



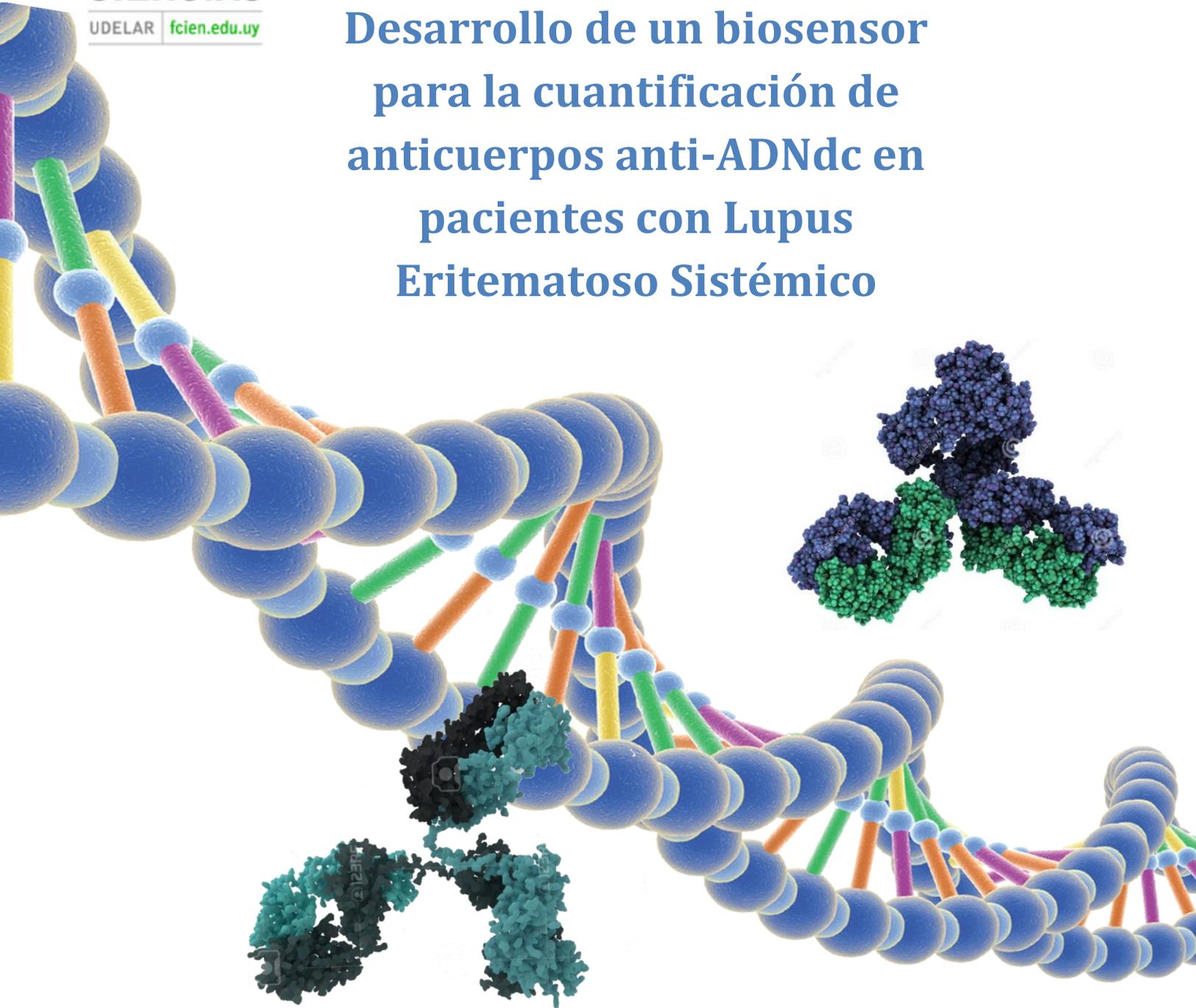
FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy



Centro de
Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias

Desarrollo de un biosensor para la cuantificación de anticuerpos anti-ADNdc en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico



Tutor: Justo Laíz

Pablo Fagúndez

Co-tutor: Gustavo Brañas

Unidad de Bioquímica Analítica-CIN

2015

1

ÍNDICE

RESUMEN	5
1- INTRODUCCIÓN	6
1.1- Generalidades del Lupus Eritematoso Sistémico.	8
1.2- Técnicas para la detección de anticuerpos anti-ADNdc en pacientes con LES.	12
1.3- Estrategias de inmovilización de ADN sobre sistemas de electrodos.	17
1.4- Diseño del sistema.	22
2- OBJETIVOS	26
2.1- Objetivo general:	26
2.2- Objetivos específicos:	26
3- MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1- Instrumental y equipamiento.	27
3.2- Reactivos y soluciones.	28
3.3- Procedimientos.	30
3.3.1- Ensayo de ELISA para detección de anticuerpos anti-ADNdc.	30
3.3.2- Inmovilización y análisis de electrodos pPy/ADN.	34
3.3.3- Inmovilización de ADN mediante el uso de poli-L-lisina.	41
3.3.4- Inmovilización de ADN mediante electrodeposición a potencial constante.	42
3.3.5- Comportamiento electroquímico del TMB sobre electrodos DropSens®.	44
3.3.6- Detección electroquímica de TMBox sobre la superficie de electrodos ADNesp-v/BSA/anticuerpo.	44
4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	45
4.1- ELISA para detección de anticuerpos anti-ADNdc.	45
4.2- Inmovilización de ADN mediante electropolimerización de Py	49
4.2.1- Ensayos con anticuerpos anti-ADNdc sobre electrodos pPy/ADNesp-v.	56
4.2.2- Pruebas no electroquímicas de detección de anticuerpos anti-ADNdc sobre la superficie de los electrodos pPy/ADNesp-v.	64
4.3- Ensayos con poli-L-lisina.	71
4.4- Inmovilización mediante electrodeposición a potencial constante	78
4.4.1- Ensayos con anticuerpos sobre electrodos modificados con ADNesp-v/BSA mediante electrodeposición.	89
4.5- Comportamiento electroquímico del TMB sobre electrodos de carbono.	91
4.6- Detección electroquímica del TMBox.	93

5- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	101
6- AGRADECIMIENTOS	102
7- BIBLIOGRAFÍA	103

RESUMEN

Dentro de la Química Analítica moderna y particularmente en la rama de Biosensores, el desarrollo de los electrodos modificados tiene una vital importancia en el momento de diseñar dispositivos sencillos capaces de detectar la interacción entre moléculas biológicas. Los estudios previos desarrollados por la Unidad de Bioquímica Analítica en relación al diseño de inmunosensores amperométricos y electrodos modificados de ADN, plantean la posibilidad de desarrollar un electrodo modificado para la detección de anticuerpos anti-ADN de doble hebra (ADNdc) capaz de ser implementado, en un futuro, en el seguimiento de los empujes del Lupus Eritematoso Sistémico. Para alcanzar dichos objetivos, se evaluaron tres métodos de inmovilización de ADNdc, sobre electrodos serigrafados de carbono grafito, (screen-printed), comerciales de la firma DropSens®: 1-coinmovilización de pirrol y ADNdc, 2-adsorción física mediante poli-L-lisina, y 3-adsorción a potencial constante. La detección de los autoanticuerpos anti-ADNdc se determinó mediante ensayos electroquímicos y colorimétricos sobre la superficie de los electrodos. Los resultados mostraron que el mejor desempeño se obtuvo mediante la inmovilización de ADNdc a un potencial de +0.5 V, y un sistema de detección amperométrica del producto de la oxidación del sustrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB), a un potencial de -0.1 V. El sistema a su vez, fue capaz de responder de forma específica a la presencia de anti-ADNdc en muestras de laboratorio, sentando las bases para futuras investigaciones tendientes al desarrollo de un dispositivo, económico, automatizable y miniaturizable, capaz de ser empleado en medidas de rutina, con muestras reales de pacientes con LES y de tipo “*point of care*”.

Palabras clave: Lupus Eritematoso Sistémico; anti-ADNdc; biosensores; amperometría; análisis “point of care”.

1- INTRODUCCIÓN

El monitoreo de biomarcadores es un elemento crucial en el seguimiento y control de las enfermedades clínicas. Numerosas aproximaciones técnicas y metodológicas han sido desarrolladas para la detección de anticuerpos en muestras de pacientes. Generalmente, los ensayos en fase sólida dominan el campo de los inmunoensayos, los cuales implican muchas veces un tiempo considerable de análisis, el uso de equipos no portátiles y muchas veces costosos, y un esfuerzo técnico importante para obtener, interpretar y reportar los resultados¹. Es así que surge la necesidad de instrumentar la realización de ensayos de tipo “point of care” (POCTs) para el seguimiento de patologías ya diagnosticadas de forma rápida, in situ, sin requerir de una infraestructura adicional y que a su vez resulten de lectura directa para el paciente, sin necesidad de conocimientos técnicos profundos para la interpretación de los resultados².

Así, los biosensores surgen como una prometedora herramienta de detección de analitos tanto en el campo clínico, como en el industrial y ambiental. De acuerdo con la definición de IUPAC, el término biosensor se aplica para definir un dispositivo analítico que incorpora un elemento de reconocimiento biológico asociado a un transductor fisicoquímico, el cual en presencia de un determinado analito produce una señal eléctrica discreta o continua³. Dicha señal es de carácter proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra problema. Gracias a esta propiedad, los mencionados dispositivos permiten la cuantificación de una inmensa variedad de moléculas biológicas, según el diseño funcional del mismo y basados en el reconocimiento biológico sobre la superficie del sensor, que provoca cambios en la señal registrada⁴. La forma en la cual dicha interacción se transduce a una señal medible depende fundamentalmente del diseño del dispositivo, existiendo técnicas basadas en principios electroquímicos, mecánicos, térmicos o incluso ópticos (Ver figura 1)⁵. Es de particular interés el desarrollo de biosensores de base electroquímica, dadas sus múltiples ventajas frente a otros métodos existentes, destacando su alta sensibilidad y

selectividad, el rápido tiempo de respuesta, así como la ausencia de pretratamiento de las muestras, características que hacen óptimo este sistema de detección para ser utilizados en análisis de tipo POCTs. Sumado a esto y en combinación con los avances de la electrónica, los biosensores de base electroquímica ofrecen la posibilidad de miniaturización y automatización, lo que los hace compatibles con la producción en masa y a bajo costo ⁶.

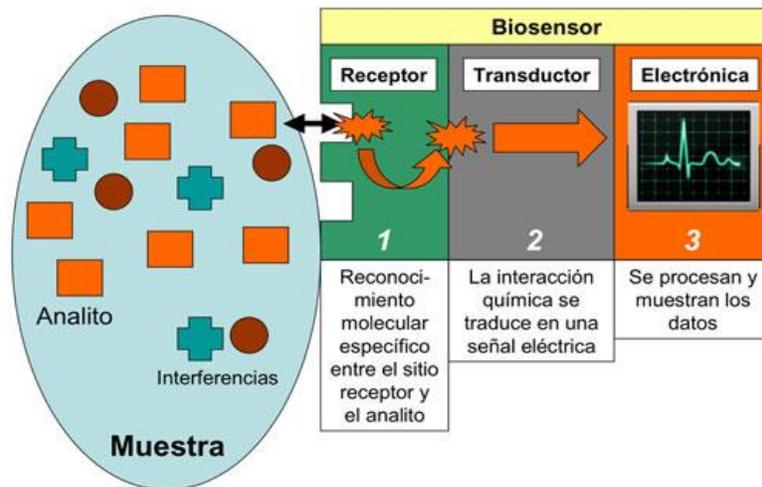


Figura 1. Esquema general de un biosensor ⁷.

