



Universidad de Oviedo

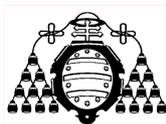
MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**MODIFICACIÓN DE APTÁMEROS ANTI-GLUTEN: EFECTO SOBRE
SUS CARACTERÍSTICAS DE ENLACE**

VIOLETA ISABEL GIL OCAÑA

Julio 2017, Oviedo



María Jesús Lobo Castañón, Profesora del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “Modificación de aptámeros anti-gluten: efecto sobre sus características de enlace”

ha sido realizado por el alumno Violeta Isabel Gil Ocaña bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2016-17, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 10 de Julio de 2017

Fdo: María Jesús Lobo Castañón

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Enfermedad celiaca y su relación con el gluten:	4
1.2. Legislación	7
1.3. Métodos actuales de detección de gluten	8
1.3.1. Ensayo inmunoenzimático ELISA	9
1.3.2. Métodos basados en la amplificación de ADN (PCR)	11
1.3.3. Western Blot.....	12
1.3.4. Espectrometría de masas.....	12
1.3.5. Tendencias en la detección del gluten	13
1.4. Aptámeros como receptores sintéticos del gluten	13
1.5. Ensayos electroquímicos basados en aptámeros	16
1.5.1. Soporte sólido.....	16
1.5.2. Medida electroquímica.....	17
1.5.2.1. Electrodo serigrafados	17
1.5.2.2. Cronoamperometría.....	18
2. OBJETIVOS	21
3. EXPERIMENTAL	23
3.1. Reactivos.....	24
3.2. Instrumentación	26
3.3. Procedimiento experimental:	27
3.3.1. Modificación de las partículas magnéticas:.....	27
3.3.1.1. Con péptido (33-mer):.....	27
3.3.1.2. Con proteína (PWG):.....	28
3.3.2. Ensayo de afinidad:	29
3.3.3. Detección:	30
3.3.4. Ensayo Bradford:.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Diseño de los aptámeros anti-gluten truncados.	34
4.2. Evaluación de la afinidad por el péptido 33-mer.	37
4.3. Evaluación de la afinidad por la proteína PWG.....	41
5. CONCLUSIONES	46
6. BIBLIOGRAFÍA.....	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad celiaca y su relación con el gluten:

La enfermedad asociada a la intolerancia al gluten es la celiaquía. Esta enfermedad celiaca (EC) es un proceso autoinmune desencadenado por una intolerancia permanente a las proteínas del gluten. Se presenta en individuos genéticamente predispuestos y cursa con una enteropatía grave de la mucosa del intestino delgado, lo que conlleva la mala absorción de nutrientes, tanto macro- como micronutrientes¹. La EC se manifiesta como un proceso inflamatorio crónico, un acortamiento progresivo de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las criptas e infiltración del epitelio por linfocitos, que eventualmente pueden experimentar una transformación maligna² (Figura 1).

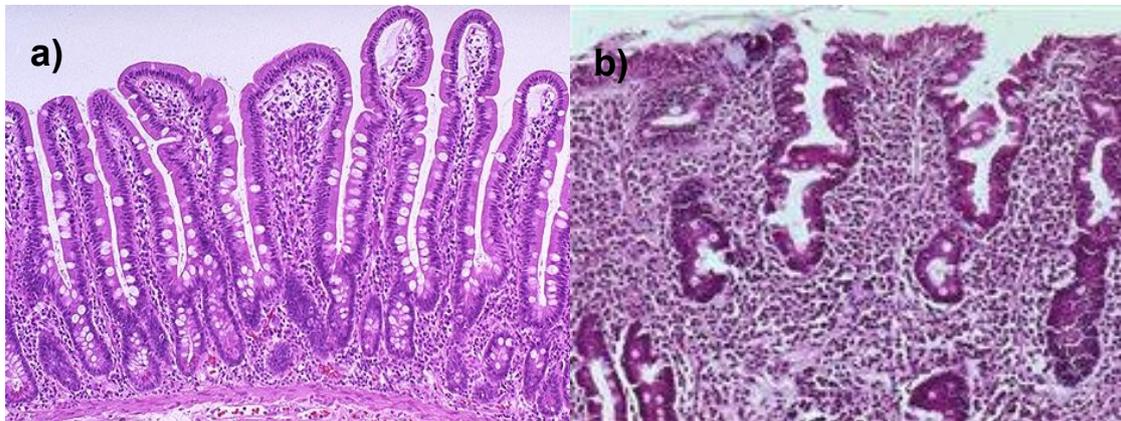


Figura 1. Corte histológico del intestino delgado normal (a) y uno afectado de celiaquía (b). Imagen sacada de www.gastrolab.com

El gluten, según el *Codex Alimentarius*, se define como la fracción proteica de reserva de trigo, cebada, centeno, avena y sus variedades híbridas y derivados, y que es insoluble en disoluciones acuosas y NaCl 0.5M³. Las distintas proteínas que componen esta fracción se clasifican en glutelinas y prolaminas, según el método de fraccionamiento de Osborne, introducido a principios del siglo XX, ya que esta enfermedad no empezó a ser conocida hasta finales del siglo XIX. Las glutelinas constituyen la fracción insoluble en disoluciones etanol-agua y las prolaminas la fracción soluble en disoluciones etanol-agua⁴. Además, según el cereal de procedencia, las prolaminas y glutelinas reciben un nombre específico como se indica en la Tabla 1. Aunque esta clasificación no es la única clasificación válida.

Tabla 1. Nombre específico según el cereal de procedencia de las prolaminas y glutelinas (fracciones de Osborne)

FRACCIÓN	GLUTEN	
	Prolaminas	Glutelinas
Trigo (<i>Triticum spp.</i>)	Gliadina	Glutenina
Centeno (<i>Secale cereale</i>)	Secalina	Secalinina
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Hordeína	Hordenina
Avena (<i>Avena spp.</i>)	Avenina	Avenalina

Las gliadinas son la fracción soluble en mezclas alcohol-agua del gluten de trigo y contienen la mayor parte de los componentes tóxicos para los celíacos. Son ricas en glutamina y prolina, lo que les confiere una mayor resistencia a la digestión en el tracto gastrointestinal que la de otros péptidos. La gliadina puede ser separada al menos en cuatro fracciones: α , β , γ , ω -gliadina.

La identificación inequívoca de la secuencia peptídica responsable de la enfermedad es difícil. Se ha demostrado que tras la ingesta de gliadina existen regiones sin digerir que son resistentes a la proteólisis enzimática gástrica, pancreática e intestinal. Entre los péptidos identificados como tóxicos se encuentra un fragmento de la α -gliadina compuesto por 33 aminoácidos (33-mer), cuya secuencia de aminoácidos es: LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF. Este péptido contiene seis epítomos para los linfocitos T^a y parece ser el más inmunógeno⁵.

Actualmente en España, la prevalencia de la celiaquía oscila entre 1/118 en la población infantil y 1/389 en la población adulta. Esta enfermedad puede presentarse a cualquier edad y el 31% de los pacientes mayores de 65 años aquejados de malabsorción intestinal son celíacos⁶. Además, hoy día se cree que un porcentaje importante de pacientes (75%) está sin diagnosticar debido, en su mayor parte, a que la EC durante años se ha relacionado exclusivamente con su forma clásica de presentación clínica.

^a Los linfocitos T son células del sistema inmunitario que se encargan de mediar la respuesta inmune celular.

Sin embargo, el reconocimiento de formas atípicas, combinado con la mayor y mejor utilización de las pruebas complementarias disponibles, ha permitido poner de manifiesto la existencia de diferentes tipos de EC:

- **Sintomática:** Los síntomas son muy diversos, pero todos los pacientes muestran una serología, histología y test genéticos compatibles con la EC.
- **Subclínica:** En este caso no existen síntomas ni signos, aunque sí son positivas el resto de las pruebas diagnósticas.
- **Latente:** Son pacientes celíacos que, en un momento determinado, consumiendo gluten, no tienen síntomas y la mucosa intestinal es normal. Existen dos variantes:
 - **Tipo A:** Fueron diagnosticados de EC en la infancia y se recuperaron por completo tras el inicio de la dieta sin gluten, permaneciendo en estado subclínico con dieta normal.
 - **Tipo B:** En este caso, con motivo de un estudio previo, se comprobó que la mucosa intestinal es normal, pero posteriormente desarrollan la enfermedad.
- **Potencial:** Estas personas nunca han presentado una biopsia compatible con la EC, pero, del mismo modo que los grupos anteriores, poseen una predisposición genética determinada por la positividad del HLA-DQ2/DQ8^b. Aunque la serología puede ser negativa, presentan un aumento en el número de linfocitos intraepiteliales. La probabilidad media de desarrollar una EC activa es del 13% y una EC latente del 50%

Mediante un examen clínico cuidadoso y una analítica de sangre que incluya los marcadores serológicos de enfermedad celíaca (anticuerpos anti-gliadina, anti-endomisio y anti-transglutaminasa tisular), se establece el diagnóstico de sospecha de la enfermedad. El conocimiento reciente de diferentes formas clínicas de enfermedad celíaca (clásica, atípica, silente, latente, potencial, etc.), ha venido a demostrar que no siempre se puede establecer un diagnóstico clínico o funcional de la enfermedad celíaca. Por ello, para el diagnóstico con certeza de la enfermedad celíaca, es imprescindible realizar una biopsia intestinal, la cual consiste en la extracción de una muestra de tejido del intestino delgado (sin haber retirado el gluten de la dieta) y su posterior análisis por un patólogo al microscopio. El tratamiento de la enfermedad una vez diagnosticada consiste en el seguimiento de una dieta estricta sin gluten durante

^b Serotipos DQ2 y DQ8 del antígeno leucocitario humano.

toda la vida. Esto conlleva una normalización clínica y funcional, así como la reparación de la lesión vellositaria intestinal⁷.

Actualmente, se están investigando distintas opciones terapéuticas basadas en el uso de inhibidores de la transglutaminasa tisular (tTG), autoantígeno de la EC, o en enzimas capaces de degradar los péptidos inmunotóxicos presentes en el gluten, pudiendo ser usadas tanto para la obtención de alimentos sin gluten como para administración oral y degradación *in vivo*⁸. Debido a esto, la determinación de gluten en los alimentos es de vital importancia, sobre todo en aquellos etiquetados y certificados como aptos para celíacos.

1.2. Legislación

Debido a que el único tratamiento efectivo contra la EC es la dieta libre de gluten de por vida, los alimentos preparados para el consumo exclusivo de celíacos contienen cereales considerados libres de gluten (arroz, maíz o soja) que de forma inherente no contienen las prolaminas inmunotóxicas. Pese a esto, es posible encontrar concentraciones de gluten apreciables en dichos alimentos debido al cultivo conjunto de cereales, que provoca así la “contaminación cruzada” por contacto durante la cosecha, la molienda o mediante la manipulación del producto final. Por este motivo, es necesario un control sobre la presencia de esta proteína en los alimentos certificados como “sin gluten”⁹. En España (Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios) y en la Unión Europea, la legislación sobre el etiquetado de alimentos obliga al fabricante a indicar en la etiqueta de los alimentos envasados si lo contienen. Además, el Reglamento (CE) nº 41/2009 de la Comisión de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios aptos para personas con intolerancia al gluten, aplicable a partir del 1 de enero de 2012, regula el empleo de las indicaciones “sin gluten” cuando el alimento o producto contenga menos de 20 mg/Kg (20 ppm) de gluten. Sin embargo, para productos donde se ha usado el almidón de trigo especialmente procesado para reducir el contenido de gluten, el fabricante podrá utilizar el término “muy bajo en gluten” si el producto contiene menos de 100 ppm de gluten¹⁰.

Igualmente, estos valores no son lo suficientemente seguros para algunos pacientes, ya que el umbral de inocuidad para los pacientes celíacos es incierto. Debido a esto, en España, la FACE (Federación de Asociaciones de Celíacos de España) establece como límite crítico un nivel de 10 ppm de gluten¹¹ (Figura 2). Este valor puede disminuir según las técnicas de análisis vayan avanzando, ya que, actualmente, los métodos de análisis

no presentan la sensibilidad necesaria para poder disminuir los límites de cuantificación muy cercanos a estos valores.



Figura 2. Distintivo usado por la FACE para reconocer los alimentos con un nivel máximo de 10 ppm. Imagen sacada de www.FACE.com

1.3. Métodos actuales de detección de gluten

La detección del gluten es una tarea complicada, ya que la especie a detectar es en realidad una mezcla compleja de distintas proteínas, con distinto tamaño y composición en aminoácidos, en las que se identifican varias regiones inmunotóxicas que además afectan de manera distinta a las personas susceptibles. Hasta no hace mucho se pensaba que únicamente las prolaminas (proteínas monoméricas ricas en aminoácidos prolina (P) y glutamina (Q)) eran inmunotóxicas, pero estudios recientes indican que también las glutelinas están implicadas¹². Además, durante el proceso de digestión, dichas proteínas son hidrolizadas de forma diferente dando lugar a péptidos de longitudes y secuencias variables. Debido a ello no se mantienen constantes los lugares de reconocimiento por los anticuerpos, siendo estos igualmente tóxicos y dificultando la cuantificación de prolaminas en muestras hidrolizadas.

