosa [1].

Muchos cánceres forman tumores sólidos, los cuales son masas de tejido. Los cánceres de la sangre, como las leucemias, en general no forman tumores sólidos sino “líquidos” [1], prácticamente derivado del estado de la materia en la que se encuentran.

Existe un criterio que segrega a los tumores en dos amplias categorías dependiendo de su grado de crecimiento agresivo. Los que crecen localmente sin invadir tejidos adyacentes son clasificados como benignos [3]. A veces estos tumores pueden ser bastante grandes y al extirparse no vuelven a crecer [1]. En la segunda categoría se encuentran los que invaden tejidos cercanos y generan metástasis, nombrados malignos [3].

De acuerdo con el tipo de célula en donde se desarrolla el cáncer inicialmente, los cánceres se clasifican en carcinomas (cánceres de células epiteliales), sarcomas (cánceres no epiteliales que derivan de tejidos conectivos), hematopoyéticos (cánceres de células que constituyen el tejido formador de sangre, así como del sistema inmunológico) y neuroectodérmicos (cánceres que comienzan en células que forman parte del sistema nervioso central y periférico). Existen otros tipos de cánceres que no se clasifican dentro de los cuatro mayores grupos anteriores, como los melanomas (que derivan de los melanocitos) y los teratomas (comienzan en las células germinativas precursoras) [3].

#### 1.1.2.1. CARCINOMAS

Los carcinomas son responsables de más del 80% de las muertes humanas relacionadas con cáncer en el mundo occidental, debido a que la mayoría de los tumores comienzan a partir del tejido epitelial, haciéndolo el tipo de cáncer más común. El epitelio

son hojas de células que recubren las paredes de las cavidades y canales o, en el caso de la piel, sirve como el recubrimiento exterior del cuerpo [3].

Los carcinomas que empiezan en diferentes tipos de células epiteliales tienen nombres específicos: a) adenocarcinoma, es un cáncer que se forma en las células epiteliales que producen fluidos o mucosidad (tejidos glandulares). La mayoría de los cánceres de seno, de colon y de próstata son adenocarcinomas; b) carcinoma de células basales, es un cáncer que empieza en la capa más baja o basal de la epidermis, la cual es la capa exterior de la piel; c) carcinoma de células escamosas o epidermoide (células epiteliales planas que están debajo de la superficie exterior de la piel), es un cáncer que se forma en las células del mismo nombre que revisten órganos como el estómago, los intestinos, los pulmones, la vejiga y los riñones; d) carcinoma de células de transición, es un cáncer que se forma en el tejido llamado epitelio de transición o urotelio, formado por muchas capas de células epiteliales que pueden hacerse más grandes o más pequeñas. Se encuentra en el revestimiento de la vejiga, de los uréteres y en parte de los riñones (pelvis renal), y en algunos otros órganos [1].

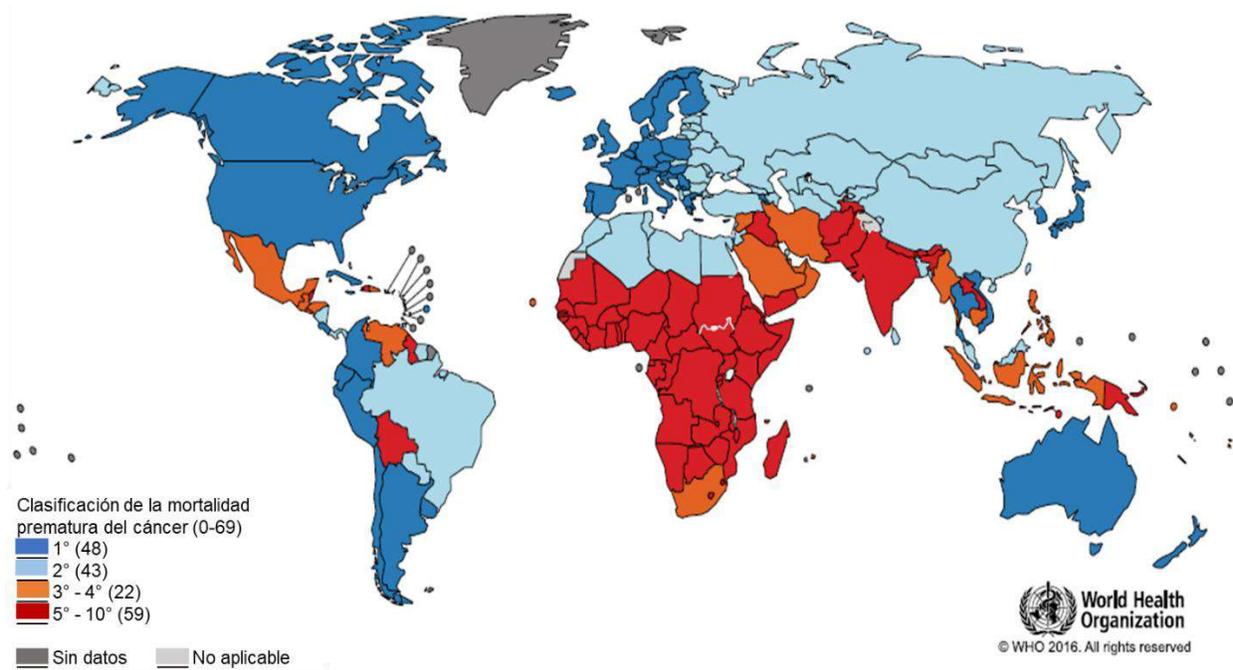
### **1.1.3. ESTADÍSTICAS DEL CÁNCER A NIVEL GLOBAL Y NACIONAL**

#### **1.1.3.1. ESTADÍSTICAS DEL CÁNCER A NIVEL GLOBAL**

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, cuyas cifras están por encima de las correspondientes a los accidentes cerebrovasculares y enfermedades coronarias. Además, ha sido considerada como la principal barrera para incrementar la expectativa de vida de cada país del mundo, en pleno siglo XXI [4].

La incidencia y la mortalidad del cáncer están creciendo rápidamente, reflejando tanto el envejecimiento como la creciente población, así como el aumento de la exposición a los principales factores de riesgo del cáncer. La posición del cáncer como una causa prematura de muerte refleja los niveles de desarrollo social y económico de cada nación, donde son visibles las diferencias correspondientes a los cánceres relacionados con la pobreza e infecciones y los cánceres asociados con los estilos de vida más típicos de los países industrializados [4,5].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2015 el cáncer fue la primera o segunda causa de muerte antes de los 70 años de edad, en 91 de 172 países, y la tercera o cuarta causa en otros 22 países (FIGURA 1.1) [4].



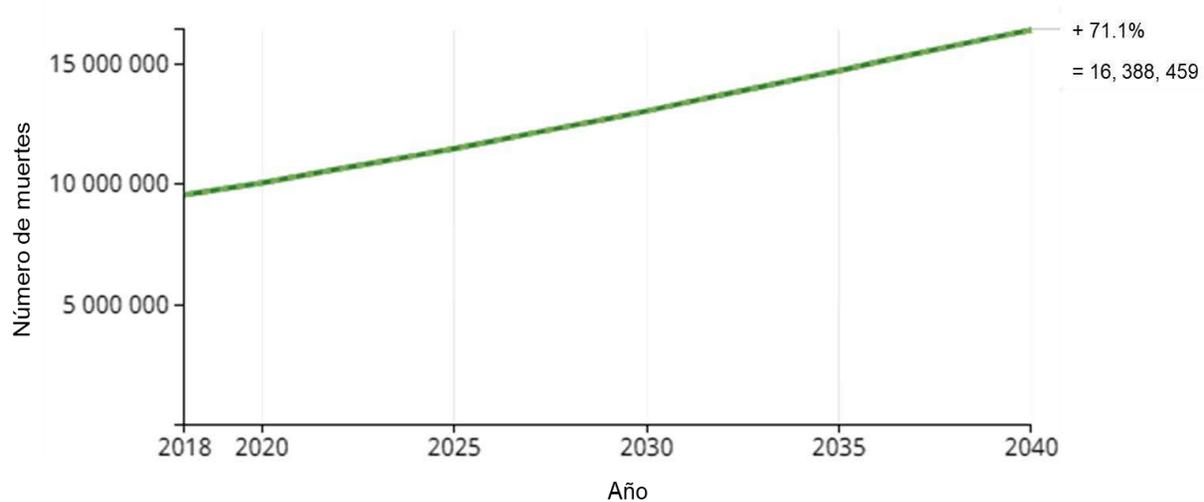
**FIGURA 1.1.** Mapa global presentando la clasificación de la mortalidad prematura del cáncer a edades por debajo de 70 años en 2015. Fuente: Organización Mundial de la Salud [4].

Para el año 2018, la carga global de cáncer se estimó con un crecimiento de 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes, aproximadamente [4-6]. Uno de cada cinco hombres y una de cada seis mujeres alrededor del mundo desarrolla cáncer durante su vida, y uno de cada ocho hombres y una de cada once mujeres muere a consecuencia de la enfermedad. En el mundo, el número total de personas que están vivas con cinco años de diagnóstico de cáncer (la llamada prevalencia de 5 años) está estimada en 43.8 millones [5].

Los cánceres de pulmón, mama y colorrectal son los tres tipos principales de cáncer en términos de incidencia y están clasificados dentro de los cinco primeros en términos de mortalidad (primero, quinto y segundo, respectivamente). Juntos, estos tres tipos de

cáncer son responsables por un tercio de la incidencia de cáncer y tasa de mortalidad a nivel mundial [5].

De acuerdo con los datos proporcionados por el Global Cancer Observatory (GCO; plataforma web desarrollada por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, IARC, órgano que forma parte de la OMS), para el año 2040 (tomando en cuenta todos los tipos de cáncer, en ambos sexos y en todas las edades), se pronostica un incremento del 71.1% en el número de defunciones a nivel global (FIGURA 1.2) [6].



**FIGURA 1.2.** Pronóstico del incremento en el número de defunciones por cáncer (todos los tipos, ambos sexos, todas las edades) entre 2018 y 2040, a nivel mundial. Fuente de datos: Globocan 2018. Producción del gráfico: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>). © International Agency for Research on Cancer 2018 [6].

### 1.1.3.2. ESTADÍSTICAS DEL CÁNCER EN MÉXICO

Para el año 2018, en México, el Global Cancer Observatory registró, de una población total de 130,759,070 personas (de todas las edades y de ambos sexos), 190,667 nuevos casos diagnosticados de cáncer (85,616 hombres y 105,051 mujeres), con un total de 83,476 defunciones, es decir el 43.78% de esos nuevos casos [6].

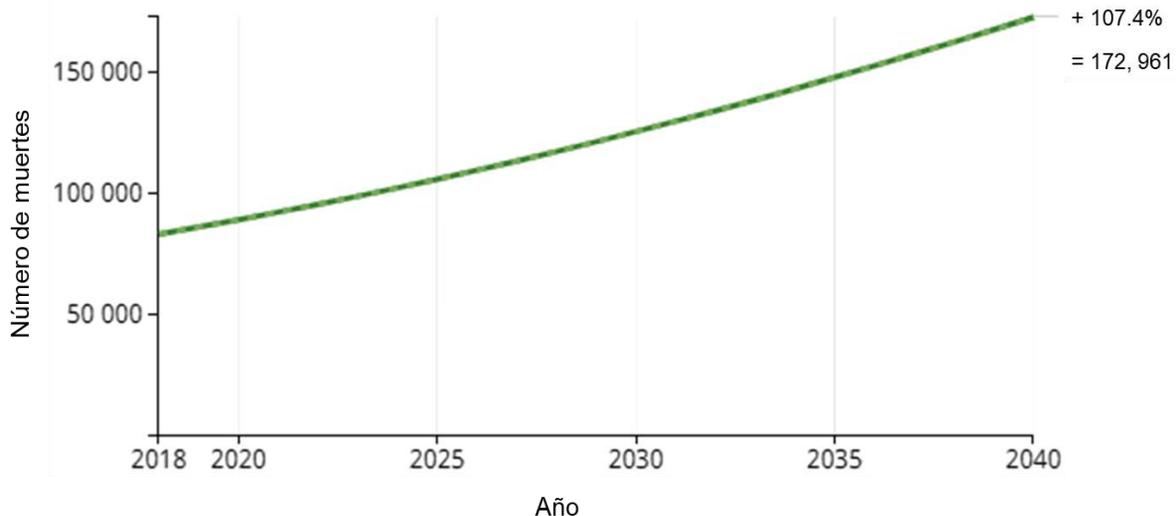
Para la población mexicana, el cáncer de seno ocupa el primer lugar en los nuevos casos diagnosticados (con un 14.3%). El segundo lugar es para el cáncer de próstata (13.1%),

seguido por el colorrectal (7.8%), el de tiroides (6.4%) y, finalmente, el cáncer cervicouterino (4.1%) [6].

De 105,051 nuevos casos de cáncer en mujeres, se registraron un total de 42,967 muertes, es decir, el 40.9%. En la clasificación de los principales tipos de cáncer en la población femenina mexicana, el de mama ocupa el primer lugar con el 26%, en segundo el tiroides con el 9.7%, seguido por el cervico-uterino (7.5%), el de cuerpo uterino (6.9%) y el colorrectal (6.8%) [6].

En el caso de la población masculina, de un total de 85,616 nuevos casos, se registraron 40,509 decesos (el 47.31%). El cáncer de próstata ocupa el primer lugar (con el 29.3%) dentro de los cinco principales tipos de cáncer en hombres. En segundo lugar está el colorrectal con el 9.1%, seguido del cáncer de testículo (5.4%), el de pulmón (5.3%) y el de estómago (4.6%) [6].

El pronóstico en defunciones a causa del cáncer (todos los tipos, ambos sexos, todas las edades), para México, en el año 2040, es de un incremento del 107.4%, respecto al total reportado en 2018 (FIGURA 1.3) [6].



**FIGURA 1.3.** Pronóstico del incremento en el número de defunciones por cáncer (todos los tipos, ambos sexos, todas las edades) entre 2018 y 2040, en México. Fuente de datos: Globocan 2018. Producción del gráfico: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>). © International Agency for Research on Cancer 2018 [6].

## 1.2. BIOMARCADORES

Biomarcador es el término que se usa para una propiedad característica que puede ser medida de forma precisa y validada objetivamente, como un indicador de un proceso fisiológico normal, un proceso patológico, o como respuesta farmacológica a una intervención terapéutica [7,8].

Durante décadas, los datos cuantitativos relativos a características de reacciones fisiológicas, a cambios funcionales y a analitos moleculares en sangre, suero, u otro fluido corporal, han sido usados en investigaciones y medicina de laboratorio [8]. En este ámbito, diversos biomarcadores han sido usados como elementos útiles para la valoración clínica y la toma de decisiones [7].

Los biomarcadores tienen muchas aplicaciones en la detección y monitoreo de diversas enfermedades. Estas aplicaciones incluyen [7,9]:

- Diagnóstico de enfermedades o condiciones anormales (ej. elevada concentración de glucosa en sangre para el diagnóstico de diabetes *mellitus*);
- Estadificación de una enfermedad (ej. mediciones del antígeno de cáncer 125 (CA125) para varios cánceres) o la clasificación del grado de una enfermedad (ej. la concentración del antígeno específico prostático (PSA) en sangre, usada para reflejar el grado de crecimiento y metástasis de un tumor prostático);
- Identificación de tipos celulares, como los marcadores histológicos;
- Pronóstico de enfermedad (ej. mediciones anatómicas de la contracción tumoral de ciertos cánceres);
- Predicción y monitoreo de una respuesta fisiológica a una intervención clínica (cirugía, terapia farmacológica, etc.).

Específicamente en el área de oncología, se enlistan cuatro usos de biomarcadores para el manejo de cánceres [9]:

- Evaluación del riesgo de cáncer;
- Estudio de las interacciones tumor-hospedero;
- Determinación del peso del tumor;
- Evaluación de la función celular, tal como los caminos de la apoptosis.

### 1.2.1. USO DE BIOMARCADORES EN ONCOLOGÍA

La tasa de supervivencia del cáncer está fuertemente correlacionada con el estado en el cual la enfermedad es diagnosticada. Una detección temprana de la enfermedad y el desarrollo de métodos de detección mínimamente invasivos, que tienen amplia aceptabilidad por parte del paciente, es un enfoque prometedor para mejorar la supervivencia a largo plazo de los pacientes con cáncer [10].

Recientes avances en las herramientas de la biología molecular y métodos computacionales han habilitado la identificación de nuevos biomarcadores de cáncer. Los biomarcadores son actualmente usados como una estrategia complementaria para técnicas de imagen o histopatología, y su objetivo es proveer información mínimamente invasiva y de fuente efectiva, la cual pueda utilizarse para predecir y pronosticar. Sin embargo, no han sido identificados biomarcadores individuales con sensibilidad satisfactoria (habilidad para detectar individuos con la enfermedad) y especificidad (habilidad para distinguir individuos con la enfermedad de aquellos que son normales o que tienen alguna otra condición) para los cánceres más comunes. Esto se debe, posiblemente, a la heterogeneidad molecular de tumores de paciente a paciente y a que un órgano individual puede contener células tumorales en varias etapas, en el mismo tejido. Además, muchos de los biomarcadores de cáncer se elevan en enfermedades benignas y algunos biomarcadores son indetectables en cánceres en etapas tempranas. Sin embargo, a pesar de las limitaciones, se utiliza de manera rutinaria una variedad de biomarcadores en laboratorios clínicos (TABLA 1.1). El descubrimiento y validación de nuevos biomarcadores de cáncer es dependiente del incremento en las capacidades

técnicas clínicas y de una mejor caracterización de los biomarcadores candidatos ya propuestos [10].

En el área de Oncología, se conoce como “biomarcador de cáncer” al biomarcador que fue producido por la célula tumoral o por el sistema hospedero en respuesta al tumor y que está presente en el tejido tumoral o en los fluidos biológicos. Los biomarcadores de cáncer incluyen muchas moléculas diferentes, como ADN, ARNm o proteínas [8].

Los cambios bioquímicos específicos del tumor originan una variedad de proteínas con características estructurales aberrantes. Estas proteínas, que constituyen biomarcadores de cáncer, en general son poco abundantes y se detectan en la circulación después de ser secretadas por la célula tumoral [11]. Por otro lado, la presencia en el organismo de proteínas aberrantes, no reconocidas por el sistema inmunitario, espolea la producción de anticuerpos de tales proteínas. Estos anticuerpos son utilizados de forma ventajosa como biomarcadores de cáncer en fases tempranas de la enfermedad, cuando la cantidad de proteínas tumorales aún es muy reducida para poder ser detectada pero que ya es suficiente para desencadenar una respuesta amplificada del sistema inmunitario [11].

Los biomarcadores de cáncer son utilizados con un propósito específico, tal como (i) detección temprana/diagnóstico del cáncer, (ii) pronóstico, (iii) respuesta a terapias anticancerígenas, (iv) detección de recurrencia del cáncer, (v) identificación de marcadores tumorales que predicen respuestas para medicaciones particulares [9,11]. Los biomarcadores de cáncer aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) se enlistan en la TABLA 1.1. En la mayoría de los casos, su principal aplicación clínica es para monitoreo de terapia y evaluación de la progresión del tumor [10].

**TABLA 1.1.** Biomarcadores tumorales aprobados por la FDA y utilizados actualmente en la práctica clínica [10].

Marcador	Nombre completo	Tipos de cáncer	Tipo de detección	Aplicaciones clínicas	Año de aprobación por la FDA
AFP	α-Fetoproteína	Hígado	Concentraciones de proteínas y fucosilación del núcleo (para AFP-L3)	Diagnóstico, estadificación, detección de recurrencia y control de la terapia	1992/2008
PSA, Pro2PSA	Antígeno específico prostático	Próstata	Concentraciones de proteínas	Detección, discriminación de cáncer de enfermedad benigna	1986/1994/2012
CA125 (MUC16)	Antígeno de cáncer 125	Ovario	Concentraciones de proteínas	Vigilancia, detección de recurrencia	1997/2011
CEA	Antígeno carcinoembrionario	Colon, gástrico, pancreático, pulmón, y seno	Concentraciones de proteínas	Vigilancia, detección de recurrencia	1985
HER2/neu	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2	Seno	Concentraciones de proteínas	Elección de Terapia	1998
Tg	Tiroglobulina	Tiroides	Concentraciones de proteínas	Vigilancia	1997
HE4 (WFDC2)	Proteína 4 de epidimia humana	Ovario	Concentraciones de proteínas	Monitoreo de terapia, detección de recurrencia	2008
Prueba OVA1 (múltiples proteínas)	B-2 Microglobulina + CA 125II (alta) + apolipoproteína A1 + prealbumina + transferrina (baja)	Ovario	Concentraciones de proteínas	Predicción	2009
Prueba ROMA	HE4 + CA125	Ovario	Concentraciones de proteínas	Predicción	2011
CA15-3 (MUC1)	Antígeno de cáncer 15-3	Seno	O-oligosacáridos sialilados en MUC1	Monitoreo de terapia	1997
CA27-29	Antígeno de cáncer 27-29	Seno	Niveles de proteína MUC1	Monitoreo de terapia	2002
CA19-9	Antígeno de carbohidrato 19-9 o antígeno de cáncer 19-9	Páncreas, ovario	SLe <sup>2</sup> en glicoproteínas de mucina y gangliósidos	Monitoreo de terapia	2002
hCG	Gonadotropina coriónica humana	Testículo, ovario	Concentraciones de proteína	Diagnóstico, estadificación, detección de recurrencia y monitoreo de terapia	No aprobado

La detección de biomarcadores de cáncer en fluidos biológicos tiene las ventajas de ser más simple (menos invasiva) y menos costosa, comparativamente con otras técnicas de diagnóstico y monitoreo (diversas técnicas de imagen y biopsias), siendo muy útil como análisis complementario al ayudar en la valoración clínica [9].

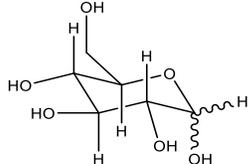
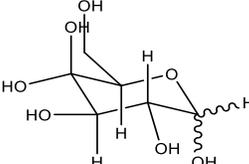
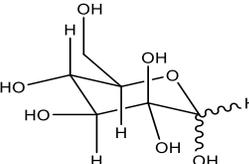
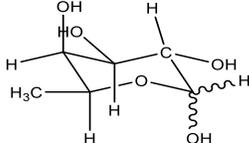
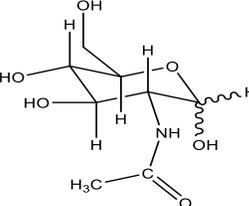
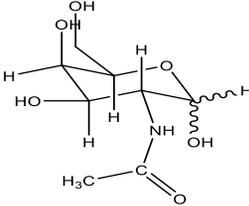
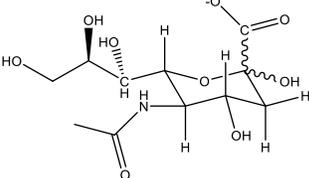
Las alteraciones específicas del cáncer, en una proteína, pueden ocurrir al nivel de la abundancia de la proteína o de las modificaciones post-traduccionales de la misma, como es la glicosilación o la fosforilación [11]. La sangre, con su facilidad de acceso (y riesgo reducido del paciente debido a la naturaleza mínimamente invasiva de la toma de muestra), y por contener en su composición biomoléculas secretadas por todas las células del organismo, es una opción atractiva desde una perspectiva clínica y diagnóstica para la detección de biomarcadores de cáncer [10].

Sin embargo, el problema de la complejidad matricial de los fluidos biológicos es enorme, sobre todo en la sangre, y puede afectar el resultado del análisis. El intervalo de concentraciones de las proteínas plasmáticas comprende alrededor de nueve órdenes de magnitud y, por eso, las proteínas muy abundantes enmascaran la presencia de los biomarcadores, que son proteínas muy poco abundantes, dificultando su detección. La depleción de las proteínas más abundantes del plasma o suero es un procedimiento obligatorio para poder detectar proteínas poco abundantes, aunque, simultáneamente, puede causar la no intencional remoción directa de algunos analitos proteicos de interés que son co-transportados por las proteínas plasmáticas abundantes [11].

### **1.3. BIOMOLÉCULAS RELACIONADAS CON EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER**

Los carbohidratos están compuestos de unidades poli-hidroxi conocidas como monosacáridos, de los cuales los más comunes son: glucosa (Glc), galactosa (Gal), manosa (Man), fucosa (Fuc), ácido siálico (SiA) o ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) y *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) (TABLA 1.2). Estas unidades están unidas unas con otras por un enlace glicosídico entre el grupo hidroxilo anomérico de un monosacárido y cualquiera de las funciones hidroxilo del segundo monosacárido [12].

TABLA 1.2. Nomenclatura de monosacáridos y su estructura [13].

Familia	Azúcar (carbohidrato)	Abreviación	Símbolo	Estructura
Hexosa	Glucosa	Glu		
	Galactosa	Gal		
	Manosa	Man		
Desoxihexosa	Fucosa	Fuc		
N-acetil hexosamina	N-acetilglucosamina	GlcNAc		
	N-acetilgalactosamina	GalNAc		
Ácido siálico	Ácido N-acetilneuramínico	Neu5Ac o Sia		

Los carbohidratos en la naturaleza existen como monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos o glicoconjugados. En contraste con las proteínas, en donde sus secuencias son únicas, los oligosacáridos y polisacáridos son típicamente compuestos

de las mismas unidades repetidas de monosacáridos, como en la celulosa y en el almidón [12].

Los carbohidratos juegan un papel clave mediando interacciones entre células y entre células y otros elementos en el ambiente celular, y pueden operar en las superficies celulares como un denso recubrimiento llamado glicocalix. En el glicocalix, los carbohidratos aparecen principalmente conjugados con proteínas y lípidos, resultando en carbohidratos complejos como las glicoproteínas, glicolípidos o proteoglicanos [12].

### 1.3.1. GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS

La glicosilación de proteínas es un fenómeno que ocurre en células procariontas y eucariotas, siendo el tipo de modificación post-traducciona de proteínas más común [14,15].

Se conoce como glicosilación de proteínas a la reacción enzimática que involucra un grupo hidroxilo anomérico de un azúcar, donde este azúcar se une a una cadena lateral de un aminoácido perteneciente a una proteína mediante un enlace glicosídico. Una proteína puede contener uno o más grupos laterales de carbohidratos ligados con este tipo de enlace covalente. Estos carbohidratos (también conocidos como glicanos) pueden tener desde un solo monosacárido hasta 70 unidades de azúcar de longitud (ligados entre sí, denominados oligosacáridos), y son comúnmente compuestos de Man, Gal, GlcNAc, y SiA. La masa del carbohidrato adherido a la proteína puede ser substancial, representando entre el 10% y el 60% del peso molecular de una glicoproteína. Debido a su tamaño e hidrofilia, las cadenas de glicanos pueden alterar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, incrementando su solubilidad y haciéndolas más estables, reduciendo la flexibilidad de la columna central o protegiéndola de la proteólisis. Además, las cadenas de glicanos pueden servir como direcciones moleculares, marcando el destino intra- o extracelular de una glicoproteína, jugando un papel importante en el tráfico de proteínas [13-17].

Entre las modificaciones co- y post-traduccionales de las proteínas, la glicosilación es por mucho la más compleja, debido al tamaño y la complejidad de los grupos agregados, y a la magnitud de las estructuras celulares dedicadas a la síntesis y modulación [16].

Las proteínas contienen secuencias de polipéptidos que tienen uno o más potenciales sitios de glicosilación. Cada sitio puede o no estar glicosilado, y puede ser glicosilado con una gama de glicanos diferentes. Así, las glicoproteínas existen como una mezcla de variantes de glicosilación estrechamente relacionadas, es decir, un “conjunto de glicofomas”. El conjunto de diferentes glicofomas exhibidas por una glicoproteína simple es específico de las especies o tejidos donde está localizada, puede diferir bajo condiciones fisiológicas variables y diferentes estados patológicos, y puede estar envuelto en la regulación de interacciones moleculares que gobiernan las respuestas celulares. La posibilidad de glicosilación de la misma proteína de diferente manera bajo diferentes condiciones significa que moléculas funcionalmente diferentes pueden ser fácilmente sintetizadas sin la necesidad de alteraciones genéticas. Biológicamente, la heterogeneidad en la forma que una proteína simple es glicosilada puede surgir debido a la forma en que las enzimas de glicosilación actúan, en el aparato de Golgi (AG), y debido a factores como la disponibilidad de sustrato y el tiempo de tránsito de proteínas (a través del sistema de endomembrana). Así, cada célula individual puede sintetizar una glicofoma específica, la cual puede diferir sutilmente entre células vecinas [17].

La importancia biológica de la glicosilación de proteínas es evidente, ya que se calcula que cerca del 50% de las proteínas naturales están glicosiladas, al igual que todas las proteínas integrales de membrana en organismos mayores y muchas proteínas secretadas. Las glicoproteínas son principalmente proteínas de membrana y son abundantemente encontradas en las superficies celulares (membranas plasmáticas), donde están involucradas en procesos de reconocimiento de célula a célula y de célula a matriz, que van desde la fertilización y desarrollo celular hasta infecciones y respuestas inmunes. Sin embargo, también existen en el citoplasma y en el núcleo celular [13,14,16,17].

### 1.3.1.1. GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS HUMANAS

En células humanas, los glicanos están compuestos de una combinación de siete monosacáridos: Man, Glc, Fuc, Gal, GalNAc, GlcNAc, SiA y ácidos neuramínicos (NeuNAc). Pueden existir como moléculas lineales, pero tienden a ocurrir en una formación de tipo anillo, energéticamente más favorable. Son muy similares unos con otros en estructura y en peso molecular, dificultando el análisis de glicanos complejos [17].

Los monosacáridos ocurren como isómeros ópticos (estereoisomerismo), designándose como isómero alfa ( $\alpha$ ) cuando el grupo hidroxilo (-OH) del primer átomo de carbono (C1) se encuentra bajo el plano del anillo, y como isómero beta ( $\beta$ ) cuando el grupo hidroxilo se encuentra por encima del plano del anillo [17].

En las cadenas de glicanos, los monosacáridos están covalentemente unidos unos a otros por enlaces glicosídicos, que resultan de una reacción catalizada por glicosiltransferasas específicas, formando disacáridos (consistiendo en dos unidades de monosacárido), trisacáridos (consistiendo en tres unidades de monosacárido) u oligosacáridos (los cuales contienen entre tres y diez unidades de monosacárido). Estas estructuras pueden ser cadenas lineales o ramificadas [17].

