

Desarrollo de un biosensor electroquímico basado en aptámeros para la detección del PSA y su isoforma p2PSA.

Wilfredo Valdivieso-Quintero¹, José Luis Roperro-Vega²

PRESENTACIÓN

El antígeno específico de próstata (PSA) es el biomarcador más utilizado para el tamizaje del cáncer de próstata (CP) en todo el mundo. Sin embargo, dista de ser un marcador ideal por lo que se ha estudiado la contribución de algunas de sus isoformas. Aunque existe una amplia variedad de técnicas analíticas que permiten su detección y cuantificación de forma sensible, actualmente se está buscando la implementación de sistemas portables que faciliten su uso por parte del personal de salud y permitan ampliar el acceso a un mayor número de personas. Como alternativa, se ha estudiado la articulación entre los complejos aptámero-PSA y sistemas electroquímicos que favorecen el diseño de dispositivos portables. Esta aproximación ofrece nuevos retos como el diseño de un sistema transductor de señales que permita la detección sensible y específica de las proteínas de interés.

RESUMEN

La cuantificación del PSA ha permitido la reducción de la mortalidad por CP entre un 20 y 30% solo en el continente americano. Sin embargo, existen escenarios clínicos en donde este biomarcador no permite la distinción entre estados patológicos o fisiológicos. En consecuencia, se han desarrollado estudios encaminados a aumentar la capacidad diagnóstica y pronóstica de este biomarcador desde dos frentes: el estudio de la biología y fisiología del PSA y el desarrollo de sistemas de detección portables. Se ha estudiado un amplio espectro de isoformas del PSA siendo una de las más promisorias el p2PSA, que permite mejorar la predicción de desarrollar CP. Por su parte, el estudio de sistemas portables ha llevado a la articulación de sistemas de reconocimiento más estables (como los

aptámeros), con dispositivos basados en electrodos que ofrecen una gran diversidad de configuraciones. Aunque se cuenta con múltiples estudios publicados a la fecha, se pueden identificar los siguientes escenarios de mejora:

El diseño de aptámeros no ha sido enfocado en el reconocimiento de isoformas del PSA, son diseñados para reconocer PSA recombinante o no han sido retados con muestras de suero para identificar reacciones inespecíficas.

El sistema compuesto por el electrodo de trabajo, electrodo de referencia y contra electrodo no están articulados en un único dispositivo lo que puede dificultar su adaptación a sistemas portables.

Aunque existe una amplia variedad de combinaciones de nano materiales y potenciadores de señal para establecer el sistema transductor muchos de estos sistemas resultan complejos, de alto costo o difícilmente extrapolables a un dispositivo portable.

Pregunta de investigación: ¿Cómo articular un sistema transductor electroquímico y un elemento de reconocimiento tipo aptámero en un dispositivo potencialmente portable que permita la detección del PSA y su isoforma p2PSA?

Objetivo general: Desarrollar un sistema electroquímico para la detección del PSA y el p2PSA utilizando aptámeros como elementos de reconocimiento.

Metodología propuesta: Se desarrollará en tres grandes etapas: i) desarrollo del aptámero para reconocimiento del PSA y p2PSA, ii) articulación del sistema transductor e iii) identificación de interferencias y límite de detección del dispositivo utilizando muestras de suero comerciales. Para la primera etapa se estudiarán secuencias de aptámeros reportadas previamente y con ellas se construirá una biblioteca de secuencias que será retada con muestras de suero y proteínas de interés para obtener aptámeros específicos. Se evaluará la constante de disociación (K_d) de los aptámeros obtenidos para seleccionar aquellos con mayor capacidad de unión. En paralelo, se evaluarán tres sistemas transductores articulados sobre electrodos serigrafados utilizando combinaciones

¹ Estudiante doctorado en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia. wilfredo.valdivieso@udea.edu.co

² Tutor. Profesor Investigador Universidad de Santander. Jose.roperro@udes.edu.co

Financiación: Minciencias, contrato 596-2018.

de óxido de grafeno (OG), nafión y azul de metileno. Cada sistema será evaluado por espectroscopía de impedancia (EI), voltamperometría cíclica (VC) y voltamperometría de onda cuadrada (VOC) utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como cupla redox. Finalmente se integrarán los aptámeros con mejor K_d con el sistema transductor que presente la mejor resolución de señales. El dispositivo resultante se retará frente a sueros comerciales para identificar y corregir posibles interferencias en la señal y evaluar su potencial como dispositivo diagnóstico.