Cabe destacar también que la extracción de gluten de muestras de alimentos es una de las etapas críticas del proceso de cuantificación, ya que durante la elaboración de los alimentos, estos se someten a diversos tratamientos y procesos que pueden dar lugar a la modificación de la estructura del gluten, lo que se añade a la dificultad que plantea la heterogeneidad de la matriz de los alimentos.

El método tradicional de extracción del gluten consiste en la utilización de una mezcla etanol-agua (60%-40%). Sin embargo, este método presenta un rendimiento bajo especialmente en alimentos que han sufrido algún tratamiento con calor. Se puede mejorar la eficiencia del proceso añadiendo a la muestra antes de la extracción definitiva

en etanol sustancias reductoras y desnaturalizantes para solubilizar los agregados de gluten producidos por el calentamiento. Esta disolución que contiene estas sustancias se ha patentado en España con el nombre de *COCKTAIL* de extracción de gluten¹³ (patente ES2182698).

Por otro lado, otro inconveniente es la falta de un estándar representativo de gluten, ya que su cuantificación se realiza mediante la medida de una señal experimental que debe compararse con la señal obtenida en iguales circunstancias con un patrón de referencia de concentración conocida (calibración). De hecho, se ha descrito que el valor de gluten informado para una determinada muestra depende de la gliadina utilizada como patrón en la calibración¹⁴. Por eso existe una necesidad urgente de desarrollar un estándar de gliadinas. La gliadina europea desarrollada hasta el momento, Prolamin Working Group-gliadin (PWG- gliadin), la cual consiste en gliadina liofilizada, aislada y obtenida de una mezcla de harinas de distintas variedades europeas de trigo, se utiliza como material de referencia, aunque esta no ha sido certificada todavía porque el Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (IRMM) considera que esta gliadina no reúne las condiciones óptimas para su certificación¹⁴.

A continuación, se detallan los métodos desarrollados actualmente para la cuantificación de gluten en alimentos.

1.3.1. Ensayo inmunoenzimático ELISA

Como se ha comentado en el punto anterior, el péptido 33-mer es el indicador primario de la respuesta inflamatoria de la enfermedad celiaca. Debido a esto, se ha utilizado como molécula diana para obtener uno de los anticuerpos contra el gluten que ha servido para desarrollar métodos de análisis inmunoquímicos, como el ensayo inmunoenzimático ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay); además, como se comentará más adelante se han descrito anticuerpos obtenidos utilizando como inmunógenos otras fracciones proteicas del gluten.

El ensayo ELISA está basado en el principio inmunológico del reconocimiento y unión de los anticuerpos a las moléculas que reconocen como extrañas (antígenos). En este ensayo se produce la unión anticuerpo-antígeno sobre una superficie a la que previamente se ha unido una de las dos partes. Alguno de los componentes del ensayo se encuentra unido a una enzima que cataliza la formación de un producto, que podrá ser cuantificado mediante la medida de alguna propiedad físico-química del mismo.

Existen distintos tipos de ensayos ELISA, siendo los más utilizados en la detección de gluten los ensayos tipo sándwich y los ensayos competitivos.

En el ELISA tipo sándwich se utilizan dos anticuerpos: el anticuerpo primario inmovilizado y el anticuerpo secundario o de detección, unido a la enzima. En este ensayo se establece la unión directa del gluten a los dos anticuerpos, quedando el antígeno capturado entre ambos, por lo que este ensayo requiere dos sitios de unión distintos (anticuerpo primario y secundario) o más de un sitio de unión idéntico (anticuerpo primario y secundario iguales)¹⁴.

En el ELISA competitivo se incuba la muestra con el anticuerpo anti-antígeno, de manera que el anticuerpo sea un reactivo limitante, para posteriormente añadir dicho preparado sobre una superficie que contiene dicho antígeno inmovilizado. De esta forma se establece una competencia entre el antígeno de la muestra y el inmovilizado por el anticuerpo específico. Finalmente se añade un segundo anticuerpo marcado que reconozca al anticuerpo anti-antígeno. En este caso se obtiene una curva de respuesta decreciente, es decir, cuanto menos antígeno en la muestra más señal se obtiene¹⁵.

Para la detección de gluten se han propuesto distintos anticuerpos y métodos de detección. Los primeros métodos inmunológicos de detección de gluten se desarrollaron en base a la obtención de anticuerpos policlonales frente al conjunto de prolaminas del trigo. Pero en 1991, Skerrit y Hill desarrollan el primer método basado en la obtención de un anticuerpo monoclonal frente a la fracción más termo-resistente de las gliadinas (ω -gliadinas). Este método fue considerado como primer método oficial de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Posteriormente se comprobó que el método presentaba una menor sensibilidad en comparación con nuevos métodos que utilizan anticuerpos diseñados frente a otras fracciones nocivas, debido a que las ω -gliadinas constituyen la fracción minoritaria de las prolaminas del gluten. Esto ha llevado a que este método esté en desuso¹⁶.

Actualmente, el único método validado por la AOAC para detección de gluten en alimentos y, que es considerado como método oficial por el *Codex Alimentarius*, es el ensayo ELISA tipo sándwich que utiliza el anticuerpo monoclonal R5, empleando el patrón de gliadina producido por Prolamin Working Group (PWG)^{17,18}, que es el único patrón disponible comercialmente. Este ensayo fue propuesto por el grupo del Dr. Méndez (CNB-CSIC, Madrid) y permite la detección de gluten de trigo, centeno y cebada incluso después del tratamiento de los alimentos con calor, previa extracción con la disolución *COCKTAIL*. *Sin embargo*, no es válido para la detección de gluten en avena. La sensibilidad aportada por este método es de 3 ppm de gluten, y su límite de cuantificación de 5 ppm. Por ello, este método es apropiado para el análisis de gluten en el intervalo de baja concentración de 20-200 ppm¹⁹. Las ventajas de este ensayo son

la rapidez y simplicidad en relación a la alta sensibilidad que ofrece. Además, no produce reacciones cruzadas frente a otras proteínas no tóxicas. Sin embargo, el principal inconveniente de esta metodología es producir falsos negativos cuando los alimentos están hidrolizados y/o altamente procesados debido a la fragmentación que sufre el gluten.

Recientemente, se ha desarrollado un método utilizando el anticuerpo monoclonal denominado G12, dirigido contra el péptido inmunotóxico 33-mer presente en la α 2-gliadina. Este anticuerpo presenta una elevada reactividad frente a las prolaminas presentes en trigo, cebada, centeno y algunos tipos de avena. El límite de detección obtenido para ensayos tipo sándwich y competitivo utilizando el anticuerpo G12 es de 0.6 ppm y 0.3 ppm, respectivamente. Este anticuerpo permite una mayor sensibilidad en el análisis y, en algunos casos, la cuantificación de aveninas, por lo que se presenta como un gran candidato para reemplazar al anticuerpo R5 como método de referencia en la cuantificación de gluten^{20,21}.

1.3.2. Métodos basados en la amplificación de ADN (PCR)

La PCR (Polymerase Chain Reaction), o reacción en cadena de la polimerasa, consiste en la obtención de múltiples copias de un fragmento específico de ADN, situado entre regiones de secuencia oligonucleotídica conocida, a partir de una muestra compleja de ADN. La amplificación de ese fragmento elegido permite realizar su detección y estudio posterior.

Este método es una alternativa a los métodos inmunológicos. La detección de gluten mediante esta técnica está basada en la amplificación del ADN responsable de la síntesis de las proteínas del gluten, proceso conocido como traducción, y que constituye uno de los pilares del funcionamiento de todos los seres vivos. Sin embargo, y a pesar de su alta selectividad y sensibilidad, en el análisis de alérgenos tiene una utilidad limitada debido a que no siempre el contenido de ADN está relacionado con la concentración de la proteína alergénica en alimentos. La relación proteína-ADN varía dependiendo del grado de expresión genética de distintos cultivos de cereales y del tipo de procesamiento sufrido por el alimento. Por todo esto, los métodos de análisis de alérgenos mediante ADN son siempre indirectos.

Dada la alta sensibilidad, uno de los puntos fuertes de esta técnica es el análisis de muestra donde hay presencia de gluten debido a contaminación cruzada.

Teniendo como inconvenientes, la necesidad de personal cualificado, además de ser una determinación indirecta y por tanto la imposibilidad de cuantificar²².

1.3.3. Western Blot

La técnica Western Blot es, al igual que los ELISA, un inmunoensayo diseñado para detectar proteínas en muestras complejas. La detección final de las proteínas se realiza mediante la unión de anticuerpos específicos anti-gluten unidos a enzimas, gracias a los cuales puede obtenerse una señal medible tras su unión al gluten.

Los procedimientos de Western Blot constan de varias etapas . En una primera etapa se separan las proteínas en función de su tamaño mediante una electroforesis en gel de acrilamida. A continuación, las proteínas separadas se transfieren electroforéticamente a una membrana, donde quedan inmovilizadas. Por último, se produce la unión específica de la proteína a los anticuerpos, siendo estos detectados gracias a la enzima unida a ellos. Los métodos de detección son muy variados.

Esta técnica es confirmatoria de los resultados de un ELISA cuando se detecta presencia de gluten. Además, con este método se tiene una alta selectividad y sensibilidad tanto para alimentos crudos como procesados. En cambio, es un método lento y requiere formación y especialización adecuada. Sirviendo este únicamente como método cualitativo^{22,14}.

1.3.4. Espectrometría de masas

En el campo de la proteómica se han desarrollado distintos métodos para cuantificar gluten nativo (MALDI-TOF-MS^c) o péptidos derivados del gluten (LC-ESI-MS^d), lo que permite el análisis de muestras hidrolizadas. Por ejemplo, se ha utilizado el sistema de reacción múltiple monitorizada (MRM) en la cuantificación de péptidos derivados del gluten en alimentos procesados que contienen harinas de trigo y cebada. El análisis de gluten mediante esta técnica se basa en la hidrólisis enzimática de las proteínas y la separación de las fracciones peptídicas resultantes, comparando los perfiles de las proteínas extraídas del alimento con los característicos de las diferentes prolaminas extraídas de estándares de cereales¹⁴.

^c Combina desorción/ionización láser asistida por una matriz (MALDI, de sus siglas en inglés) como técnica de ionización suave con un analizador de tiempo de vuelo (TOF)

^d Los péptidos se separan por Cromatografía de líquidos (LC) y a continuación se acopla la detección por espectrometría de masas (MS) empujando la técnica de ionización por Electrospray (ESI) para la producción de iones.

Sin embargo, a pesar de la rapidez y facilidad de manipulación de la muestra, reproducibilidad y precisión, presenta el inconveniente de que ninguno de estos métodos permite cuantificar el contenido total de gluten como dicta la legislación, sino la cuantificación en determinados péptidos. En general, estos métodos están más orientados hacia la caracterización de fragmentos inmunotóxicos. Teniendo en cuenta además el alto coste del equipamiento requerido esta técnica no es aplicable a análisis de rutina^{14,22}.

1.3.5. Tendencias en la detección del gluten

Hoy día se están desarrollando nuevas metodologías en la detección de gluten en alimentos basadas en biosensores, cuya ventaja principal es la posibilidad de automatizar la detección de gluten de una forma sencilla y rápida¹⁴. Una de las claves en el diseño de estos dispositivos es el acceso a receptores específicos, capaces de reconocer las proteínas alergénicas. En este contexto, una de las tendencias identificadas es el desarrollo de nuevos receptores para el gluten, entre los que se encuentran los aptámeros²³.

1.4. Aptámeros como receptores sintéticos del gluten

En el presente trabajo se propone como alternativa a los anticuerpos, tradicionalmente utilizados en el reconocimiento específico del gluten, los aptámeros. Un aptámero es una secuencia corta de ADN o ARN, que adopta una estructura tridimensional característica y es capaz de enlazar con elevada selectividad y afinidad a una molécula determinada, ya sea proteínas, carbohidratos, moléculas pequeñas, etc.

El proceso por el cual se obtienen los aptámeros se denomina SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Este método fue publicado por Tuerk y Gold²⁴, y Ellington y Szostak en 1990²⁵ de forma independiente. Inicialmente, se seleccionaron únicamente aptámeros de ARN partiendo de una biblioteca aleatoria de ácidos nucleicos y, posteriormente, se amplió la selección a aptámeros de ADN²⁶. Desde ese momento, el SELEX se convirtió en una herramienta en la investigación de nuevos medicamentos basados en estos receptores, así como de reactivos de afinidad para su aplicación en métodos de diagnóstico y análisis.