Los enlaces glicosídicos pueden ocurrir entre grupos hidroxilo asociados a diferentes átomos de carbono del monosacárido, generando así diferentes enlaces (ej. un enlace 1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6 o 2 $\rightarrow$ 3) son posibles. Además, los enlaces glicosídicos entre dos unidades de monosacáridos pueden ser de tipo  $\alpha$ -enlace o  $\beta$ -enlace. Un enlace  $\alpha$ -glicosídico se encuentra bajo el plano del monosacárido de izquierda, un enlace  $\beta$ -glicosídico se encuentra encima del plano del monosacárido de izquierda. Así, los enlaces entre el primer carbono de un monosacárido y el cuarto carbono de un segundo monosacárido pueden ser un enlace  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4 o un  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 [17].

Las características químicas del carbohidrato, la posibilidad de enlazarlos unos con otros a través de diferentes átomos de carbono, la elección de  $\alpha$ - y  $\beta$ -enlaces glicosídicos, la estructura lineal o ramificada y de longitudes variables explican la vasta diversidad estructural de las estructuras de glicanos encontradas en células humanas [17].

Los ácidos nucleicos y proteínas son generadas a partir de instrucciones codificadas por el ADN. En contraste, los glicanos no son productos de genes primarios; su síntesis no es “impulsada por plantillas”, más bien son construidos por la acción de enzimas de construcción (glicosiltransferasas) y enzimas de recorte (glicosidasas), colectivamente referidas como glicozimas, del retículo endoplásmico rugoso (RER) y del AG. Las células humanas tienen un repertorio de cerca de 250 glicozimas, reflejando la diversidad de estructuras de oligosacáridos que pueden ser construidos, y la acción coordinada de hasta 30 diferentes enzimas pueden ser requeridas para la síntesis de un solo oligosacárido complejo. Alrededor del 1-2% de genoma de los mamíferos codifica estas enzimas [17].

Las reglas que gobiernan qué estructuras de glicanos son sintetizadas y si los potenciales sitios de glicosilación en el polipéptido están ocupados o desocupados, aún no son entendidos. Sin embargo, están influenciados por diversos factores, que incluyen los niveles de expresión y actividad de las glicosiltransferasas, la disponibilidad del azúcar-donador y aceptor apropiados y la competencia con otras glicosiltransferasas por el sustrato disponible. Además, el tiempo de tránsito de la glicoproteína a través de los compartimentos del AG pueden jugar un rol, ya que el paso rápido limita el tiempo disponible para que las reacciones de glicosilación tengan lugar. La glicosilación está bajo estricto control celular [17].

La localización de las glicosiltransferasas dentro de la vía secretora del RER y AG corresponde aproximadamente al orden en que actúan. Diferencias en su localización ocurren en diferentes tipos celulares y, además, en algunos estados de enfermedad y están asociados con diferencias consecuentes en el repertorio de glicosilación de la célula [17].

A pesar de que todas las células en un organismo poseen los mismos genes para las glicosiltransferasas, no todos son expresados al mismo tiempo. Dependiendo del estado de desarrollo del organismo, del tejido y del estado de la célula, diferentes patrones de transferasas son expresados, llevando a diferentes estructuras de glicanos. Por lo tanto, algunas cadenas de glicanos características pueden ser usadas como marcadores de diagnóstico y como posibles objetivos terapéuticos en enfermedades como el cáncer.

Incluso dentro de una célula, los patrones de la glicosilación de proteínas pueden variar, por lo que las glicoproteínas generalmente existen como poblaciones heterogéneas de variantes glicosiladas [16].

### 1.3.1.2. TIPOS DE GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS (O Y N)

La glicosilación de proteínas es clasificada por el tipo de átomo al cual la cadena de glicano se une, pudiendo ser del tipo *O* y *N*. Las *O*- y *N*-glicoproteínas comparten características comunes, y muchas llevan cadenas de *N*- y *O*-glicanos unidas al mismo péptido [16,17].

#### 1.3.1.2.1. O-GLICOSILACIÓN

La *O*-glicosilación comienza después de que la síntesis de proteínas es completada y es enteramente post-traducciona. En este tipo de glicosilación, el primer monosacárido de la cadena de oligosacáridos (usualmente un GalNAc) se une, mediante un enlace  $\alpha$ -*O*-glicosídico, a un átomo de oxígeno de un grupo hidroxilo presente en los extremos terminales (por lo tanto “*O*-ligante”) de un residuo de aminoácido en la cadena polipeptídica. Este residuo de aminoácido es una serina (Ser) o una treonina (Thr) [16,17].

Los *O*-glicanos usualmente son más pequeños y menos ramificados que los *N*-glicanos (FIGURA 1.4); comúnmente son bi-antenarios, no comparten un núcleo común y son más heterogéneos en sus estructuras [17].

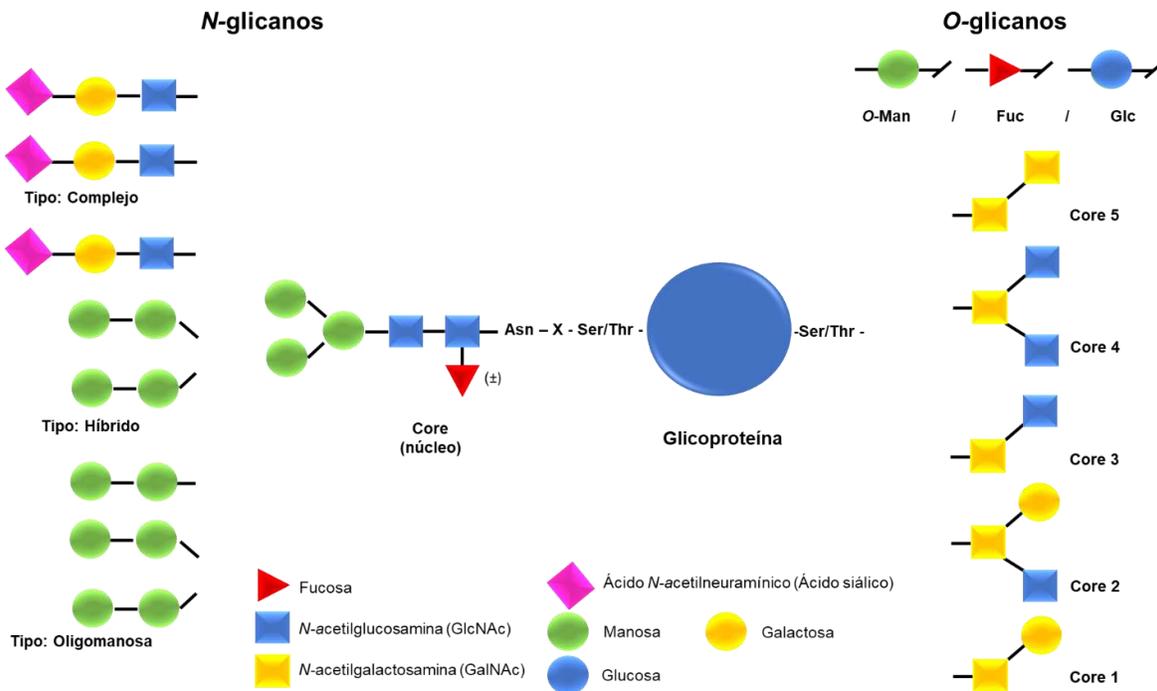
#### 1.3.1.2.2. N-GLICOSILACIÓN

Más de dos tercios de las proteínas contienen secuencias consensadas para *N*-glicosilación. En la *N*-glicosilación, una cadena de carbohidrato es unida covalentemente al átomo N<sub>5</sub>2 de una cadena lateral de asparagina (Asn). Casi todas las cadenas de *N*-glicanos contienen la estructura núcleo (*core*) de pentasacárido GlcNA<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> común:

Man- $\alpha$ -(1,6)-[Man- $\alpha$ -(1,3)]-Man- $\beta$ -(1,4)-GlcNAc- $\beta$ -(1,4)-GlcNAc- $\beta$ -(1,N)-Asn (FIGURA 1.4) [16,13].

La *N*-glicosilación de proteínas comienza en el RER durante la síntesis de proteínas, y continúa durante el transporte de la proteína del RER hacia el AG, siendo así un evento co-traduccional. En este tipo de glicosilación, un residuo de Asn solo puede ser glicosilado si es parte del llamado “sequon”, un motivo (*motif*) de secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (Pro). Además, esta secuencia consensada puede ocurrir varias veces a lo largo de la cadena del polipéptido y cada sitio potencial de glicosilación puede o no ser glicosilado [16,17].

El enlace *N*- de las glicoproteínas involucra la formación de enlaces entre el primer carbono (C1) de un monosacárido GlcNAc, en un enlace  $\alpha$ -*N*-glicosídico, a un nitrógeno (por tanto, *N*-ligando) del grupo amino de un residuo de Asn en la cadena de polipéptido. No todos los sequons que están presentes en una cadena de proteína están glicosilados, lo que significa que la presencia de un sequon es necesaria, pero no un suficiente para la *N*-glicosilación [16,17].

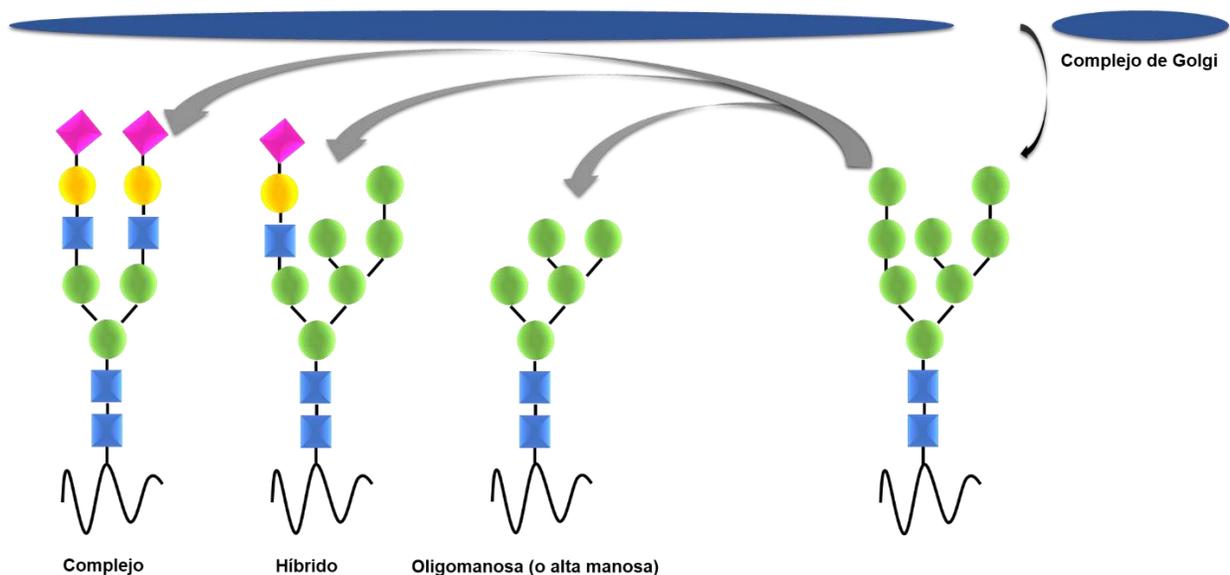


**FIGURA 1.4.** Representación gráfica de las estructuras naturales de los glicanos tanto de tipo *N*- como del tipo *O*- [18].

### 1.3.1.3. BIOSÍNTESIS DE LAS *N*-GLICOPROTEÍNAS

La *N*-glicosilación es el tipo de glicosilación más frecuente de las proteínas secretoras y de membrana en células eucariotas. Las proteínas que pasan a través de la vía secretora del conducto RER-AG son transferidas a la superficie celular donde se exportan o son ancladas a la membrana plasmática, a la matriz extracelular o a la pared celular. El resto de estas glicoproteínas se enfrenta al exterior de la célula y forma parte del glicocalix, una formación compleja y densa de carbohidratos que cubre las células [16].

Los *N*-glicanos biantenarios son los más abundantes, pero los *N*-glicanos tri- y tetraantenarios también son comunes [16]. Las estructuras son clasificadas en tres clases. La estructura oligomanosa (o alta manosa) es aquella en que el núcleo contiene entre cinco y nueve residuos de Man; la estructura compleja no contiene residuos de Man adicionales a aquellos del núcleo trimanosil y es ramificada, resultando en un nivel elevado de complejidad; la estructura híbrida posee características estructurales de oligomanosa y de *N*-glicano complejo (FIGURA 1.5) [16,17].



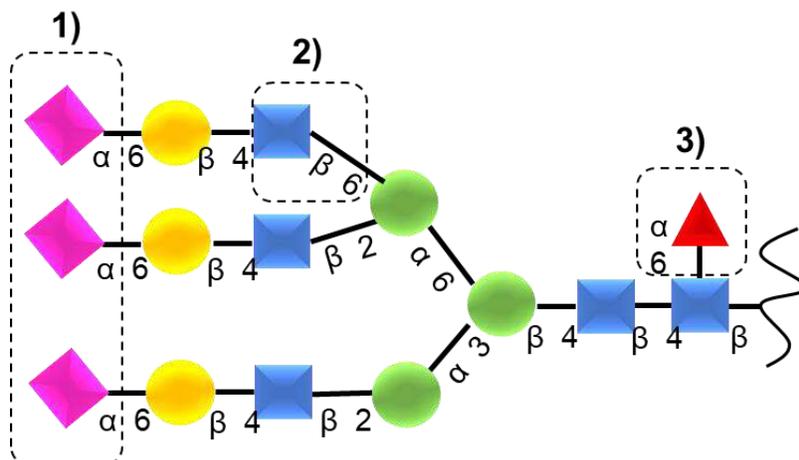
**FIGURA 1.5.** Esquematación simplificada de la modificación de *N*-glicanos en el AG, dando origen a los tres tipos de *N*-glicosilación [13].

### 1.3.1.3.1. BIOSÍNTESIS ABERRANTE DE *N*-GLICANOS EN EL PROCESO ONCOLÓGICO

Las alteraciones en los modelos o patrones de la glicosilación han sido observadas en todos los tipos de células malignas cuando se compararon con las células normales, debido a que las glicosiltransferasas y glicosidasas presentan niveles de actividad alterada, resultando en la expresión de glicoconjugados aberrantes encontrados en las células cancerígenas. Estas alteraciones pueden afectar las interacciones entre los glicanos y demás estructuras celulares y pueden determinar el potencial metastásico de las células tumorales [12].

En las células tumorales se observa un aumento en el tamaño de los *N*-glicopéptidos (tetra-antenarios), el cual ha sido explicado como un incremento en la ramificación  $\beta$ 1-6 de los *N*-glicanos, que resulta de la expresión incrementada de uridina-disfostato-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). Esta alteración en la *N*-glicosilación de proteínas ha sido observada en cáncer de seno, colorrectal, de hígado, de ovario y melanoma [19,20]. El aumento de la ramificación  $\beta$ 1-6 de los *N*-glicanos está asociado al aumento de la expresión de la enzima *N*-acetilglucosaminiltransferasa V (GnT-V), que cataliza la adición de  $\beta$ 1-6GlcNAc del sexto brazo del núcleo de *N*-glicano (FIGURA 1.6) [12,19,20].

Ha sido mostrado que el incremento en las estructuras ramificadas no solo está asociado con estados iniciales de cáncer, sino también con la progresión de estados avanzados y metástasis. Niveles más altos de la expresión de GnT-V fueron positivamente correlacionados con el grado histológico y la presencia de metástasis en tejidos de pacientes con carcinomas [12,19].



**FIGURA 1.6.** Alteraciones más comunes de *N*-glicanos observadas en tumorigénesis: 1) sialilación; 2) incremento en la ramificación  $\beta 1-6$ ; 3) fucosilación del núcleo [20].

Además, la ramificación  $\beta 1-6$  ofrece sitios adicionales para la unión de residuos de SiA terminales. Un aumento general de la actividad de sialiltransferasas y fucosiltransferasas conduce a un aumento en el contenido de SiA y Fuc en las células malignas (FIGURA 1.6). Por ejemplo, las *N*-glicoproteínas fucosiladas están elevadas en el cáncer de ovario, próstata y colorrectal [20].

#### 1.3.1.4. *N*-GLICANOS ABERRANTES COMO BIOMARCADORES

La leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) ha sido utilizada frecuentemente para la detección de la ramificación  $\beta 1-6$  presente en estructuras aberrantes de *N*-glicanos, independientemente de la técnica utilizada para su detección o cuantificación [21].

La PHA-L requiere la antena  $\beta 1-6$ -lactosamina (ramificación  $\beta 1-6$ ) para mayor afinidad de unión. Este hecho fue usado en los estudios publicados por Dennis et al. en 1989 [22] para cuantificar estas estructuras en glicoproteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio. Los niveles del oligosacárido reactivo a PHA-L fueron comparados en una serie de biopsias de seno humano malignas y benignas. Los tejidos normales de seno humano y lesiones benignas mostraron baja expresión,

pero el 50% de las malignidades primarias examinadas mostraron un aumento significativo de la reactividad a PHA-L. La actividad de la GnT-V en los carcinomas de seno humano se correlacionó con los niveles de reactividad a la PHA-L en el tejido. Los resultados mostraron que la ramificación  $\beta$ 1-6 ligada a oligosacáridos es dependiente de la regulación de la actividad de GnT-V. Un subconjunto de tumores malignos de seno humano mostró elevados niveles de oligosacáridos ramificados  $\beta$ 1-6, comparados con muestras benignas, sugiriendo la asociación entre la presencia de estos oligosacáridos, la metastización y la reducción del tiempo de supervivencia del paciente.

En 2004 se diseñó un estudio para extraer las glicoproteínas que eran glicosiladas aberrantemente por la fucosiltransferasa-8 (Fut8) y/o GnT-V en tumores gástricos en humanos, y para proporcionar una guía para los estudios proteómicos funcionales posteriores [23]. Para ello, seis conjuntos de muestras de tejido, cada uno consistiendo en tejidos cancerosos y normales, fueron preparados a partir de materiales de resección de pacientes de cáncer gástrico del Hospital Universitario Católico (Korea). El análisis se llevó a cabo utilizando la técnica de electroforesis en gel-bidimensional (2-DE). Las transferencias de membrana se trataron con aglutinina de *Lens culinaris* (LCA; con afinidad por el enlace  $\alpha$ 1-6-Fuc) marcada con biotina o lectina PHA-L. Posteriormente, fueron visualizadas por quimioluminiscencia. Respecto a los resultados, se notó que las muestras de tejido canceroso fueron más reactivas tanto a LCA como a PHA-L en comparación con los tejidos sanos. Estos resultados son consistentes con la observación de que la transformación neoplásica y maligna está estrechamente asociada con un incremento en la ramificación  $\beta$ 1-6 en *N*-glicanos complejos.

Una investigación publicada en 2017 sobre cáncer de seno [21] menciona el uso de la técnica de espectrometría de masas y de la lectina PHA-L, la cual se une específicamente a las ramificaciones  $\beta$ 1-6 de estructuras *N*-ligadas en glicoproteínas. Esta lectina mostró una unión selectiva a células epiteliales de seno a medida que la enfermedad progresó a carcinoma invasivo, pero no a las células sanas. Usando esta lectina, las ramificaciones  $\beta$ 1-6-*N*-acetilglucosamina ( $\beta$ 1-6-GlcNAc) de *N*-glicanos contenidos en glicoproteínas fueron detectados en los tejidos de controles sanos y de pacientes con carcinoma invasivo. En contraste con los controles sanos, 12

glicoproteínas fueron detectadas en los tejidos de carcinoma de seno ductal invasivo. Estos resultados indicaron que las estrategias de enriquecimiento o adición de lectina (técnica que se empleó en estos ensayos) dirigida a un cambio de glicano en particular, asociado con la malignidad, puede ser un método efectivo de identificación de potenciales biomarcadores para carcinoma de seno.

#### 1.4. DETECCIÓN DE GLICANOS POR MEDIO DE LECTINAS

Los carbohidratos son reconocidos de forma específica por un grupo particular de proteínas llamadas lectinas. Ellas son una clase de proteínas de origen natural no inmune, presentando estructuras diversas, que pueden aglutinar células y precipitar carbohidratos complejos o polisacáridos. Su interacción con los sacáridos se asemeja a las reacciones sustrato-enzima y antígeno-anticuerpo [12].

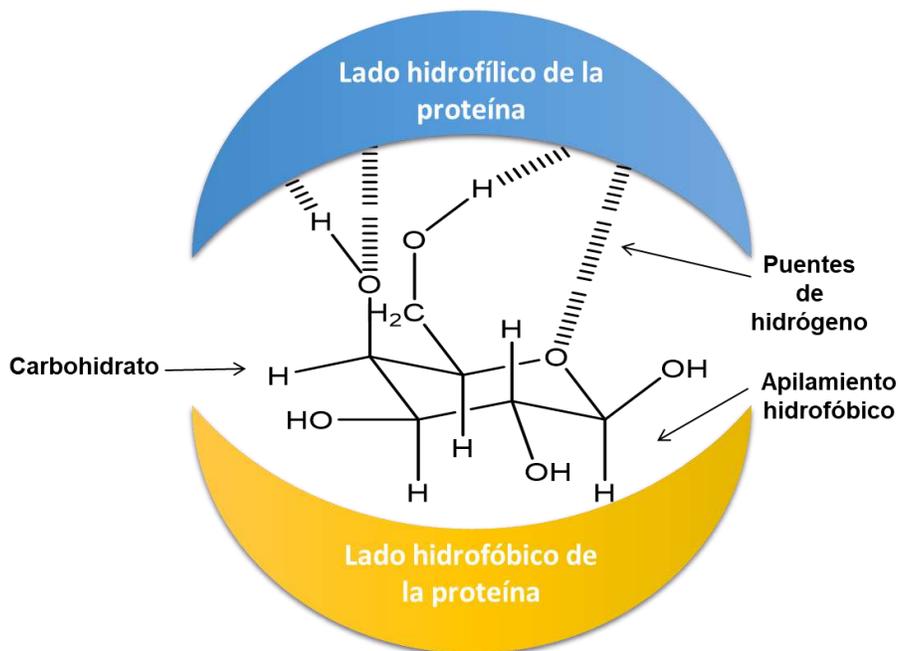
Los carbohidratos interactúan con las lectinas a través de puentes de hidrógeno, coordinación metálica, interacciones hidrofóbicas y de van der Waals. Los puentes de hidrógeno son comunes en estructuras de sacáridos debido a la presencia de grupos hidroxilo. En el reconocimiento de los carbohidratos por parte de muchas lectinas, son necesarios cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , que están involucrados ya sea directamente, por organización del sitio de enlace, y estabilizando la conformación molecular de las lectinas, o a través de la unión directa del carbohidrato al  $\text{Ca}^{2+}$ , como en las lectinas de tipo C. A pesar del carácter hidrofílico de los carbohidratos, las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en el reconocimiento de carbohidratos por lectinas [12].

El enlace entre una lectina y un carbohidrato monovalente es típicamente débil ya que las lectinas generalmente poseen cavidades de unión superficiales o poco profundas que están expuestas a solventes [12].

Las interacciones carbohidrato-proteína son mucho más débiles que las interacciones proteína-proteína. Dependiendo de la técnica utilizada para el análisis, el valor de la constante de disociación ( $K_D$ ) de los enlaces de lectina con un monosacárido simple puede variar, llegando a encontrarse en la literatura el valor de aproximadamente 1 mM.

Sin embargo, en el contexto biológico, esta limitación ha sido superada por interacciones multivalentes. La interacción entre la lectina y el carbohidrato no es un simple evento de enlace monomérico, pero un mecanismo de enlace oligo- o polimérico [12].

Las lectinas a menudo tienen más de un sitio de unión de carbohidrato, y ha sido mostrado que la ocurrencia de dos eventos de enlace simultáneos puede incrementar la avidéz de interacción por más de 100 veces, e incluso tan alto como 10,000 veces. En la interacción con un mono- u oligosacárido cargado, la lectina está inclinada a tener una afinidad ligeramente mayor. En general se puede decir que, con la incorporación de elevadas densidades de carbohidratos en la superficie celular, los puntos de contacto multivalente (puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals y el apilamiento hidrofóbico) entre los carbohidratos y las proteínas pueden resultar en un efecto de aglomerado de glucósidos, lo que conduce a una mejora casi logarítmica de las potencias de unión (FIGURA 1.7) [12].



**FIGURA 1.7.** Puntos de contacto multivalente entre el carbohidrato y la proteína [12].

En contraste con otros métodos para analizar glicanos, como cromatografía (líquida de afinidad, de fase normal), espectrometría de masas y digestión enzimática, las lectinas

pueden detectar estructuras específicas de glicanos a partir de pequeñas cantidades de muestras biológicas. Esta capacidad es importante para distinguir cambios en estructuras de glicanos entre muestras o condiciones, lo cual es fundamental para entender la intervención de glicanos particulares en una enfermedad. Las lectinas han sido usadas exitosamente en una amplia variedad de formatos, como en histoquímica, electroforesis de afinidad, tinción de células por inmunofluorescencia, entre otras, para caracterizar tanto la glicosilación normal como la patológica [24].

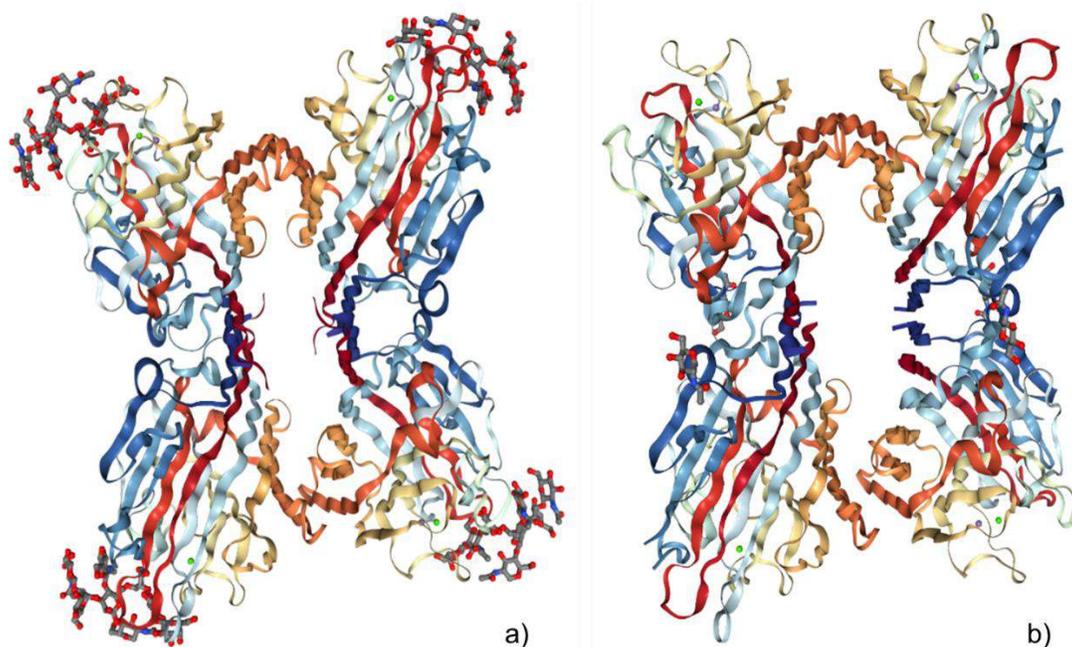
Las lectinas pueden utilizarse para la identificación de glicanos específicos del cáncer en biomarcadores glicoproteicos. La habilidad de las lectinas para discriminar entre diferentes estructuras de glicanos les confiere mucha utilidad para glicoanálisis [25].

En el estudio de glicanos, tanto las lectinas como los anticuerpos tienen ventajas discretas entre ellos. A pesar de que los anticuerpos monoclonales tienen mayor especificidad a los glicanos, la unión específica de los glicanos a las lectinas de plantas y animales está mejor caracterizada. En este sentido, las lectinas tienen una especificidad más amplia y, por tanto, garantizan una mayor cobertura del glicoma. Tal como se ha mencionado, las interacciones lectina-glicano son más débiles (reportando para este caso en específico una  $K_D = 10^{-4}$ - $10^{-7}$  M) comparadas con las interacciones típicas antígeno-anticuerpo ( $K_D = 10^{-8}$ - $10^{-12}$  M) [25]. Una débil afinidad lleva a una sensibilidad pobre en un ensayo analítico; esta es una seria limitación, debido a que rara vez se encuentra un glicano de forma abundante en una muestra biológica [24].

#### 1.4.1. LEUCOAGLUTININA DE *Phaseolus vulgaris*

Las semillas del frijol común contienen una fracción de proteína con propiedades de unión a azúcar (aglutinantes) y hemaglutinantes, llamada fitohemaglutinina (PHA) [26]. Esta fracción contiene dos lectinas (isolectinas) que son conocidas como eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) y leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) (FIGURA 1.8), con un peso molecular de 34 kDa y 32 kDa, respectivamente [27,28]. Estas subunidades son sintetizadas junto al RER y después son combinadas aleatoriamente cinco diferentes tetrámeros, construidos a partir de los dos polipéptidos

antes mencionados (PHA-L y PHA-E): L<sub>4</sub>, L<sub>3</sub>E, L<sub>2</sub>E<sub>2</sub>, LE<sub>3</sub>, E<sub>4</sub> [26,29]. A su vez, todas estas isolectinas son glicoproteínas de aproximadamente 125 kDa [29].



**FIGURA 1.8.** Estructuras tridimensionales de las dos isolectinas de PHA: a) PHA-E y b) PHA-L [26]. Estructuras consultadas en la página del Banco de Datos de Proteínas (RCSB PDB), disponibles en: <https://www.rcsb.org/structure/1FAT>.

Estas isolectinas tienen similares propiedades fisicoquímicas y homología estructural, pero difieren en sus actividades biológicas relativas [29]. Las isolectinas PHA-E y PHA-L poseen fuerte actividad mitogénica y de aglutinación de las células sanguíneas, siendo que la PHA-E aglutina eritrocitos y la PHA-L aglutina leucocitos [27].