El ejemplo más conocido, utilizado y comercializado de biosensor de base electroquímica lo constituye el glucosímetro empleado para la determinación de glucosa en pacientes diabéticos. Su funcionamiento básico, se basa en la medición amperométrica del peróxido generado por la enzima glucosa oxidasa inmovilizada covalentemente a la superficie de un electrodo, la cual utiliza como sustrato la glucosa presente en la sangre del paciente ⁸.

Cuando el biosensor emplea como elemento de reconocimiento la reacción antígeno-anticuerpo y esta reacción es acoplada a un transductor, se está en presencia de un inmunosensor. La base de los mismos es similar a los inmunoensayos y se basa en la especificidad del reconocimiento molecular de los antígenos por sus anticuerpos formando un complejo estable. Así, este método surge como un sistema de

inmunoensayo continuo, aplicado al campo clínico, la industria alimenticia y ambiental, y es considerado uno de los desarrollos más aplicables en el campo de la inmunoquímica^{9,10}. A pesar de que existen muchos trabajos sobre estos biosensores inmunológicos aplicados al área de la salud, existen, al momento, muy pocas aplicaciones comerciales debido, en parte, a cuestiones relacionadas con la inmovilización, orientación y propiedades específicas, tanto de anticuerpos como de antígenos sobre la superficie de los transductores y los inconvenientes derivados del análisis de muestras reales, de mayor complejidad.

1.1- Generalidades del lupus eritematoso sistémico.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad reumática autoinmune crónica de etiología desconocida que afecta a más de un millón de personas cada año. Se caracteriza por una hiperactividad de linfocitos T y B, desarrollándose anticuerpos dirigidos contra componentes propios (autoanticuerpos), entre los cuales son característicos los anti-estructuras nucleares, y defectos en la remoción de células apoptóticas y complejos inmunológicos¹¹. Es una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes, desarrollándose en la mayoría de los pacientes entre los 15 y 45 años, afectando sobre todo a mujeres en edad reproductiva; las estadísticas muestran que, por cada 9 mujeres, solamente un hombre padece LES. La enfermedad tiene una prevalencia de 40 a 200 cada 100000 habitantes, siendo más frecuente en poblaciones urbanas y en individuos con descendencia afro-caribeña.¹²

Como lo indica su nombre, es una enfermedad sistémica que puede causar daño en casi cualquier órgano y sistema del cuerpo. Durante su curso, la enfermedad puede provocar síntomas tan disímiles como eritemas en “ala de mariposa” o discoides (malar and discoid rash), inflamación y dolores articulares, pérdida de peso, problemas gastrointestinales, fiebre, úlceras orales y pleuritis, siendo una de las manifestaciones más serias la nefritis causada por LES^{12,13,14}. Dado que los síntomas no son específicos de la enfermedad, pueden aparecer lentamente y no presentarse todos al mismo tiempo, el diagnóstico de LES se hace muy difícil. Sumado a esto, la

enfermedad se caracteriza por periodos de empuje y remisión que complican aún más la identificación de la misma ¹⁵. Es por ello que el American College of Reumatology (ACR en inglés) estableció once criterios que buscan facilitar el diagnóstico de la enfermedad, empleándose como parámetro para confirmar la presencia de LES, el cumplimiento de 4 o más de los mismos, ya sea en secuencia o simultáneamente, durante cualquier intervalo de observación ^{12,14} (Ver tabla 1).

Tabla 1. Criterios empleados para el diagnóstico de LES, sugeridos por el ACR, actualizados al año 1997 ^{12,14,16}.

	Síntoma	Descripción
1	Erupción malar	<ul style="list-style-type: none"> • Eritema fijo, plano o alto, sobre las eminencias malares, que no suele afectar los surcos nasogenianos.
2	Erupción discoide	<ul style="list-style-type: none"> • Placas eritematosas altas, con descamación queratósica adherente y tapones foliculares; puede haber cicatrices atróficas en las lesiones más antiguas.
3	Fotosensibilidad	<ul style="list-style-type: none"> • Erupción cutánea a causa de una reacción insólita con la luz solar, referida por el paciente u observada por el médico.
4	Úlceras bucales	<ul style="list-style-type: none"> • Ulceración nasofaríngea, indolora, observada por un médico.
5	Artritis	<ul style="list-style-type: none"> • Artritis no erosiva que afecta a dos o más articulaciones periféricas caracterizada por dolor a la palpación, tumefacción o derrame.
6	Serositis	<ul style="list-style-type: none"> • Pleuritis: antecedente de dolor pléurico, o signos de derrame pleural. • Pericarditis: comprobada por electrocardiograma, o signos de derrame.
7	Trastorno renal	<ul style="list-style-type: none"> • Proteinuria persistente mayor a 0,5 g/día o mayor de 3+ si no se ha cuantificado.