El proceso SELEX comienza con la obtención de una colección de ácidos nucleicos que contiene hasta 10^{14} - 10^{15} oligonucleótidos de cadena sencilla de ADN o ARN diferentes. Esta biblioteca inicial se genera por síntesis química y puede ser utilizada sin necesidad de un tratamiento previo.

Los oligonucleótidos que componen esta biblioteca están formados por una región central variable de entre 40 y 60 nucleótidos flanqueada por dos regiones constantes, denominadas cebadores, que servirán para su posterior amplificación por PCR. Inicialmente, durante la selección de los aptámeros, las moléculas diana se incuban con la colección de ácidos nucleicos para permitir el reconocimiento molecular entre estas y los oligonucleótidos de la biblioteca (etapa 1 en Figura 3). A continuación, se separan las secuencias unidas a la diana de las secuencias no enlazadas, descartándose estas últimas (etapa 2, Figura 3). Esta separación es posible mediante diferentes métodos aprovechando las distintas propiedades químico-físicas del complejo aptámero-diana y los oligonucleótidos libres. Después de esta separación, y mediante elución, se recuperan las secuencias enlazadas a la diana (etapa 3, Figura 3) con posterior amplificación por PCR (etapa 4, Figura 3) para generar una nueva colección de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias con mayor afinidad por la diana, y con menor variedad de secuencias que la inicial. Esta nueva colección de oligonucleótidos, se vuelve a incubar con las moléculas diana dando comienzo a un nuevo ciclo. En cada ciclo las condiciones de interacción y separación son cada vez más restrictivas para favorecer la selección de las secuencias con mayor afinidad. Normalmente, se necesitan entre 8 a 12 ciclos de SELEX para la selección de aptámeros de alta afinidad.

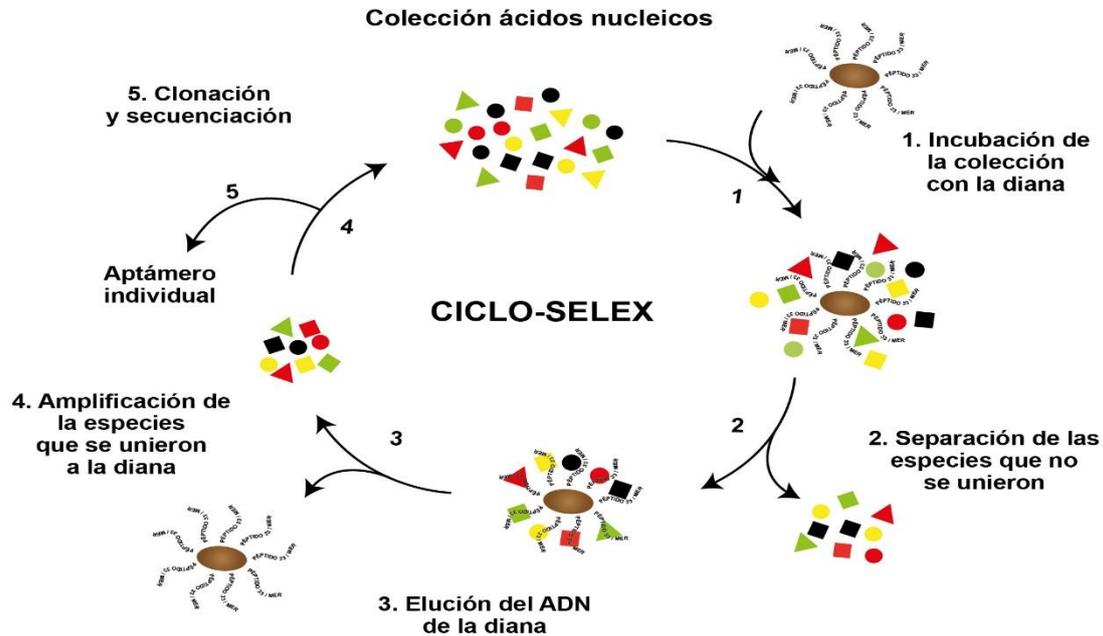


Figura 3. Procedimiento general del método SELEX.

El grado de enriquecimiento se determina después de cada ciclo mediante ensayos de enlace. Cuando el porcentaje de oligonucleótidos con alta afinidad se considera

suficiente, se lleva a cabo una clonación para separar las distintas secuencias de oligonucleótidos obtenidas. Finalmente, se secuencian los clones para identificar los oligonucleótidos seleccionados (etapa 5, Figura 3). Los aptámeros identificados por este procedimiento suelen tener de 80 a 100 nucleótidos incluyendo los cebadores. Sin embargo, no todos los oligonucleótidos de un aptámero juegan un papel crítico en la unión a su diana. Por ello, los nucleótidos no esenciales son eliminados posteriormente en estudios de truncado^{27,28}.

Los aptámeros se han propuesto como potenciales sustitutos de los anticuerpos convencionales debido a sus propiedades de reconocimiento similares y otras características superiores. De hecho, la constante de afinidad del enlace aptámero-diana varía en el intervalo de μM a pM , siendo comparable a la de algunos anticuerpos monoclonales²⁹. Además, presentan elevada selectividad, ya que son capaces de diferenciar entre homólogos estrechamente relacionados³⁰ e incluso enantiómeros³¹. Hay que mencionar también que su obtención *in vitro* hace que no sea necesario inmunizar animales ni utilizar conjuntos celulares, mientras que los anticuerpos se obtienen por uno de estos sistemas. Este hecho permite generar aptámeros contra compuestos tóxicos o no inmunogénicos. Y además pueden obtenerse aptámeros dirigidos contra un epítipo concreto, lo que no es posible con los anticuerpos.

Además, los aptámeros pueden desnaturalizarse y recuperar posteriormente su conformación nativa, por lo que pueden usarse en condiciones de pH y temperatura extremas. Como se obtienen por síntesis química, son baratos y presentan gran reproducibilidad entre lotes, y pueden purificarse en condiciones desnaturalizantes consiguiendo elevados grados de pureza. También pueden combinarse fácilmente con diferentes “etiquetas” o “grupos químicos” que proporcionan flexibilidad para su inmovilización sobre diferentes superficies o para detectarlos aprovechando las diferentes técnicas analíticas existentes.

A pesar de las prometedoras características de estos receptores sintéticos, solo recientemente el grupo de investigación de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo seleccionó los primeros aptámeros capaces de reconocer a las proteínas del gluten³². Para el proceso de selección se utilizó como diana el péptido inmunotóxico dominante 33-mer, que se inmovilizó a través de una etiqueta de histidinas sobre partículas magnéticas modificadas con ácido nitrilotriacético. Tras 10 ciclos de selección empleando una biblioteca inicial de oligonucleótidos de 80 nt de longitud con una secuencia central aleatoria de 40 nt de largo, se identificaron cinco familias diferentes de secuencias, con diferente afinidad hacia el péptido empleado como diana. Además,

se comprobó que todos los aptámeros identificados muestran afinidad por la proteína completa, PWG así como proteínas de cebada, centeno y avena, también tóxicas para los celíacos³². La interacción en disolución entre el péptido y el aptámero de mayor afinidad (Gli 4) es muy fuerte, con una constante de afinidad de solo 45 nM.

Con el objetivo de desarrollar ensayos más sensibles y robustos para la detección de gluten, es necesario modificar los aptámeros para su inmovilización y/o detección. Esta modificación puede conducir a pérdidas de afinidad en la interacción aptámero-diana. Después de evaluar diferentes configuraciones se comprobó que es la inmovilización del péptido y la modificación del aptámero con biotina la que conduce a una menor pérdida de afinidad para la interacción³³. Esta fue la configuración empleada para el desarrollo de ensayos electroquímicos para detectar gluten en alimentos con gluten y sin gluten, pudiendo determinar así la cantidad de gluten de los alimentos etiquetados como "gluten free". En estos ensayos se baja el límite de detección hasta 0.5 ppm con el uso de aptámero, muy por debajo del límite de detección de muchos anticuerpos^{34,35}.

1.5. Ensayos electroquímicos basados en aptámeros

Debido a las numerosas ventajas que presenta el uso de aptámeros como elemento de reconocimiento molecular, ha ido aumentando el número de dispositivos analíticos en los que se combina el reconocimiento de la molécula diana por estos receptores sintéticos con detección electroquímica. Estos ensayos se basan normalmente en la inmovilización de aptámero o diana sobre un soporte sólido, en el que se desarrolla la interacción de afinidad, con la posterior medida electroquímica del aptámero que se enlaza a esta.

1.5.1. Soporte sólido

Uno de los principales objetivos a la hora de inmovilizar el aptámero es mantener la afinidad de unión y la selectividad que el aptámero posee en disolución. La elección adecuada y cuidadosa del método de inmovilización del aptámero es determinante para el desarrollo del aptasensor, ya que la sensibilidad y selectividad del ensayo estarán influidas por la orientación y accesibilidad del receptor.

En general, los métodos de inmovilización deben permitir un control adecuado de la densidad de empaquetamiento y de la orientación de las moléculas de manera que se facilite el reconocimiento molecular. La inmovilización debe conducir a una pérdida mínima de la capacidad de enlace del aptámero y, la adsorción inespecífica debe ser despreciable.

Debido a esto las partículas magnéticas (MBs) se han convertido en una de las herramientas más versátiles como soporte sólido de bioensayos, ya que este tipo de soporte en ensayos de afinidad presenta una excelente compatibilidad con el elemento de biorreconocimiento, estabilidad en el tiempo y protocolos de síntesis perfectamente establecidos, además de la reducción de tamaño hasta niveles de micro- y nanopartículas. Actualmente, constituyen una herramienta muy potente en una gran variedad de aplicaciones analíticas y biotecnológicas relacionadas con la determinación de contaminantes en alimentos^{36,37}.

Estas MBs existen comercialmente modificadas con diversos grupos funcionales según la necesidad de captura de moléculas específicas. Se trata de partículas esféricas de tamaño micrométrico (diámetros 1-2.8 μ m) de poliestireno con un núcleo de hierro que le proporciona su condición superparamagnética.

En el trabajo abordado, se van a utilizar las MBs como superficie sólida sobre la que inmovilizar el elemento de biorreconocimiento, por las ventajas que esto conlleva: mejoran notablemente el rendimiento de la reacción de afinidad debido a un aumento de la superficie de biorreconocimiento, y favorecen una cinética más rápida de interacción, ya que las partículas están en suspensión y el analito no tiene que migrar muy lejos durante la interacción. Además, proporcionan una baja adsorción inespecífica y se minimiza el efecto matriz, debido a la alta eficiencia en la separación durante las etapas de lavado por acción de un campo magnético³⁸.

1.5.2. Medida electroquímica

1.5.2.1. Electroodos serigrafiados

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron electroodos serigrafiados de carbono para efectuar la medida final electroquímica. La tecnología de serigrafiado (screen-printing technology) desde principio de los 90 ha sido muy utilizada en la industria microelectrónica para aplicaciones electroquímicas y es la tecnología utilizada en la fabricación de electroodos desechables de amplio uso en la actual electroquímica analítica. Los electroodos serigrafiados (SPEs), son el equivalente miniaturizado de una célula electroquímica tradicional que incluye tres electroodos: electroodo de trabajo, electroodo de referencia y electroodo auxiliar. El uso de SPEs requiere volúmenes de muestra y reactivos muy pequeños debido a su pequeño tamaño. Esto supone una gran ventaja ya que reduce el coste y consumo de reactivos, del orden de diez veces comparado con los métodos ELISA. Además, permite también la producción de

electrodos en masa de forma reproducible y más económica, constituyendo una excelente alternativa para su combinación con partículas magnéticas en el desarrollo de ensayos electroquímicos³⁷.

1.5.2.2. Cronoamperometría.

Las técnicas electroanalíticas conocidas como cronoamperométricas se basan en una misma función de excitación que consiste en uno o varios saltos de potencial aplicados a un electrodo sumergido en una disolución sin agitar.

La función de excitación consiste en un salto de potencial desde un valor inicial E_1 , al que no hay corriente debida a un proceso redox, hasta un segundo potencial E_2 , cuyo valor es tal que toda la forma oxidada (supuesta una reacción de reducción) en la superficie del electrodo es inmediatamente reducida, provocando un gradiente de concentración y, por tanto, un transporte de materia debido a la difusión de la especie oxidada desde el seno de la disolución hasta la superficie del electrodo. Tan rápido como la especie oxidada difunde al electrodo, se convierte en una especie reducida (Figura 4). Por tanto, la velocidad de desaparición de la especie oxidada y la consecuente velocidad de formación de la especie reducida, están controladas por la velocidad de difusión de la especie oxidada a la superficie del electrodo bajo la influencia del gradiente de concentración³⁹.