La especificidad de las aglutininas de *Phaseolus vulgaris* es compleja. Hay algunas superposiciones en especificidad entre la PHA-L y la PHA-E, pero ambas exhiben reactividad única con varias glicoproteínas diferentes. Por ejemplo, la PHA-L reacciona fuertemente con la glicoproteína de Tamm-Horsfall, mientras que la PHA-E no reacciona del todo con esta glicoproteína; la PHA-E se une con elevada afinidad a la tiroglobulina porcina, mientras que la PHA-L reacciona solo débilmente; la PHA-E forma un precipitado con varias glicoproteínas de suero incluyendo la fetuina, mientras que la

PHA-L, aunque se una a esta glicoproteína, no la precipita. La PHA-L es fuertemente inhibida por el trisacárido Gal  $\beta(1,4)$ GlcNAc $\beta(1,2)$ Man. Esta estructura está presente en diversas glicoproteínas, incluyendo fetuina y transferrina, pero la PHA-L no reacciona con ninguna de estas glicoproteínas [27].

#### 1.4.2. DETECCIÓN DE *N*-GLICANOS ABERRANTES POR MEDIO DE LA PHA-L

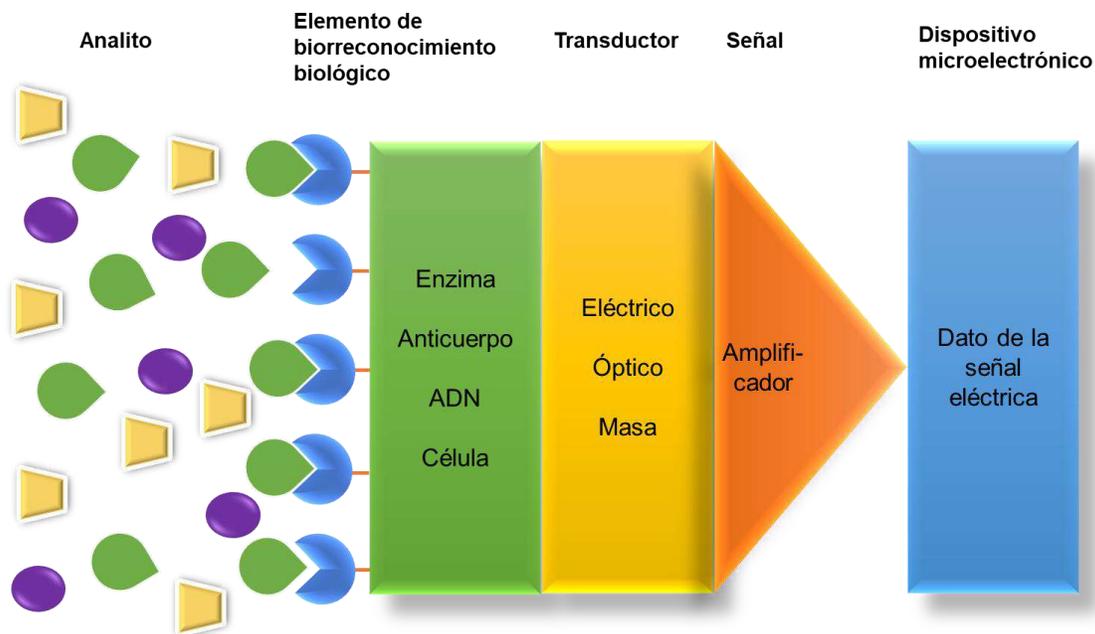
La PHA-L reconoce específicamente los *N*-glicanos con estructura ramificada y ha sido utilizada en diversos estudios para evidenciar la expresión aumentada de estos *N*-glicanos. Algunos de los ejemplos del uso de la PHA-L para la detección de *N*-glicanos ramificados están indicados en la sección 1.3.1.4.

### 1.5. BIOSENSORES Y SU APLICACIÓN EN ONCOLOGÍA

#### 1.5.1. ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO GENERAL DE UN BIOSENSOR

En las últimas décadas, la biodetección se ha convertido en un sector en rápido desarrollo basado en el conocimiento de diversos campos, incluyendo la Química, la Bioquímica, la Biomedicina, la Biotecnología, la Nanotecnología y las Ciencias de los Materiales [18].

Un biosensor es un dispositivo integrado, el cual es capaz de proveer información analítica cuantitativa y semi-cuantitativa a través de la interacción de un analito con un elemento de reconocimiento biológico (bioreceptor de moléculas), el cual está en contacto directo con un elemento de transducción (FIGURA 1.9) [20,30].



**FIGURA 1.9.** Esquema general de la estructura de un biosensor [30].

Muchas biomoléculas pueden servir como elementos de bio-reconocimiento, tales como las proteínas (enzimas, anticuerpos y lectinas), oligosacáridos, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y microorganismos [20,30].

Debido al amplio conjunto de elementos de reconocimiento biológico que pueden ser utilizados, la diversidad de analitos que pueden ser detectados también es enorme, haciendo los biosensores muy útiles en muchas áreas de investigación. Los elementos de bio-reconocimiento son a menudo inmovilizados en la superficie del transductor. Una vez establecido el bio-reconocimiento, el transductor es capaz de convertir la señal generada por la reacción bioquímica en una señal medible, que es proporcional (o inversamente proporcional) a la concentración del analito, la cual puede ser amplificada y procesada apropiadamente [30,31].

Los biosensores pueden ser divididos en dos principales grupos basados en el tipo de elemento de bio-reconocimiento. El primer tipo incluye los biosensores catalíticos (utilizando enzimas, varios tipos de células y tejidos) y el segundo grupo está compuesto

por los biosensores de afinidad, aplicando anticuerpos, receptores, lectinas y ácidos nucleicos/aptámeros como elementos de bio-reconocimiento [20].

El transductor es un dispositivo para convertir un conjunto amplio de efectos físicos, químicos o biológicos en una señal eléctrica con una alta sensibilidad y perturbación mínima en la medición. Los transductores pueden ser categorizados en cinco clases principales: electroquímica (amperométrica, impedimétrica, potenciométrica), óptica, magnética, pizoeléctrica (métodos de detección de masa) y térmica [30].

Las técnicas de transducción de señal en los biosensores pueden ser divididas en dos grupos, según el uso o no de marcadores (*labels*) del evento de reconocimiento. Los biosensores que requieren marcadores están diseñados para transducir la señal analítica de una molécula marcada (*label*) que no es la misma del analito. Este tipo de transducción permite la implementación de diversos esquemas de detección, pero aumentan el tiempo y el costo del ensayo, ya que se introducen pasos adicionales para posibilitar la detección [32]. Además, puede introducir variabilidad no deseada en un evento de bio-reconocimiento, afectando la capacidad de unión del elemento de bio-reconocimiento al analito [33]. Por otro lado, las modificaciones a las proteínas unidas a glicanos, como la marcación con fluoróforo, la biotilación y la inserción de una etiqueta His, pueden reducir la actividad o alterar la selectividad de la unión. Los reactivos secundarios para la marcación con fluoróforo no están disponibles para muchas proteínas, principalmente para las de reciente descubrimiento que se encuentran unidas a glicanos. Finalmente, muchos fluoróforos son sensibles a la luz y propensos a la degradación oxidativa. Por lo tanto, la intensidad de la señal decrecerá con el tiempo y puede variar con las condiciones experimentales. Debido a estas limitaciones, ha habido un interés considerable en el desarrollo de estrategias de detección alternativas, especialmente en métodos *label-free* [34].

En los biosensores *label-free*, el cambio de señal se genera en un solo paso en cuanto el analito objetivo es reconocido por la capa de las moléculas biorreceptoras. Aunque requieren formatos muy específicos, este tipo de biosensores presenta ventajas en cuanto al tiempo, a la capacidad de monitoreo en tiempo real y a la simplicidad del ensayo. De manera general, los formatos de biosensores se enfrentan al problema de

las interferencias de adsorción inespecífica, especialmente con muestras complejas como el suero sanguíneo, que afectan la sensibilidad del dispositivo. Los *label-free* no son la excepción, donde estos compuestos no específicos de la matriz pueden unirse a la superficie del transductor, teniendo como consecuencia resultados falsos positivos. Sin embargo, para controlar este tipo de comportamiento, se ha recomendado el uso de agentes de bloqueo como recubrimientos sobre la superficie de soporte expuesta. Otra estrategia es diluir la muestra para minimizar la unión no específica, cuidando no diluir de más la concentración del analito, especialmente si se espera que esta sea demasiado baja [32].

Los biosensores presentan diversas ventajas como herramientas analíticas, tales como: (i) especificidad elevada para llevar a cabo mediciones selectivas en medios complejos; (ii) rapidez en la medición; (iii) posibilidad de combinarse con sistemas automatizados; (iv) volumen requerido de muestra bajo; (v) bajo o nulo uso de solventes orgánicos; (vi) portabilidad [31,32].

Siendo un dispositivo analítico, las características de presentación de un biosensor deben ser evaluadas por parámetros usados en la caracterización de un método analítico. Por tanto, un biosensor debe ser evaluado cuanto a: (a) sensibilidad, que refleja el cambio en la respuesta producida por un cambio unitario en la concentración del analito; (b) el intervalo lineal de concentraciones que el biosensor puede detectar; (c) el límite de detección, que es la concentración más baja del analito que puede ser medida por el biosensor; (d) la selectividad, que es la habilidad del biosensor de responder solo al analito sin interferencia de otros componentes de la muestra; la selectividad del biosensor depende, principalmente, de la especificidad de la interacción entre el analito y el bioreceptor; (e) el tiempo de respuesta, que refleja el tiempo requerido por el biosensor para indicar la respuesta provocada por la presencia del analito; (f) la reproducibilidad, que indica la precisión del proceso de medición; (g) la estabilidad, que caracteriza la constancia en la respuesta del biosensor durante un periodo fijo de tiempo [30].

## 1.5.2. TRANSDUCTORES EMPLEADOS EN LOS BIOSENSORES DE LECTINAS

En el caso de los biosensores basados en lectinas para el diagnóstico clínico de cáncer, así como para la detección de infecciones bacterianas y virales, se utiliza principalmente la transducción electroquímica (TABLA 1.3) y, en algunos casos, la óptica [12].

**TABLA 1.3.** Transductores utilizados en biosensores basados en lectinas [12].

Lectina	Elemento sensor biológico	Transductor físico	Mecanismo de detección
Concanavalina A (Con A)	Fiebre de dengue y fiebre hemorrágica de dengue	Electroquímico	Carbohidrato – interacción con lectina
Aglutinina de <i>Cratylia mollis</i> (Cramoll)	Detección de serotipos del virus de dengue	Electroquímico	Carbohidrato – interacción con lectina
Con A	Expresión de Man y SiA en condiciones normales	Electroquímico	Biosensor basado en lectina con bioconjugados con etiquetas de lectina y tiónina unidas a nanopartículas de oro para amplificación de señal
Aglutinina de <i>Sambucus nigra</i> (SNA)			
Con A	Carbohidratos de bacterias gram-negativas y gram-positivas, hongos, y células humanas de cáncer cervical	Electroquímico	Carbohidrato – interacción con lectina
Aglutinina de <i>Ricinus communis</i> (RCA)			
Con A	Enterobacteria patogénica, como <i>Clostridium jejuni</i> , <i>Helicobacter pylori</i>	Pizoeléctrico	Aglutinación de células específicas
Aglutinina de <i>Ulex europaeus</i> (UEA)			
Aglutinina de <i>Maackia amurensis</i> (MAL)			
Aglutinina de <i>Lens culinaris</i> (LCA)			
Aglutinina de <i>Wheat Germ</i> (WGA)			
Aglutinina de <i>Aleuria aurantia</i> (AAL)	Gonadotropina coriónica humana hiperglicosilada producida por neoplasia trofoblástica gestacional maligna y tumores de células germinales masculinas	Óptico	Lectinas que reconocen carbohidratos
Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i> (GNL)			
Eritroaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA-E)			
Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> (PSA)			
RCA			
MAL			
SNA			
WGA	Cepas de <i>C. jejuni</i>	Pizoeléctrico	Lectinas que reconocen carbohidratos
WGA			
MAL			
LCA			
Con A			

La transducción óptica es lograda midiendo la luz absorbida o emitida por un componente de la capa del biosensor a una longitud de onda específica. En los biosensores de transducción óptica, el analito interactúa con la capa de la molécula biorreceptora para inducir el cambio de la señal óptica [30].

El biosensor requiere una guía óptica para transmitir luz a lo largo de las direcciones seleccionadas para la detección. Las guías de onda ópticas pueden ser construidas en forma de fibras ópticas, en una configuración planar o en otras geometrías. Varias técnicas espectroscópicas pueden ser usadas para el desarrollo de biosensores ópticos como absorción, fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia de plasmón de superficie (SPR) y espectroscopía Raman [30].

Otra método de transducción poco utilizado, pero reportado por algunos autores en sus investigaciones, es el pizoeléctrico. En este caso, el efecto pizoeléctrico es explicado como la interacción electromecánica lineal entre los sistemas mecánicos y eléctricos en materiales cristalinos sin simetría de inversión. Estos biosensores son llamados sensores de microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM). El material transductor (cuarzo) tiene una frecuencia de resonancia natural, y los elementos de bio-reconocimiento son inmovilizados sobre el transductor. Un circuito eléctrico externo es aplicado para controlar la frecuencia y para producir una corriente, y el proceso de reconocimiento molecular del analito provoca un cambio de frecuencia, el cual producirá el cambio de señal analítica [30].

Finalmente, la detección electroquímica es muy a menudo utilizada en combinación con otras técnicas, como la separación y la digestión enzimática de glicanos, en el campo de la glicómica. El verdadero potencial de la técnica está en sus características atractivas en comparación con otros medios de detección, tales como la simplicidad operativa, sensibilidad extraordinaria, bajo costo, rapidez y detección en tiempo real [33]. Además, los métodos electroquímicos no requieren requerimientos estrictos de geometría, forma o tamaño del electrodo (transductor); pueden ser fácilmente usados en modos de flujo para sistemas analíticos automatizados y permiten la miniaturización de electrodos transductores. El biosensor electroquímico es el biosensor más usado en áreas como el diagnóstico clínico [30].

De acuerdo con el principio de generación de la señal, los biosensores electroquímicos pueden ser divididos en cuatro categorías principales [20,30,35]:

1. Amperométrico/Voltamétrico: la técnica mide la corriente aplicando un potencial constante a un electrodo de trabajo *versus* un electrodo de referencia con la ayuda de un electrodo auxiliar o contraelectrodo, en función del tiempo [30,35]. El electrodo de trabajo está usualmente hecho de oro (Au), carbono (C) o platino (Pt); el de referencia está generalmente hecho de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) [30]. La reacción bioquímica involucra la oxidación y reducción de especies electroactivas, y la corriente que resulta de esa reacción es proporcional a la concentración del analito [30,35]. En voltametría, el potencial es escaneado en un intervalo establecido, y la respuesta es un pico o meseta proporcional a la concentración del analito. Sin embargo, en amperometría, se aplica un potencial constante al electrodo de trabajo [30].
2. Potenciométrico. Está basado en la medición del potencial de la celda electroquímica mientras la corriente es nula o insignificante (de forma constante), siendo que el potencial medido es, en realidad, la diferencia de potencial entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia [30,35]. El potencial del electrodo indicador se debe a la interacción entre este y el analito, y es proporcional al logaritmo de la concentración de la especie a determinar [35]. Los electrodos indicadores más comunes son electrodos selectivos a iones o electrodos de pH con una membrana selectiva de unión a iones específicos. Este tipo de transducción puede ser utilizada en biosensores inmovilizando una capa de elemento de bio-reconocimiento biológico sobre el electrodo indicador [30].
3. Conductimétrico. Para la transducción conductimétrica, la información es obtenida midiendo la conductividad del electrolito, donde se usa una correlación entre la conductancia y la concentración de las especies iónicas que son responsables de esta conductividad [30,35]. El transductor está compuesto por dos electrodos separados por una cierta distancia o por un medio como un nanocable. El cambio de composición iónica proporciona un cambio de conductancia, que puede ser medido usando un ohmímetro. La transducción conductimétrica se puede emplear

en biosensores catalíticos y en dispositivos micro/nanoeléctricos como el transistor de efecto de campo (FET) para un biosensor de afinidad. Como la medición de transducción conductimétrica es una propiedad aditiva, es menos sensible comparada con otros métodos electroquímicos y es fuertemente dependiente de la respuesta a la capacidad de la solución tampón [30].

4. Impedimétrico. La técnica electroquímica *label-free* frecuentemente usada es la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Esta técnica está basada en una perturbación eléctrica (pequeña amplitud de corriente alterna) de una capa delgada en la superficie conductora con la capacidad de proporcionar características (impedancia, resistencia y capacitancia) de esta interfaz utilizable en la detección, mediante el empleo de un circuito equivalente para la evaluación de datos [33].

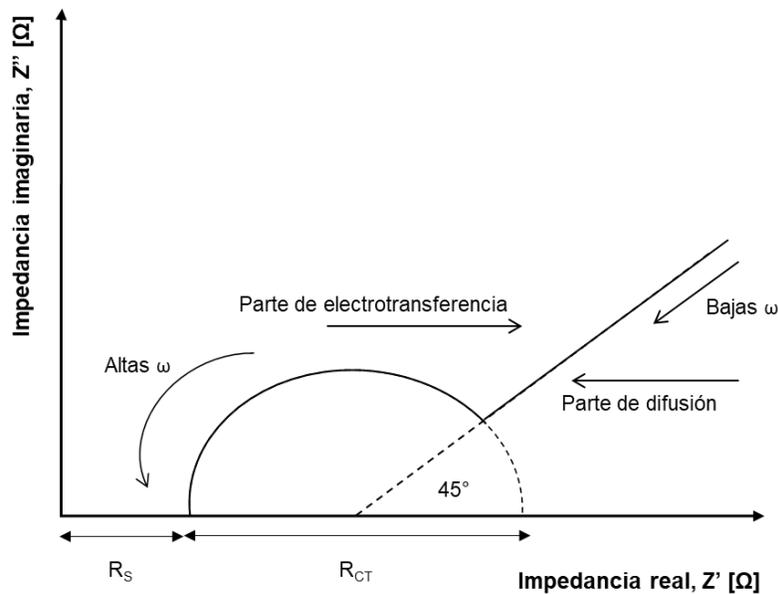
La EIS es una técnica analítica sensible, que puede o no ser destructiva, y se utiliza para la caracterización de sistemas electroquímicos de materiales (de una interfaz electrodo-electrolito). La EIS se aplicó originalmente en la investigación sobre el sistema electroquímico, y, a partir de 1920, comenzó a ser utilizado en sistemas biológicos [36-39].

El método de análisis por EIS es adecuado para el sondeo de interacciones interfaciales en electrodos de superficie modificada y, en el caso específico de la glicómica, para evaluar el perfil de glicosilación de manera ultrasensible, en que el analito puede detectarse hasta un nivel de molécula individual [18,20].

En EIS, un pequeño potencial sinusoidal (2-10 mV) es aplicado a una celda electroquímica y la respuesta de la corriente resultante es medida. Consecuentemente, la impedancia es calculada como el ratio entre el voltaje del sistema  $U(j\omega)$  y la señal de corriente  $I(j\omega)$ , donde  $j=\sqrt{-1}$ , y  $\omega$  y  $f$  son frecuencias de excitación expresadas en unidades  $\text{rad s}^{-1}$  y Hertz (Hz), respectivamente. Una vía común para representar una impedancia compleja es usar una suma del componente real (resistivo) de la impedancia  $Z_{Re}(\omega)$  y la parte imaginaria (capacitiva)  $Z_{Im}(\omega)$ . En analogía con la Ley de Ohm, la impedancia electroquímica está dada por (ECUACIÓN 1.1) [20]:

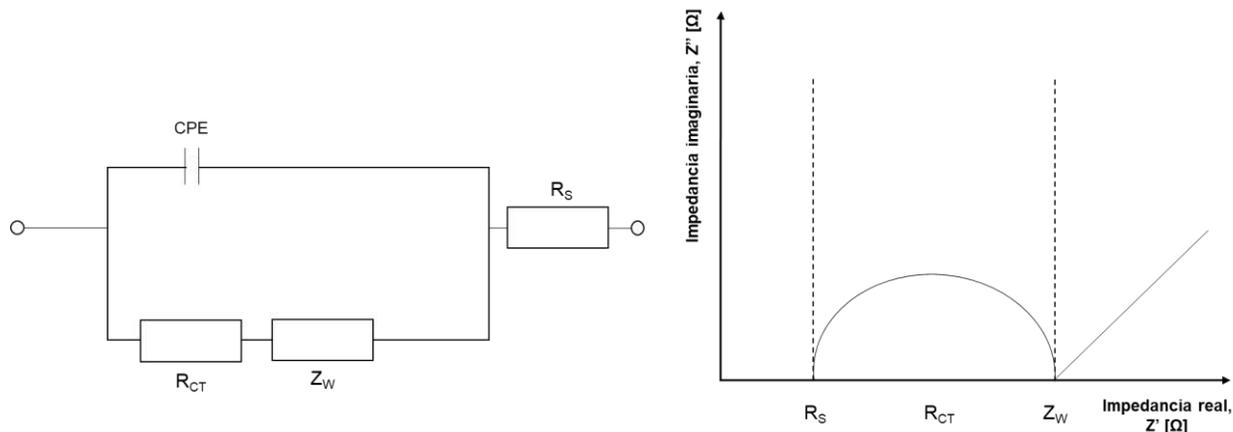
$$Z(j\omega) = U(j\omega) / I(j\omega) = Z_{Re}(\omega) + jZ_{Im}(\omega) ; \omega = 2\pi f \quad \text{ECUACIÓN 1.1.}$$

Los datos de impedancia son típicamente representados en un diagrama de *Nyquist* mostrando la relación entre la impedancia real y la impedancia imaginaria (FIGURA 1.10). Un diagrama de *Nyquist* provee una visión de las dinámicas de un sistema electroquímico con un semicírculo y una parte lineal. La parte del semicírculo a elevadas frecuencias coincide con un proceso limitado por transferencia de electrones, mientras que la parte lineal, a bajas frecuencias, expresa un proceso limitado por difusión. Si un proceso de transferencia de electrones muy rápido está presente, el diagrama de *Nyquist* podría incluir solo una región lineal. Por otra lado, en caso de un proceso de transferencia de electrones muy lento, se observa un semicírculo largo sin una región lineal [20].



**FIGURA 1.10.** Diagrama de *Nyquist* típico en análisis por EIS, donde se reflejan las características del sistema [20].

Un típico circuito de equivalencia (de acuerdo con el modelo de Randles y Ershler) considera la resistencia de la solución de electrolito ( $R_s$ ), la capacitancia de la doble capa (CPE), el coeficiente de Warburg ( $Z_w$ ) y la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{CT}$ ) (FIGURA 1.11) [20].



**FIGURA 1.11.** Esquema de un típico circuito de equivalencia aplicado para la evaluación de datos de EIS (a la izquierda) con la representación de un diagrama de *Nyquist*, usado para la medición de  $R_{CT}$  (a la derecha). CPE, capacitancia;  $R_{CT}$ , resistencia a la transferencia de electrones;  $R_S$ , resistencia de la solución; y  $Z_W$ , un elemento de Warburg [33].

Usando un par redox, generalmente una mezcla de ferriciaruro y ferrocianuro, se obtiene el cambio en la resistencia a la transferencia de carga  $R_{CT}$ , la cual es inversamente proporcional a la velocidad de la transferencia de electrones. La capacitancia de la doble capa (CPE) y la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{CT}$ ) describen características dieléctricas y de aislamiento de la interfaz electrodo-electrolito. La resistencia electrolítica ( $R_S$ ) y la impedancia de Warburg ( $Z_W$ ) caracterizan las propiedades de una solución electrolítica y la limitación de difusión, para que la sonda redox alcance la superficie del electrodo y no afecte la transferencia de electrones en la superficie de este. La detección en el ancho del intervalo de frecuencias ( $10^{-4} - 10^{-6}$  Hz) hace que la estrategia de EIS sea útil para el análisis de difusión y para proporcionar características cinéticas [20].

Los elementos físicos utilizados para EIS comprenden un potencióstato, mediante el cual se aplica un potencial programado al circuito y se detecta su corriente, además de tres electrodos: a) Trabajo, el cual ayuda en el estudio de solo una de las interfaces (electrolito-electrodo). b) Referencia, que debe ser un dispositivo

estándar. c) Contraelectrodo (que puede ser de platino o grafito, entre otros materiales), cuya función es que la mayor parte de la corriente sea aplicada a la interfaz de interés y no al electrodo de referencia, permitiendo que las variaciones o lecturas de tensión correspondan solo a la interfaz del electrodo de trabajo [38].

El análisis *label-free* característico de la EIS resulta en una ventaja indiscutible, debido a que se llegó a observar que el proceso de marcación de biomoléculas puede afectar la bioafinidad entre el agente de bio-reconocimiento y el analito, resultando en un falso positivo/negativo. Además, la detección por EIS proporciona límites de detección muy bajos (en el intervalo de pM a aM) [20].

Debido a estas características atractivas, la técnica de EIS está ganando popularidad en estudios basados en interacciones lectina-carbohidrato, proteína-glicano y anticuerpo-antígeno [20]. En el área oncológica, estas particularidades son también muy ventajosas, debido a las bajas concentraciones de los analitos a detectar y/o cuantificar en muestras cuya disponibilidad es limitada.

### 1.5.3. APLICACIONES DE LOS BIOSENSORES DE LECTINAS EN EL ÁREA DEL CÁNCER

Los biosensores (electroquímicos y otros) de lectinas se han aplicado para el análisis del antígeno carcinoembrionario (CEA),  $\alpha$ -fetoproteína y células cancerosas intactas [18].

Recientemente, se aplicaron dispositivos de espectroscopía de impedancia microeléctrica ( $\mu$ EIS) para diferenciar entre células normales y cancerosas utilizando sus amplitudes y ángulos de fase. Se ha demostrado que esta estrategia era efectiva como herramienta de diagnóstico, siendo una técnica rentable, rápida y no invasiva, permitiendo analizar células sin la necesidad de marcarlas o modificarlas [37].

En 2007 se desarrolló por primera vez un biosensor compacto *label-free*, para la rápida detección (<80 s) de interacciones glicano-lectina usando mediciones impedimétricas. Se utilizaron dos lectinas, aglutinina de cacahuete (PNA) y SNA, las cuales fueron covalentemente inmovilizadas en la superficie de electrodos de placa de circuito impreso

(PCB) de capas de Cu/Ni/Au. Las muestras de glicoconjugados fueron analizadas de forma separada por ambas lectinas inmovilizadas en los electrodos PCB. Los resultados indicaron que se podía detectar el antígeno TF (*O*-glicano) de forma rápida y fiable hasta una concentración de  $1 \text{ pg ml}^{-1}$  (13 fM) en el electrodo de PNA, pero, como esperado, no dio respuesta en el electrodo de SNA debido a que esta lectina no reconoce la estructura del antígeno TF. Esta tecnología podría encontrar aplicaciones en el diagnóstico de cáncer y otras enfermedades con múltiples glicobiomarcadores [20,40].

En 2010 se reportó un biosensor basado en lectinas, usando las lectinas Con A y SNA, para ensayos electroquímicos, por voltametría diferencial de pulso (DVP), para evaluar la glicosilación asociada a cáncer por estudio comparativo de la expresión de Man y SiA en células normales y de cáncer de pulmón, hígado y próstata. Usando un formato de *sandwich*, se obtuvo una elevada sensibilidad y selectividad combinando el biosensor basado en lectinas con el uso de nanopartículas de oro (AuNPs), que permitieron una amplificación de señal. La estrategia propuesta demostró que había altos niveles de expresión de Man tanto en células normales como en cancerosas, mientras que el ácido siálico fue más abundante en células cancerígenas comparadas con las normales. Los resultados coincidieron con los estudios de microscopía por fluorescencia. La diferencia en las dos expresiones de glicanos indicó que el SiA podría servir como un potencial biomarcador para la detección temprana de cáncer [20,41].

En 2014 se reportó el desarrollo de un biosensor *label-free* para la detección y discriminación selectiva del antígeno sialil-Tn (STn, un *O*-glicano truncado) asociado a cáncer, utilizando la aglutinina de SNA tipo I (SNA-I) como elemento de bio-reconocimiento. Los ensayos se llevaron a cabo por EIS, donde la lectina fue inmovilizada sobre electrodos serigrafados de oro (SPE-Au), observándose un incremento en la resistencia a la transferencia de electrones linealmente proporcional a la concentración de las dos glicoproteínas modelo utilizadas (transferrina y mucina submaxilar bovina). Los ensayos realizados en muestras séricas de individuos control y oncológicos (con carcinoma), demostraron la selectividad y capacidad de discriminación del biosensor de SNA-I hacia el epítipo STn en glicoproteínas, pudiendo ser utilizado en el diagnóstico y monitoreo de terapias [42].

Otro biosensor impedimétrico fue reportado en 2017 para la detección selectiva del antígeno Tn (O-glicano truncado) asociado a cáncer mediante el uso de la lectina de *Vicia villosa* (VVA), como elemento de bio-reconocimiento, e inmovilizado sobre SPE-Au. Los complejos formados entre VVA y el antígeno Tn contenido en glicoproteínas fueron monitoreados por EIS. Este biosensor fue probado para evaluar la expresión del antígeno Tn en muestras de suero, siendo capaz de discriminar entre las pertenecientes a individuos sanos y las de pacientes con determinado tipo de carcinoma [43].

En 2019, se desarrolló un biosensor impedimétrico para la detección selectiva del antígeno T asociado a cáncer, usando la lectina procedente de *Arachis hypogaea* (aglutinina de cacahuate, PNA) como elemento de bio-reconocimiento. El biosensor fue usado para evaluar la expresión del antígeno T (O-glicano truncado) en muestras de suero y fue capaz de discriminar entre las muestras control (individuos sin cáncer) y las muestras de casos de pacientes con diferentes tipos de carcinomas (piel, colon, mama, próstata, estómago, riñón, pulmón, hígado y recto), donde es bien conocido el incremento en la expresión del antígeno T [44].

## 1.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Instituto Nacional del Cáncer del Instituto Nacional de la Salud. ¿Qué es el cáncer? Consultado el 24/07/2019. Disponible en:  
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>.
- [2] Pollock Raphael E., Holland-Frei – Cancer Medicine. 8a Edición. 2010. Ed. People's Medical Publishing House-USA. Estados Unidos de América. pp. 1. (2021 páginas).
- [3] Weinberg Robert A. The Biology of Cancer. 2a Edición. 2013. Ed. Garland Science. Estados Unidos de América y Reino Unido. pp. 31-34, 38-40, 42, 44, 49 (960 páginas).
- [4] Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancer in 185 Countries. *Ca Cancer J Clin.* (2018), 68, 394-424.