		<ul style="list-style-type: none"> • Cilindros celulares.
8	Trastorno neurológico	<ul style="list-style-type: none"> • Convulsiones o psicosis. Ambas en ausencia de tratamiento farmacológico o alteraciones metabólicas conocidas.
9	Trastorno hematológico	<ul style="list-style-type: none"> • Anemia hemolítica. • Leucopenia. • Linfopenia. • Trombocitopenia.
10	Trastorno inmunitario	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-ADNdc: título anormal de anticuerpos contra ADN doble cadena nativo. • Anti-Sm (antiSmith): presencia de anticuerpos contra antígeno nuclear Sm. • Anti-fosfolípidos: presencia de anticuerpos antifosfolipídicos con falso positivo en prueba serológicas de Sífilis.
11	Anticuerpo antinuclear	<ul style="list-style-type: none"> • Título anormal de anticuerpo antinuclear(ANA)

No se conocen claramente las causas de la enfermedad, se maneja la hipótesis de que, como en muchas otras patologías autoinmunes, el LES es desencadenado por estímulos externos en individuos genéticamente susceptibles. La marcada diferencia entre individuos de sexo diferente y la edad frecuente de aparición en mujeres, sugieren que existe una fuerte influencia hormonal en el desarrollo de la enfermedad ¹².

Sobre el origen genético, muchos trabajos coinciden en que los genes implicados podrían ser los del sistema HLA y/o alteraciones en los genes de los componentes del complemento, pero no existen aún estudios que lo confirmen para todos los casos ^{12,17}.

En cuanto a los factores hormonales, algunos estudios realizados en ratones mostraron que la administración de andrógenos revierte el desarrollo de la enfermedad, mientras que el suministro de estrógenos y progesterona la aceleró y desencadenó la muerte de

los individuos. Sin embargo, los resultados han sido variables en estudios que relacionaron el consumo de píldoras anticonceptivas y LES. Algunas drogas pueden inducir el LES en pacientes susceptibles, y además la exposición a radiación UV puede exacerbar el daño cutáneo y sistémico¹².

Se han descrito cientos de autoanticuerpos contra antígenos propios en pacientes con LES, aunque no todos presentes en un mismo momento ni en todos los casos y, a su vez, no todos presentan relevancia clínica; entre ellos, se pueden mencionar anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos, antígenos de membrana, anti-fosfolípidos, y anticuerpos contra componentes del tejido nervioso^{18,19}. Los anticuerpos antinucleares (ANA) aparecen en casi todos los casos (prevalencia mayor a 95%), pero no son específicos de LES, surgiendo también en otras enfermedades reumáticas e infecciosas; particularmente aparecen aumentados los anticuerpos anti-nucleosoma (grupo dentro del cual se engloban anticuerpos anti-histona, anti-ADNdc entre otros) apareciendo los mismos en la mayoría de los casos. En particular, se ha encontrado una fuerte correlación entre los anticuerpos anti-ADNdc y el LES, siendo un importante marcador de la patología, dado que no aparece con frecuencia en otras enfermedades reumáticas^{19,20}. En un estudio de perfiles de anticuerpos llevado a cabo en 401 pacientes, se mostró que la prevalencia de anticuerpos anti-ADNdc es del 61%^{12,18}. Es importante aclarar que, normalmente, se encuentran ANAs circulantes en concentraciones bajas en personas sanas, pudiendo aumentar su título por procesos infecciosos; por ello, la sola presencia de los mismos en títulos altos no es prueba suficiente de diagnóstico de una patología autoinmune por lo que y se debe acompañar con el seguimiento clínico del paciente, considerando los criterios del ACR. En particular, no todos los anti-ADNdc son patológicos; algunos estudios han determinado que la patogenicidad se relaciona con los anticuerpos de la clase IgG, en particular IgG1 e IgG3 y su habilidad de activación de la vía del complemento²¹.

Así, los ANAs, y en particular los anticuerpos anti-ADNdc, han sido empleados como herramienta de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, de acuerdo a las recomendaciones del ACR, para lo cual han surgido varias aproximaciones metodológicas para su determinación²².

1.2- Técnicas para la detección de anticuerpos anti-ADNdc en pacientes con LES.

Una de las técnicas más antiguas de cuantificación de anticuerpos anti-ADNdc, es el radioinmunoensayo (RIA), más específicamente, el ensayo de Farr. El mismo consiste en tratar a las muestras de suero de pacientes, con ADNdc marcado radiactivamente, y luego precipitar los complejos ADNdc/anti-ADNdc, en presencia de sales. La detección de los niveles de radiación permite por tanto cuantificar la cantidad de anticuerpos. Si bien esta técnica fue usada como referencia durante muchos años, la necesidad de trabajar con materiales radiactivos, y de contar con una infraestructura especializada para ello, han llevado a que muchos laboratorios ya no realicen el ensayo ²³.

La técnica de referencia empleada desde la década de los 50s, para la detección y semicuantificación de autoanticuerpos antinucleares se basa en la inmunofluorescencia indirecta (IFI) en donde un anticuerpo conjugado a una molécula fluorescente sirve como marcador de las reacciones antígeno-anticuerpo (luego de la incubación con suero del paciente) que tienen lugar sobre una superficie de un sustrato colocado sobre una lámina ^{24,25}.

El sustrato más empleado en kits comerciales, y con el que se han obtenido mejores resultados, es la célula epitelial humana (HEp-2), aunque existen otros, como las células de riñón y estómago de ratón, o el hemoflagelado *Crithidia lucilliae*; este último se utiliza únicamente para detectar anticuerpos anti-ADNdc por tinción del kinetoplasto ²⁶.

La técnica que emplea células HEp-2 presenta varias ventajas, entre ellas, que se trata de una línea celular de humano, con una alta concentración de antígenos y el gran tamaño de sus núcleos, lo que hace más fácilmente visualizables los patrones de fluorescencia ²⁷. Con esta técnica, se determina un título y un patrón de fluorescencia sobre el sustrato (más de 40 patrones diferentes en la actualidad); patrones específicos están asociados a la presencia de determinados autoanticuerpos contra determinadas estructuras celulares (Ver figura 2), pero no existe acuerdo sobre la nomenclatura de estos patrones, y menos aún qué patrones han de ser considerados y cuáles no.