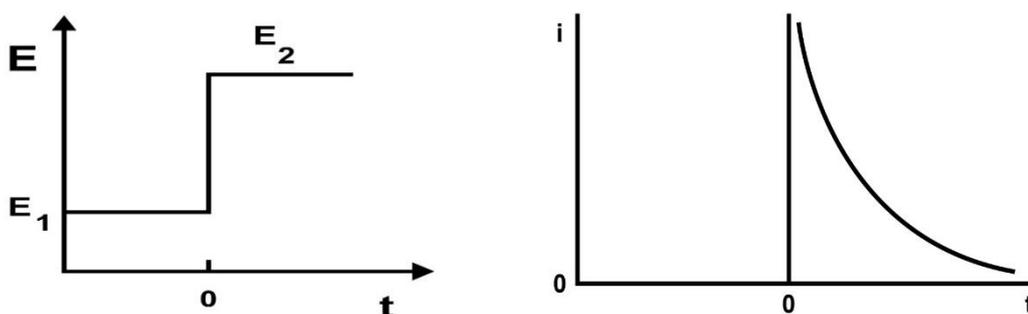


Figura 4. (A) Señal de excitación empleada en cronoamperometría cuando la especie que se encuentra en disolución es oxidada. (B) respuesta obtenida, corriente registrada en función del tiempo (cronoamperograma)

Para un electrodo plano la dependencia corriente-tiempo viene definida por la ecuación de Cottrell:

$$i_f(t) = \frac{nFAD^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

Donde $i(t)$ es la corriente faradaica y viene expresada en amperios, n es el número de electrones que intervienen en la reacción electroquímica, F la constante de Faraday ($C \cdot mol^{-1}$), A es el área del electrodo en cm^2 , D es el coeficiente de difusión en $cm^2 \cdot s^{-1}$, C_0 es la concentración del analito en la disolución en $mol \cdot cm^{-3}$, t es el tiempo transcurrido desde la aplicación del pulso de potencial.

La corriente que se registra contiene también una componente capacitiva, la cual disminuye de manera exponencial con el tiempo. En consecuencia, sólo es significativa a tiempos muy cortos. En la siguiente ecuación se expresa la variación de esta corriente en función del tiempo:

$$i_c(t) = \frac{\Delta E}{R} e^{-\frac{t}{RC}}$$

Donde R es la resistencia de la disolución en ohmios y C la capacidad diferencial de la doble capa en faradios.

Según esto, la respuesta registrada en esta técnica tras llevar a cabo el salto de potencial es la corriente que fluye por el electrodo de trabajo utilizado, monitorizada en función del tiempo (Figura 4B). La duración del salto de potencial (τ) viene determinada por el tipo de información deseada, pudiendo variar desde $10 \mu s$ hasta varios segundos.

El paso de E_1 a E_2 provoca la aparición de una elevada corriente instantánea como resultado de la reducción de la especie oxidada a la reducida. La corriente que pasa se debe a que dicha reducción crea un gradiente de concentración que produce, a su vez un flujo neto de especie oxidada a la superficie del electrodo. Debido a que la especie oxidada no puede existir en el electrodo al potencial E_2 , ésta debe ser eliminada por reducción. El flujo de especie oxidada y, por tanto, también la corriente, es proporcional al gradiente de concentración en la superficie del electrodo. El flujo continuado de la especie oxidada da lugar a que la zona de agotamiento de ésta se haga más grande y, como consecuencia, la pendiente del perfil de concentración en la superficie disminuye con el tiempo, ocurriendo lo mismo con la corriente, siendo inversamente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo³⁹. Finalmente, se puede registrar como señal analítica la

corriente límite registrada a tiempos lo suficientemente largos, que depende de la concentración inicial de especie electroactiva, tal y como indica la ecuación de Cottrell.

2. OBJETIVOS

Tal y como se ha indicado en la sección de Introducción de este trabajo, en el grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo (GEUO) se han obtenido, mediante el método SELEX, aptámeros contra el péptido inmunodominante de gliadina 33-mer, identificándose dos secuencias oligonucleotídicas denominadas Gli4 y Gli 1, por sus características de afinidad y selectividad hacia las proteínas inmunotóxicas. Estos receptores oligonucleotídicos son secuencias de ADN de hebra sencilla con un tamaño de 40 bases. Sin embargo, es muy probable que el número de bases implicadas en el reconocimiento tanto del péptido como de la proteína sea muy inferior. Un aptámero normalmente incluye diferentes regiones funcionales: el sitio de unión a la molécula diana, una región que facilita el enlace a la misma y nucleótidos no esenciales. Si se cortan o eliminan estos últimos potencialmente se pueden obtener receptores de mayor afinidad, ya que se mejora la accesibilidad de la diana al sitio de reconocimiento del aptámero por reducción de impedimentos estéricos. Además, el truncado de los aptámeros abarataría los costes asociados a su síntesis química. Por lo que, partiendo de esta base, el objetivo principal de este trabajo de investigación es realizar estudios de truncado de los aptámeros descritos para el reconocimiento de las proteínas del gluten (Gli 4 y Gli 1) con el fin de mejorar tanto la afinidad del aptámero por la proteína como abaratar los costes de dicho aptámero.

Para alcanzar este objetivo general, se han formulado los siguientes objetivos más específicos:

1. Estudio *in silico* para diseñar los fragmentos aptaméricos, incluidos en los aptámeros Gli 4 y Gli 1, que serán evaluados por sus características de enlace hacia el péptido inmunotóxico (33-mer) y la proteína completa, gliadina.
2. Diseño de un ensayo de afinidad, basado en el uso de partículas magnéticas y detección electroquímica, para evaluar de manera comparada las características de afinidad de los aptámeros truncados hacia el péptido inmunotóxico 33-mer.
3. Evaluación de las características de afinidad de los aptámeros truncados hacia la proteína completa.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos.

Los oligonucleótidos utilizados durante este trabajo fueron sintetizados por metabion international AG, purificados mediante HPLC y suministrados en forma liofilizada. La nomenclatura utilizada para la identificación de cada oligonucleótido durante el desarrollo de este trabajo, junto con el número de bases y la secuencia de los mismos se presenta en la Tabla 2.

Todos los oligonucleótidos se encuentran funcionalizados en el extremo 5' con una molécula de biotina.

Tabla 2. Información sobre nomenclatura, número de bases y secuencias de los oligonucleótidos empleados.

Nombre	Nº de bases	Secuencia en sentido 5'-3'
Gli 4	40	CCA GTC TCC CGT TTA CCG CGC CTA CAC ATG TCT GAA TGC C
Gli 4 truncado 1	24	TTT TTC TAC ACA TGT CTG AAT GCC
Gli 4 truncado 2	24	TTT CCA GTC TCC CGT TTA CCG CGC
Gli 4 truncado 2'	26	TTT TTC CAG TCT CCC GTT TAC CGC GC
Gli 1 truncado	19	TTT TTC AAC TGC TTG AAG G

Como soporte del ensayo se usaron partículas magnéticas de 1 µm de diámetro funcionalizadas con estreptavidina Dynabeads MyOne Streptavidin C1 y de 2.8 µm funcionalizadas con grupos tosilo Dynabeads M-280 Tosylactivated, adquiridas a Invitrogen Thermo Fisher Scientific.

Para comprobar que las secuencias seleccionadas conservan su afinidad por el péptido empleado como diana en la selección y por la proteína, se utilizó el péptido 33-mer modificado con biotina (Biomedal, España) de secuencia: LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPFHHHHHH y la gliadina estándar PWG obtenida bajo la guía del grupo de trabajo en prolaminas (Prolamin Working Group) adquirida a R-Biopharm AG.

Las disoluciones empleadas en las diferentes etapas del ensayo son:

Disoluciones del ensayo con 33-mer:

- Disolución de modificación (BMOD): PBS 1×
- Disolución de lavado 1 (BLMOD): BMOD + 0.01 % Tween-20
- Disolución de afinidad^e (BS): 50 mM Tris, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂
- Disolución de lavado 2 (BSL): BS + 0.01 % Tween-20

Disoluciones del ensayo con PWG:

- Disolución de modificación (BM): Borato 0.1 M pH=9.5
- Disolución de lavado 1 (BM2): 3M (NH₄)₂SO₄ en BM pH=7.4
- Disolución de bloqueo (BLM): 1× PBS pH=7.4 con 0.5% BSA (w/v)
- Disolución de almacenamiento (BLM2): 1× PBS pH=7.4 con 0.1% BSA (w/v)

Para ajustar el pH de todas las disoluciones del ensayo con PWG se utilizó NaOH.

Disoluciones del ensayo Bradford:

- BM/BM2: Mezcla en la relación 1:2 de las disoluciones BM y BM2 del ensayo con PWG.

Otros reactivos utilizados, junto con los necesarios para preparar estas disoluciones se detallan en la Tabla 3.

Las disoluciones fueron preparadas con agua purificada mediante un sistema Mili-Q RG (Milipore).

^e Disolución en la que se realizó el ensayo de reconocimiento aptámero-péptido 33-mer, que es el mismo medio que se empleó en la selección del aptámero (SELEX)²³.

Tabla 3. Reactivos empleados durante los ensayos.

Reactivo	Casa comercial
Tris HCl	Sigma Aldrich
10x PBS ^f	Sigma Aldrich
MgCl ₂	Sigma Aldrich
NaCl	Sigma Aldrich
Tween-20	Sigma Aldrich
Str-HRP ^g	Thermo Scientific
Biotina	Sigma Aldrich
BSA ^h	Sigma Aldrich
Bradford 5x	SERVA
H ₃ BO ₃	Sigma Aldrich
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma Aldrich
3',3',5',5'- tetrametilbencidina 99% (TMB)	Sigma Aldrich

3.2. Instrumentación

La señal electroquímica se mide por medio de un potenciostato AutoLab PGSTAT 10 controlado por un equipo informático que lleva incorporado el programa NOVA 2.1, para el desarrollo de las técnicas electroquímicas convencionales.

Tanto la inmovilización del péptido a las partículas como del aptámero al péptido se lleva a cabo empleando un agitador termostatzado modelo Thermomixer Comfort (Eppendorf, España).

Las medidas espectrofotométricas se realizaron con un espectrómetro modelo Genesys 10S UV-VIS (Thermo Scientific, España).

En la detección cronoamperométrica se empleó un electrodo serigrafado de carbono DRP-110 de Dropsens que se conecta al potenciostato con un conector específico de Dropsens.

^f La disolución 10x PBS está compuesta por una reguladora de fosfato 0.1 M de pH=7.4, NaCl 1.54 M y está libre de ARNasas.

^g Las iniciales Str-HRP, corresponden al conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa de rábano silvestre.

^h Albumina de suero bovino

La separación de las partículas de la disolución se lleva a cabo mediante un imán DynaMag-2, con capacidad para 16 viales de 1.5 mL.

3.3. Procedimiento experimental:

3.3.1. Modificación de las partículas magnéticas:

3.3.1.1. Con péptido (33-mer):

En primer lugar, se debe eliminar la disolución comercial de almacenamiento. Para ello se lavan 50 μ L de partículas Dynabeds MyOne Streptavidin C1, de concentración 10 mg/mL, 950 μ L de PBS 1x 0.01% de Tween-20 (BLMOD) dos veces.

Seguidamente se procede a la inmovilización del péptido. Para ello se resuspenden las partículas en 1 mL de PBS 1x (BMOD) con 2 μ M de péptido biotinilado, haciéndolas interaccionar en el Thermomixer de Eppendorf a 1300 rpm, 30°C durante 30 min. Tras esto se lavan dos veces durante dos minutos con 1mL de BLMOD.

Una vez llegados a este punto se realiza el bloqueo de los sitios de enlace libres de las estreptavidinas de la superficie de las partículas, evitando así adsorciones inespecíficas. Para ello, se resuspenden las partículas en 1mL de BMOD con 500 μ M de Biotina haciéndolas interaccionar en el Thermomixer de Eppendorf a 1300 rpm, 30 °C durante 30 min. Tras esto se lavan dos veces durante dos minutos con 1mL de BLMOD y una vez durante dos minutos con 1mL de BS. Para reconstituirlas finalmente en 500 μ L de BS para su uso (Figura 5). Las partículas se modifican y se usan al día siguiente a dicha modificación.