- [5] Organización Mundial de la Salud. Press release N° 263: Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. (2018). Suiza. pp 1-3.
- [6] Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Cancer Today. 2018. Última actualización: mayo 2019. Consultado el 22/08/19. Disponible en: <https://gco.iarc.fr>.
- [7] Atkinson A. J., Magnuson W. G., Colburn W. A., DeGruttola V. G., Downing G. J., Hoth D. F., Oates J. A., Peck C. C., Schooley R. T., Spilker B. A., Woodcock J., Zeger S. L. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* (2001), 69, 89-95.
- [8] Neuman Siegfried. Biomarker Validation: Technological, Clinical and Commercial Aspects. 2015. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. pp. 1-6.
- [9] Aronson, J. K. Ferner, R. E. Biomarkers-A general review. *Curr. Protoc. Pharmacol.* (2017). 76, 9.23.1-9.23.17.
- [10] Kirwan A., Utratna M., O'Dwyer M. E., Joshi L., Kilcoyne M. Glycosylation-Based Serum Biomarkers for Cancer Diagnostics and Prognostics. *BioMed. Res. Int.* (2015), 1-16.
- [11] Tainisky M. A. General and Applied Toxicology (General, Applied and Systems Toxicology). (2009), 1-29.
- [12] Zeng X., Andrade C. A. S., Oliveira M. D. L., Sun X.-L. Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. *Anal. Bioanal. Chem.* (2012), 402, 10, 3161-3176.
- [13] Andersen M. R., Nam J. H., Sharfstein S. T. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology. (2009). John Wiley & Sons, Inc. pp. 1-6.
- [14] Ham. B. M. Proteomics of Biological Systems: Protein Phosphorylation Using Mass Spectrometry Techniques. (2012). John Wiley & Sons, Inc. pp. 59-60.

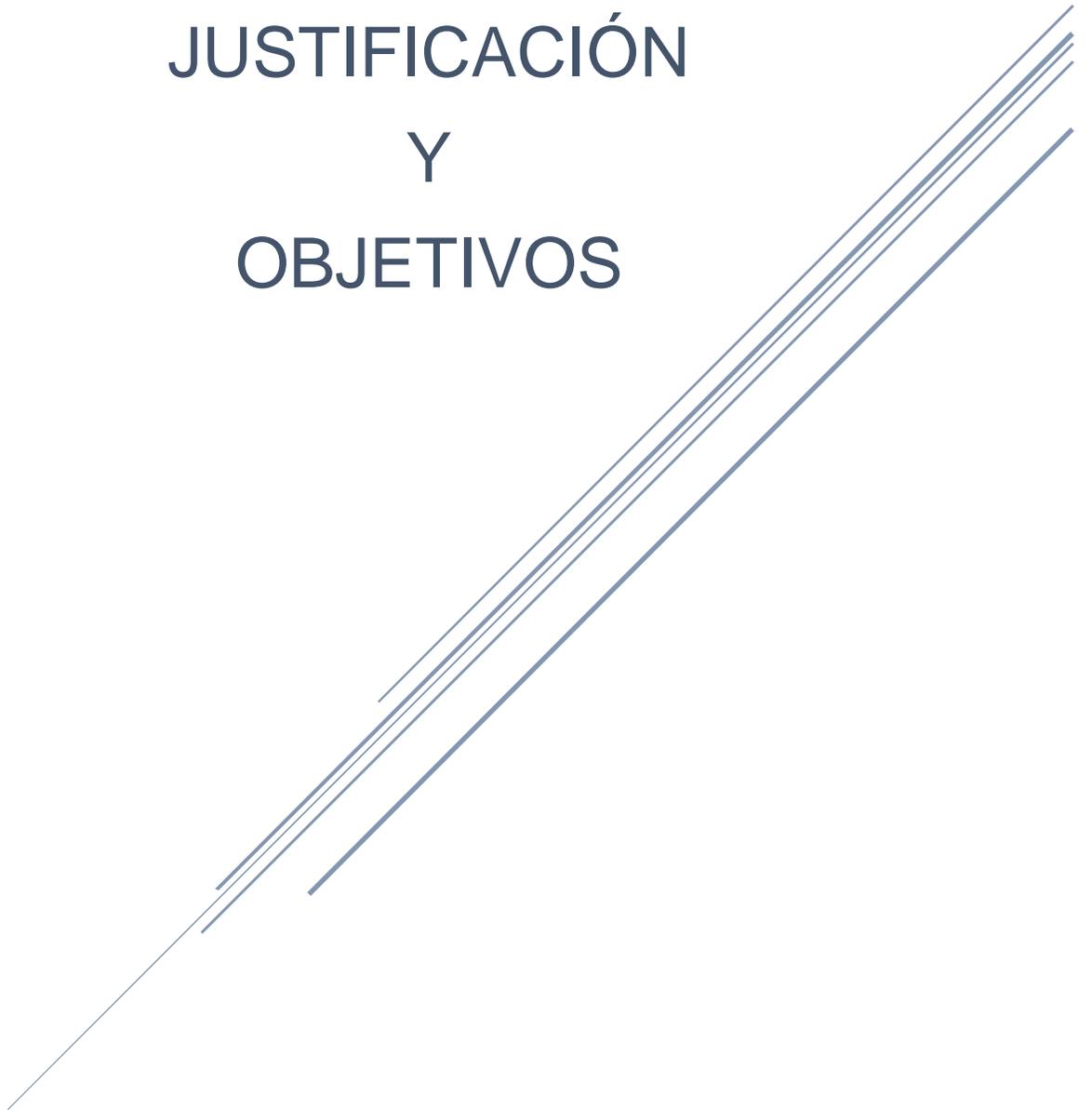
- [15] Lisowska E., Jaskiewicz E. Protein Glycosylation, an Overview. (2012). John Wiley & Sons. pp 1-7.
- [16] Lieth C.-W. V. D., Lütteke T. Bioinformatics for Glycobiology and Glycomics: An Introduction. (2009). John Wiley & Sons, Ltd. Alemania. pp. 143-144.
- [17] Brooks S.A. Post-translational Modification of Protein Biopharmaceuticals. (2009). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. pp. 17-23.
- [18] Belický S., Katrik J., Tkáč J. Glycan and lectin biosensors. *Essays Biochem.* (2016), 60, 1, 37-47.
- [19] Christiansen M. N., Chik J., Lee L., Anugraham M., Abrahams J. L., Packer N. H. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* (2014), 14, 4-5, 525-546.
- [20] Pihíková D., Kasák P., Tkac J. Glycoprofiling of cancer biomarkers: Label-free electrochemical lectin-based biosensors. *Open Chem.* (2015), 13, 1, 636-655.
- [21] Kailemia M. J., Park D., Lebrilla C. B. Glycans and Glycoproteins as Specific Biomarkers for Cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* (2017), 409, 2, 395-410.
- [22] Dennis J.W., Laferté S. Oncodevelopmental Expression of -GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-6Man $\beta$ 1- Branched Asparagine-linked Oligosaccharides in Murine Tissues and Human Breast Carcinomas. *Cancer Res.* (1989), 49, 945-950.
- [23] Kim Y.-S., Hwang S.Y., Oh S., Sohn H., Kang H.-Y., Lee J.-H., Cho E.-W., Kim J.-Y., Yoo J.S., Kim N.-S., Kim C.-H., Miyoshi E., Taniguchi N., Ko J.H. Identification of target proteins of *N*-acetylglucosaminyl-transferase V and fucosyltransferase 8 in human gastric tissues by glycomic approach. *Proteomics* (2004), 4, 11, 3353-3358.
- [24] Cao Z., Partyka K., McDonald M., Brouhard E., Hincapie M., Brand R.E., Hancock W.S., Haab B.B. Modulation of Glycan Detection on Specific Glycoproteins by Lectin Multimerization. *Anal. Chem.* (2013), 85, 3, 1689-1698.
- [25] Syed P., Gidwani K., Kekki H., Leivo J., Pettersson K., Lamminmäki U. Role of lectins microarrays in cancer diagnosis. *Proteomics* (2016), 16, 8, 1257-1265.

- [26] Hamelryck T.W., Dao-Thi M.-H., Poortmans F., Chrispeels M.J., Wyns L., Loris R. The Crystallographic Structure of *Phytohemagglutinin-L*. *J. Biol. Chem.* (1996), 271, 34, 20479-20485.
- [27] EY Laboratories, Inc. LECTIN APLICACIONES – *Phaseolus vulgaris*. Última actualización: 2015. Estados Unidos. Consultado el 20 de agosto de 2019. Disponible en: <http://eylabs.com/phaseolus-vulgaris/?distributor=true#.XXBwlChKjIU>.
- [28] Shi J., Xue S.J., Kakuda Y., Ilic S., Kim D. Isolation and characterization of lectins from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Process Biochem.* (2007), 42, 10, 1436-1442.
- [29] Zhang J., Shi J., Ilic S., Xue S.J., Kakuda Y. Biological Properties and Characterization of Lectin from Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Food Rev. Int.* (2009), 25, 1, 12-27.
- [30] Jiang J.-H., Tang H. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. (2018). John Wiley & Sons, Ltd. pp.1-28.
- [31] Mulaa F. J., Krämer P. M. *Handbook of Food Safety Engineering*. (2012). Blackwell Publishing Ltd. pp.313-351.
- [32] Rackus D. G., Shamsi M. H., Wheeler A. R. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. *Chem. Soc. Rev.* (2015), 44, 15, 5320-5340.
- [33] Bertók T., Katrlík J., Gemeiner P., Tkac J. Electrochemical lectin based biosensors as a label-free tool in glycomics. *Microchim. Acta* (2012), 180, 1-2, 1-13.
- [34] Park S., Gildersleeve J., Blixt O., Shin I. Carbohydrate microarrays. *Chem. Soc. Rev.* (2012), 42, 10, 4310-4326.
- [35] Catherino H.A. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*. (2006). John Wiley & Sons, Inc. pp. 1-6.
- [36] Metrohm. Autolab application note EIS01. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Part 1-Basic principles. pp 1-3.

- [37] Park Y., Kim H. W., Yun J., Seo S., Park C.-J., Lee J. Z., Lee J.-H. Microelectrical Impedance Spectroscopy for the Differentiation between Normal and Cancerous Human Urothelial Cell Lines: Real-Time Electrical Impedance Measurement at an Optimal Frequency. *BioMed Res. Int.* (2016), 2016, 1-10.
- [38] Piratoba U., Vera E., Ortiz C. Basic aspects in the interpretation of the diagrams of Electrochemical Impedance. *DYNA.* (2010), 77, 162, 13-19.
- [39] Zhao X., Zhuang H., Yoon S.-C., Dong Y., Wang W., Zhao W. Electrical Impedance Spectroscopy for Quality Assessment of Meat and Fish: A Review on Basic Principle, Measurement Methods, and Recent Advances. *J. Food Qual.* (2017), 2017, 1-16.
- [40] La Belle J.T., Geriach J.Q., Svarovsky S., Joshi L. Label-Free Impedimetric Detection of Glycan-Lectin Interactions. *Anal. Chem.* (2007), 79, 6959-6964.
- [41] Zhang X., Teng Y., Fu Y., Xu L., Zhang S., He B., Wang C., Zhang W. Lectin-Based Biosensor Strategy for Electrochemical Assay of Glycan Expression on Living Cancer Cells. *Anal. Chem.* (2010), 82, 9455-9460.
- [42] Silva M.L.S., Gutiérrez E., Rodríguez J.A., Gomes C., David L. Construction and validation of a *Sambucus nigra* biosensor for cancer-associated STn antigen. *Biosens. Bioelectron.* (2014), 57, 254-261.
- [43] Silva M.L.S. Rangel M.G.H. A *Vicia villosa* agglutinin biosensor for cancer-associated Tn antigen. *Sens. Actuators B* (2017), 252, 777-784.
- [44] Rangel M.G.H., Silva M.L.S. Detection of the cancer-associated T antigen using an *Arachis hypogaea* agglutinin biosensor. *Biosens. Bioelectron.* (2019), 141, 111401, 1-6.

# CAPÍTULO 2

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



## 2.1. JUSTIFICACIÓN

El cáncer se encuentra dentro de las primeras causas de muerte a nivel mundial, de acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). En 2015 ocasionó cerca de 8.8 millones de defunciones, donde el cáncer pulmonar, el hepático, el colorrectal, el gástrico y el de mama se posicionaron dentro de los cinco tipos de cáncer con el mayor número de fallecimientos [1].

Actualmente existen diferentes técnicas para poder detectar el cáncer y monitorear la progresión de la enfermedad, además de ayudar a elegir la mejor terapia para un paciente con cáncer y evaluar su eficacia. Sin embargo, algunas son invasivas o requieren de la aplicación o ingestión de agentes químicos que pueden causar reacciones secundarias. De ahí se concluye la importancia de desarrollar nuevas técnicas sensibles y mínimamente invasivas que permitan obtener resultados confiables.

Dentro de estas tecnologías emergentes, existe la creciente tendencia hacia la miniaturización de dispositivos que faciliten realizar análisis clínicos *in situ* para una menor degradación de la muestra y que permitan su portabilidad. Un ejemplo es el uso de electrodos serigrafados (SPE, por sus siglas en inglés) que pueden ser modificados mediante diferentes técnicas para la construcción de biosensores selectivos hacia estructuras relacionadas a múltiples enfermedades, incluyendo el cáncer.

Considerando todo lo anterior, en el presente trabajo de investigación se realizó la construcción, optimización y caracterización de un biosensor de lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) para la detección selectiva de la ramificación aberrante  $\beta$ 1-6 presente en estructuras de *N*-glicanos detectadas en glicoproteínas presentes en el suero sanguíneo de pacientes con diferentes tipos de carcinomas. La modificación de la superficie de los SPE se llevó a cabo utilizando un procedimiento de construcción con pocos elementos y mínimos volúmenes de reactivos. Además, el uso de esta técnica requirió de micro-volúmenes de muestra, lo que permitiría ser utilizada en el campo de la medicina con una mínima invasión al organismo del paciente. La técnica de medición que se utilizó fue la EIS, que se caracteriza por una elevada sensibilidad.

## 2.2. OBJETIVOS

### 2.2.1. GENERAL

Construir, optimizar y caracterizar un biosensor de lectina para la detección selectiva de *N*-glicanos aberrantes asociados a carcinomas, presentes en glicoproteínas modelo positivo.

### 2.2.2. ESPECÍFICOS

- Inmovilizar la leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) en electrodos de tipo *screen-printed* y evaluar la formación del complejo entre la lectina y glicoproteínas que presentan los *N*-glicanos de interés.
- Optimizar el proceso de construcción mediante el método univariado, tomando en cuenta variables como las concentraciones de las disoluciones de reactivos, la cantidad de lectina por electrodo, el procedimiento de bloqueo y el tiempo de incubación de la muestra.
- Evaluar la selectividad del biosensor frente a glicoproteínas modelo negativo (sin estructuras *N*-glicanos aberrantes) presentes en muestras séricas reales.
- Caracterizar el comportamiento analítico del biosensor desarrollado, a través de estudios de voltamperometría cíclica e impedancia, determinando su intervalo de respuesta lineal para la glicoproteína modelo positivo, límite de detección y cuantificación, y estabilidad durante el almacenamiento.

### 2.3. REFERENCIAS

[1] Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. “Estadísticas a propósito del...Día Mundial Contra El Cáncer (4 de febrero)”. 2018. pp. 1-13. Disponible en: [http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018\\_NaI.pdf](http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_NaI.pdf).

# CAPÍTULO 3

## ASPECTOS GENERALES DE LA PARTE EXPERIMENTAL



### 3.1. INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se describen los reactivos e instrumentación empleados en la fabricación del biosensor, la descripción del proceso de construcción y el procedimiento de medición de la respuesta analítica, así como el procedimiento de recolección y pretratamiento de las muestras de sangre.

### 3.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

El agua utilizada para la preparación de las disoluciones y el enjuague del material limpio fue purificada y desionizada empleando el sistema Millipore Mili Q, con una resistividad de  $18.2 \mu\Omega\cdot\text{cm}$ .

#### 3.2.1. DISOLUCIONES TAMPÓN

Se preparó una disolución tampón de fosfatos PBS 20x, o disolución *stock*, a pH 7.4 (en el cual la lectina presenta una actividad normal [1]), con una estabilidad de almacenamiento de varios meses a temperatura ambiente y la cual estuvo compuesta por NaCl  $2.737 \text{ mol l}^{-1}$ , KCl  $0.054 \text{ mol l}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $0.222 \text{ mol l}^{-1}$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.035 \text{ mol l}^{-1}$ . A partir de esta disolución se preparó el tampón de fosfatos PBS 1x o disolución de trabajo.

La preparación de la disolución de trabajo PBS 1x ( $0.14 \text{ mol l}^{-1}$  en NaCl), con un pH de 7, se realizó al inicio de cada ensayo a temperatura ambiente y, a la cual, se adicionó una alícuota de cada disolución de iones divalentes:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $100 \text{ mmol l}^{-1}$ . Los carbohidratos interactúan con las lectinas a través de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y de van der Waals. Los cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , están involucrados en el reconocimiento dando forma al sitio de unión, de manera indirecta o a través de enlaces entre el carbohidrato y el ion divalente [2]. Por ello, se adicionaron los cuatro iones divalentes a la disolución de PBS 1x.

### 3.2.2. MONOCAPA AUTOENSAMBLADA (SAM; *SELF-ASSEMBLED MONOLAYER*)

Se preparó una disolución de ácido mercaptohexadecanoico (16-MHDA; Sigma Aldrich) 25 mmol l<sup>-1</sup> al inicio de cada ensayo utilizando etanol anhidro (J.T. Baker) como solvente.

### 3.2.3. DISOLUCIÓN DE AGENTE ENTRECruzANTE (*CROSS-LINKER*)

La disolución de agente entrecruzante utilizada estuvo compuesta por etilencarbodiimida (ECD; Sigma Aldrich) 20 mmol l<sup>-1</sup> + N-hidroxisulfosuccinimida (NHS, Aldrich) 40 mmol l<sup>-1</sup>. Al tratarse de una disolución inestable, su preparación se realizó al momento de efectuar los ensayos, utilizando PBS 1x como solvente.

### 3.2.4. LECTINA

Como elemento de bio-reconocimiento, se utilizó la leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L; EY Laboratories), preparada en PBS 1x.

El reactivo (2.5 mg) se disolvió directamente en su envase con un volumen total de PBS 1x de 2 ml. Se tomaron alícuotas de 100 µl y depositaron en tubos Eppendorf nuevos de 1.5 ml, previamente rotulados, y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Cada tubo se descongeló a temperatura ambiente minutos antes de utilizarlo.

El volumen total del reactivo fue dividido en los tubos Eppendorf para evitar ciclos de congelación/descongelación que degradan las proteínas.

### 3.2.5. DISOLUCIÓN DE BLOQUEO DE SUPERFICIE

La disolución de bloqueo se preparó con etanolamina (ETA; Sigma Aldrich) 20 mmol l<sup>-1</sup> en agua desionizada. Al ser estable, se almacenó a 4°C y se reutilizó durante todo el trabajo experimental.

### 3.2.6. GLICOPROTEÍNA MODELO POSITIVO

Como glicoproteína modelo positivo se utilizó la tiroglobulina bovina (Tg bovina; Sigma Aldrich) en disolución a  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$ , preparada en PBS 1x. Esta disolución se podría almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$  y usar dentro de los 15 días posteriores a su preparación (la respuesta del biosensor se vio afectada cuando la disolución tenía más de 15 días de almacenamiento), habiendo que preparar una disolución nueva al término de dicho periodo.

Está reportado que la Tg bovina contiene 14 sitios putativos de *N*-glicanos, siendo que 13 de ellos están efectivamente *N*-glicosilados con ramificación  $\beta 1-6$  [3]. Esta es la razón por la cual la Tg bovina resulta poseer una estructura favorable como glicoproteína modelo positivo al portar un número significativo de sitios con *N*-glicosilación y con la estructura de interés.

Mediante el uso de la Tg bovina se evaluó la formación de los complejos PHA-L – *N*-glicanos aberrantes, debido a que la PHA-L presenta afinidad por las estructuras ramificadas  $\beta 1-6\text{GlcNAc}$  tri/tetraantenarias de *N*-glicanos [4].

### 3.2.7. GLICOPROTEÍNAS MODELO NEGATIVO

Se preparó una serie de disoluciones *stock* de diferentes glicoproteínas modelo negativo (TABLA 3.1) a  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  en PBS 1x. A partir de esta concentración inicial, se prepararon diluciones de trabajo: 0.25, 0.125 y  $0.0625 \text{ mg ml}^{-1}$ , las cuales fueron analizadas para evaluar la selectividad del biosensor. Las glicoproteínas fueron seleccionadas por presentar una estructura que no contiene *N*-glicanos con la ramificación  $\beta 1-6$ , pero sí otras estructuras de *N*-glicanos u *O*-glicanos.

**TABLA 3.1.** Glicoproteínas modelo utilizadas para la evaluación de la selectividad del biosensor.

<b>Glicoproteína</b>	<b>Tipo de glicano que contienen en su estructura</b>
Mucina submaxilar bovina (BSM; Sigma)	O-GlcNAc, sialiladas [5].
Transferrina humana (Trf; Sigma)	N-acetilactosamina (LacNAc), bi- y tetraantenarias, sialiladas [6]
Fetuina de suero de ternera (Fet; Sigma)	Seis estructuras: 1) core 1, Gal $\beta$ 1–3GalNAc. 2) O-glicanos del core 1 monosialilados. 3) Neu5Ac $\alpha$ 2–3Gal $\beta$ 1–3GalNAc. 4) Neu5Ac $\alpha$ 2–6(Gal $\beta$ 1–3)GalNAc. 5) O-glicano del core 1 disialilado, Neu5Ac $\alpha$ 2–3Gal $\beta$ 1–3(Neu5Ac $\alpha$ 2–6)GalNAc. 6) O-glicano del core 2 disialilado, Neu5Ac $\alpha$ 2–3Gal $\beta$ 1–3 (Neu5Ac $\alpha$ 2–3Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–6) GalNAc [7].
Antígeno carcinoembrionario (CEA; Sigma)	N-glicanos sialilados, antígeno de Lewis X (O-glicano) en menor concentración [8].
Asialo-Mucina submaxilar bovina (aBSM)	Estructura obtenida por la remoción de los ácidos siálicos terminales de la BSM.
Asialo-Transferrina (aTrf)	Estructura obtenida por la remoción de los ácidos siálicos terminales de la Trf.
Asialo-Fetuina (aFet)	Estructura obtenida por la remoción de los ácidos siálicos terminales de la Fet.
Albúmina sérica bovina (BSA)	Proteína no glicosilada [9].

Para obtener las formas asialo de BSM, Trf y Fet, estas glicoproteínas fueron tratadas enzimáticamente utilizando nauraminidasa de *Clostridium perfringens* tipo VI (Sigma). Para el proceso de desialilación se incubó 1.0 mg de cada glicoproteína en 1.0 ml de

disolución de neuraminidasa ( $3 \text{ U ml}^{-1}$ ) preparada en disolución tampón de acetato a pH 5.5. El proceso se realizó a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 h [10].

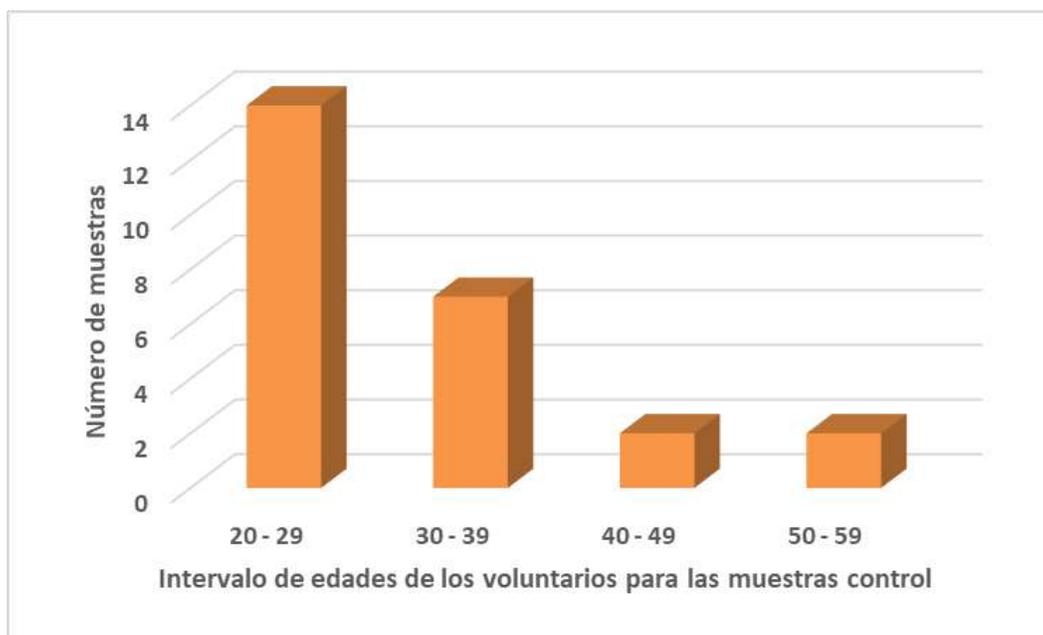
### 3.2.8. Sonda REDOX

Para realizar las mediciones de impedancia se utilizó una disolución de hexacianoferrato de potasio (III) y hexacianoferrato de potasio (II)  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  de cada uno, preparada antes de cada ensayo en PBS 1x.

## 3.3. COLECTA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

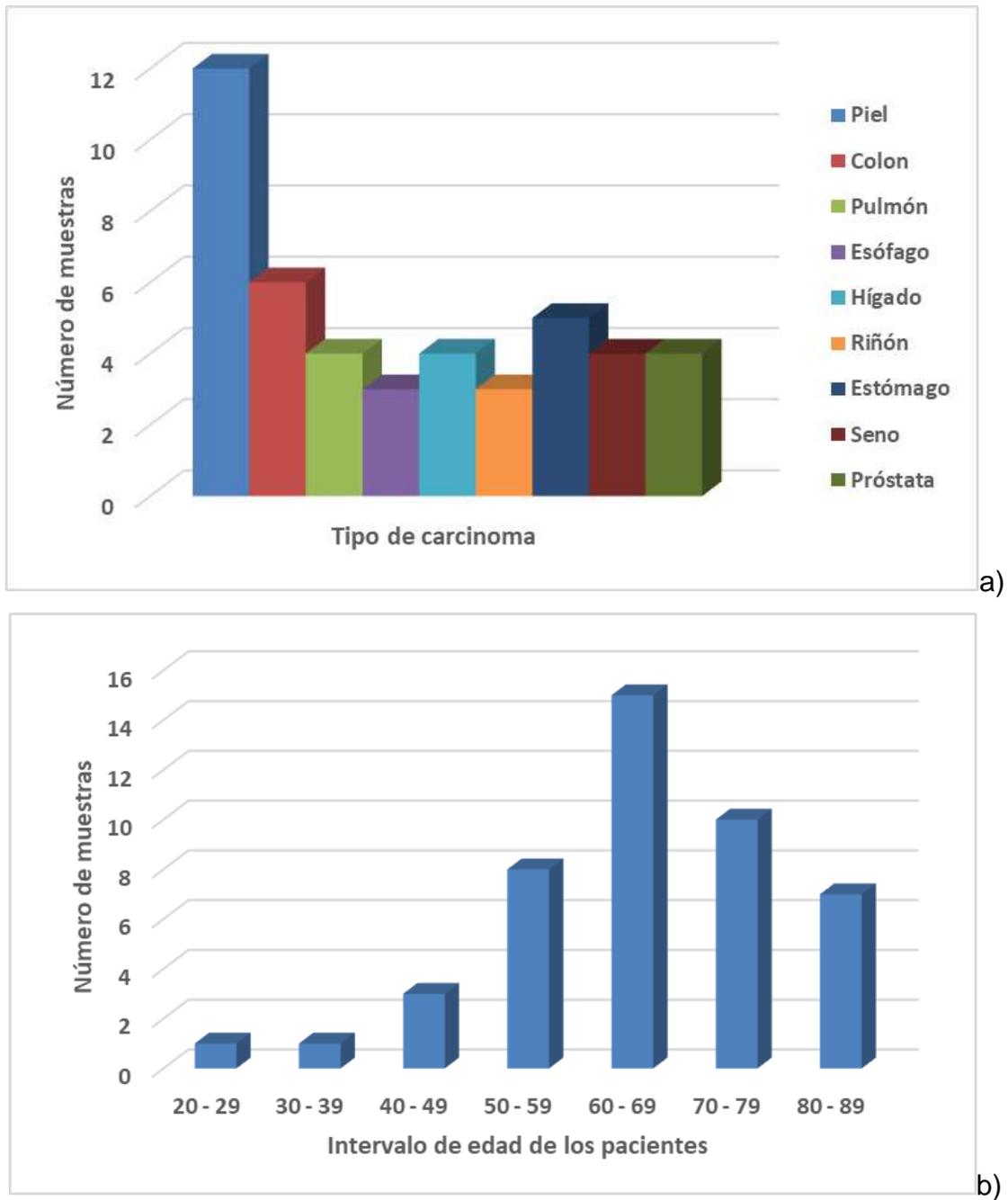
### 3.3.1. COLECTA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS CONTROL Y ONCOLÓGICAS

Se colectaron 25 muestras de sangre control (12 mujeres y 13 hombres) de donadores voluntarios mayores de 18 años de edad, en el mes de junio de 2018 (FIGURA 3.1). Las muestras fueron procedentes de personas sanas, es decir, sin enfermedades crónico-degenerativas ni cáncer. La información obtenida en las entrevistas se muestra en la TABLA 3.2.



**FIGURA 3.1.** Distribución de las muestras de sangre control por intervalos de edad.

En el caso de las muestras oncológicas, la recolección se realizó en el Hospital General de Pachuca, en el periodo comprendido de enero de 2018 a marzo de 2019, con previa autorización por parte del Consejo de Ética del hospital y realizando todos los trámites administrativos pertinentes. Se obtuvieron un total de 25 muestras de pacientes oncológicos voluntarios, mayores de edad, con diagnóstico previo de algún tipo de carcinoma. Los pacientes fueron informados acerca del objetivo del proyecto antes de la toma de muestra, confirmando su autorización. La información complementaria, obtenida a partir de cada expediente, se desglosa en la TABLA 3.3. Sin embargo, por motivos de la técnica de pretratamiento a aplicar (formación de *pools* para analizar por la técnica Biblioteca Combinatoria de Ligandos de Péptidos (CPLL)) en las muestras séricas, se tuvo que recurrir a anexar más muestras oncológicas procedentes de una reserva existente dentro del equipo de trabajo, totalizando 45 (22 mujeres y 23 hombres), pertenecientes a nueve tipos diferentes de carcinomas: piel, colon, pulmón esófago, hígado, riñón, estómago, seno y próstata (FIGURA 3.2).