RESULTADOS OBTENIDOS Y ESPERADOS:

Se han diseñado cinco bibliotecas para obtener aptámeros utilizando SELEX. Una de estas bibliotecas se evaluó por qPCR, pero no se obtuvo amplificación. Se probará una segunda biblioteca mejorando los parámetros de secuencia que faciliten su amplificación por qPCR tratando de no afectar la estructura base del aptámero.

Se observó variabilidad en la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) de los electrodos sin modificar. Se estudio la electrodeposición de oro por VC y cronamperometría (CA) y el anclaje de un aptámero modelo sobre el electrodo modificado con oro observándose un aumento en el paso de corriente por VC y VOC.

BIBLIOGRAFIA

1. Salud OP de la. Expertos regionales discuten enfoques para el tamizaje y detección temprana del cáncer de próstata en las Américas [Internet]. 2017 [cited 2020 Oct 12]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13818:regional-experts-discuss-approaches-for-prostate-cancer-screening-and-early-detection-in-the-americas&Itemid=42459&lang=es
2. Bassler TJ, Orozco R, Bassler IC, O'Dowd GJ, Stamey TA. Most prostate cancers missed by raising the upper limit of normal prostate-specific antigen for men in their sixties are clinically significant. *Urology*. 1998;52(6):1064–9.
3. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003;21(2):383–91.
4. Végvári Á, Rezeli M, Sihlbom C, Häkkinen J, Carlsson E, Malm J, et al. Molecular microheterogeneity

of prostate specific antigen in seminal fluid by mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2012;45(4–5):331–8.

5. Wang G, Zhao D, Spring DJ, Depinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. :1105–40.
6. Savory N, Abe K, Sode K, Ikebukuro K. Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2010;26(4):1386–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.057>
7. Svobodova M, Bunka DHJ, Nadal P, Stockley PG, O'Sullivan CK. Selection of 2'F-modified RNA aptamers against prostate-specific antigen and their evaluation for diagnostic and therapeutic applications. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(28):9149–57.
8. Díaz-Fernández A, Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Rodríguez EF, Lobo-Castañón MJ. Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer. *Biosens Bioelectron*. 2019;128(December 2018):83–90.
9. Najeeb MA, Ahmad Z, Shakoor RA, Mohamed AMA, Kahraman R. A novel classification of prostate specific antigen (PSA) biosensors based on transducing elements. *Talanta*. 2017;168(February):52–61.
10. Sanchís-Bonet A, Barrionuevo-González M, Bajo-Chueca AM, Pulido-Fonseca L, Ortega-Polledo LE, Tamayo-Ruiz JC, et al. Validación del índice de salud prostática en un modelo predictivo de cáncer de próstata. *Actas Urol Esp* [Internet]. 2018;42(1):25–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2017.06.003>
11. Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG, Bangma C, et al. A Multi-Center Study of [–2] Pro-Prostate-Specific Antigen (PSA) in Combination with PSA and Free PSA for Prostate Cancer Detection in the 2.0 to 10.0 ng/mL PSA Range William. *J Urol*. 2011;23(1):1–7.
12. Jeong S, Han SR, Lee YJ, Lee SW. Selection of RNA aptamers specific to active prostate-specific antigen. *Biotechnol Lett*. 2010;32(3):379–85.
13. Zhao J, Ma Z. Ultrasensitive detection of prostate specific antigen by electrochemical aptasensor using enzyme-free recycling amplification via target-induced catalytic hairpin assembly. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2018;102(September 2017):316–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.044>

14. Xia N, Deng D, Zhang L, Yuan B, Jing M, Du J, et al. Sandwich-type electrochemical biosensor for glycoproteins detection based on dual-amplification of boronic acid-gold nanoparticles and dopamine-gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2013;43(1):155–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.020>
15. Díaz-Fernández A, Miranda-Castro R, de-Ios-Santos-Álvarez N, Rodríguez EF, Lobo-Castañón MJ. Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer. *Biosens Bioelectron*. 2019;128:83–90.
16. Ma W, Yin H, Xu L, Wu X, Kuang H, Wang L, et al. Ultra-sensitive aptamer-based SERS detection of PSAs by heterogeneous satellite nanoassembly. *Chem Commun* [Internet]. 2014;50(68):9737–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4CC03734K>