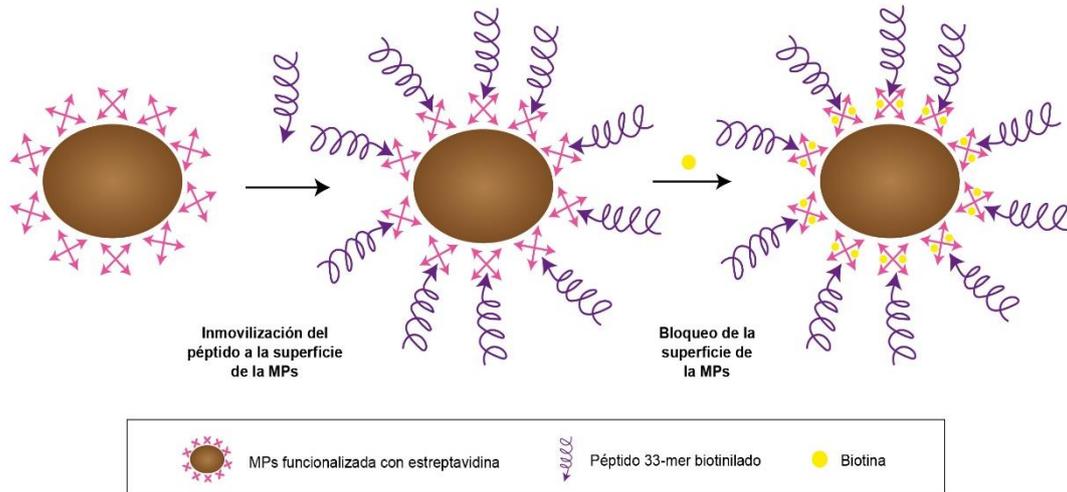


Figura 5. Protocolo de modificación de las partículas magnéticas con el péptido 33-MER

3.3.1.2. Con proteína (PWG):

En primer lugar, se debe eliminar la disolución comercial de almacenamiento. Para ello se lavan 165 μ L de partículas Dynabends M-280 Tosylactivated, de concentración 30 mg/mL, con 1 mL de borato 0.1 M a pH=9.5 (BM) dos veces.

Seguidamente se procede a la inmovilización de la proteína. Para ello se resuspenden las partículas en una mezcla de 50 μ L BM y 100 μ L BM2 con 100 μ L de PWG de 1 mg/mL haciéndolas interaccionar en el Thermomixer de Eppendorf a 1300 rpm, 30°C durante 18 h. Tras esto se recoge el sobrenadante y se guarda en un tubo para posteriormente hacer el ensayo Bradford y conocer la cantidad de proteína inmovilizada.

Una vez llegados a este punto se realiza el bloqueo de los posibles sitios de enlace libres de los grupos tosilo de la superficie de las partículas con BSA, evitando así adsorciones inespecíficas. Para ello se resuspenden las partículas en 1mL de BLM haciéndolas interaccionar en el Thermomixer de Eppendorf a 1300 rpm, 30°C durante 1h. Tras esto se lavan dos veces durante dos minutos con 1mL de BLM2. Para reconstituirlas finalmente en 250 μ L de BS para su uso.

Las partículas modificadas se encuentran en una concentración de 20 mg/mL por lo que para su uso se procede a una dilución hasta 1mg/mL (figura 6). En este caso, las partículas pueden usarse el mismo día de la modificación y en días posteriores.

A partir de este punto, todas las etapas son comunes para las dos modificaciones descritas en los puntos anteriores.

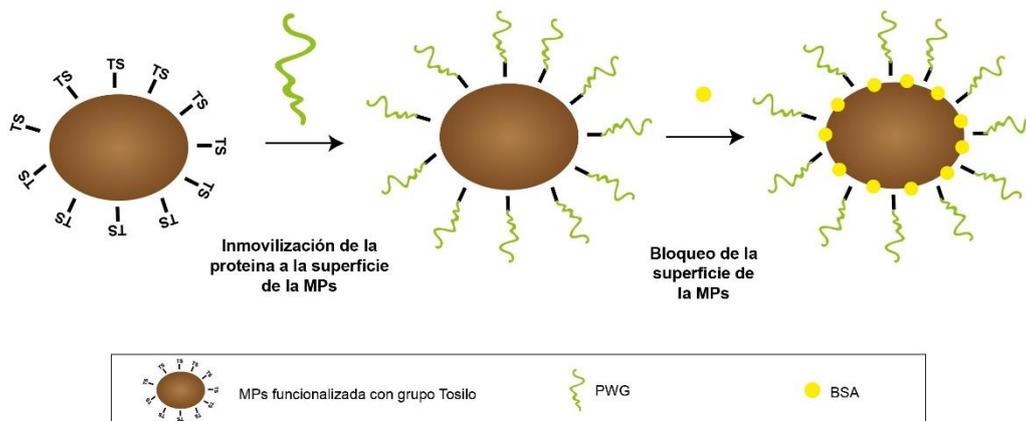


Figura 6. Protocolo de modificación de las partículas magnéticas con la proteína PWG.

3.3.2. Ensayo de afinidad:

Para la interacción de estas partículas con los diferentes aptámeros se sigue el siguiente protocolo:

1. Interacción con el aptámero deseado (figura 7 etapa 1): 10 μ L de partículas modificadas se hacen reaccionar 30 min a 30°C y 1300 rpm en el Thermomixer de Eppendorf con 1 mL de disoluciones concentraciones crecientes de aptámero marcado con biotina, en un intervalo desde 0 hasta saturación en BS. Posteriormente se procede a lavar dos veces las partículas con 1 mL de BSL.

2. Marcaje enzimático (figura 7 etapa 2): Las partículas se resuspenden en 1 mL de BS con 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa de rábano silvestre (Str-HRP). Se dejan interaccionar en el Thermomixer de Eppendorf durante 30 min a 30°C y 1300 rpm con posterior lavado con 1 mL de BSL dos veces y con BS una vez para finalmente resuspenderlas en 10 μL de BS.

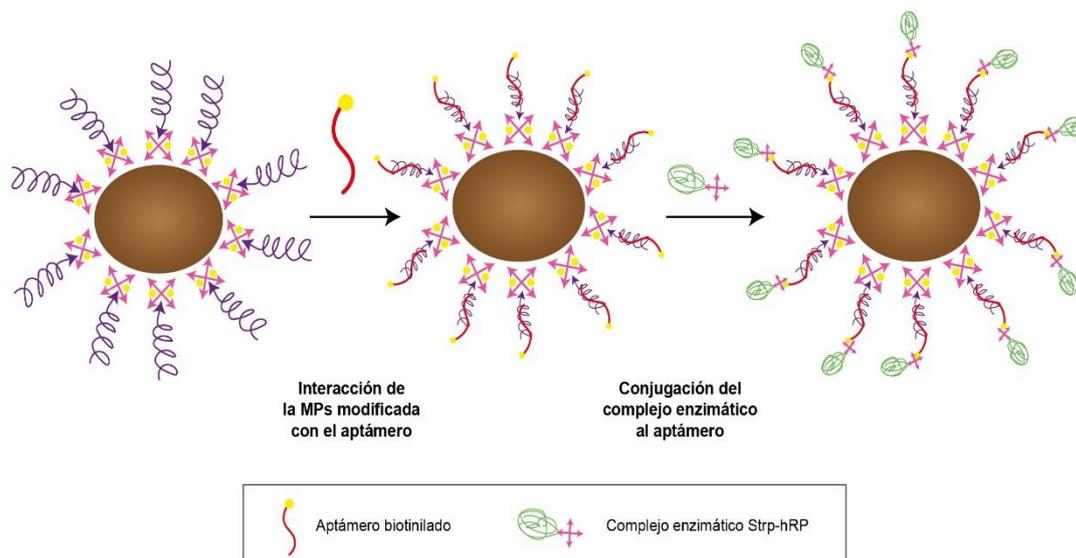


Figura 7. Protocolo del ensayo de afinidad.

3.3.3. Detección:

En la etapa final de detección se lleva a cabo una medida electroquímica de la actividad enzimática inmovilizada sobre la superficie de las partículas magnéticas. Con este fin se emplea como sustrato de la enzima HRP tetrametilbencidina (TMB), ya que este se oxida por la acción de peróxido de hidrógeno en presencia de peroxidasa para dar lugar a la especie oxidada de TMB (TMB_{ox}) que puede detectarse mediante cronoamperometría. Las medidas se llevan a cabo en una celda serigrafada bajo cuyo electrodo de trabajo, de carbono, se adhiere un imán de 4 mm de diámetro con el fin de que las partículas magnéticas queden atrapadas únicamente sobre la superficie del electrodo de trabajo. Para ello se depositan 10 μg de las partículas resuspendidas sobre el electrodo. Tras un minuto, para que el imán atrape las partículas, se añaden 40 μL de sustrato enzimático y se deja que tenga lugar la reacción enzimática durante 30 segundos. Al cabo de ese tiempo se mide cronoamperométricamente durante 60 segundos a 0 V, ya que este potencial permite reducir el TMB_{ox} generado enzimáticamente. La corriente generada durante la reducción del producto de reacción

es una medida de la actividad enzimática inmovilizada sobre las partículas magnéticas y, por tanto, de la cantidad de aptámero enlazado.

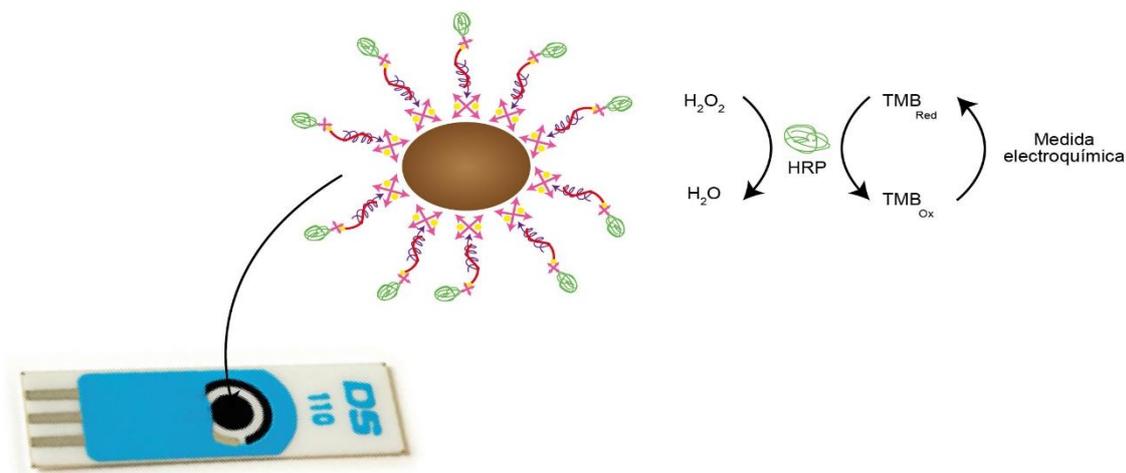


Figura 8. Protocolo para la etapa de detección electroquímica del ensayo.

3.3.4. Ensayo Bradford:

Para conocer la concentración de proteína (PWG) que se inmoviliza sobre las MPs activadas con grupos tosilo se utilizó un ensayo colorimétrico, el ensayo Bradford para la cuantificación de proteínas. Este método se basa en emplear un colorante hidrofóbico, cuyas disoluciones acuosas tienen un color pardo, pero que al interactuar con la proteína, en el entorno hidrofóbico que esta proporciona, cambia a un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este es un ensayo relativamente inespecífico, que requiere la calibración con un patrón de proteína, para lo que generalmente se utiliza la albúmina, aunque en este caso se optó por utilizar la propia gliadina, ya que la respuesta depende de la proteína que se utilice.

Con este fin se utiliza una disolución 1x de reactivo Bradford en agua (accesible comercialmente) y patrones de PWG en el intervalo de 100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de una 1mg/mL en la disolución BM/BM2 descrita anteriormente. A continuación, se añaden a un tubo 100 μl de cada disolución patrón junto con 5 mL de reactivo Bradford 1x y se dejan reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se transfiere a la cubeta de un espectrofotómetro y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 595 nM. La medida debe hacerse antes de 30 minutos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Diseño de los aptámeros anti-gluten truncados.

En estudios previos del Grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo se han descrito dos aptámeros anti-gliadina, denominados Gli4 y Gli1, con una longitud de 40 nucleótidos y una masa molecular aproximada de 12 kDa³². Estos aptámeros se identificaron mediante un proceso de selección SELEX, empleando como molécula diana el péptido de 33 aminoácidos, conocido como 33-mer y contenido en la α -gliadina. El aptámero Gli 4 es el que presentó mayor afinidad tanto hacia el péptido inmounotóxico como hacia la proteína completa, mientras que el aptámero Gli 1 fue el que más veces se repitió entre las secuencias oligonucleotídicas identificadas en la disolución final del proceso de selección. La mayor abundancia de esta secuencia, Gli 1, en la biblioteca enriquecida final puede estar relacionada con una cinética de enlace favorable hacia esta secuencia.

Los aptámeros identificados mediante el proceso de selección son en realidad secuencias de 80 nucleótidos, ya que incorporan secuencias constantes de 20 nucleótidos, flanqueando una secuencia variable central, que se utilizaron para el anclaje de los cebadores en las amplificaciones PCR necesarias en la selección. Sin embargo, no todos los nucleótidos de estos aptámeros juegan un papel esencial en su enlace a la diana.

Como se ha indicado previamente, el aptámero completo que se identifica tras el proceso de selección tiene normalmente tres regiones funcionales diferenciadas⁴⁰. La región del sitio de reconocimiento, que interacciona con la molécula diana no suele ser mayor de 10-15 nucleótidos. Estos nucleótidos suelen además estar involucrados en estructuras secundarias del tipo bucle, cuartetos de guaninas o pseudonudos. Una segunda región incluye nucleótidos que aunque no entran directamente en contacto con la molécula diana juegan un papel importante dirigiendo la interacción de afinidad. El resto de nucleótidos no son esenciales y podrían eliminarse, llegando incluso a mejorar la afinidad con respecto a los aptámeros iniciales.