**FIGURA 3.2.** Distribución de las muestras sanguíneas de pacientes con carcinomas por: a) tipo de carcinoma y, b) intervalo de edades de los pacientes.

### CAPÍTULO 3: ASPECTOS GENERALES DE LA PARTE EXPERIMENTAL

**TABLA 3.2. Muestras control y sus respectivos datos demográficos, clínicos y antecedentes familiares.**

Control	Género	Edad	Consumo Alcohol	Fumador	Cáncer	Hipertensión	Diabetes	Enfermedades del corazón	Sobrepeso / Obesidad	Antecedentes - Familiares
1	Masculino	30	*	-	-	-	-	-	*	Abuela: Diabetes y cáncer (IV). Padre: Enfermedad coronaria. Madre: Diabetes. Hermana: Cáncer cervicouterino.
2	Femenino	23	*	*	-	-	-	-	-	Abuelo: Diabetes. Madre: Hipertensión.
3	Femenino	29	*	*	-	-	-	-	-	Donador: Hipotiroidismo. Abuelos: Linfoma y cáncer de pulmón.
4	Masculino	25	*	-	-	-	-	-	-	Donador: Hígado graso (hace un año). Abuela: y abuelo: Diabetes. Madre: Enfermedad del corazón.
5	Femenino	30	*	-	-	-	-	-	*	Abuela: Diabetes. Abuelo: Hipertensión.
6	Femenino	24	*	-	-	-	-	-	-	Abuela: Enfermedad del corazón. Abuelo: Diabetes.
7	Masculino	28	-	-	-	-	-	-	-	Madre: Hipertensión.
8	Femenino	26	*	-	-	-	-	-	-	Abuelas (2): Diabetes, Alzheimer.
9	Masculino	24	*	*	-	-	-	-	*	Abuela: Cáncer de seno. Hermano: Enfermedad del corazón.
10	Femenino	24	*	*	-	-	-	-	*	Madre: Hipertensión. Padre: Diabetes. Abuelas (2): Diabetes, enfermedad del corazón.
11	Femenino	25	*	*	-	-	-	-	-	-
12	Femenino	47	*	-	-	-	-	-	-	-
13	Femenino	30	*	-	-	-	-	-	*	-
14	Masculino	36	*	-	-	-	-	-	-	Madre y padre: Hipertensión.
15	Masculino	30	-	-	-	-	-	-	-	Abuela: Diabetes.
16	Masculino	27	-	-	-	-	-	-	-	Padre: Diabetes, hipertensión, enfermedad del corazón.
17	Femenino	20	-	-	-	-	-	-	-	Abuelas (2): Diabetes, linfoma y cáncer de hueso. Abuelos (2): Enfermedad del hígado/pulmón.
18	Masculino	21	-	-	-	-	-	-	-	Abuela: Diabetes, hipertensión.
19	Masculino	29	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Masculino	41	-	-	-	-	-	-	-	Abuelo: Alzheimer. Padre: Hipertensión. Hermana: Cáncer de seno.
21	Femenino	30	*	*	-	-	-	-	-	-
22	Masculino	31	*	*	-	-	-	-	-	Abuela: Cáncer.
23	Masculino	27	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Masculino	55	*	-	-	-	-	-	*	-
25	Femenino	55	-	-	-	-	-	-	-	Padre: Linfoma.

(\*) El donante indicó como positivo el hábito o antecedente personal.

CAPÍTULO 3: ASPECTOS GENERALES DE LA PARTE EXPERIMENTAL

TABLA 3.3. Muestras de casos oncológicos y sus respectivos datos demográficos y clínicos.			Cáncer				Información complementaria					
Paciente	Género	Edad	Tipo	Estadio	Relación consanguínea	Quimioterapia / Radioterapia / Otro	Alcohol	Fumador	Hipertensión	Diabetes	Obesidad / Sobrepeso	Otros.
1	Femenino	70	Piel	-	-	-	-	-	-	-	-	Post-operada sin post-tratamiento.
2	Femenino	62	Colon	-	-	-	-	-	*	-	-	Madre: Diabetes.
3	Masculino	75	Pulmón	IV	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Masculino	64	Esófago	-	-	-	-	-	-	-	-	Tumor grande.
5	Femenino	88	Piel	-	-	Cirugía	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 5 años.
6	Masculino	72	Hígado	-	Hermana: Ovario.	Quimioablación	*	*	-	-	-	Quimioablación sin éxito.
7	Femenino	53	Pulmón	IV	-	Cirugía	-	-	-	-	-	Post-operada de tiroidectomía sin post-tratamiento.
8	Masculino	76	Piel	-	-	-	-	-	-	-	-	Dos tipos de cáncer.
9	Masculino	64	Hígado	IV	-	Quimioterapia	-	*	-	-	-	Quimioterapia sin éxito.
10	Masculino	72	Piel	-	-	-	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 5 años.
11	Masculino	61	Piel	-	-	-	-	-	-	-	-	Tiempo de evolución de 5 años.
12	Femenino	88	Piel	-	-	-	-	-	*	-	-	Tiempo de diagnóstico de 4 meses.
13	Femenino	59	Riñón	II	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Masculino	83	Esófago	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Femenino	50	Estómago	-	-	-	-	*	-	-	*	-
16	Masculino	44	Riñón	IV	-	-	-	-	-	-	-	Post-operado.
17	Femenino	61	Pulmón	IV	-	-	-	-	-	-	-	Post-operada.
18	Femenino	77	Piel	III	-	-	-	-	*	*	-	Tiempo de resección de tumor 2 años atrás.
19	Femenino	76	Piel	III	-	-	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 1 año.
20	Femenino	88	Piel	III	-	-	-	-	*	-	-	-
21	Masculino	56	Piel	-	-	-	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 4 años.
22	Masculino	82	Piel	III	-	-	-	-	*	*	-	Tiempo de diagnóstico de 1 mes. Tejido necrosado.
23	Femenino	53	Piel	II	-	-	-	-	*	-	-	Cáncer recurrente a 4 meses el primero. Tiempo de diagnóstico del primer cáncer de 6 años.

### CAPÍTULO 3: ASPECTOS GENERALES DE LA PARTE EXPERIMENTAL

24	Femenino	29	Colon	-	-	-	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 3 meses.
25	Masculino	65	Colon	-	-	Cirugía	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 1 año y 4 meses. Previa hemicolectomía.
26	Masculino	60	Colon	-	Madre: Colon; Hermana	Cirugías (2)	-	*	-	-	-	Previo cáncer de intestino grueso y delgado.
27	Masculino	55	Colon	-	Hermana: Mama	-	-	-	*	*	-	Tiempo de diagnóstico de 1 mes.
28	Masculino	72	Colon	-	Hija: Mama	-	-	-	-	-	*	Tiempo de sintomatología de 2 años.
29	Femenino	67	Pulmón	-	-	Quimioterapia	-	-	-	-	-	-
30	Masculino	53	Esófago	-	-	Cirugía	-	-	*	-	-	Tiempo de diagnóstico de 4 meses.
31	Femenino	66	Hígado	-	-	Quimioterapia	-	-	*	*	-	Tiempo de diagnóstico de 4 meses.
32	Masculino	70	Hígado	IV	-	Quimioterapia	-	-	*	-	-	Tiempo de diagnóstico de 3 meses.
33	Masculino	49	Riñón	IV	Madre: Intestino Tía: Estómago	Cirugía	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 1 mes con sintomatología de 1 año.
34	Femenino	39	Estómago	-	-	Cirugía	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico 1 mes, durante cirugía de parto.
35	Masculino	55	Estómago	-	Padre: Tráquea	Cirugía	-	-	-	*	-	Tiempo de diagnóstico de 1 semana.
36	Femenino	68	Estómago	-	-	Cirugía	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 4 meses.
37	Femenino	80	Estómago	-	-	Cirugía	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 2 meses.
38	Femenino	65	Mama	-	-	-	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 1 mes.
39	Femenino	64	Mama	-	Madre	-	-	-	*	-	-	Tiempo de diagnóstico de 5 meses.
40	Femenino	64	Mama	-	-	Cirugía	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 4 meses.
41	Femenino	43	Mama	IV	Hermana: Mama	Quimioterapia y radioterapia	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 1 mes. Cáncer previo de mama. Otra enfermedad: Migraña.
42	Masculino	72	Próstata	-	-	-	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 4 meses.
43	Masculino	68	Próstata	IV	Padre: Próstata Hermano: Mieloma	-	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 1 año. Otra enfermedad: EPOC.
44	Masculino	67	Próstata	-	-	-	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 3 años.
45	Masculino	77	Próstata	-	-	Cirugía	-	-	-	-	-	Tiempo de diagnóstico de 7 años y 11 meses.

(\*) El paciente indicó como positivo el hábito o antecedente personal.

El manejo de las muestras biológicas, en cada etapa del proceso, fue realizado bajo medidas de higiene, portando equipo de protección adecuado (guantes desechables, bata de laboratorio, goggles de seguridad/lentes). El material de plástico y de punción utilizado en la recolección y procesamiento de muestras fue almacenado en contenedores especiales para residuos de muestras biológico-infecciosas, y desechados.

El procedimiento general para la recolección, la obtención de suero sanguíneo y el almacenamiento de cada una de las muestras fue el siguiente [11]:

Usando instrumentación estéril, un volumen de ~6 ml de sangre fue almacenado en tubos al vacío para muestras sanguíneas, sin anticoagulante. El tubo fue rotulado con la información pertinente de su procedencia. Las muestras fueron procesadas dentro de un periodo de tres horas posteriores a su toma.

- i) Enseguida de la recolección de la muestra, se agitó el tubo tres veces para homogenizar el contenido. Después, se dejó en reposo por 1 hora, en posición vertical, y a temperatura ambiente (~25 °C).
- ii) Transcurrido el tiempo indicado, el tubo con la muestra fue almacenado y transportado (para la extracción del suero) en posición vertical y en hielo.
- iii) Para la separación del suero, se centrifugó la muestra a 3000 rpm a ~4 °C, por 10 min.
- iv) Una vez separado el suero, fue colectado sin tocar ni tomar parte del precipitado. El volumen fue almacenado en microtubos Eppendorf de plástico de 1.5 ml, nuevos y previamente rotulados.
- v) Los microtubos con el suero fueron transportados en hielo para su almacenamiento en ultracongelación a -80 °C, hasta su uso.

### 3.3.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS SÉRICAS CONTROL Y ONCOLÓGICAS

Se seleccionaron nueve tipos diferentes de carcinomas (de las muestras recolectadas) a las cuales fue incorporada una décima, que correspondió al control, para realizar diez *pools*. El criterio de selección en los tipos de carcinomas se basó en publicaciones científicas donde se describe la presencia de *N*-glicanos aberrantes.

Las muestras almacenadas a -80 °C fueron descongeladas a temperatura ambiente. Para la generación de un *pool*, del total de muestras obtenidas para un carcinoma (y para el control), se tomó equitativamente una fracción de volumen de cada una para completar en total el volumen de 1 ml.

La creación de *pools* permite disminuir la variabilidad de cada muestra y reforzar los aspectos en común, en este caso la presencia de los *N*-glicanos aberrantes.

Finalmente, los *pools* fueron almacenados en tubos Eppendorf nuevos de plástico (rotulado) a una temperatura de -20 °C, hasta su uso.

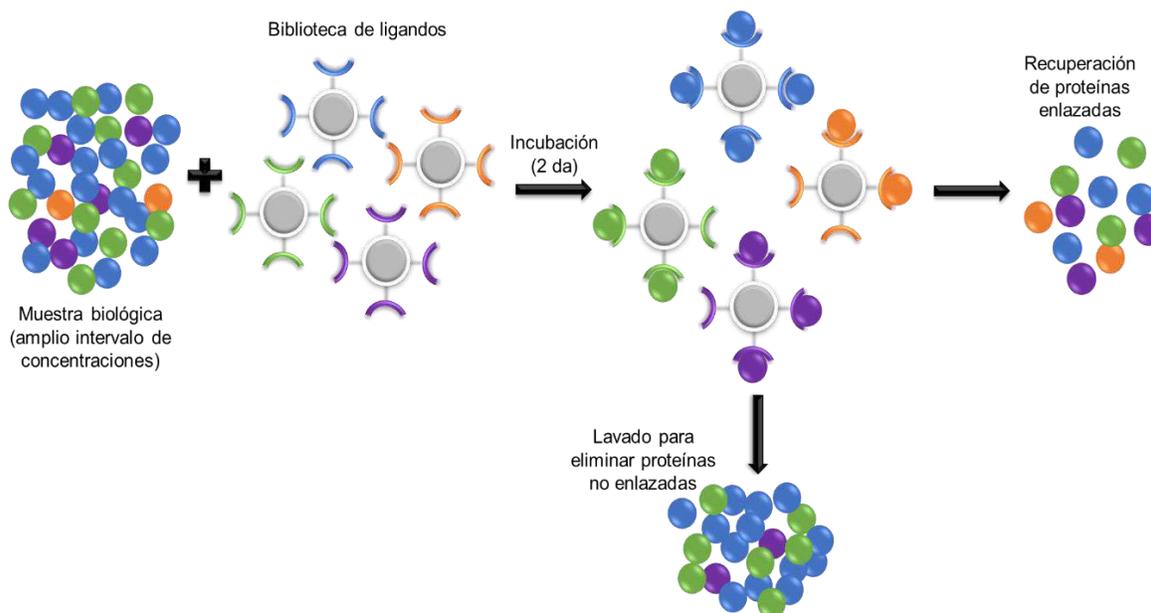
#### 3.3.2.1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS SÉRICAS POR CPLL

Para el procesamiento de las muestras séricas control y oncológicas, se utilizó la técnica conocida como CPLL, por sus siglas en inglés (*Combinatorial Peptide Ligand Library*), para diez muestras [12].

Los 10 *pools* de muestras fueron procesados siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante en el kit ProteoMiner™, de BIO-RAD LABORADORES INC. Este kit de gran capacidad de enriquecimiento de proteínas permite tratar hasta 10 muestras de suero sanguíneo. El procedimiento radica en poner la muestra en contacto con la fase sólida de la CPLL (que consiste en hexapéptidos unidos a *beads*), para después eliminar por lavado las proteínas no adsorbidas y, finalmente, recuperar aquellas que quedaron adsorbidas mediante métodos de desorción de cromatografía de afinidad estándar (FIGURA 3.3) [12].

Tomando en cuenta que las proteínas y las glicoproteínas en el suero sanguíneo presentan un intervalo de concentración de varios órdenes de magnitud, el uso de este

procedimiento permite reducir el intervalo de concentraciones de las proteínas de esta matriz compleja, a través de la dilución simultánea de las más abundantes sin disminuir la concentración de aquellas menos abundantes. Con esta técnica es posible modular la concentración relativa de proteínas y glicoproteínas en las muestras [12].



**FIGURA 3.3.** Esquema del proceso para la reducción de las diferencias de concentración entre proteínas en una muestra a través de la técnica de CPLL [12].

### 3.3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LAS MUESTRAS

La cuantificación de las proteínas en las muestras séricas control y oncológicas se realizó con el kit comercial “Pierce BCA Protein Assay Kit”, de Thermo Scientific. El ensayo fue realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método, del ácido bicinconínico (BCA), se basa en la reacción de reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$  por proteínas en un medio alcalino con la detección colorimétrica altamente selectiva y sensible del catión cuproso ( $\text{Cu}^{+}$ ) por el ácido. Para esta reacción, la intensidad del color producido (de azul claro a violeta) es proporcional al número de enlaces de péptidos participando en la misma [13].

La cuantificación de proteínas presentes en los diez eluidos de CPLL se realizó por espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda 562 nm [13].

Obtenidos los resultados, se determinó la cantidad en  $\mu\text{g}$  de proteínas totales en cada muestra de suero procesada. A partir de estos valores, se pudo establecer la dilución de los eluidos CPLL de las muestras, en PBS 1x, para evitar la interferencia de la albúmina sérica y aplicar la misma cantidad de proteínas en cada biosensor para que la respuesta no fuera afectada por variaciones en la concentración proteica.

### 3.4. INSTRUMENTACIÓN

#### 3.4.1. EQUIPOS

Para el trabajo experimental se utilizaron los siguientes equipos:

- Adaptador de electrodos para lectura en potenciostato (DropSens®, modelo DRP-DSC70320).
- Agitador Vortex (Cole-Parmer®, modelo S0100A-CP).
- Balanza analítica (Sartorius®, modelo BP 221 S).
- Cables (3; “caimanes”) para la conexión del adaptador a los cables del potenciostato.
- Centrífuga con refrigeración (4 °C) (Eppendorf®, modelo 5403).
- Centrífuga para eppendorfs (Eppendorf®, modelo Mini sSpin).
- Espectrofotómetro UV-Vis portátil (DR 2700).
- Micropipetas de 1-10  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$  y de 100-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf®).
- Potenciómetro (Corning®; modelo 450).
- Potenciostato Autolab PGSTAT30, Eco Chemie, acoplado a monitor y CPU y con módulo FRA, controlado por el software *General Purpose Electrochemical System* (GPES), Version 4.5, AUTOLAB®, Eco Chemie para las medidas de voltametría cíclica (CV); y el software *Frequency Response Analyser* (FRA), Version 2.4, AUTOLAB®, Eco Chemie para las mediciones de impedancia.
- Refrigerador (4 y -20 °C) Daewoo®.

- Rotor para muestras biológicas (microtubos) (Barnstead|Thermolyne®; modelo 400110).
- Sistema Millipore Mili Q® (para agua desionizada), con resistividad de 18.2  $\mu\Omega$ .cm.
- Termoblock Multi-blok (Lab-Line Instruments Inc.®).
- Ultracongelador (-80 °C) Sanyo®.

#### 3.4.2. MATERIALES

Para el trabajo experimental se utilizaron los siguientes materiales:

- Materiales de plástico para la recolección, procesamiento y almacenamiento de las muestras y para la construcción de los biosensores y mediciones.
- Electrodo serigrafado de oro (SPE-Au), Metrohm DropSens® 220BT, con  $E_w$  (4 mm de diámetro) y  $E_{aux}$  de oro, y  $E_{ref}$  de plata.

Los SPEs son dispositivos que son producidos mediante deposiciones o impresiones de tinta capa por capa sobre un sustrato sólido, como el plástico o la cerámica, y mediante el uso de una pantalla que define la geometría del sensor [14,15].

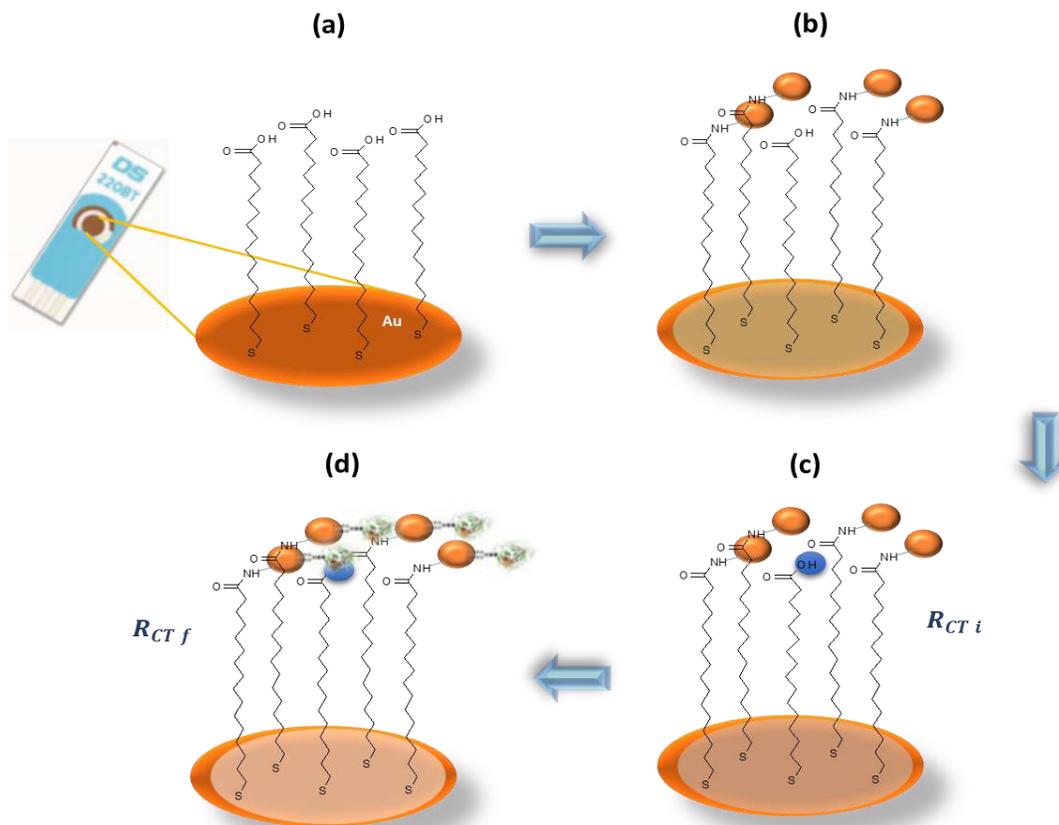
La configuración que presentan los SPE generalmente incluye tres electrodos: el de trabajo, el de referencia y el auxiliar, los cuales son impresos en los diversos tipos de sustrato que se pueden modificar fácilmente [15]. La composición de las tintas utilizadas para imprimir los electrodos determina la selectividad y sensibilidad requerida para ciertos análisis [14]. Entre las tintas más comúnmente usadas se encuentran la de plata y la de carbón, donde la tinta plateada se imprime como una pista conductora, mientras que los electrodos de trabajo se imprimen con grafito u otros materiales como oro, platino y plata [15].

La tecnología utilizada para la fabricación de estos electrodos tiene ventajas como la flexibilidad de diseño, posibilidad de automatización de procesos, buena reproducibilidad y una amplia variedad de materiales [15]. Además, estos dispositivos presentan una gran versatilidad como consecuencia de la amplia gama de formas en la que pueden modificarse. Una de ellas es mediante la composición de las tintas de impresión, las

cuales pueden variarse a través de la adición de múltiples reactivos como metales, enzimas, polímeros, etc.; o bien, depositando estas sustancias sobre la superficie de los SPE [14].

#### 3.5. CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR DE PHA-L

La construcción del biosensor se realizó teniendo al electrodo en posición completamente horizontal para que las soluciones se dispersaran de manera homogénea en toda el área a modificar (FIGURA 3.4). Todas las etapas de la construcción se desarrollaron a temperatura ambiente (~ 25°C). En la aplicación de las varias soluciones, se trató de evitar la dispersión del volumen del alcanotiol fuera del área del electrodo de trabajo, debido a que la dispersión del líquido afectaba la reproducibilidad de la respuesta analítica.



**FIGURA 3.4.** Esquema de construcción del biosensor de PHA-L para la detección de *N*-glicanos aberrantes por EIS. (a) Formación de la SAM por quimisorción sobre la superficie del SPE-Au. (b) Activación de los grupos COOH terminales de la SAM (16-MHDA) mediante incubación de la disolución reticuladora (ECD + NHS) por 1 h, y posterior adición de la PHA-L que se une covalentemente a la SAM. (c) Bloqueo de los grupos COOH no activados ni ligados a PHA-L, por inmersión en disolución de ETA por 30 min. (d) Respuesta del biosensor a la formación del complejo PHA-L – Tg bovina por afinidad de la lectina a la ramificación  $\beta$ 1-6-GlcNAc presente en *N*-glicanos aberrantes, monitoreada por EIS.

### 3.5.1. FORMACIÒN DE LA MONOCAPA AUTOENSAMBLADA (SAM)

Se depositaron 10  $\mu$ l de la disolución del alcanotiol 16-MHDA 25 mmol l<sup>-1</sup> (FIGURA 3.4-a) sobre la superficie central del electrodo de oro (electrodo de trabajo), el cual fue

utilizado sin cualquier pretratamiento. Posteriormente, se dejó secar la superficie y se procedió a almacenar (en un recipiente con tapa) por 24 h.

Terminado el periodo de incubación del alcanotiol y formación de la SAM, el electrodo se enjuagó con etanol anhidro a flujo constante por 5 segundos para remover el exceso de alcanotiol. Se dejó evaporar el líquido completamente y se procedió a depositar la solución entrecruzante.

#### 3.5.2. APLICACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE *CROSS-LINKER*

Se depositó sobre la superficie del electrodo de trabajo 10  $\mu\text{l}$  de la disolución entrecruzante (FIGURA 3.4-b). La solución se dejó en incubación por 1 h hasta que el líquido estuviese evaporado. Posteriormente, se enjuagó la superficie con PBS 1x a flujo constante por 5 segundos, y se realizó el secado del área perimetral de los electrodos con papel secante (limpio), sin tocar la superficie en modificación.

#### 3.5.3. APLICACIÓN DE LA LECTINA

Minutos antes de comenzar con la incubación de la lectina, la disolución de PHA-L se descongeló a temperatura ambiente y, posteriormente, se agitó en vortex por 3 segundos para homogenizar el contenido.

Realizada la modificación con el *cross-linker*, se depositaron en total 30  $\mu\text{l}$  de lectina (que equivalen a 75  $\mu\text{g}$ ), en 2 fracciones de 15  $\mu\text{l}$  cada una, dejando incubar el primer volumen por 1 h hasta casi dejar secar la superficie, antes de depositar la segunda fracción (FIGURA 3.4-b). Los últimos 15  $\mu\text{l}$  se incubaron por 1 h más hasta que el volumen no fue casi perceptible, pero sin dejar secar enteramente el electrodo en modificación. La aplicación de la lectina en dos fracciones iguales fue para igualar el error asociado al volumen medido y para evitar que éste saliera del área del electrodo de trabajo, pudiendo ocasionar pérdida del reactivo. Enseguida se pasó al bloqueo de la superficie, sin realizar enjuague.

Para esta parte de la construcción fue importante encontrar el punto justo donde la lectina no se encontrase todavía en solución antes de pasar al bloqueo, esto debido a que, si se incubaba antes, el biosensor no tenía una respuesta reproducible ni congruente; pero, si se dejaba secar por completo, se corría el riesgo de desnaturalizar a la proteína, dejándola, probablemente, sin la posibilidad de reaccionar en etapas posteriores.

### 3.5.4. BLOQUEO DE LOS GRUPOS CARBOXILO NO OCUPADOS

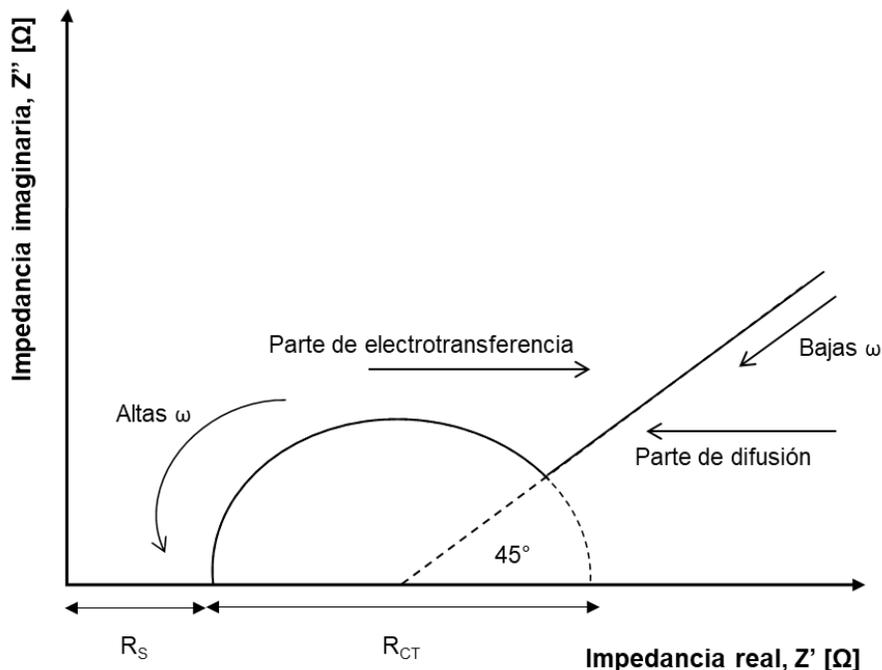
Previo al bloqueo, la solución de ETA 20 mmol l<sup>-1</sup> se dejó a temperatura ambiente, minutos antes de su utilización.

Terminada la incubación con la lectina, los electrodos fueron acomodados de manera vertical dentro del vaso con la disolución de ETA, cuidando de cubrir la zona de los electrodos (pero sin humedecer las terminales eléctricas), por un periodo de 30 min (FIGURA 3.4-c). Finalizado el lapso de tiempo, se realizó un enjuague con PBS 1x a flujo constante por 5 segundos.

Realizada la construcción, los biosensores se almacenaron a 4 °C, sumergidos verticalmente en PBS 1x con iones divalentes, cuidando de cubrir el área de los electrodos, pero no los contactos eléctricos, hasta el momento de realizar las mediciones (en un máximo de 3 h).

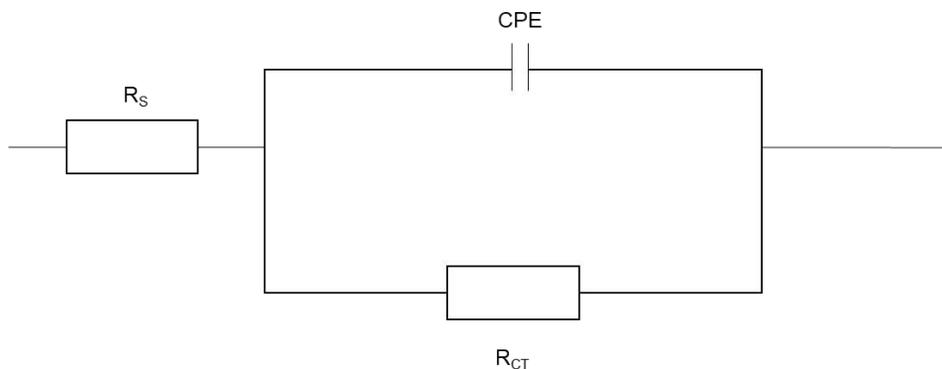
### 3.6. PROCESO DE MEDICIÓN DE LA RESPUESTA ANALÍTICA

En un diagrama de *Nyquist* pueden observarse dos tipos de procesos: a) un proceso limitado por difusión, que ocurre a bajas frecuencias de medición y donde se da una transferencia de electrones de manera muy rápida, observándose una pendiente en el diagrama; y b) un proceso limitado por transferencia de electrones, muy lento y que ocurre a elevadas frecuencias, el cual corresponde al semicírculo que se forma durante la etapa de medición (FIGURA 3.5) [4].