Sumado a esto, el patrón observado debe hacerse con cautela, conllevando una fuerte dependencia con la experiencia del observador que analiza la muestra ^{27,28}. Al mismo tiempo, hay que considerar las diferencias en los resultados que se obtienen al emplear diferentes kits, diferentes operarios y diferentes microscopios, que pueden dar lugar a títulos y patrones distintos, lo que constituye la principal desventaja de este método clínico.

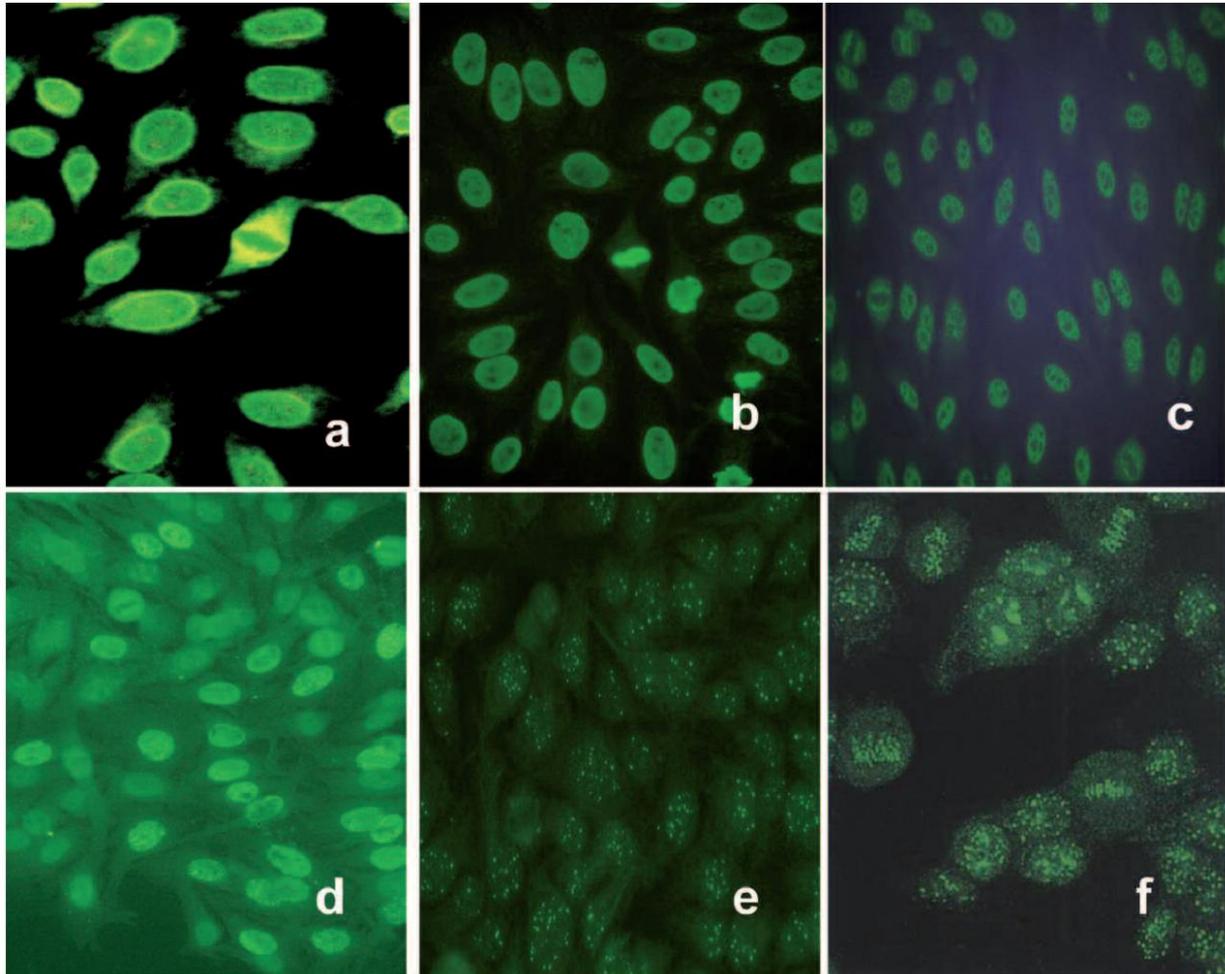


Figura 2. Patrones de fluorescencia nucleares: a) periférico, b) homogéneo, c) moteado, d) pleomórfico, e) puntos nucleares, f) centromérico ²⁷.

El título es definido como la máxima dilución de suero que permite detectar determinado patrón y nivel de fluorescencia; individuos con patologías autoinmunes tienden a presentar títulos de moderados (1/160-1/320) a altos (1/640) mientras que los sanos presentan bajos títulos (1/80) aunque tampoco existe consenso sobre este valor.