El diseño racional de estudios de truncado se realiza tomando como punto de partida el análisis de las estructuras secundarias de los aptámeros descritos.

Con este objetivo se utiliza el algoritmo informático Mfold⁴¹, de acceso libre a través de Internet, www.mfold.es. En la Figura 9 se muestran las estructuras, con las energías libres de formación más bajas (Tabla 4), encontradas para los dos aptámeros objeto de estudio. Aunque no se trata de estructuras muy estables, es necesario resaltar que ambos aptámeros tienen una estructura similar, con forma de horquilla, y además los

nucleótidos implicados en estas horquillas corresponden a las zonas conservadas. Aunque el proceso de truncado de los aptámeros es un proceso empírico, de prueba y error, se decidió comenzar dividiendo el aptámero de mayor afinidad, Gli 4, en dos mitades, cada una de las cuales conserva una de las estructuras secundarias en forma de horquilla que aparecen en el aptámero completo.

Se consideró además evaluar el truncado del aptámero Gli 1, seleccionando en este caso la zona de la estructura de horquilla que contiene la región conservada de 12 nucleótidos que se repiten en las diferentes familias de oligonucleótidos identificadas en el proceso SELEX.

Por otro lado, previamente se encontró que la afinidad de los aptámeros completos hacia proteína y péptido disminuye al incorporar una molécula marcadora en el extremo 5'. Por esta razón, para evaluar los aptámeros truncados se decidió incorporar una secuencia de 5 timinas entre la secuencia aptamérica y la biotina final en el extremo 5'.

Además, en vista de que el truncamiento del aptámero Gli 4 da como resultado dos aptámeros con diferente número de bases, truncado 1 con 19 bases y truncado 2 con 21 base, también se decidió probar a poner 3 Timinas en el aptámero de 21 base para obtener como resultado final dos aptámeros con el mismo número de bases y poder conocer así el comportamiento de ambos (Figura 9).

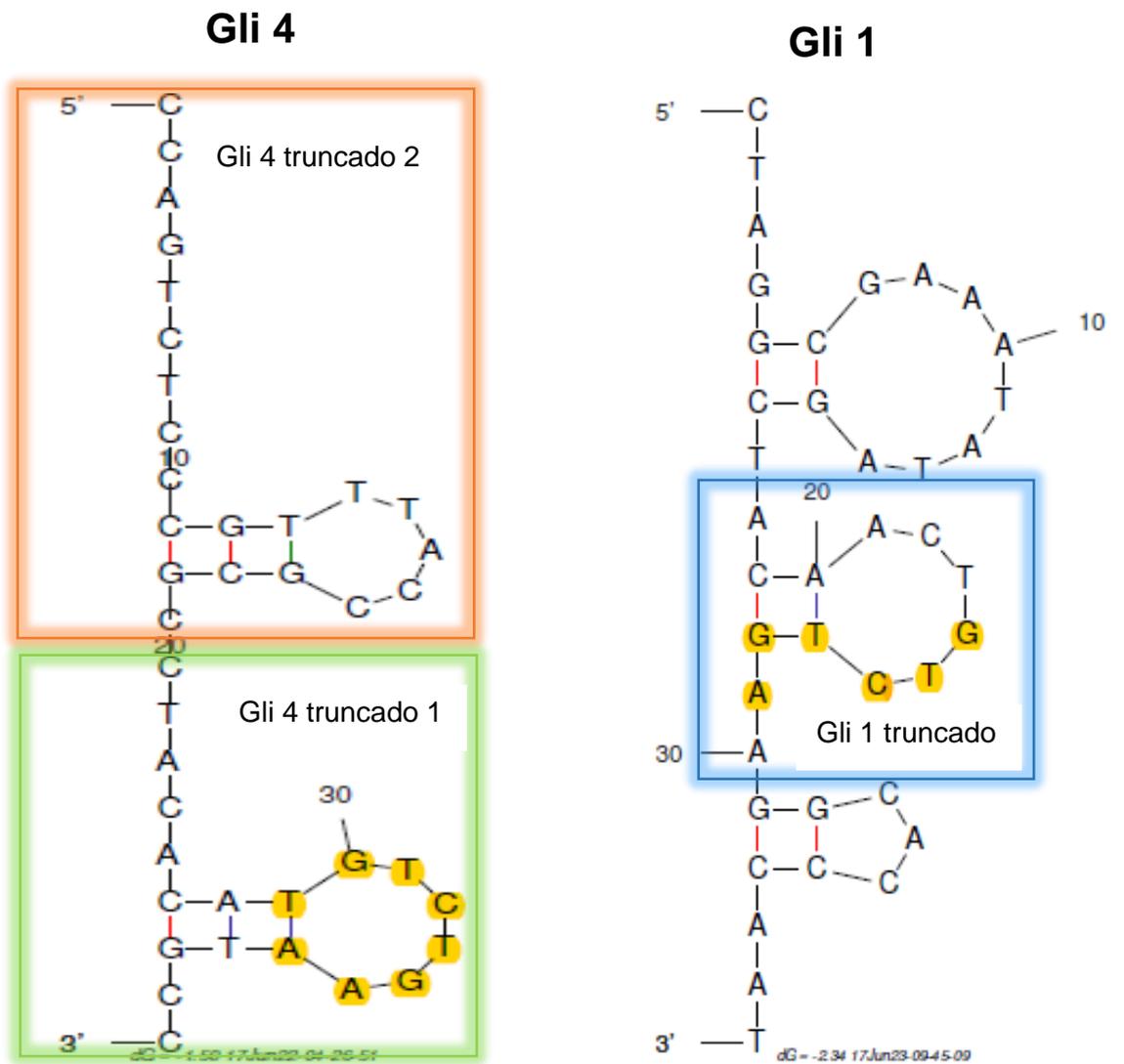


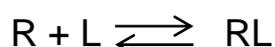
Figura 9. Estructuras secundarias más estables para los aptámeros Gli 4 y Gli 1, resaltando los fragmentos que se seleccionan como aptámeros truncados para su análisis.

Tabla 4. Datos de ΔG para las estructuras más estables de Gli 4 y los diferentes aptámeros truncados.

	Gli 4	Gli 4 truncado 1	Gli 4 truncado 2	Gli 4 truncado 2'	Gli 1 truncado
Bases	40	19	21	21	14
ΔG (Kcal/mol)	-1.5	-0.42	-0.6	-0.6	-1.85

4.2. Evaluación de la afinidad por el péptido 33-mer.

Se evaluó a continuación la capacidad de los aptámeros truncados descritos en la sección anterior (Tabla 2) para reconocer y unirse al péptido inmunotóxico 33-mer. Con este objetivo se diseñó el ensayo de afinidad descrito en la sección de protocolos 3.3.1.1. En este ensayo una cantidad constante de péptido inmovilizado sobre partículas magnéticas (R) se hace interaccionar con cantidades crecientes de cada uno de los aptámeros (L), de manera que se establecerá el siguiente equilibrio:



Asumiendo una estequiometría para la interacción 1:1, la constante de este equilibrio:

$$K_{eq} = \frac{[RL]}{[R][L]}, \text{ con unidades de } M^{-1},$$

es una medida de la afinidad del aptámero por el péptido. Así cuanto mayor es K_{eq} más fuerte es la interacción péptido-aptámero. El inverso de esta constante:

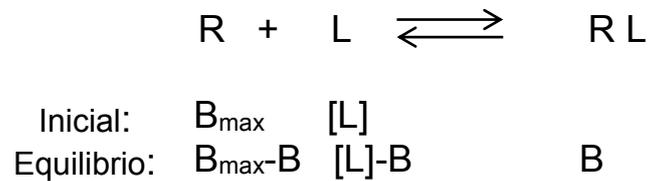
$$K_d = \frac{1}{K_{eq}} = \frac{[R][L]}{[RL]}, \text{ con unidades de } M \text{ (mol/L)}$$

es en realidad un parámetro más utilizado en la literatura como medida de la magnitud de una interacción de afinidad. Así definida, cuanto menor es el valor de K_d tanto más fuerte será la interacción a estudio.

Partiendo de cantidades de R y L conocidas, es suficiente medir, una vez se alcanza el equilibrio de la interacción, la cantidad de complejo RL formado para obtener el valor de la constante de afinidad correspondiente. En el ensayo de afinidad diseñado es la opción que se toma, ya que una vez que la interacción alcanzó el equilibrio se aplica un campo magnético para separar las partículas de la disolución y a continuación se mide la cantidad de aptámero enlazado añadiendo el conjugado enzimático que se enlaza a este. Por tanto, la medida final de la actividad enzimática unida a la superficie de las partículas magnéticas nos informa de la fracción de aptámero enlazado, B.

Además debe considerarse que la cantidad máxima de aptámero enlazado, B_{max} , no puede superar a la cantidad de péptido inmovilizada. Por lo que para una interacción 1:1 puede asumirse que el valor máximo medido en el ensayo de afinidad, B_{max} , es una medida de la cantidad total de péptido disponible para el enlace en el experimento. Por

tanto, al cambiar la cantidad de L en el ensayo, y medir en cada caso la fracción enlazada B, se tiene:



De esta forma la expresión general para la constante de disociación puede escribirse como:

$$K_d = \frac{(B_{max} - B) ([L] - B)}{B}$$

Y diseñando el ensayo de manera que $[L]-B \sim [L]$

Se obtiene:

$$K_d = \frac{(B_{max}-B)[L]}{B}, \text{ de donde}$$

$$B = \frac{B_{max} [L]}{K_d + [L]} \text{ (ecuación 1)}$$

Es decir que si se cumple este modelo, el más utilizado en el estudio de interacciones de afinidad, al representar los resultados del experimento de afinidad en la forma indicada, el ajuste de los mismos a la ecuación 1 nos permitiría obtener de los parámetros de ajuste el valor de la constante de afinidad, K_d , para cada aptámero ensayado.

En la Figura 10 se muestran las curvas de enlace obtenidas para los diferentes aptámeros estudiados. En dicha figura se ha representado la intensidad de corriente media en nA frente a la concentración de aptámero en nM en una escala logarítmica.

Como puede observarse, los resultados obtenidos no se ajustan a una hipérbola equilátera (ecuación 1), si no que adoptan una forma sigmoidea, lo que es un indicativo de una interacción más complicada que una simple interacción bimolecular. Aunque el péptido experimente una interacción bimolecular con el aptámero, el hecho de que sobre

cada partícula magnética se haya inmovilizado múltiples moléculas de péptido puede dar lugar a efectos de cooperatividad en la reacción, es decir, la unión del primer aptámero a la partícula magnética puede afectar la afinidad de unión de las subsiguientes moléculas de aptámero al péptido inmovilizado sobre la misma partícula. En estos casos, las curvas de enlace muestran la forma sigmoidea obtenida.

Para ajustar estas curvas, uno de los modelos más utilizados es el modelo logístico de cuatro parámetros:

$$B = A + \frac{(B_{max} - A)}{1 + \left(\frac{[L]}{EC_{50}}\right)^p}$$

Donde B_{max} representa la máxima señal o señal de saturación (asíntota máxima), A es el valor de la respuesta a concentración cero o asíntota mínima, p es la pendiente de la curva en el punto de inflexión y EC_{50} representa la concentración de aptámero que se necesita para obtener la mitad de la señal máxima⁴². Es habitual utilizar este valor de EC_{50} como una medida de K_d y por tanto una indicación de la afinidad del ligando por su diana. En la Tabla 5 se resumen todos los parámetros de ajuste para las diferentes secuencias ensayadas.

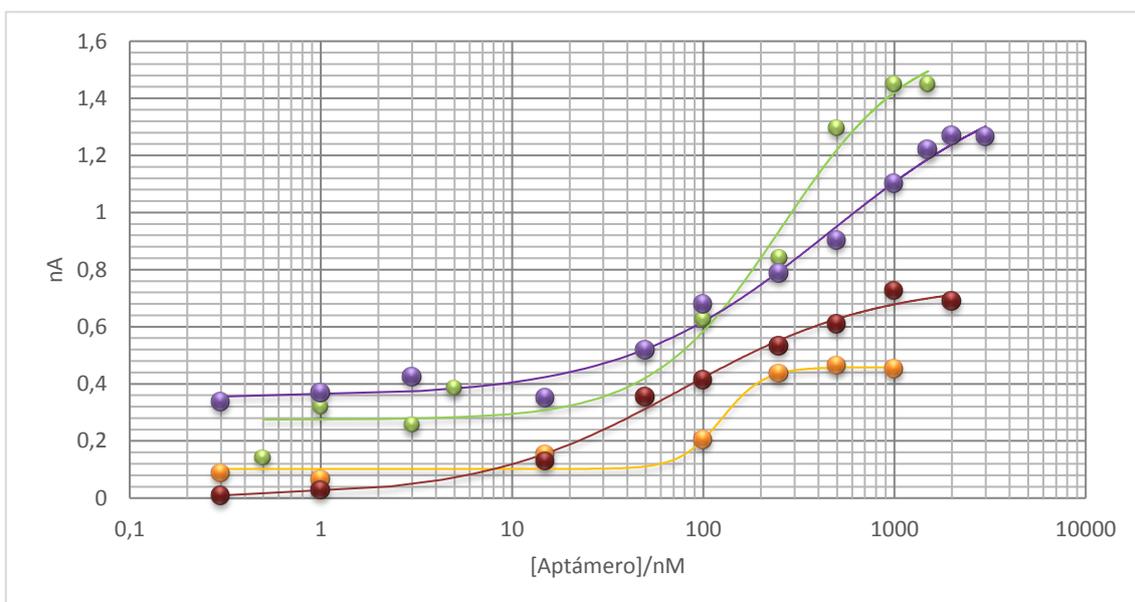


Figura 10. Curvas de enlace de los aptámeros Gli 4 (verde), Gli 4 truncado 1 (morado), Gli 4 truncado 2' (naranja) y Gli 1 truncado (rojo) frente al péptido 33-mer.