**FIGURA 3.5.** Esquema general del diagrama de *Nyquist* [4].

A un diagrama de *Nyquist* corresponde un circuito equivalente de Randles. En el caso del biosensor desarrollado, por las características y el comportamiento del sistema, se contempló uno formado por tres componentes (FIGURA 3.6): la resistencia de transferencia de carga ( $R_{CT}$ ), la resistencia de la solución ( $R_s$ ) y el elemento de fase constante (o capacitancia; CPE) [16,17].



**FIGURA 3.6.** Circuito de Randles equivalente al sistema impedimétrico del biosensor construido [16].

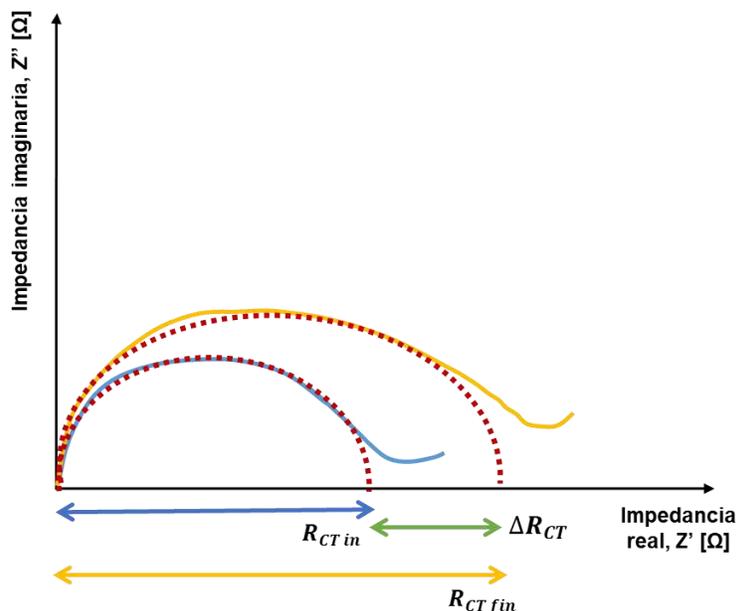
Mediante el uso del par redox ferri/ferrocianuro es posible que se presenten algunas dificultades al momento de repetir múltiples mediciones impedimétricas en el mismo electrodo, ya que la curva de respuesta cambia continuamente y, por tanto, no es posible realizar mediciones repetidas. Además de que, cuando se realizan mediciones sobre una superficie de oro sin modificar, los subsecuentes pasos de quimisorción se vuelven menos eficientes. Sin embargo, y a pesar de que el uso de esta sonda pueda presentar inconvenientes, en la mayoría de los documentos que tratan sobre EIS en combinación con electrodos de oro, la estabilidad del par ferri/ferrocianuro no parece ser un problema [18]. Por tanto, se decidió utilizar esta disolución en la presente metodología, solo tomando en cuenta las recomendaciones sobre su uso.

Durante las mediciones impedimétricas es necesario tener en cuenta ciertos aspectos o cuidados para evitar la obtención de datos erróneos, por ejemplo: a) se debe comenzar con un electrodo limpio donde las mediciones por EIS se caracterizarán por el semicírculo correspondiente al valor de  $R_{CT}$  y la diagonal del proceso de difusión. Por el contrario, se tendrá la presencia de semicírculos adicionales como consecuencia de impurezas remanentes que comprometerán el análisis [18]. Además, en análisis por CV del ferrocianuro en un electrodo limpio, se podrá comprobar los picos claros de oxidación y reducción, con posiciones ligeramente diferentes dependiendo del electrodo de referencia utilizado (tal como se aprecia en la FIGURA 4.9-a del Capítulo 4, sección 4.3.1) [19]. b) Es recomendable que al realizar las mediciones se hagan de manera rápida debido a que, en tiempos extendidos de contacto con la muestra, la SAM de tiol se elimina de la superficie de oro de forma gradual, como consecuencia de la liberación de iones  $CN^-$  procedentes del par redox ferri/ferrocianuro [18].

Para el proceso de medición de la respuesta analítica, con el electrodo montado en el adaptador, se depositaron 40  $\mu$ l de la disolución de sonda redox sobre la superficie del biosensor y se realizó la primera medición impedimétrica, obteniendo una curva de tipo sinusoidal y el valor  $R_{CT\ in}$  (FIGURA 3.7). Posteriormente, se realizó un enjuague del biosensor con PBS 1x a flujo constante por 5 segundos, se secó el exceso de PBS alrededor del área de trabajo y se depositaron 10  $\mu$ l de la solución de Tg bovina (FIGURA 3.4-d), dejando en incubación por 10 min, a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo,

se volvió a enjuagar la superficie del biosensor, de la misma manera que al inicio del procedimiento. Se colocó nuevamente el biosensor en el adaptador, y se depositaron 40  $\mu\text{l}$  de la disolución de sonda redox para realizar la segunda medición del mismo electrodo, obteniendo el valor  $R_{CT\text{ fin}}$  (FIGURA 3.7).

Para las mediciones, se empleó un intervalo de frecuencia de  $1 \times 10^5 \text{ Hz}$  a  $1 \times 10^{-2} \text{ Hz}$ , con un total de 25 frecuencias medidas y una amplitud de 0.005 V.



**FIGURA 3.7.** Diagrama de *Nyquist*. Curvas sinusoidales generales superpuestas, obtenidas en las dos mediciones y la señalización de los datos que se utilizaron para calcular la respuesta analítica ( $\% \Delta R_{CT}$ ).

Con ambos valores, se obtuvo la diferencia ( $\Delta R_{CT}$ ) y, aplicando la siguiente fórmula (ECUACIÓN 3.1), se calculó  $\% \Delta R_{CT}$  para cada biosensor:

$$\% \Delta R_{CT} = \frac{\Delta R_{CT}}{R_{CT\text{ in}}} 100$$

Donde:

$$\Delta R_{CT} = R_{CT\text{ fin}} - R_{CT\text{ in}}$$

**ECUACIÓN 3.1.** [10].

Se calcula el  $\% \Delta R_{CT}$  para homogenizar resultados y poder realizar comparaciones entre biosensores, debido al error de fabricación de los SPE-Au y al añadido en la modificación de la superficie de estos.

El sistema construido presentó elevada sensibilidad durante las mediciones realizadas, respecto al ruido eléctrico, razón por la cual todo el equipo se conectó a un regulador y éste, a su vez, a un supresor de picos de variación de voltaje para evitar resultados incongruentes durante las mediciones. Para la obtención de resultados fiables, durante el trabajo se evitó el uso de equipos cercanos al potencióstato, así como golpes o movimientos bruscos sobre la superficie donde se encontraba el equipo de medición. Respecto al ambiente, el clima fue un factor importante en la generación de ruido, particularmente en los días lluviosos, generando lecturas incongruentes, erráticas y fluctuantes entre biosensores, observándose semicírculos poco definidos en los diagramas de *Nyquist*, con mayor dispersión en los puntos finales del semicírculo. Además, se optó por un horario de trabajo donde la actividad del personal del laboratorio fuese bajo o nulo.

Para las mediciones de CV, se programó un total de 3 barridos, con una velocidad de barrido de  $0.2 \text{ V s}^{-1}$ , un paso de potencial de  $0.01 \text{ V}$ , un potencial inicial de  $-0.4 \text{ V}$ , un primer potencial de vértice de  $0.6 \text{ V}$  y un segundo potencial de vértice de  $-0.4 \text{ V}$ .

### 3.7. OPTIMIZACIÓN Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Durante los análisis y ensayos de optimización, se realizaron al menos duplicados y hasta cuadruplicados para cada condición evaluada. Se obtuvieron los valores promedios de  $\% \Delta R_{CT}$  de cada condición, así como la desviación estándar ( $\sigma$ ) correspondiente, para poder seleccionar la mejor respuesta (el mayor  $\% \Delta R_{CT}$  con la menor desviación estándar).

La optimización de la construcción del biosensor se realizó utilizando el método univariado, en el cual se estudian por separado cada una de las variables que componen el sistema; es decir, se van realizando análisis basados en una sola variable a la vez, mientras las restantes se mantienen fijas.

### 3.8. REFERENCIAS

- [1] EY Laboratories, Inc. LECTIN APPLICATIONS, *Phaseolus vulgaris*. Última actualización: 2015. Estados Unidos. Consultado el 14 de marzo de 2020. Disponible en: <http://eylabs.com/phaseolus-vulgaris/?distributor=true#.Xm7q9ahKjIU>.
- [2] Zeng X., Andrade C. A. S., Oliveira M. D. L., Sun X.-L. Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. *Anal. Bioanal. Chem.* (2012), 402, 3161-3176.
- [3] Yang S.-X. Pollock H.G., Rawitch A.B. Glycosylation in Human Thyroglobulin: Location of the N-Linked Oligosaccharide Units and Comparison with Bovine Thyroglobulin. *Arch. Biochem. Biophys.* (1996), 327, 1, 0093, 61-70.
- [4] Pihíková D., Kasák P., Tkac J. Glycoprofiling of cancer biomarkers: Label-free electrochemical lectin-based biosensors. *Open Chem.* (2015), 13, 1, 636-655.
- [5] Varki A., Cummings R.D., Esko J.D. *Essentials of Glycobiology*. 3a edición. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; (2015-2017). Capítulo 9. pp 1-19.
- [6] Champion B., Léger D., Wieruszkeski J.-M., Montreuil J., Spik G. Presence of fucosylated triantennary, tetraantennary and pentaantennary glycans in transferrin synthesized by the human hepatocarcinoma cell line Hep G2. *Eur. J. Biochem.* (1989), 184, 405-413.
- [7] Kozak R.P., Royle L., Gardner R.A., Fernandes D.L., Wuhrer M. Suppression of peeling during the release of O-glycans by hydrazinolysis. *Anal. Biochem.* (2012), 423, 119-128.
- [8] Saeland E., Belo A.I., Mongera S., Die I.V., Meijer G.A., Kooyk Y.V. Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumor tissue of colon cancer patients. *Int. J. Cancer.* (2012), 131, 117-128.
- [9] Sigma-Aldrich. Product information. Albumin from bovine serum / Mucin from bovine submaxillary glands. (2019). Estados Unidos de América. pp. 1-2; 1 (4; 1 páginas).

[10] Silva M.L.S., Gutiérrez E., Rodríguez J.A., Gomes C., David L. Construction and validation of *Sambucus nigra* biosensor for cancer-associated STn antigen. *Biosens. Bioelectron.* (2014), 57, 254-261.

[11] Guerin J.S., Murray D.W., McGrath M.M., Yuille M.A., McPartlin J.M., Doran P.P. Molecular Medicine Ireland Guidelines for Standardized Biobanking. *Biopreservation & Biobanking.* (2010), 8, 1, 3-63.

[12] Thulasiraman V., Lin S., Gheorghiu L., Lathrop J., Lomas L., Hammond D., Boschetti E. Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. *Electrophoresis* (2005), 26, 3561-3571.

[13] Thermo Fisher Scientific. BCA assay principles: Chemistry of BCA-based protein assay. Consultado el 25/02/2020. Disponible en:

[https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html?gclid=Cj0KCQiAqNPyBRCjARIsAKA-WFwLnjIMKIW53rhQirmmMUorSfDj3Lp\\_mKEJu\\_yV-7RVGgnGzDOZGBoaAqnkEALw\\_wcB&ef\\_id=Cj0KCQiAqNPyBRCjARIsAKA-WFwLnjIMKIW53rhQirmmMUorSfDj3Lp\\_mKEJu\\_yV-7RVGgnGzDOZGBoaAqnkEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!236691226945!e!!g!!pierce%20bca%20protein%20assay%20kit%20protocol](https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html?gclid=Cj0KCQiAqNPyBRCjARIsAKA-WFwLnjIMKIW53rhQirmmMUorSfDj3Lp_mKEJu_yV-7RVGgnGzDOZGBoaAqnkEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQiAqNPyBRCjARIsAKA-WFwLnjIMKIW53rhQirmmMUorSfDj3Lp_mKEJu_yV-7RVGgnGzDOZGBoaAqnkEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!236691226945!e!!g!!pierce%20bca%20protein%20assay%20kit%20protocol)

[14] Renedo O.D., Lomillo M.A.A., Martínez M.J.A. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta* (2007), 73, 202-219.

[15] Taleat Z., Khoshroo A., Ardakani M.M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008-2013). *Microchim Acta.* (2014), 181, 865-891.

[16] Li J., Kim B.K., Wang K.K. Im J.E., Choi H.N., Kim D.H., Cho S.I., Lee W.Y., Kim Y.R. Sensing Estrogen with Electrochemical Impedance Spectroscopy. *J. Anal. Methods Chem.* (2016), 2016, 1-6.

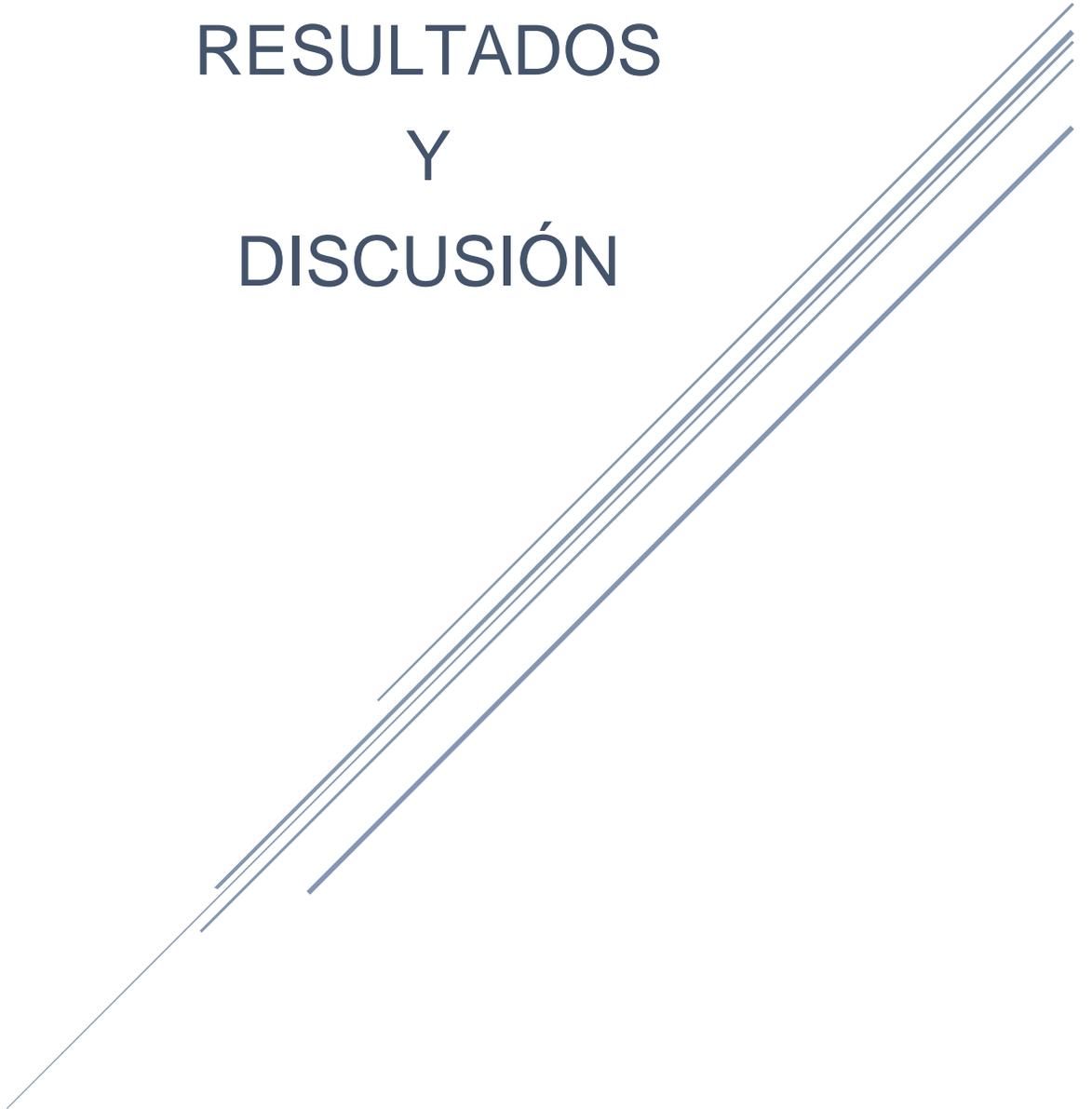
[17] Bertók T., Katrlík J., Gemeiner P. Tkac J., Electrochemical lectin based biosensors as a label-free tool in glycomics. *Microchim Acta.* (2012), 180, 1-2, 1-13.

[18] Vogt S., Su Q., Sanchez C.G., Nöll G. A critical view on electrochemical impedance spectroscopy (EIS) using the ferri/ferrocyanide redox couple at gold electrodes. *Anal Chem.* (2016), 88, 4383-4390.

[19] Bogomolova A., Komarova E., Reber K., Gerasimov T., Yavuz O., Bhatt S., Aldissi M. Challenges of Electrochemical Impedance Spectroscopy in Protein Biosensing. *Anal. Chem.* (2009), 81, 3944-3949.

# Capítulo 4

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR

### 4.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA MONOCAPA AUTOENSAMBLADA

Existen diversas formas de inmovilización de lectinas sobre superficies. Las posibilidades son mediante enlaces de tipo covalente, como la unión a través de SAMs vía acoplamiento de amina o tiol; y no covalente, como la fisisorción, el enlace por afinidad, el atrapamiento en gel, y *cross-linking* utilizando un agente multifuncional [1]. Para el presente trabajo, la lectina fue inmovilizada a través de la formación de una SAM, empleando el alcanotiol 16-MHDA.

De manera general, las SAM son capas monomoleculares que se forman de manera espontánea al sumergir (o poner en contacto) un sustrato sólido en una solución que contenga moléculas anfifuncionales, tales como los silanos, usados para modificar superficies de sílica, y los alcanotioles con afinidad hacia metales [2].

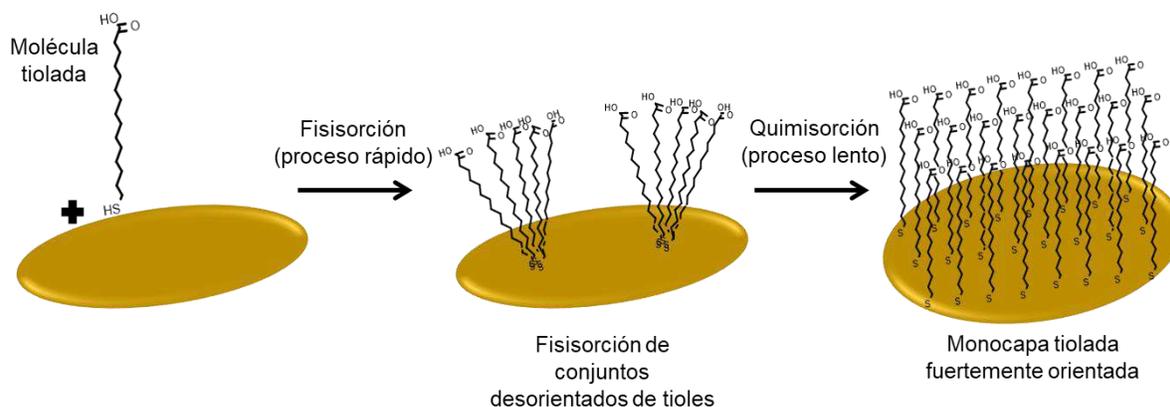
Una característica atractiva de las SAM es el control a nivel molecular sobre la modificación de electrodos. Además, la incorporación de múltiples componentes moleculares dentro de una monocapa permite que la interfaz cumpla una variedad de funciones, como proporcionar acceso selectivo al electrodo subyacente o incorporar una molécula de reconocimiento unida al electrodo modificado con la SAM [2].

Existe una amplia gama de diferentes superficies que pueden ser aplicadas en la inmovilización de lectinas. Una de ellas es la superficie de oro, el cual es un material razonablemente inerte (en comparación con la plata), resistente a la oxidación y, además, las películas delgadas de oro son compatibles con numerosas plataformas de detección. El oro presenta la habilidad de formar SAMs vía quimisorción espontánea de tioles (SH) y disulfuros en su superficie [3]. Por esa razón, se utilizaron electrodos SPE-Au para la construcción del biosensor de PHA-L.

Los derivados de tioles presentan una amplia gama de grupos funcionales en su extremo- $\omega$ , de tal manera que pueden aplicarse efectivamente para ajustar propiedades interfaciales, con la capacidad de controlar el proceso de acoplamiento posterior a nanoescala [4].

La estabilidad de los enlaces sulfuro con oro los hacen químicamente convenientes para promover reacciones de inmovilización (de lectinas, por ejemplo). La modificación de la superficie con una SAM controla la organización del ligando adjunto [5], y la longitud de la cadena de alcanotiol afecta la organización de esta [4], pudiendo hacerla más o menos densa.

La adsorción de la solución del alcanotiol a la superficie del electrodo de Au toma de unos milisegundos a minutos en llevarse a cabo. Sin embargo, la siguiente fase de reorganización de las cadenas alifáticas puede tomar varias horas para maximizar la densidad de la capa y minimizar los defectos en la SAM (FIGURA 4.1) [5]. Por ello, la etapa de incubación del alcanotiol se realizó durante 24 horas, para permitir que se llevara a cabo la inclinación de las cadenas alquilo en un ángulo de 20-30° respecto de la superficie del electrodo [5].



**FIGURA 4.1.** Proceso de formación de la SAM sobre la superficie de oro [6].

Los alcanotioles evaluados para la formación de la SAM sobre la superficie de los SPE-Au fue uno de cadena corta de 6 carbonos (ácido mercaptohexanoico, 6-MHA) y uno de cadena larga de 16 carbonos (ácido mercaptohexadecanoico, 16-MHDA). Se testaron seis diferentes concentraciones (reactivos en solitario y mezclas de ambos, TABLA 4.1), con el objetivo de encontrar la combinación donde se inmovilizaría la mayor cantidad de cadenas de alcanotiol sobre la superficie de oro, y se tradujera en el mayor promedio del

$\% \Delta R_{CT}$ , debido a la formación de un mayor número de complejos PHA-L – *N*-glicanos aberrantes.

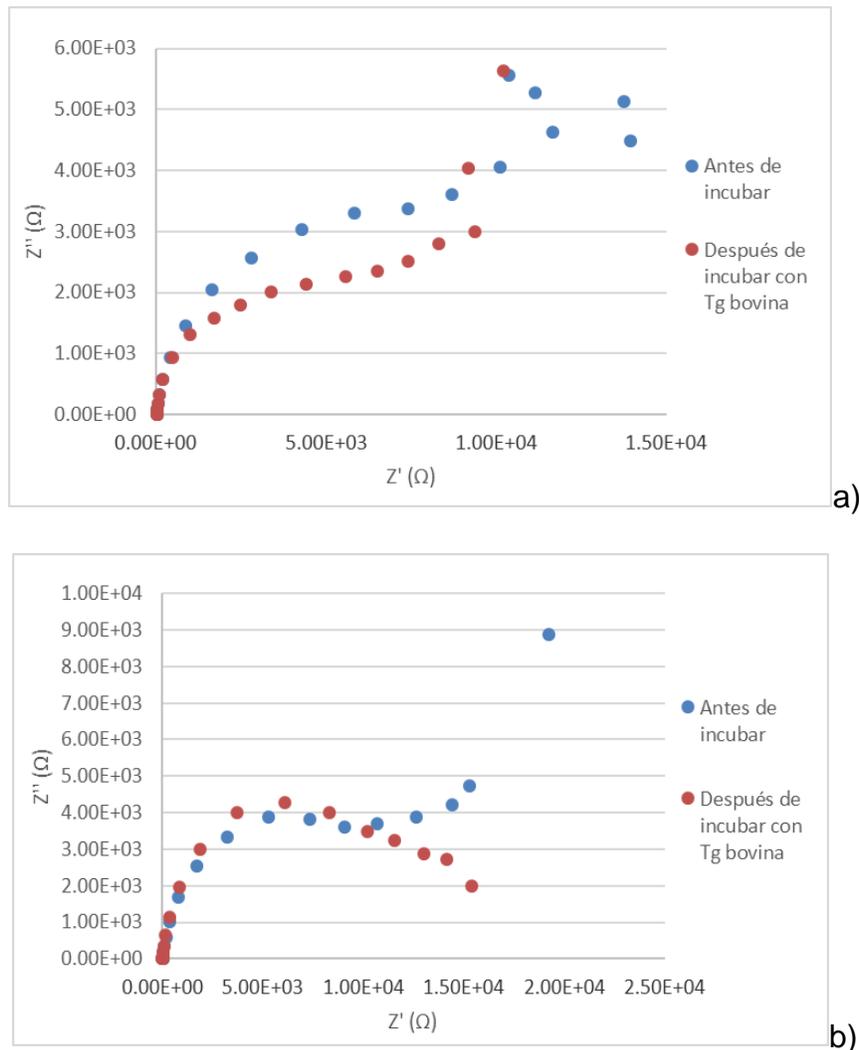
**TABLA 4.1.** Reactivos correspondientes a la monocapa autoensamblada, concentraciones testadas y resultados obtenidos.

Nº de ensayo	Reactivos [mmol l <sup>-1</sup> ]:		Promedio $\% \Delta R_{CT}$ (n= 2)	Desviación estándar
	6 - MHA	16 - MHDA		
1	25	-	0	-
2	-	25	47.65	14.82
3	25	12.5	4.57	3.53
4	12.5	12.5	36.01	4.61
5	12.5	25	49.35	16.19
6	12.5	37.5	24.69	3.07

Los resultados que se obtuvieron de los ensayos mostraron los mayores  $\% \Delta R_{CT}$  empleando 16-MHDA 25 mmol l<sup>-1</sup>, como reactivo único (ensayo nº 2) o en mezcla con 6-MHA (ensayo nº 5), aunque con mayores desviaciones estándar. Sin embargo, la diferencia en el  $\% \Delta R_{CT}$  entre ambos ensayos fue de solo 1.7%, mostrando que para este sistema en específico el uso de una SAM mixta no representó una mejora significativa en la señal analítica (TABLA 4.1). La adición de alcanotioles de cadena corta afecta la organización de una monocapa, disminuyendo su densidad y mejorando la transferencia de electrones [7]. Esto pudo ocurrir en los ensayos con 6-MHA al obtenerse los menores  $\% \Delta R_{CT}$ , donde los diagramas de *Nyquist* llegaron a mostrar un comportamiento de difusión a bajas frecuencia, tal como se aprecia en la FIGURA 4.2.

Se sabe que el ordenamiento, el nivel de defectos y la estabilidad de una SAM se ven mejorados por las fuerzas de atracción de van der Waals entre las cadenas alquilo. Las superficies aparentemente más lisas y los alcanotioles de cadena larga producen SAMs más ordenadas (es decir, con menos defectos) que aquellas con cadenas más cortas [2], tal como se observa en los resultados de la TABLA 4.1. En los resultados

presentados en la FIGURA 4.2 (que corresponden a los ensayos nº 1 (a) y nº 3 (b)) no se observó un incremento de la señal después de la incubación con la Tg bovina como consecuencia de la formación una SAM inestable y con posibles defectos que ocasionó una deficiencia en la inmovilización de la lectina y, por tanto, en la menor o nula formación de complejos PHA-L – Tg bovina.

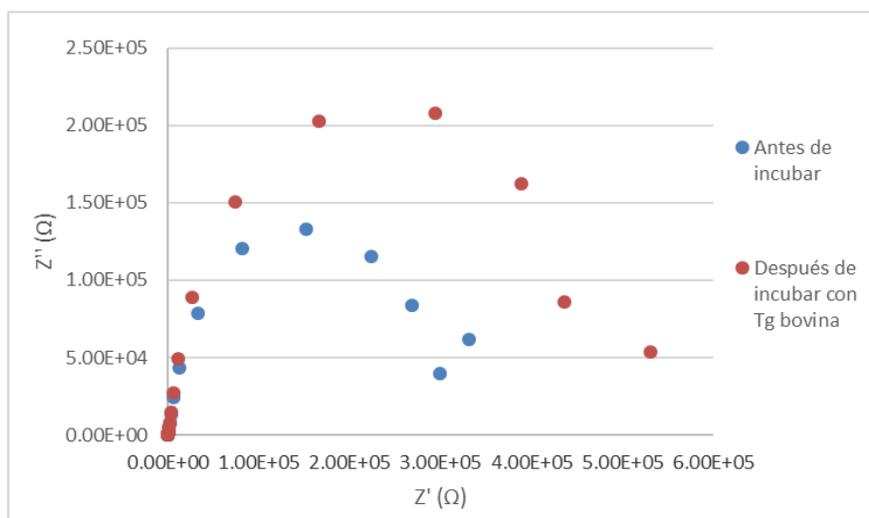


**FIGURA 4.2.** Diagramas de *Nyquist* obtenidos empleando: (a) 6-MHA 25 mmol l<sup>-1</sup>; (b) 6-MHA 25 mmol l<sup>-1</sup> + 16-MHDA 12.5 mmol l<sup>-1</sup>. Incubación con Tg bovina 10 mg ml<sup>-1</sup>.

En el caso del biosensor de PHA-L es de interés la formación del semicírculo a elevadas frecuencias debido a que es un indicativo de la modificación de la superficie del electrodo

y la resistencia que se ejerce, por parte de la densidad de la SAM formada, al paso de la sonda redox para llegar a la superficie del electrodo y efectuar la reacción de óxido-reducción.