Como complicación extra, individuos sanos o con patologías no autoinmunes pueden mostrar la presencia de un determinado patrón de fluorescencia, por ello es importante que las muestras positivas se sometan a técnicas de detección más específicas, buscando autoanticuerpos específicos de LES, apoyado por evidencia clínica de patología autoinmune sistémica ^{28,29}. Es por ello que muchos grupos de investigación y empresas se han encaminado a desarrollar inmunoensayos de fase sólida para detección de ANA y ANAs específicos, buscando obtener técnicas más económicas, sencillas, rápidas y fáciles de estandarizar en comparación con la técnica IFI. Dentro de estos ensayos se emplea la técnica de ELISA (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) donde se sensibiliza la placa con componentes de células HEp-2, ADN genómico humano (ADNg), ADN bacteriano y más recientemente con antígenos recombinantes y sintéticos, lo que le confiere mayor especificidad a la técnica ^{23,30,31}. En la actualidad existen variedad de kits y protocolos diseñados para la cuantificación y detección de anti-ADNdc, los cuales difieren en el tipo de ADN empleado, y en la estrategia de inmovilización del antígeno a la placa de ELISA. Dado que el ADNdc no es capaz de adsorberse directamente a la placa de ELISA, se han empleado diversas estrategias como ser la preincubación de las placas con moléculas policationicas como la poli-L-lisina y protamina, recubrimientos con seroalbúmina bovina metilada (BSA) o tratamientos previos de las placas con radiación UV ^{32,33,34}. Otras estrategias más complejas implican la síntesis de ADN biotinilado en 5' que es luego incubado en placas recubiertas con streptavidina, obteniéndose así resultados más reproducibles y con menor número de falsos positivos ^{34,35}.

Igualmente, los resultados obtenidos discrepan entre un procedimiento y otro, en parte debido a la gran heterogeneidad de ADNs y a las estrategias de inmovilización empleadas, a la diversidad de tamaños y estado conformacional de los antígenos, que pueden desfavorecer la interacción antígeno-anticuerpo, o a la contaminación con ADNsc, lo cual conlleva la obtención de resultados falsos positivos ²³. Además, por las características del ensayo, se requiere un laboratorio con equipamiento especializado, y largos tiempos de análisis, lo cual hace a la metodología poco aplicable al análisis de tipo POCT ³⁶.

Las estrategias más modernas de análisis se basan en el sistema Luminex xMAP[®] Technology, el cual emplea microesferas de 5.5 μm de diámetro, recubiertas con ADNdc, conteniendo en su interior colorantes fluorescentes. Dichas microesferas se incuban en primer lugar con la muestra de suero y luego con un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo. Posteriormente, se pasan a través de un citómetro, donde, tanto el colorante interior como el fluoróforo son excitados, detectándose luego la intensidad de la emisión. Este sistema permite detectar y semicuantificar una gran variedad de analitos en una misma muestra, siendo factible de emplearse para la elaboración de un perfil de anticuerpos del paciente, mediante el empleo de sets de microesferas recubiertas con diferentes antígenos, y conteniendo diferentes colorantes internos. El sistema es completamente automatizado, y permite obtener resultados comparables al ensayo de ELISA en un tiempo menor, pero requiere equipamiento costoso y es de difícil aplicación para el análisis fuera de un laboratorio^{23,37,38,39}.

En cuanto al desarrollo de biosensores para la cuantificación y detección de anti-ADNdc, se reportaron algunos trabajos en la literatura científica en donde se emplea el análisis por micro balanza de cuarzo, espectroscopía de impedancia eléctrica y la técnica de espectroscopía de resonancia plasmónica (SPR). Si bien son métodos sensibles y reproducibles, requieren equipamiento costoso e implican una infraestructura de laboratorio para su realización. En tanto, poco se ha hecho en relación a técnicas más específicas relacionadas al análisis del tipo POCT^{40,41-43}.

Son de particular interés en este trabajo, los biosensores de base electroquímica, dadas las características destacadas al comienzo de esta introducción. Dentro del área de los inmunosensores desarrollada en la Unidad de Bioquímica Analítica, la MSc. Tamara Laube en su tesina de grado plantea los primeros pasos en la creación de un biosensor de base electroquímica, capaz de detectar la interacción de anticuerpos contra estructuras nucleares. En dicha tesis, se plantea el estudio de autoanticuerpos contra ADNdc en sueros de pacientes que presentan Lupus Eritematoso Sistémico. En ésta, se establece un modelo de electrodo modificado capaz de detectar y cuantificar la presencia de anticuerpos anti-ADNdc planteando la construcción de un biosensor de base electroquímica mediante el empleo de un electrodo de carbono grafito como

conductor electrónico ¹⁶. Sobre la superficie del mismo, y con un pretratamiento ya establecido, se inmoviliza conjuntamente ADNdc (genómico y de 800 pares de bases en ensayos diferentes) junto con peroxidasa de rábano (HRP), verificándose su pegado por métodos electroquímicos donde se destacan la voltamperometría cíclica (VC) con una cupla redox, no electroquímicos como ser la medida del ángulo de contacto y tinción con bromuro de etidio. En este sistema, lo que se plantea es que el reconocimiento de anticuerpos contra ADNdc imposibilita el acceso de hidroquinona a la superficie del electrodo y por tanto se reduce la oxidación a quinona por la enzima HRP, por lo que a mayor título de anticuerpos, menor será la quinona generada enzimáticamente y por lo tanto se observará un menor registro de corriente de reducción de la misma sobre el electrodo de trabajo a un potencial establecido en +35 mV contra un electrodo de referencia Ag/AgCl. El resto de las condiciones de trabajo, como ser concentraciones de sustrato y co-sustrato, así como también concentración de ADNdc utilizado, fueron establecidas en dicho estudio por la Msc. Laube. Los métodos empleados para corroborar dicha hipótesis son la VC junto con mediciones amperométricas a potencial constante. Los resultados obtenidos, si bien fueron alentadores, resultaron poco reproducibles y no fueron concluyentes en términos de optimización y validación. Un sistema similar fue propuesto en los trabajos de Gennady Evtugyn, empleando además de HRP, la enzima colinestearasa ⁴⁴. En el mismo año, fue publicado un trabajo en donde la interacción anti-ADNdc/ADNdc es detectada mediante el análisis de la corriente de reducción de complejos de Pt(II). Los resultados muestran que el aumento de la concentración de anti-ADNdc origina una disminución de la corriente catódica, registrada a un potencial de -1.2 V (vs electrodo de calomelanos) ⁴⁵.