Se puede apreciar (Figura 10) que todos los aptámeros truncados ensayados son capaces de unirse al péptido 33-mer, al igual que lo hacía el aptámero completo Gli 4, aunque con diferencias entre ellos. El aptámero Gli 4 truncado 1, que se corresponde con las 19 bases del extremo 3' del aptámero completo, en las que se incluye la secuencia común a todos los aptámeros identificados, es el que muestra las características de enlace más similares al aptámero completo. La señal máxima obtenida con este primer truncado, B_{max} , es similar a la del aptámero completo (dentro del error experimental), mientras que para el resto de truncados se obtiene señales máximas significativamente menores, especialmente el truncado 2, correspondiente a los 21 nucleótidos del extremo 5' de Gli 4. Sin embargo, curiosamente la diferencia en su constante de afinidad (EC_{50}) con respecto al aptámero completo no es significativa. Es de resaltar que todos los aptámeros dan valores de p próximos a 1, característicos de una interacción bimolecular, si se exceptúa precisamente este truncado 2, para el que se obtiene un valor de $p = 4$. Esto puede ser indicativo de un mecanismo de interacción con cooperatividad, lo que explicaría una mayor constante de afinidad aparente (menor constante de disociación), aunque con una señal máxima muy inferior. Por otro lado, es reseñable que el aptámero Gli 1 truncado muestra la interacción de mayor afinidad hacia el péptido. Este aptámero contiene la secuencia de nucleótidos consenso obtenida en el proceso de selección y es el más corto de todos los ensayados. Estos resultados experimentales apuntan por tanto a la existencia de nucleótidos no esenciales en los aptámeros completos, que además dificultan la interacción aptámero-peptido

Tabla 5. *Parámetros de ajuste de las curvas de enlace de los diferentes aptámeros al péptido 33-mer.*

	Gli 4	Gli 4 trunc 1	Gli 4 trunc 2	Gli 4 trunc 2'	Gli 1 trunc
Bases	40	19	21	23	14
Timinas	0	5	3	5	5
A / nA	0.27±0.06	0.35 ± 0.04	0.04 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.01 ± 0.04
B_{max} / nA	1.6±0.3	1.5 ± 0.2	0.32 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.76 ± 0.06
p	1.3±0.6	0.8 ± 0.2	3 ± 2	4 ± 3	0.8 ± 0.2
IC50 / nM	119±39	464±211	114±15	125±24	76±18
r^2	0.99433	0.98395	0.97335	0.95592	0.98489

Por otro lado, al comparar los aptámeros Gli 4 truncado 2 y Gli 4 truncado 2', que solo se diferencian en la longitud del espaciador de timinas que se incluyó para separar la secuencia oligonucleotídica de interés del marcador biotina, se observa una ligera disminución en la señal máxima obtenida cuando se utilizó el espaciador más corto. Este resultado concuerda con la observación de que la modificación de los aptámeros con una molécula marcadora afecta a su afinidad y pone de relieve la necesidad de incorporar este espaciador para minimizar las pérdidas de afinidad por esta razón. Sería muy interesante comprobar si espaciadores más largos de cinco timinas contribuyen a mejorar aún más la afinidad de los aptámeros en su interacción con el péptido (Figura 11).

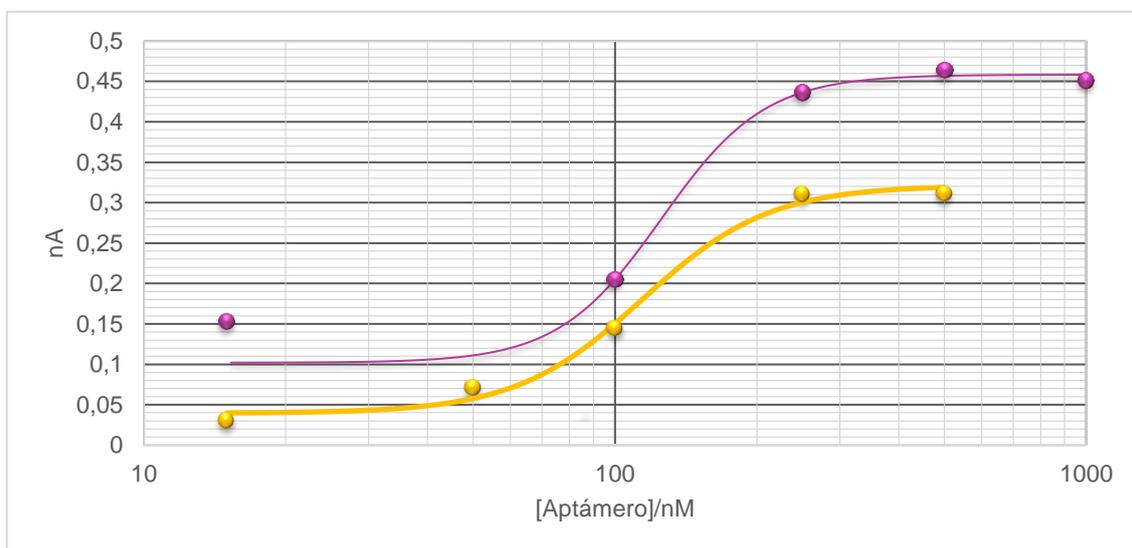


Figura 11. Curva de enlace comparativa Gli 4 truncado 2' (rosa) y Gli 4 truncado 2 (amarillo)

4.3. Evaluación de la afinidad por la proteína PWG.

Una vez que se comprueba que las diferentes secuencias presentan afinidad en mayor o menor medida, contra el péptido seleccionado como diana es necesario determinar si presentan también afinidad contra la proteína completa. El reconocimiento del fragmento 33-mer no es suficiente para el desarrollo de un ensayo de detección de gluten en alimentos si el receptor no es capaz de detectar la proteína en su forma nativa, que es el alérgeno a determinar.

Cabe destacar que, en ocasiones, algunas secuencias seleccionadas frente a un fragmento de una proteína no son capaces de reconocer la proteína completa o lo hacen

con una menor afinidad⁴³. Esto es así porque la libertad que presenta el fragmento peptídico libre para adaptar conformaciones secundarias desaparece cuando se encuentra incluido en la proteína completa. Las conformaciones secundarias, tanto del péptido como de la secuencia oligonucleotídica seleccionada como receptor, pueden ser cruciales en la formación del complejo de reconocimiento ligando-gliadina.

Con el fin de determinar la capacidad de enlace de las secuencias seleccionadas frente a la proteína completa se lleva a cabo un ensayo análogo al desarrollado para la determinación del enlace al péptido. Para ello se emplea la gliadina PWG que es un material preparado por el Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Esta proteína, descrita anteriormente, es el único material de referencia obtenido hasta el momento y ha sido utilizada en la validación de diferentes métodos de análisis y en este trabajo se va a utilizar como estándar de gliadina.

Sobre la superficie de partículas magnéticas se inmovilizó esta proteína. La inmovilización de la proteína en este caso se realiza sobre partículas magnéticas disponibles comercialmente que se encuentran modificadas en superficie con grupos tosilo activados. Estos grupos permiten la formación de un enlace covalente con grupos aminos disponibles en la proteína. Para determinar la cantidad de proteína inmovilizada sobre las partículas modificadas con grupos tosilo se utiliza un método general de determinación de proteínas para cuantificar la proteína en la disolución residual, obtenida tras el enlace covalente a las partículas magnéticas, el método de Bradford⁴⁴. El colorante unido a las proteínas presenta un máximo de absorbancia a 595 nm. A esta longitud de onda se realiza un calibrado con concentraciones crecientes y conocidas de PWG, ya que estas proteínas tienen una composición en aminoácidos y unas características que las hacen diferentes de las que más habitualmente se emplean como patrón en este método (BSA). La Figura 12 muestra la recta de calibrado obtenida con PWG, con un intervalo lineal hasta 1000 ppm. Utilizando esta recta de calibrado, se aplicó este método para determinar la proteína en la disolución sobrenadante después del enlace. El valor de absorbancia obtenido nos indicó que la proteína en dicha disolución está por debajo del límite de detección del método, lo que indica una gran eficacia en el método de inmovilización de PWG.

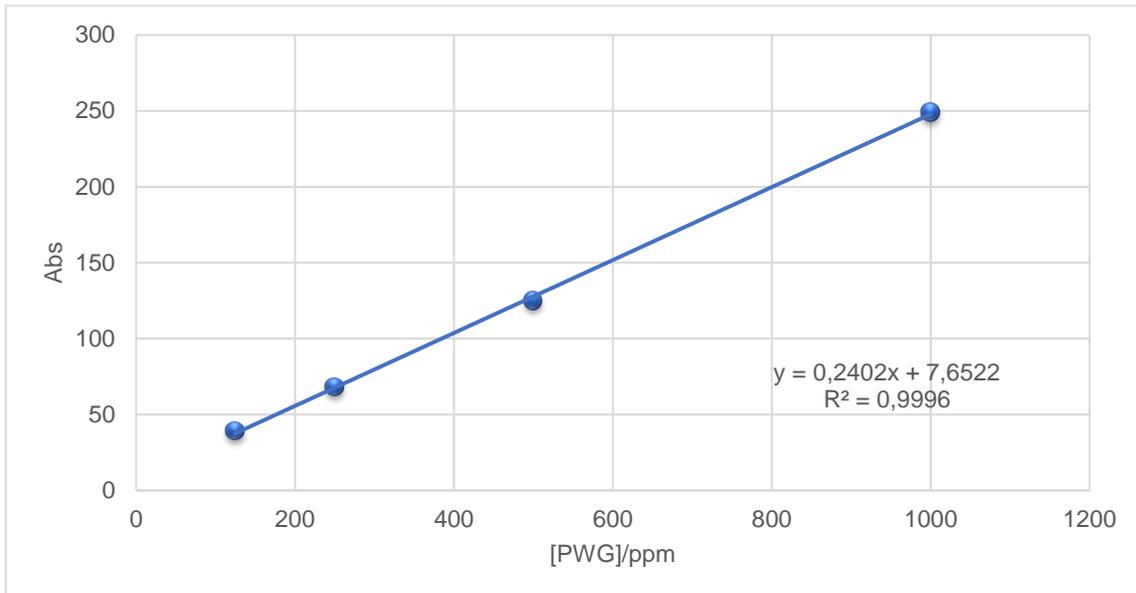


Figura 12. Variación de la absorbancia respecto a la concentración de proteína empleando el método de Bradford para PWG.

Después de confirmar la efectividad del proceso de inmovilización de la proteína, se llevaron a cabo incubaciones con concentraciones crecientes de los aptámeros biotinilados. Las partículas modificadas se hacen interaccionar con los diferentes aptámeros truncados el protocolo 3.3.1.2 descrito en el apartado experimental. Tras llevar a cabo el ensayo, se obtuvieron las curvas de enlace que se muestran en la Figura 13. Al igual que en el caso de la unión péptido-aptámero, se utilizó la función logística de 4 parámetros para ajustar las curvas sigmoideas obtenidas, usando el programa Origin 8.6.