Considerando lo antes mencionado y las respectivas desviaciones estándar, fue seleccionada la disolución del alcanotiol de cadena larga 16-MHDA 25 mmol l<sup>-1</sup> como reactivo y concentración óptimos para la SAM donde, en el diagrama de *Nyquist* correspondiente, se distingue fácilmente el semicírculo que denota el proceso limitado por la transferencia de electrones (FIGURA 4.3). Esta concentración se utilizó en los ensayos posteriores para la construcción de los biosensores.

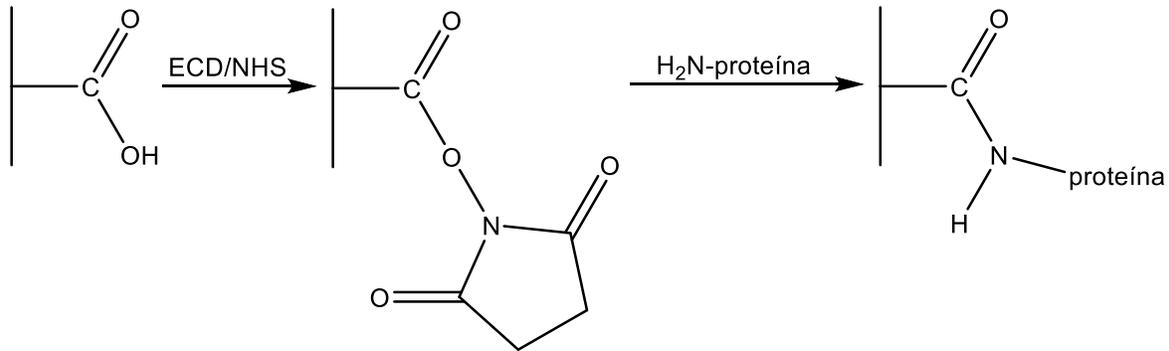


**FIGURA 4.3.** Diagrama de *Nyquist* obtenido para un biosensor construido con una SAM de 16-MHDA a una concentración 25 mmol l<sup>-1</sup>. Incubación con Tg bovina 10 mg ml<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE *CROSS-LINKER*

Para la unión de biomoléculas a la SAM se requiere de la activación de los grupos funcionales terminales del alcanotiol, en este caso los grupos COOH que se encuentran libres para reaccionar [3]. El método más popular y versátil para la unión covalente de proteínas, ácidos nucleicos y compuestos orgánicos a la SAM [8] es la activación de agentes vía enlace covalente, empleando una disolución de hidroclorehidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (ECD) y N-hidroxisulfosuccinimida (NHS),

disolución también conocida como solución reticuladora o *cross-linker*. En este acoplamiento, los grupos COOH terminales del alcanotiol se activan primero formando ésteres de succinimida reactivos y después el éster reacciona espontáneamente con una amina primaria de la biomolécula (en este caso, la lectina). La N-hidroxisuccinimida (NHS) se aplica con frecuencia para aumentar la eficiencia de acoplamiento (FIGURA 4.4) [3,7].



**FIGURA 4.4.** Activación con ECD de la SAM inmovilizada sobre la superficie de oro del electrodo para posteriormente interactuar con la lectina [9].

Para optimizar la etapa de *cross-linking* se evaluaron mezclas de disoluciones a diferentes concentraciones de ECD y NHS (TABLA 4.2), con el objetivo de seleccionar aquella donde se obtuviese el mayor promedio del porcentaje de  $\Delta R_{\text{CT}}$ , analizando de igual manera su desviación estándar.

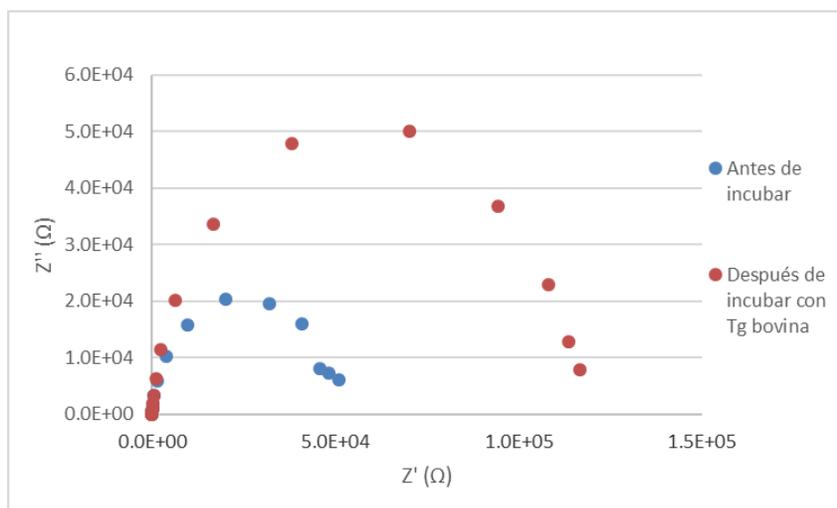
**TABLA 4.2.** Mezclas de los reactivos del *cross-linker* a diferentes concentraciones, y resultados obtenidos.

Nº de ensayo	Reactivos [mmol l <sup>-1</sup> ]:		Promedio % $\Delta R_{CT}$ (n= 2)	Desviación estándar
	ECD	NHS		
1	10	20	75.70	8.76
2	10	30	109.07	29.85
3	20	5	26.30	1.40
4	20	10	27.10	15.61
5	20	20	34.33	13.68
6	20	30	94.83	24.69
7	20	40	117.06	18.87
8	20	50	83.97	11.92
9	40	5	6.12	-
10	40	10	5.08	-

Respecto a los resultados obtenidos (TABLA 4.2), en el caso de las mezclas donde la concentración de NHS era inferior a la de ECD (ensayos nº 3, 4, 9 y 10), los promedios de los porcentajes de  $\Delta R_{CT}$  fueron bajos, llegando a registrar hasta un 5.08%, valor que puede considerarse como ruido al ser menor al 10%. Se sabe que la carbodiimida reacciona con un carboxilo para formar un intermediario de *O*-acilisourea reactiva con amina, y es bien conocido que este intermediario puede reaccionar con un grupo amina para unir dos moléculas mediante un estable enlace amida, pero también es susceptible a la hidrólisis, haciéndolo inestable y de corta duración en solución acuosa [8]. Por tal motivo, al tener una concentración insuficiente de NHS en un sistema para estabilizar la *O*-acilisourea, puede ocurrir su hidrólisis antes de reaccionar con un grupo amina, evitando que se complete la activación y unión a la lectina.

Los promedios del % $\Delta R_{CT}$  más elevados correspondieron a las mezclas de ECD 10 mmol l<sup>-1</sup> + NHS 30 mmol l<sup>-1</sup> y ECD 20 mmol l<sup>-1</sup> + NHS 40 mmol l<sup>-1</sup>, con resultados de 109.07 y 117.06, respectivamente (TABLA 4.2).

Se tomó en cuenta la desviación estándar de cada una de ellas para la selección de las concentraciones óptimas de ambos reactivos, siendo la mezcla de ECD 20 mmol l<sup>-1</sup> + NHS 40 mmol l<sup>-1</sup> la empleada para los siguientes ensayos. En estas condiciones, los diagramas de *Nyquist* mostraron el semicírculo correspondiente a un proceso limitado por la transferencia de electrones (FIGURA 4.5).



**FIGURA 4.5.** Diagrama de *Nyquist* correspondiente a las concentraciones seleccionadas como óptimas de los reactivos que componen a la solución reticuladora: ECD 20 mmol l<sup>-1</sup> y NHS 40 mmol l<sup>-1</sup>. Incubación con Tg bovina 10 mg ml<sup>-1</sup>.

#### 4.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CANTIDAD DE PHA-L INMOVILIZADA

La cantidad de lectina inmovilizada sobre la superficie modificada de los SPE-Au fue optimizada con la finalidad de maximizar el número de complejos formados entre la lectina y los carbohidratos aberrantes de interés presentes en las glicoproteínas.

Para seleccionar la cantidad de lectina inmovilizada en las cadenas previamente activadas del alcanotiol, donde se obtuviese el mayor valor promedio del porcentaje de  $\Delta R_{CT}$  y mejor valor de desviación estándar, se analizaron cinco cantidades diferentes del reactivo (TABLA 4.3).

**TABLA 4.3.** Cantidades de lectina testadas para la optimización del reactivo inmovilizado en el biosensor y resultados obtenidos.

<b>Nº de ensayo</b>	<b>Reactivo: PHA-L (µg)</b>	<b>Promedio %<math>\Delta R_{CT}</math> (n= 2)</b>	<b>Desviación estándar</b>
1	25	0.03	0.04
2	50	17.47	6.89
3	75	36.57	13.40
4	100	5.83	8.24
5	125	6.49	9.17

La interacción entre una lectina y un carbohidrato no es un simple evento de unión monomérica, sino un mecanismo de unión oligo- o polimérico. Las lectinas a menudo tienen más de un sitio de unión a carbohidratos, y ha sido demostrado que la ocurrencia de dos eventos de unión simultánea puede incrementar la actividad de interacción por más de 100 veces, e incluso tan alto como 10,000 veces [10].

De los resultados obtenidos en la serie de ensayos, se observó que el % $\Delta R_{CT}$  fue aumentando gradualmente conforme se incrementaba la cantidad en µg de PHA-L, debido a un favorecimiento en la frecuencia de eventos de unión que dieron lugar a la formación del complejo PHA-L – Tg bovina, teniendo un valor máximo a 75 µg con un 36.57% (TABLA 4.3).

En los ensayos cuyas concentraciones eran mayores a 75 µg, los valores de % $\Delta R_{CT}$  disminuyeron significativamente. Esto pudo deberse a que la densidad de glicanos, el efecto de un glicano vecino y la separación en la unión con lectinas pueden afectar en gran medida las interacciones glicano-proteína, causando una disminución en el número de complejos formados [3]. Además, la cantidad de enlaces activados del alcanotiol pudieron no ser suficientes para inmovilizar cantidades elevadas de lectina, y ésta podría formar aglomerados (debido a su elevada concentración, y que pudieron observarse a

simple vista sobre la superficie del electrodo) y, como consecuencia, un efecto de impedimento estérico podría ocurrir.

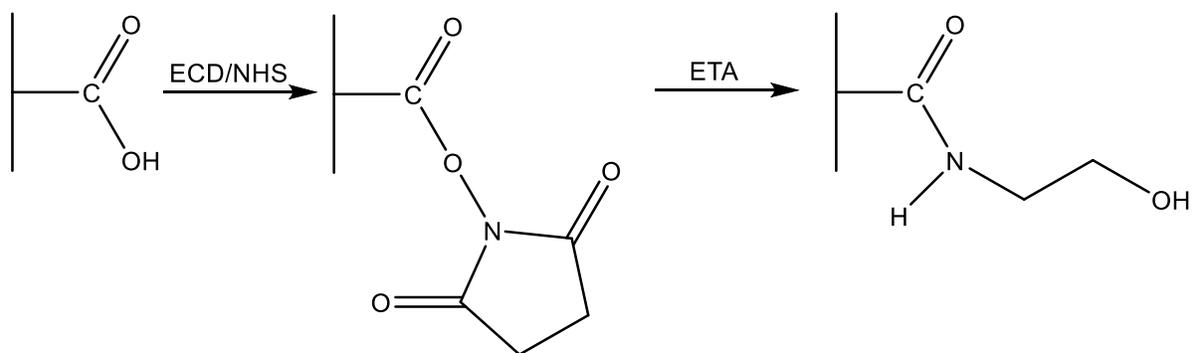
Para los ensayos siguientes se seleccionó como cantidad óptima de lectina 75  $\mu\text{g}$ , para inmovilizar en la superficie del biosensor.

#### 4.1.4. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BLOQUEO

El objetivo de la optimización del procedimiento de bloqueo fue seleccionar el o los reactivos, su concentración y procedimiento de aplicación, mediante los cuales se disminuyeran las posibles interacciones inespecíficas sobre la superficie del biosensor. En esta etapa se realizó el bloqueo de los grupos carboxilo no activados de la SAM formada, para evitar posibles interferencias en la medición ocasionadas por la presencia de moléculas cargadas.

Por otro lado, la fisisorción es una preocupación general en el estudio de las proteínas con interacciones de elevada afinidad (como antígeno-anticuerpo o aptámero/proteínas), y más aún con las de baja afinidad como las lectinas y sus ligandos de glicanos monoméricos. La fisisorción interferente conduce a una sobreestimación de la cantidad de proteína “real” unida al ligando de superficie [11]. Las proteínas y glicoproteínas (como la Tg bovina) tienden a adsorberse espontáneamente a la mayoría de los materiales, resultando en la formación de capas y pasivación de electrodos, por ejemplo [12].

Se comenzó probando el reactivo ETA, el cual se une a los grupos COOH de la SAM no activados (FIGURA 4.6), a tres diferentes concentraciones: 20, 40 y 60  $\text{mmol l}^{-1}$ , realizando una inmersión de los electrodos modificados en la solución por 30 minutos. El ensayo se realizó sobre la superficie de electrodos carentes de lectina PHA-L (por tanto, no se esperó respuesta alguna por parte del biosensor cuando se incubó con Tg bovina para ningún ensayo) [11]. Los promedios del  $\%\Delta R_{CT}$  obtenidos para cada concentración fueron:  $\sim 0$ , 244.46 y 170.84, respectivamente; llevando a seleccionar como óptima la concentración de 20  $\text{mmol l}^{-1}$  de ETA.



**FIGURA 4.6.** Bloqueo de los grupos carboxilo de la SAM que quedaron sin reaccionar con la lectina vía ETA [9].

A partir de los resultados previos, se evaluaron combinaciones de ETA 20 mmol l<sup>-1</sup> como reactivo único de bloqueo y en mezcla con otros reactivos (algunos utilizados como disoluciones de enjuague) con el objetivo de disminuir la adsorción inespecífica de proteínas y glicoproteínas sobre el biosensor, a diferentes porcentajes p/p (TABLA 4.4), seleccionando el menor valor promedio del porcentaje de  $\Delta R_{CT}$ . Los electrodos fueron modificados, pero no se inmovilizó la PHA-L, y las mediciones fueron realizadas incubando la Tg bovina.

**TABLA 4.4.** Reactivos evaluados en la etapa de bloqueo para el biosensor de PHA-L y resultados obtenidos.

Reactivos:		Promedio % $\Delta R_{CT}$ (n= 2)	Desviación estándar
ETA [mmol l <sup>-1</sup> ]	+		
20	-	~0	3.56
20	Etilenglicol 5%	22.90	13.42
20	Etilenglicol 10%	50.24	18.69
20	Etilenglicol 15%	98.36	28.98
20	PVA 2%	41.67	9.09
20	PVA 5%	64.00	11.43
20	SDS 2%	227.22	12.68

El etilenglicol (EG) es una molécula soluble en agua, de carga neutra que impide la adsorción de proteínas a las superficies planas de oro [13]. Sin embargo, aún no se han podido comprender bien los mecanismos moleculares mediante los cuales las proteínas se adsorben y la resistencia creada por el EG que se inmoviliza sobre una superficie [14]. Una estrategia para formar estas capas de polímero es a través de fisisorción (fuerzas de van der Waals, hidrofobicidad) o quimisorción (enlaces tiolato de oro e interacciones electrostáticas), que dan lugar a un injerto más grueso (10-100 nm o más), pero que requieren de una previa funcionalización del sustrato con un iniciador adecuado [14]. Algunas estrategias que se mencionan en la literatura contemplan el uso de polietilenglicol (PEG) funcionalizado con acrilato a partir de una superficie de oro modificada con una SAM, dando lugar a un recubrimiento más grueso donde, en su momento, se exhibió una excelente resistencia a las incrustaciones de proteínas [14]. Sin embargo, para el sistema propuesto los resultados mostraron que en el uso del EG como segundo agente de bloqueo, conforme se incrementó el porcentaje del reactivo en disolución, también lo hizo la respuesta del biosensor de acuerdo con los  $\% \Delta R_{CT}$  obtenidos. Por tal motivo, se descartó su posible uso para dicho fin. Tomando en cuenta todo lo anterior, en los ensayos de optimización del bloqueo se utilizó una disolución única de EG, un polímero de cadena más corta que el PEG pero sin previa funcionalización, lo que pudo haber mermado su actividad y eficiencia de unión a la superficie de oro y creado interacciones electrostáticas con los componentes de las capas al ingresar en las cavidades pequeñas por su longitud. Esto pudo haber traído como consecuencia una inestabilidad en las uniones previamente creadas entre los reactivos, teniendo como resultado una respuesta errónea por parte del biosensor.

En el caso del PVA (un polímero no conductor altamente hidrofílico, no tóxico, biocompatible con una excelente fuerza mecánica y pH estable), se incorpora a los biosensores para evitar la contaminación de la superficie de los electrodos por proteínas y otras sustancias [15,16]. Sin embargo, después de realizar algún tipo de modificación por adsorción sobre una superficie con PVA, las unidades del reactivo que quedan sin adherir frecuentemente terminan por desprenderse o disolverse cuando un solvente (como el agua desionizada) u otras moléculas penetran los poros que pudiesen existir, complicando su uso para una aplicación eficiente. Por tanto, se recomienda su uso en

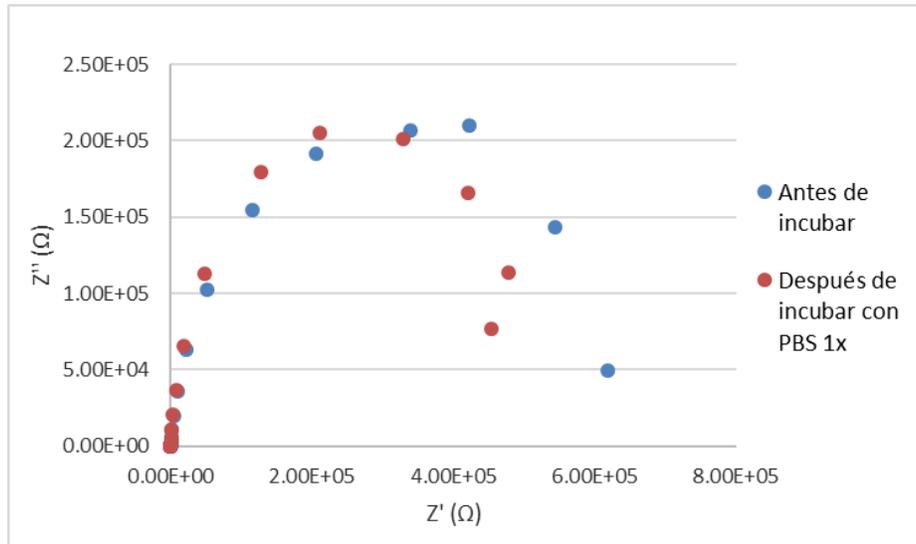
combinación con reactivos *cross-linking* [16]. Lamentablemente, los resultados con PVA no fueron favorables para este sistema en específico, lo que probablemente pudo deberse a una disolución del reactivo adherido durante la aplicación de la sonda redox y los enjuagues realizados a la superficie del biosensor. El PVA pudo haber establecido interacciones con la Tg bovina, así como con el resto de los componentes inmovilizados, desestabilizando las capas generadas y favoreciendo la adhesión de las proteínas libres, dando como resultado interacciones inespecíficas y una respuesta errada por parte del biosensor.

Una estrategia alternativa se basó en la implementación de protocolos de limpieza de superficies que alteran eficientemente las proteínas débilmente adheridas y facilitan su eliminación selectiva, tal es el uso que se le ha dado al tensioactivo dodecil sulfato de sodio (SDS) que se ha empleado con éxito para eliminarlas [11]. Sin embargo, para este biosensor en específico, tampoco se obtuvieron resultados favorables con este reactivo, tal como se muestra en la Tabla 4.4 con un porcentaje de  $\Delta R_{CT}$  de 227.22. En este caso el mismo tensioactivo pudo haber ocasionado una desnaturalización proteica de la PHA-L y de la Tg bovina, lo que expuso fracciones cargadas de las mismas biomoléculas, pudiendo ejercer un efecto de repulsión electrostática entre ellas mismas y con la sonda redox, alterando la respuesta del biosensor.

Evaluando los resultados en cada protocolo de bloqueo, se optó por el uso exclusivo de ETA 20 mmol l<sup>-1</sup>, donde el  $\% \Delta R_{CT}$  cercano a 0 y la desviación estándar de 3.56, denotan un mínimo de interacciones inespecíficas entre la Tg bovina y los diversos componentes del biosensor, excepto la lectina, que puedan alterar la respuesta de este.

Para evaluar la respuesta del blanco se construyó un biosensor (con lectina) y se incubó con PBS 1x para evaluar la respuesta del blanco. De acuerdo con los resultados obtenidos con otros biosensores impedimétricos de lectinas, se estableció como límite máximo de ruido un  $\% \Delta R_{CT} = 10$  [17]. El resultado obtenido en este ensayo con PBS 1x fue 7.54%, el cual se considera como un valor de ruido aceptable, que corresponde al procedimiento de construcción y materiales propios del biosensor [17]. En tal caso, al no estar presente la glicoproteína modelo, no existió la formación del complejo de interés a

detectar y, por tanto, el biosensor no dio una respuesta considerada positiva, es decir, un porcentaje de  $\Delta R_{CT}$  superior al 10% (FIGURA 4.7).



**FIGURA 4.7.** Diagrama de *Nyquist* del biosensor optimizado cuando se incubó con PBS 1x.

#### 4.1.5. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA MODELO POSITIVO

Se realizaron ensayos probando diferentes tiempos de incubación (TABLA 4.5) de la glicoproteína modelo positivo sobre la superficie del biosensor construido, para evaluar el tiempo necesario para obtener el mayor número de complejos lectina-glicano aberrante formados, dando como resultado el valor más alto del  $\% \Delta R_{CT}$  en la etapa de medición.

**TABLA 4.5.** Tiempos de incubación evaluados de la glicoproteína modelo positivo sobre la superficie del biosensor y resultados obtenidos.

<b>Tiempo de incubación de la Tg bovina (min)</b>	<b>Promedio <math>\% \Delta R_{CT}</math> (n= 2)</b>	<b>Desviación estándar</b>
5	13.10	0.36
10	29.70	8.12
15	28.67	2.66
20	19.29	25.47

Probando 5 minutos de incubación, el  $\% \Delta R_{CT}$  fue el menos favorable debido a que el tiempo resultó insuficiente para el acoplamiento lectina - *N*-glicano aberrante. Además, incubando por 20 minutos el  $\% \Delta R_{CT}$  decae, en comparación con lo obtenido a 10 y 15 minutos, lo cual puede deberse a una desnaturalización de la lectina y de la Tg bovina ocasionada por la deshidratación de estas como consecuencia de la evaporación del solvente de la alícuota depositada.

De los cuatro tiempos evaluados, 10 y 15 minutos presentaron los  $\% \Delta R_{CT}$  más elevados y muy similares, con una ligera diferencia de 1.03%. Sin embargo, se optó por aplicar 10 minutos en el periodo de incubación para ensayos futuros, debido a que se reduce el tiempo de análisis sin afectar la formación de dicho complejo.

#### 4.2. PRUEBAS DE SELECTIVIDAD

Con la finalidad de observar el comportamiento discriminativo del biosensor sobre una variedad de glicoproteínas modelo presentes de manera normal en el suero sanguíneo humano, así como sobre otras glicoproteínas con estructuras normales de *N*-glicanos que pudiesen ocasionar interferencias en la medición, se evaluaron las proteínas enlistadas en la TABLA 4.6. Cada glicoproteína se valoró bajo las siguientes concentraciones: 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg ml<sup>-1</sup>.

**TABLA 4.6.** Glicoproteínas evaluadas con el biosensor como posibles interferentes y resultados obtenidos.

Glicoproteína modelo	N-glicano aberrante	Concentraciones mg ml <sup>-1</sup>	Promedio % $\Delta R_{CT}$ (n= 2)	Desviación estándar
BSM	-	0.5	~0	5.57
Trf	-	0.125	11.77	25.45
Fet	-	0.5	11.65	10.21
CEA	-	0.5	~0	2.53
aBSM	-	0.25	~0	2.08
aTrf	-	0.0625	9.42	2.66
aFet	-	0.125	4.78	6.77
BSA	-	0.5	~0	4.93
Tg bovina	+	0.5	32.92	11.92

Las estructuras de las proteínas testadas carecen de formas de *N*-glicanos aberrantes con aumento de ramificación  $\beta$ 1-6 (excepto la Tg bovina), por tanto, se marcaron como glicoproteínas modelo negativo (-), para las cuales no se espera interacción con la lectina PHA-L inmovilizada en el biosensor.

En el caso de la mucina de glándulas submaxilares bovinas (BSM), se trata de una proteína altamente glicosilada, rica en prolina, serina, treonina y residuos de glicina, con un contenido de 9 a 24% de ácido siálico [18]. La glicosilación que presenta es del tipo O-GlcNAc [19].

La Trf es una glicoproteína del plasma sanguíneo, la cual contiene estructuras *N*-acetilactosamina (LacNAc), bi- y tetraantenarias, sialiladas de glicanos [20].

La Fet contiene glicanos sialilados *N*-ligados y *O*-ligados [21].

El CEA es una glicoproteína oncofetal que normalmente se expresa en las células mucosas, en concentraciones normales menores a 5 ng ml<sup>-1</sup>. Normalmente ocurre en el

tejido intestinal fetal. Por nacimiento, desaparecen los niveles séricos detectables, pero se sobreexpresa en el torrente sanguíneo de adultos con tumores malignos presentando glicosilación aberrante [22]. En el caso del CEA utilizado para los ensayos realizados, su origen no fue de células tumorales sino normales, por tanto, este reactivo careció de las estructuras aberrantes de los *N*-glicanos de interés, es decir, se esperó una respuesta negativa por parte del biosensor.

La albúmina sérica es una proteína que no contiene carbohidratos y comprende el 55-62% de las proteínas totales presentes en el suero sanguíneo [18]. Los niveles de albúmina normales son  $\geq 35 \text{ g l}^{-1}$  [23]. Se analizó la BSA para simular la interferencia de la albúmina sérica humana (HSA).

En el caso de las asialo-glicoproteínas (aBSM, aTrf, aFet), presentan las mismas estructuras de glicanos descritas exceptuando las unidades de ácido siálico terminal.

Para las pruebas de selectividad se comenzó por analizar las disoluciones con la concentración de  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  debido a que fue la concentración óptima de Tg bovina donde el biosensor presentó el mayor  $\% \Delta R_{CT}$ . Si se obtenían valores de  $\% \Delta R_{CT}$  superiores a 10% se analizaban las disoluciones de menor concentración, secuencialmente, hasta verificar la no interferencia ( $\% \Delta R_{CT} \leq 10$ ) Los resultados de selectividad se visualizan en la TABLA 4.6.

El biosensor de PHA-L no mostró respuesta alguna al evaluarlo desde la primera concentración  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  para las glicoproteínas BSM, Fet, CEA y BSA (con estructuras de glicanos *O*-GlcNAc, *O*-glicanos, *N*-glicanos sialilados y sin glicanos, respectivamente), evidenciando la ausencia de interferencia que estas podrían haber ejercido en el dispositivo, como consecuencia de la carencia de estructuras de glicanos con las que la PHA-L posee afinidad. En el caso de la aBSM, la concentración a partir de la cual el biosensor ya no presentó respuesta fue a  $0.25 \text{ mg ml}^{-1}$ . Al presentar un cambio en su estructura por la falta de unidades de ácido siálico (de carga negativa), pudo haber ejercido efectos de atracción con la carga negativa de la sonda redox y traducirse en una respuesta errónea a  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$ . Para la Trf humana y la aFet (con estructuras LacNAc y *O*-glicanos no sialilados, respectivamente),  $0.125 \text{ mg ml}^{-1}$  fue la concentración a partir de la cual no ejercieron interferencia en la respuesta del biosensor,

debido a que la PHA-L no presenta afinidad por la LacNAc ni estructuras desialiladas de O-glicanos como las de la aFet. La aTrf presentó interferencias al evaluarla con las primeras tres concentraciones, probablemente por cambios estructurales significativos ocurridos durante el proceso de desialilación, ya que se trata de una glicoproteína que se describe en sí como bi- y tetra-ramificada sialilada; al final, careció de respuesta por parte del biosensor a  $0.0625 \text{ mg ml}^{-1}$ . Los ensayos realizados con las glicoproteínas modelo negativo evidenciaron la selectividad que el biosensor de lectina posee por la ramificación  $\beta 1-6$  de los N-glicanos aberrantes, y no por O-glicanos o estructuras sialiladas existentes de manera normal en el torrente sanguíneo.

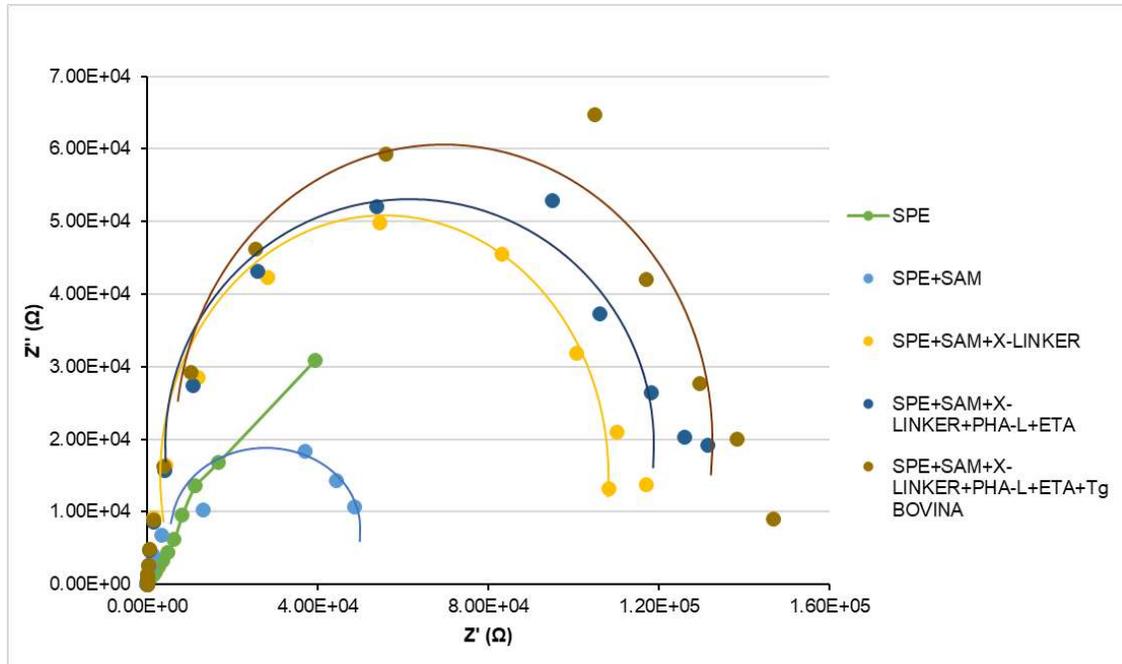
### 4.3. CARACTERIZACIÓN DEL BIOSENSOR

#### 4.3.1. MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DEL BIOSENSOR: EIS Y CV

Como parte del monitoreo de las modificaciones hechas a la superficie del biosensor, se realizaron mediciones utilizando las técnicas electroquímicas EIS y CV (procedimiento y especificaciones descritas en el Capítulo 3, apartado 3.6).