Dos trabajos recientes plantean el desarrollo de un dispositivo electroquímico portátil para la detección rápida de anticuerpos anti-cromatina/anti-ADNdc en muestras de suero de pacientes con LES ^{46,47}. El sistema diseñado por los autores es similar al empleado en la técnica de ELISA; sobre una membrana porosa de fluoruro de polivilideno, se inmoviliza un polímero de fenilalanina/lisina, y sobre éste, por simple adsorción física, cromatina despojada de la histona H1. La formación del complejo de reconocimiento es favorecida haciendo pasar la solución de suero a través de la

membrana, mediante la aplicación de un vacío con bomba peristáltica y detectada mediante la incubación con un anticuerpo secundario, anti-humano IgG conjugado a una peroxidasa. El producto de la catálisis enzimática es detectado en tiempo real en un sistema de tres electrodos que funciona como transductor. Luego de las etapas de incubación, lavado con la muestra de suero y los anticuerpos secundarios, se agrega una solución de peróxido y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), el sustrato primario y secundario de la enzima, respectivamente. Lo que se detecta es la reducción electroquímica del TMB oxidado (TMB_{ox}) producto de la catálisis enzimática, mediante la técnica de amperometría de pulso intermitente, que logra amplificar la señal de salida. En dicho trabajo, se comparan también los resultados obtenidos mediante un ensayo convencional de ELISA, y los obtenidos mediante el uso del biosensor para 30 muestras de pacientes con LES, obteniéndose una fuerte correlación entre ambas técnicas, indicando que ambos ensayos presentan sensibilidad y selectividad comparables, destacándose el método electroquímico, ya que es factible la fabricación de un dispositivo manual y portátil. Además, se suma el hecho de la reducción del tiempo de análisis en comparación con el del ensayo de ELISA.

1.3- Estrategias de inmovilización de ADN sobre sistemas de electrodos.

Un punto clave en la construcción de un biosensor es la correcta inmovilización del elemento de biorreconocimiento. La sensibilidad y selectividad del dispositivo se verán afectadas por el porcentaje de recubrimiento superficial, la orientación espacial, estabilidad y reactividad de las moléculas inmovilizadas, así como también por la capacidad del método empleado de minimizar la adsorción no específica ⁴⁸. Este punto merece por lo tanto una breve exposición de algunas de las estrategias de inmovilización más aplicadas.

Uno de los métodos más simples, es la adsorción física a la superficie de los electrodos. El método consiste en poner en contacto la solución de ADN y el transductor (por lo general se realiza una incubación durante tiempo prolongado y con agitación) de forma que el ADN se adsorba por interacciones físicas. La adsorción puede ser más drástica si se deja secar el volumen de solución de ADN. Las

principales desventajas de este método son la posibilidad de desorción del ADN y la unión del mismo a múltiples sitios de la superficie, lo cual podría ocasionar cambios conformacionales que alteren el reconocimiento por los anti-ADNdc⁵. Se han reportado casos en donde la adsorción se favorece, mediante interacciones iónicas entre las cargas negativas del ADN, y cargas positivas resultantes del recubrimiento de la superficie con ciertas moléculas. Entre las moléculas más empleadas se destacan, el sulfato de protamina, la poli-L-lisina, y el quitosán, todas moléculas poliméricas con una alta densidad de carga positiva^{48,32}. Fue explicado anteriormente el empleo de las dos primeras en ensayos de ELISA para detección de anti-ADNdc, pero se han reportado pocos trabajos relacionados a su uso en la superficie de electrodos, entre los cuales se destacan los de Konstantinov y Rubin, donde el ADN se adsorbe sobre membranas preincubadas con polímeros de fenilalanina/lisina, las cuales se colocan posteriormente sobre los electrodos^{1,49}. La ventaja de la adsorción radica en el hecho de no requerir la funcionalización previa de la molécula de ADN. La estabilidad y reproducibilidad de las moléculas inmovilizadas, puede aumentarse mediante el entrecruzamiento con moléculas de glutaraldehído^{16,45}.

La adsorción también puede realizarse aplicando un potencial positivo (+0.5 V vs Ag/AgCl) a la superficie del electrodo, el cual incrementa la estabilidad de la unión al existir una atracción electrostática importante entre la superficie del electrodo y el ADN, en su carácter de polianión. Este procedimiento normalmente requiere el pretratamiento electroquímico de la superficie del electrodo, de forma de incrementar la hidrofobicidad y rugosidad de la superficie. La desventaja de este procedimiento radica en el hecho de que el recubrimiento no se realiza en la totalidad de la superficie, ocasionando problemas de pegado inespecífico, por lo que de emplearse para ensayos inmunológicos requiere una etapa de bloqueo^{48,5}. Esta estrategia ha sido muy desarrollada para la construcción de biosensores para la detección de pequeñas moléculas capaces de interactuar con el ADNdc, y para el análisis de fenómenos de oxidación de las bases nitrogenadas⁵⁰⁻⁵¹.