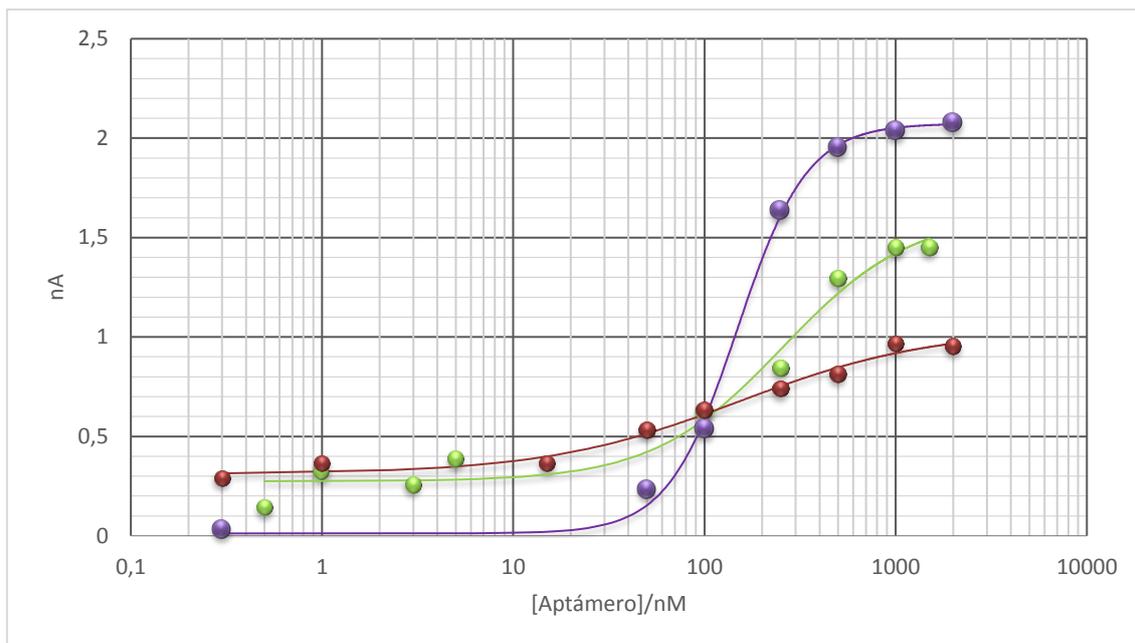


Figura 13. Curvas de enlace de los aptámeros Gli 4 (verde), Gli 4 truncado 1 (morado), y Gli 1 truncado(rojo) frente a la proteína PWG.

Se puede apreciar (Figura 13) que los aptámeros truncados ensayados son capaces de unirse a la proteína PWG, al igual que el aptámero completo Gli 4, aunque de nuevo con diferencias entre ellos. Merece especial mención el comportamiento anómalo de los aptámeros Gli 4 truncado 2 y Gli 4 truncado 2', cuyas curvas de enlace no se muestran en la Figura 13. Estos truncados, que ya mostraron la menor afinidad hacia el péptido, en el caso de la proteína dan lugar a resultados muy irreproducibles, lo que impidió obtener una curva de enlace fiable y por tanto calcular los valores de afinidad correspondientes a la proteína. El aptámero Gli 4 truncado 1 y el aptámero Gli 1 truncado, en los que se incluye la secuencia común a todos los aptámeros identificados, muestra características de afinidad, medidas a través de su EC50, muy similares (dentro del error experimental) y que no son significativamente diferentes a las del aptámero completo. Sin embargo, la señal máxima obtenida con estos truncados, B_{max} , que puede considerarse una medida de la capacidad de enlace de las partículas modificadas, sigue el orden: Gli 4 truncado 1 > Gli 4 > Gli 1 truncado. Este hecho, parece poner de manifiesto que al eliminar nucleótidos no esenciales del aptámero Gli 4 completo se reducen impedimentos estéricos, lo que hace posible que un mayor número de aptámeros se enlacen a las partículas modificadas con la proteína inmovilizada. Además el valor de p obtenido para el aptámero Gli 4 truncado 1, es próximo a 3, a diferencia de

lo que se observa en su unión al péptido. Esto puede ser indicativo de un mecanismo de interacción con cooperatividad.

Por otro lado, es reseñable que con el aptámero Gli 1 truncado que se corresponde con las 14 bases de la horquilla que forma el aptámero completo Gli 1, en la que se incluye también la secuencia común a todos los aptámeros identificados, se obtiene señales máximas significativamente menores, lo que puede indicar que se requiere algún nucleótido adicional para dirigir la interacción de afinidad, aun cuando esos nucleótidos no estén implicados directamente en la interacción con la proteína.

Tabla 6. *Parámetros de ajuste de las curvas de enlace de los diferentes aptámeros a la proteína gliadina PWG.*

	Gli 4	Gli 4 trunc 1	Gli 1 trunc
Bases	40	19	14
Timinas	0	5	5
A / nA	0.02±0.11	0.02 ± 0.05	0.31 ± 0.04
B_{max} / nA	1.7±0.2	2.07 ± 0.05	1.04 ± 0.09
p	0.85±0.263	2.4 ± 0.3	0.9 ± 0.3
IC50 / nM	119±39	149±8	151 ± 59
r²	0.99531	0.99591	0.9738

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas después de la realización del presente trabajo son las siguientes:

1. Tomando como punto de partida los aptámeros de 80 nucleótidos encontrados mediante un proceso SELEX frente al péptido de 33 aminoácidos contenido en la α -gliadina, se diseñaron tres aptámeros truncados con 21, 19 y 14 bases utilizando como criterio la conservación tanto de la secuencia de bases consenso como los motivos estructurales característicos de los aptámeros completos. Todos los truncados son capaces de detectar tanto al péptido aislado como a la proteína gliadina completa.
2. El aptámero de 14 bases obtenido mediante truncado del aptámero Gli 1, el más abundante en el proceso SELEX, presentó frente al péptido 33-mer las mejores características de enlace, con una constante de disociación de 76 nM, inferior a la del aptámero completo, al mismo tiempo que se ha conseguido la reducción de costes del receptor sintético.
3. Se ha demostrado la importancia que presenta la separación de la biotina, utilizada como marcador, de la secuencia aptamérica mediante un espaciador de timinas. Cuando se utilizan 5 timinas, en lugar de tres, como espaciador se mejoran las propiedades de enlace del aptámero truncado.
4. El comportamiento de enlace a la proteína completa es diferente, resultando el aptámero de 19 bases, que también incorpora la secuencia de nucleótidos consenso, el que da lugar a una mayor capacidad de enlace (B_{max}), aunque con una afinidad que no es significativamente diferente a la del aptámero completo o la del aptámero más corto, Gli 1 truncado. Esto puede ser debido a un mecanismo de interacción diferente, implicando cierta cooperatividad de enlace que no se manifiesta en el aptámero truncado con menor número de nucleótidos ni en el aptámero completo.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez Sáez, L. *Enfermedad celíaca. Sistema Nacional de Salud* **34**, (2010).
2. Casellas, F. Enfermedad celíaca. *Med. Clínica* **126**, 137–142 (2006).
3. Oliver, A. P. *et al.* Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con la enfermedad celíaca y los problemas que plantean las técnicas analíticas para el control del contenido de gluten en los alimentos. *Rev. del Com. Científico* **12**, 63–78 (2010).
4. Alejandra Araya, M. El gluten. Su historia y efectos en la enfermedad celíaca. *Rev. Med. Chil.* **138**, 1319–1325 (2010).
5. Biffi, C. A. & Tuissi, A. Stato dell'arte sulle tecniche di produzione additiva per metalli. *Metall. Ital.* **109**, 5–10 (2017).
6. Shewry, P. R. & Halford, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* **53**, 947–958 (2002).
7. www.celiacos.org. (Último acceso 5/06/2017)
8. Allred, L. K., Lesko, K., McKiernan, D., Kupper, C. & Guandalini, S. The celiac patient antibody response to conventional and gluten-removed beer. *J. AOAC Int.* **100**, 485–491 (2017).
9. Lee, H. J., Anderson, Z. & Ryu, D. Gluten Contamination in Foods Labeled as 'Gluten Free' in the United States. *J. Food Prot.* **77**, 1830–1833 (2014).
10. Comisi, L. A. & Europeas, D. E. L. A. S. C. Reglamento (CE) N° 41/2009, sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten. 20–22 (2009).
11. www.FACE.COM. (Último acceso 5/06/2017)
12. Sollid, L. M. & Khosla, C. Novel therapies for coeliac disease. *J. Intern. Med.* **269**, 604–613 (2011).
13. Application, F., Data, P. & Corman, E. M. Inve tion T (em ° p r C atu) e. **1**, (2004).
14. González, J. M., García, E., Fernández, J. M., Gago, L. & Benito, J. Técnicas analíticas para la detección de gluten en alimentos. (2007).
15. Yu, A., Shim, K. W. & Chung, S. A. E. D. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B 1 . Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **384**, 286–

294 (2006).

16. Skerritt, J. H. & Hill, A. S. Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1771–1778 (1990).
17. Osman, a a Uhlig, H H Valdes, I Amin, M Méndez, E Mothes, T. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 1189–1193 (2001).
18. Thompson, T. & Méndez, E. Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not Created Equal. *J. Am. Diet. Assoc.* **108**, 1682–1687 (2008).
19. Sorell, Luis López, Juan Antonio Valdés, Israel Alfonso, Patricia Camafeita, Emilio Acevedo, Boris Chirido, Fernando Gavilondo, Jorge Méndez, Enrique *et al.* An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Lett.* **439**, 46–50 (1998).
20. Comino, I. Real, A. de Lorenzo, L. Cornell, H. Lopez-Casado, M. A. Barro, F. Lorite, P. Torres, M. I. Cebolla, A. Sousa, C. Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut* **60**, 915–922 (2011).
21. Manyani, H., Moisés, A., Megías, M., Thomas, C. & Lo, M. C. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main. 405–414 (2008).
22. Inglis, G. *et al.* Molecular Methods to Measure Intestinal Bacteria: A Review. *J. AOAC.* **95**, 5–24 (2012).
23. Miranda-castro, R., Miranda-ordieres, A. J. & Lobo-castañón, M. J. Harnessing Aptamers to Overcome Challenges in Gluten Detection. (2016).
24. Tuerk L., Gold C., Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* **249**, 505-10 (1990).
25. Ellington A.D., Szostak J.W., Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature.* **355**, 850-2 (1992).
26. Ellington A.D., Szostak J.W., In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* **346**, 818-22 (1990).
27. Zhou, J., Batting, M.R., Wang, Y., Aptamer-based molecular recognition for

- biosensor development. *Anal Bioanal Chem.* **398**, 2471-2480 (2010).
28. De-los-Santos-Álvarez, N., Lobo Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tuñón-Blanco, P., Trends in Analytical Chemistry. **27**, 437-446 (2008).
 29. Stoltengurg, R., Reinemann, C. y Strehlitz, SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *B. Biomol. Eng.* **24**, 381-403 (2007).
 30. Tombelli S., Minunni M., Mascini M. Analytical applications of aptamers. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2424-34 (2005).
 31. Patel D.J., Suri A.K., Jiang P., Fan P., Kumar A., Nonin S., Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *J. Mol. Biol.* **272**, 645-64 (1997).
 32. Amaya-gonzález, S De-los-Santos-Álvarez, N Miranda-ordieres, A. J & Lobo-castañón, M. J. Aptamer Binding to Celiac Disease-Triggering Hydrophobic Proteins: A Sensitive Gluten Detection Approach. *Anal. Chem.* **86**, 2733 (2014).
 33. Amaya-gonzález, S., López-lópez, L., Miranda-Castro, R., Miranda-Ordieres, A. J. & Lobo-castañón, M. J. *Anal Chim Acta*. Affinity of aptamers binding 33-mer gliadin peptide and gluten proteins : In fl uence of immobilization and labeling tags. *Anal. Chim. Acta* **873**, 63–70 (2015).
 34. López-López, L., Miranda-castro, R., Miranda-Ordieres, A. J. & Lobo-Castañón, M. J. Disposable electrochemical aptasensor for gluten determination in food. *Sensors and Actuators B : Chemical* **241**, 522–527 (2017).
 35. Amaya-González, S De-los-Santos-Álvarez, N Miranda-ordieres, A. J Lobo-Castañón M. J. Sensitive gluten determination in gluten-free foods by an electrochemical aptamer-based assay. *Anal. Bioanal. Chem.* **407** (2015).
 36. S. Solé, A. Merkoçi, S. Alegret. New materials for electrochemical sensing III. Beads. Trends in Anal Chem. vol.20, no. 2. (2001).
 37. E. Zacco, M.I. Pividori, S. Alegret. Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues. *Anal Chem.* **78**, 1780-8 (2006).
 38. M. Hervas, M. Angel Lopez, A. Escarpa. Electrochemical immunoassay using magnetic beads for the determination of zearalenone in baby food An anticipated analytical tool for food safety. *Analytica Chimia Acta.* **653**, 167-172 (2009).
 39. Pingarrón-Carrazón J.M., Sánchez-Batanero P., Química Electroanalítica

- Fundamentos y Aplicaciones, Editorial Sintesis Madrid (1999).
40. L.Gold, B.Plisky, O. Umlenbeck, M. Yarns. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 763-797(1995).
 41. M. Zuker. M fold web server for nucleic acid foldin and hibrization prediction. *Nucleic Acids Research.* **31**, 3406-3415 (2003).
 42. Daviter, M.A. Williams and T. s.l. Springer, Protein-lingand interactions Fundamentals, in Protein-Ligand Interactions Methods and applications, (2013).
 43. Ellington, W.Xu and A.D. Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 7475–7480. (1976).
 44. M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254 (1976).