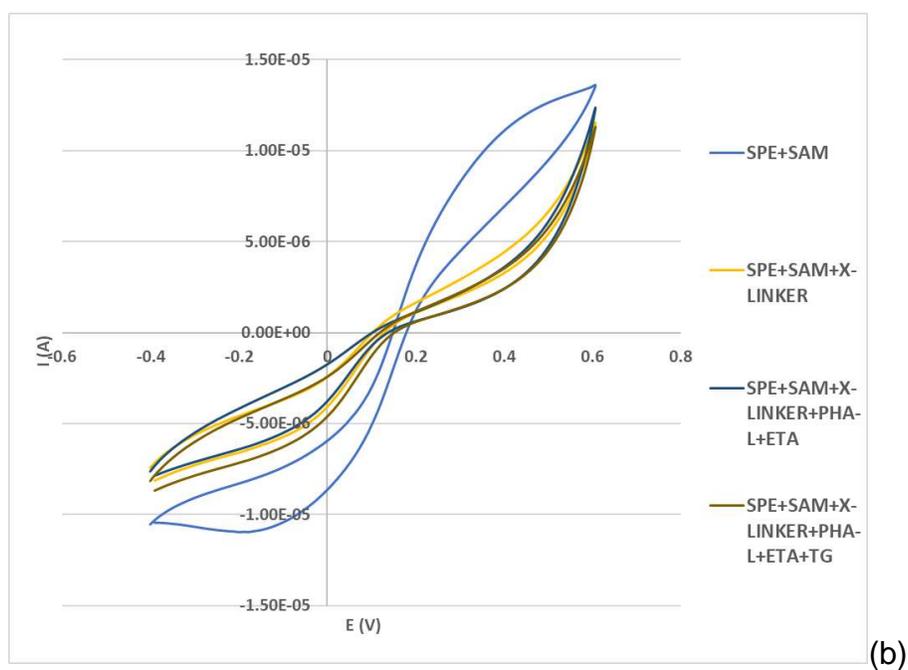
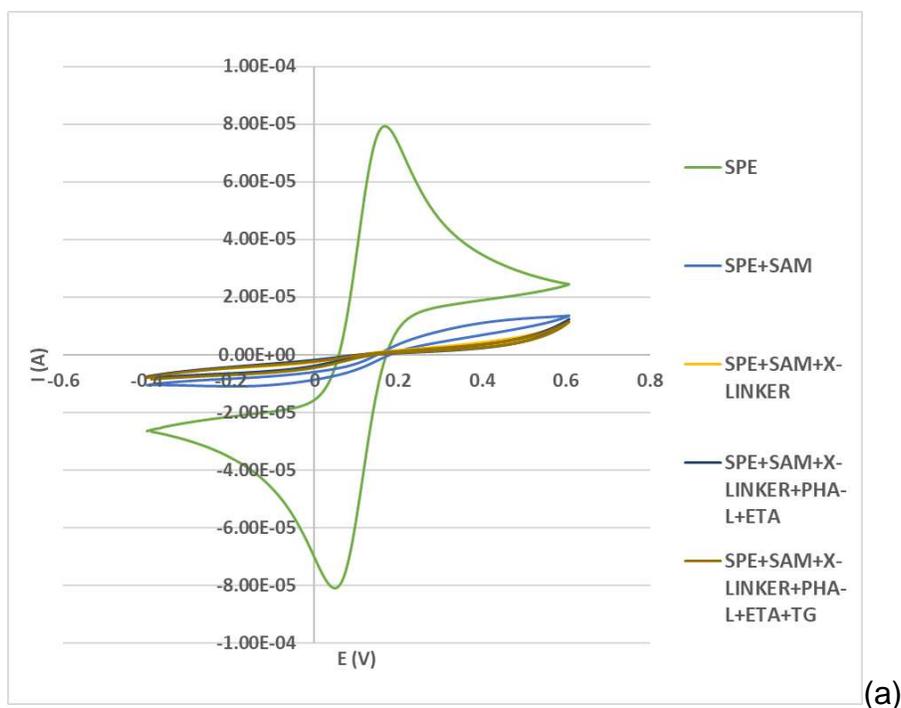
El objetivo fue observar, mediante el diagrama de *Nyquist* (FIGURA 4.8) y el voltamperograma cíclico (FIGURA 4.9), las modificaciones realizadas sobre la superficie del electrodo de oro (SPE-Au) en cada etapa de construcción optimizada:

- Electrodo sin modificar (SPE).
- Electrodo modificado con la SAM (SPE + SAM).
- Electrodo con la SAM activada mediante la adición del *cross-linker* (SPE + SAM + X-LINKER).
- Electrodo con la SAM activada mediante la cual se inmoviliza la lectina de PHA-L, y bloqueo con ETA de los grupos carboxilo sin reaccionar (SPE + SAM + X-LINKER + PHA-L + ETA).
- Electrodo modificado e incubado con Tg bovina: formación del complejo PHA-L-Tg bovina (SPE + SAM + X-LINKER + PHA-L + ETA + Tg BOVINA).



**FIGURA 4.8.** Diagramas de *Nyquist* donde se muestra la respuesta del biosensor después de cada etapa de modificación.

En el diagrama de *Nyquist* puede observarse cómo el efecto impedimétrico de las capas depositadas sobre la superficie del biosensor va incrementando, dificultando el paso de la sonda redox hacia el electrodo de trabajo para llevar a cabo el proceso de óxido-reducción. El SPE no modificado evidencia un comportamiento en que el proceso redox es limitado por difusión, mientras que después de la formación de la SAM el electrodo adquiere un comportamiento resistivo, en que el proceso redox es limitado por la transferencia de electrones hacia la superficie del electrodo.

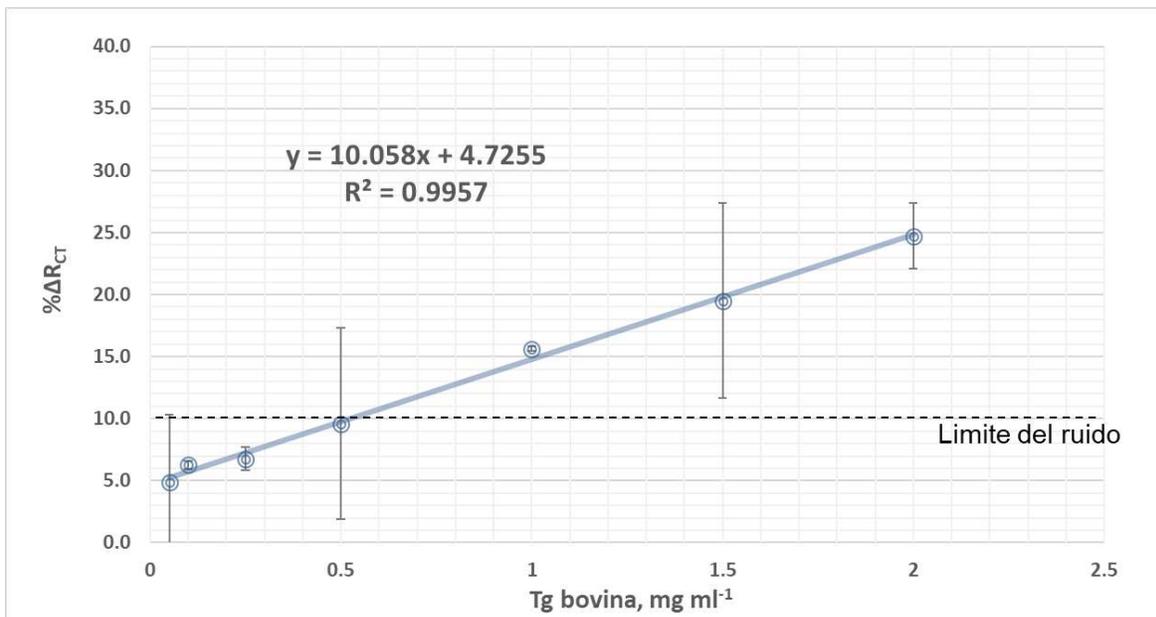


**FIGURA 4.9.** (a) Voltamperograma cíclico mediante el cual se aprecia el comportamiento redox de la sonda después de cada etapa de modificación realizada sobre la superficie del SPE-Au, y (b) la amplificación para mejor observación de los voltamogramas.

En el voltamperograma pueden apreciarse tanto el pico de oxidación como el de reducción cuando el SPE se encuentra sin modificar. Sin embargo, al comenzar la construcción, ambos picos desaparecen debido a la pasivación/modificación de la superficie del electrodo con la adición de cada uno de los reactivos empleados, confirmando la formación de las capas de interés para el proyecto.

#### 4.3.2. CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DEL BIOSENSOR

La caracterización analítica se realizó tomando en cuenta las especificaciones obtenidas de la optimización de la construcción del biosensor de PHA-L, evaluando su respuesta a diferentes concentraciones de Tg bovina de 0.05 a 2.0 mg ml<sup>-1</sup>, obteniendo una ecuación de regresión lineal de  $y = 10.058x + 4.7255$  y un coeficiente de correlación de 0.9957 ( $n=2$ , 7 puntos de concentración) (FIGURA 4.10). Los límites de detección y cuantificación se calcularon de acuerdo con lo establecido por la IUPAC [24], donde los resultados fueron 0.6947 mg ml<sup>-1</sup> y 1.2193 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente, de Tg bovina.

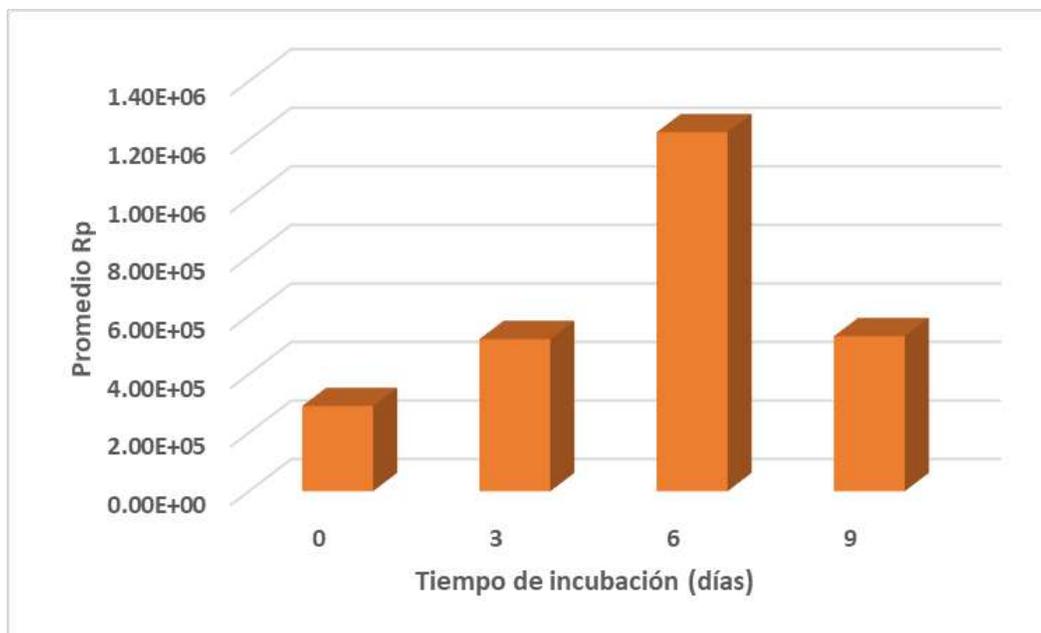


**FIGURA 4.10.** Curva de calibración para el biosensor de PHA-L incubado soluciones de Tg bovina, ecuación de regresión y su coeficiente de correlación. Cada concentración fue medida en duplicado, con dos biosensores independientes.

### 4.3.3. ESTABILIDAD DEL BIOSENSOR EN EL ALMACENAMIENTO

Para los ensayos de estabilidad en el almacenamiento, se construyó un lote de ocho biosensores (cuatro pares) bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se utilizaron dos (primer par) en el mismo día de construcción y se almacenaron tres pares por inmersión en PBS 1x a 4 °C, realizando mediciones a cada determinado periodo de tiempo (FIGURA 4.11). El objetivo fue evaluar por EIS la estabilidad de la superficie del biosensor modificado con el paso del tiempo y el efecto de la exposición constante de las capas proteicas a la solución tampón de PBS 1x.

Las mediciones de EIS se realizaron haciendo un solo barrido de frecuencias, en presencia de la sonda redox, obteniéndose valores absolutos de resistencia a la polarización o  $R_p$ . Cabe mencionar que, de acuerdo con la forma del espectro de impedancia que se observó en los diagramas de *Nyquist*, el valor de  $R_p$  es el mismo que la resistencia a la transferencia de carga o  $R_{CT}$ , el cual se estima en el eje de impedancia real extrapolando la tendencia de impedancia a los valores de las frecuencias más bajas [25], como se ha descrito con anterioridad.



**FIGURA 4.11.** Evaluación de la estabilidad del biosensor a diferentes tiempos de almacenamiento por inmersión en solución PBS 1x a 4°C.

Tal como se aprecia en la FIGURA 4.11, el menor valor promedio obtenido de  $R_p$  fue en el día 0, es decir, cuando la medición se efectuó justo al terminar la construcción del biosensor. Para los días 3, 6 y 9 los valores fueron mayores respecto al día 0 como consecuencia de un incremento impedimétrico en la superficie modificada del electrodo, esto por un reacomodo estructural de los componentes inmovilizados (interacciones entre las mismas unidades de la lectina y con el resto de los reactivos) y la diferencia del gradiente de concentración salina entre las capas del biosensor y la disolución tampón. Sin embargo, la única forma en la que se podrían evitar resultados falsos-positivos, relacionados con la incubación, es evaluando el biosensor con controles paralelos, es decir, probarlos bajo las mismas condiciones, aunque seguiría siendo propenso a afectaciones en la señal por el alto ruido experimental [26]. Tomando en cuenta lo anterior y para efectos prácticos del proyecto (referente al tiempo de construcción y evaluación del dispositivo), se decidió realizar la medición el mismo día de la construcción (día 0).

#### 4.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS

##### 4.4.1. DEFINICIÓN DEL FACTOR DE DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS PROCESADAS

Se realizaron ensayos para determinar la dilución bajo la cual se llevarían a cabo los análisis de las muestras, de forma que no hubiese interferencia de las proteínas más abundantes del suero sanguíneo. Para ello, se construyeron biosensores (bajo condiciones optimizadas) que se probaron con diferentes diluciones de la muestra control procesada (eluido de CPLL) en PBS 1x (TABLA 4.7), con el objetivo de seleccionar aquella donde el biosensor no presentara respuesta  $\geq 10\%$  (nivel de ruido).

TABLA 4.7. Diluciones testadas de la muestra control procesada y resultados obtenidos.

<b>Dilución: 1: x; x =</b>	<b>Promedio %<math>\Delta R_{CT}</math> (n= 2)</b>	<b>Desviación estándar</b>
20	112.93	8.87
40	110.37	-
60	27.21	7.82
80	23.70	8.18
100	~0	-
120	~0	-

De las diluciones evaluadas, se optó por utilizar la correspondiente a 1:100 debido a que el % $\Delta R_{CT}$  fue prácticamente 0, mostrando selectividad por parte del biosensor al no tener respuesta con alguna de las proteínas séricas presentes en la matriz, por lo que, al evaluar las muestras oncológicas bajo las mismas condiciones, la respuesta obtenida sería únicamente debida a las estructuras de los glicanos de interés. Se descartó la dilución 1:120 con la misma respuesta en el % $\Delta R_{CT}$  para evitar diluir de más la muestra, pudiendo comprometer la disponibilidad del analito en el medio y la sensibilidad en la cuantificación. Por ello se debió seleccionar un adecuado factor de dilución que permitirá discriminar entre los interferentes, ya que de lo contrario se podrían obtener resultados falsos-positivos.

#### 4.4.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS PROCESADAS USANDO EL BIOSENSOR DE LECTINA

Como consecuencia de la falta de un reactivo, el cual no se encuentra disponible con el fabricante en los próximos meses, no fue posible analizar las muestras séricas de pacientes con carcinomas. Sin embargo, se realizarán los ensayos pertinentes cuando se lleva a cabo la recepción del reactivo en falta.

#### 4.5. REFERENCIAS

- [1] Scouten W.H., Luong J.H.T, Brown R.S. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends Biotechnol.* (1995), 13, 5, 178-185.
- [2] Gooding J.J., Mearns F., Yang W., Liu J. Self-Assembled Monolayers into the 21st Century: Recent Advances and Applications. *Electroanalysis* (2003), 15, 2, 81-96.
- [3] Hushegyi A., Tkac J. Are glycan biosensors an alternative to glycan microarrays?. *Anal. Methods* (2014), 6, 17, 6610-6620.
- [4] Berg J. M., Stryer L., Tymoczko J. L. *Biochemistry*. 6a Ed. Reverté, España (2007). pp 316-318.
- [5] Belický S., Katrlík J., Tkác J. Glycan and lectin biosensors. *Essays Biochem.* (2016), 60, 1, 37-47.
- [6] Taşaltın C., Gürol I., Duran H., Uludağ Y., Sezer U.A., Taşdemir Z., Başarır F. Hybrid Organic – Inorganic Interfaces: Towards Advances Functional Materials – Capitulo 14: Interface Engineering with Self-Assembled Monolayers in Biosensors. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Turquía (2018). pp .639.
- [7] Pihíková D., Kasák P., Tkac J. Glycoprofiling of cancer biomarkers: Label-free electrochemical lectin-based biosensors. *Open Chem.* (2015), 13, 1, 636-655.
- [8] Liu L., Deng D., Xing Y., Li S., Yuan B., Chen J., Xia N. Activity análisis of the carbodiimide-mediated amine coupling reaction on self-assembled monolayers by cyclic voltammetry. *Electrochim. Acta.* (2013), 89, 616-622.
- [9] Frederix F., Bonroy K., Reekmans G., Laureyn W., Campitelli A., Abramov M.A., Dehaen W., Maes G. Reduced nonspecific adsorption on covalently immobilized surfaces using poly(ethylene oxide) containing blocking agents. *J Biochem. Biophys. Methods* (2004), 58, 67-74.
- [10] Zeng X., Andrade C.A.S., Oliveira M.D.L., Sun X.-L. Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. *Anal. Bioanal. Chem.* (2012), 402, 3161-3176.

- [11] Yang J. Siriwardena A., Boukherroub R., Ozanam F., Szunerits S., Gouget-L. A. C. A quantitative method to discriminate between non-specific and specific lectin-glycan interactions on silion-modified surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* (2016), 464, 198-205.
- [12] Trzeciakiewicz H., Esteves V. J., Soudy R., Kaur K., Martic M. S. Electrochemical Characterization of Protein Adsorption onto YNGRT-Au and VLGXE-Au Surfaces. *Sensors* (2015), 15, 19429-19442.
- [13] Zheng M., Davidson F., Huang X. Ethylene Glycol Monolayer Protected Nanoparticles for Eliminating Nonspecific Binding with Biological Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* (2003), 125, 7790-7791.
- [14] Hamming L.M., Messersmith P.B. Fouling Resistant Biomimetic Poly(Ethylene Glycol Based Grafted Polymer Coatings. *Material Matters* (Sigma-Aldrich). (2008), 3.3, 52, 1-5.
- [15] Emr S A., Yacynych A. Use of Polymer Films in Amperometric Biosensors. *Electroanalysis* (1995), 7, 10, 913-923.
- [16] Ma X., Su Y., Sun Q., Wang Y., Jiang Z. Enhancing the antifouling property of polyethersulfone ultrafiltration membranes through surface adsorption-crosslinking of poly(vinyl alcohol). *J. Membrane Sci.* (2007), 300, 71-78.
- [17] Silva M.L.S. Rangel M.G.H. A *Vicia villosa* agglutinin biosensor for cancer-associated Tn antigen. *Sens. Actuators B* (2017), 252, 777-784.
- [18] Sigma-Aldrich. Product information. Albumin from bovine serum / Mucin from bovine submaxillary glands. (2019). Estados Unidos de América. pp. 1-2; 1.
- [19] Varki A., Cummings R.D., Esko J.D. *Essentials of Glycobiology*. 3a edición. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; (2015-2017). Capítulo 9. pp 1-19.
- [20] Champion B., Léger D., Wieruszeski J.-M., Montreuil J., Spik G. Presence of fucosylated triantennary, tetraantennary and pentaantennary glycans in transferrin synthesized by the human hepatocarcinoma cel line Hep G2. *Eur. J. Biochem.* (1989), 184, 405-413.

[21] New England BioLabs® Inc. Fetuin. Última actualización: 2019. Consultado el 9 de noviembre de 2019. Disponible en:

<https://www.neb.com/products/p6042fetuin#Product%20Information>.

[22] Pagana K. D., Pagana T. J. MOSBY'S – Manual of Diagnostic and Laboratory Tests. 6a edición. Elsevier. 2018. Canadá. pp. 129.

[23] Zhang J., Zhang R., Wang Y., Li H., Han Q., Wu Y., Wang T., Liu F. The Level of Serum Albumin Is Associated with Renal Prognosis in Patients with Diabetic Nephropathy. *J. Diabetes Res.* (2019), 2019, 1-9.

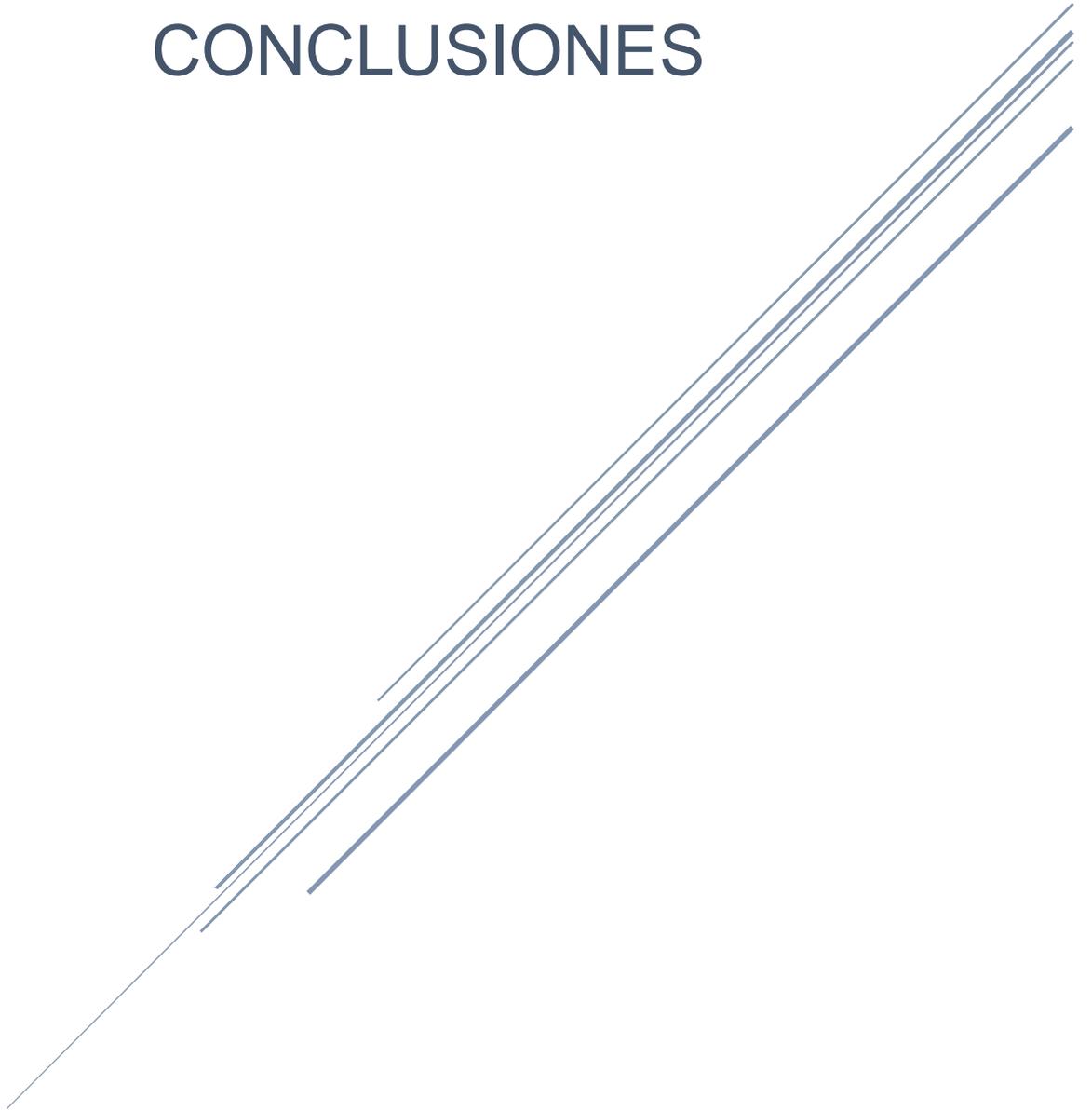
[24] Currie L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure Appl. Chem.* (1995), 67, 10, 1699-1723.

[25] Fedrizzi L., Ciaghi L., Bonora L. Corrosion behavior of electrogalvanized steel in sodium chloride and ammonium sulphate solutions; a study by E.I.S. *J. Appl. Electrochem.* (1992), 22, 247-254.

[26] Bogomolova A., Komarova E., Reber K., Gerasimov T., Yavuz O., Bhatt S., Aldissi M. Challenges of Electrochemical Impedance Spectroscopy in Protein Biosensing. *Anal. Chem.* (2009), 81, 3944-3949.

# CAPÍTULO 5

## CONCLUSIONES



## 5.1 CONCLUSIONES

Se pudo llevar a cabo la construcción y optimización del biosensor de PHA-L con afinidad selectiva a estructuras aberrantes de *N*-glicanos asociados a cáncer (específicamente con ramificación  $\beta$ 1-6 aumentada). Esta selectividad ha sido estudiada y evaluada por diversos métodos analíticos. Sin embargo, de acuerdo con la búsqueda bibliográfica realizada, este es el primer biosensor impedimétrico de PHA-L desarrollado para la detección de estos glicanos.

El procedimiento de construcción es relativamente simple debido a que no es necesaria la intervención de equipos especializados para llevarla a cabo, además de que se puede realizar en cualquier laboratorio químico-biológico. El consumo de volúmenes de reactivos y analito es mínimo, lo que se traduce en menores costos de producción y baja generación de residuos. Al ser un dispositivo de tamaño pequeño, puede ser transportado con facilidad y, en caso necesario, presenta la ventaja de poder ser almacenado a temperaturas de refrigeración, manteniendo su estabilidad.

La consecutiva modificación de la superficie del electrodo provocó un aumento en la impedancia dado que las capas se van superponiendo, tal como esperado. Este comportamiento se pudo observar con EIS y con CV.

La técnica de EIS demostró ser eficiente y sensible, dando un resultado congruente en el seguimiento realizado por esta técnica en cada una de las etapas de construcción (a mayor densidad en las modificaciones realizadas, mayor comportamiento impedimétrico de la superficie), sin la necesidad de la marcación (*labeling*) del analito.

El biosensor presentó la actividad esperada que se confirmó desde los primeros análisis realizados, donde el aumento de la impedancia se correlacionó con la concentración de la glicoproteína modelo positivo incubada (Tg-bovina, con presencia de las estructuras analito) para la cantidad de PHA-L inmovilizada ya que, al aumentar la concentración de la glicoproteína modelo positivo, el número de complejos PHA-L-glicoproteína formados también aumentó.

Fue demostrado que había una relación directamente proporcional entre la concentración de Tg bovina y el  $\% \Delta R_{CT}$  en el intervalo de 0.05 a 2.0 mg ml<sup>-1</sup>, pero este

intervalo de respuesta lineal es solamente indicativo, ya que para diferentes glicoproteínas con ramificación  $\beta$ 1-6 aumentada los intervalos lineales serán diferentes porque dependen del grado de *N*-glicosilación de la proteína. Además, en el suero sanguíneo de un paciente con un carcinoma, existe una gran diversidad de glicoproteínas que presentan *N*-glicanos con ramificación  $\beta$ 1-6 aumentada, y el biosensor no detectará individualmente cada glicoproteína aberrante sino la suma de todas las ramificaciones  $\beta$ 1-6 presentes, independientemente de las glicoproteínas a las cuales están unidas.

Fue posible constatar que la concentración/cantidad en exceso de reactivos funge como interferente en el correcto desempeño y respuesta del dispositivo debido a que puede ocasionar que se lleven a cabo interacciones no deseadas entre los mismos componentes de las capas de modificación de la superficie, así como la saturación de esta, como consecuencia del efecto de impedimento estérico que ejercen las estructuras vecinas de glicanos y su unión con lectinas en las interacciones glicano-proteína, por ejemplo.

Como esperado, la selectividad de la PHA-L (y de las lectinas en general) no es completamente específica, ya que la lectina reconoce más de una estructura de glicanos, pero se verificó que el biosensor presentaba capacidad de discriminación entre *N*-glicanos normales y *N*-glicanos aberrantes, como fue evidente al no generar una respuesta  $\geq 10\%$  de  $\Delta R_{CT}$  para el CEA de células normales.

Una limitación a considerar es el pre-tratamiento de las muestras séricas debido a que dificultaría el análisis *point-of-care* (junto al paciente). Sin embargo, se ha demostrado que el pre-tratamiento con CPLL es un procedimiento efectivo que evita interferencias de la matriz al momento de analizar biomarcadores poco abundantes.

Otra limitación del biosensor desarrollado es su estabilidad durante el almacenamiento, llevando a concluir que el biosensor debe ser utilizado en el mismo día de su construcción.

Por motivos ajenos faltó realizar el análisis de muestras de los pacientes con carcinomas para validar el funcionamiento y utilidad del biosensor desarrollado, pero se hará la validación próximamente.