La inmovilización por unión covalente, es una de las técnicas más elegantes y con la que se obtienen mejores resultados. Para el caso de electrodos de oro, el

procedimiento de quimioadsorción es uno de los más indicados, basándose en la fuerte afinidad de los grupos tiol y oro. La estrategia generalmente consiste en modificar el ADN en su fosfato del extremo 5' con un grupo mercaptohexil, y luego incorporarlo en una monocapa autoensablada (SAM) formada sobre la superficie de oro. Cuando el transductor es de carbono, las estrategias de inmovilización implican la modificación de la superficie con grupos carboxilo o amino, los cuales son capaces de unirse posteriormente a la guanina o al extremo 5' o 3' del ADN. Estos procedimientos, si bien ofrecen la ventaja de controlar la orientación de la molécula, el grado de recubrimiento de la superficie, y la estabilidad del ADNdc, requieren el empleo de varios reactivos y moléculas de ADN funcionalizadas^{48,5,52,53}. Un ejemplo del empleo de estas estrategias en inmunoensayos, es el trabajo de Guangyu Shen, donde se emplea un ADN modificado con tioles y ác. Mercaptopropiónico para la formación de una SAM⁴¹.

De especial interés en este trabajo es la inmovilización en matrices poliméricas conductoras. Los polímeros conductores (CPs) producidos a partir de la década de los 70, son materiales orgánicos que exhiben propiedades eléctricas y ópticas similares a algunos metales y semiconductores inorgánicos, pero también presentan otras propiedades atractivas como ser la facilidad de síntesis y procesamiento⁵⁴. Los CPs muestran baja conductividad en la forma neutra, en cambio el aumento de la conductividad resulta de la formación de transportadores de carga, después del proceso de oxidación o reducción de sus enlaces conjugados⁵⁵. Algunos CPs simples como la polianilina (PANI) y el polipirrol (pPy) entre otros, pueden ser sintetizados química o electroquímicamente en un sistema de tres electrodos. Debido a su conductividad relativamente alta en estados oxidados o dopado con iones, estos polímeros han encontrado una potencial aplicación en el desarrollo de biosensores electroquímicos, dado que presentan la habilidad de atrapar biomoléculas formando films, aumentan la eficiencia de la transferencia de carga en biorreacciones que puedan desarrollarse sobre la superficie del electrodo, son fáciles de sintetizar y muy versátiles, dado que sus propiedades pueden ser moduladas, variando las moléculas que quedan atrapadas o los iones usados como dopantes. Sumado a esto, se encuentra el hecho de que son relativamente baratos y fáciles de sintetizar electroquímicamente sobre la superficie de los electrodos, aumentando enormemente la superficie de los mismos⁵⁴.

Debido a que es capaz de mantener la electroactividad incluso a pH neutro, en el cual se realizan la mayoría de las medidas que involucran componentes biológicos, el pPy ha sido preferido para el desarrollo de este trabajo. Además, en la Unidad, se cuenta con una vasta experiencia en la inmovilización de ADNdc y ADNsc en matrices pPy. La síntesis electroquímica es sencilla, realizándose en un sistema de tres electrodos, ya sea a potencial constante (+0.7 V) o mediante voltamperometría cíclica (10 ciclos contiguos entre -0.7 V y +0.7 V)^{56,57}. Este protocolo de síntesis fue descrito por primera vez por Wang et al, y consiste en el dopaje del pPy por las moléculas de ADN, cuando éstas se encuentran como las únicas moléculas presentes en la solución de polimerización, incorporándose como contra-iones durante el crecimiento del polímero⁵⁸. La oxidación del monómero de Py origina un radical catión, que rápidamente reacciona con otro radical o monómero neutro para obtener un dímero, que luego es oxidado⁵⁹.

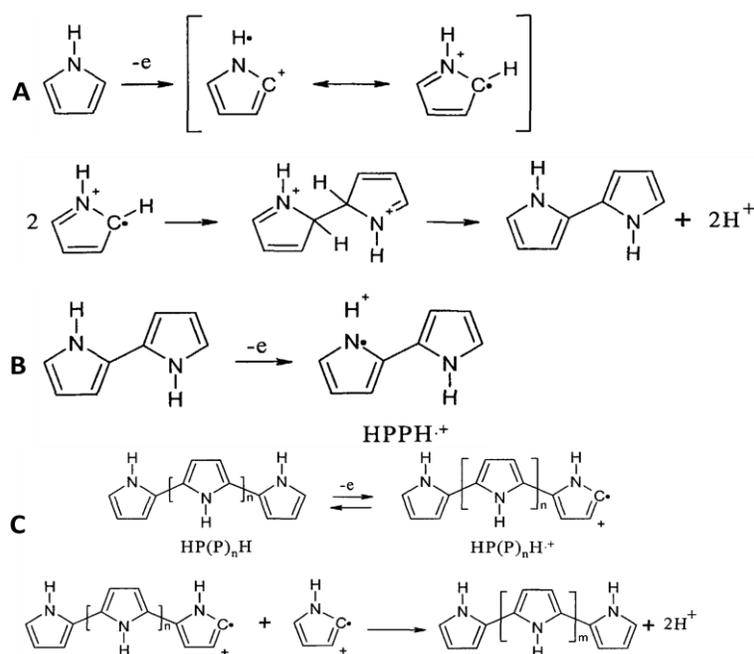


Figura 3. Mecanismo de oxidación del Py. **A.** Inicialización. **B.** Propagación. **C.** Terminación⁶⁰.

Estos polímeros conductores están siendo utilizados más frecuentemente para la inmovilización de ADN como sonda y como transductores de señal en dispositivos de

base electroquímica ⁵⁷. El tamaño y la naturaleza del dopante (ADNdc en este caso), determina la porosidad y estructura del polímero que puede llegar a representar hasta un 30 % del peso del mismo. El MSc. Tosar, docente de la Unidad de Bioquímica Analítica en su tesis de grado, inmovilizó secuencias monocatenarias de ADN sobre electrodos de oro utilizando la electropolimerización de pirrol y utilizando el ADN como dopante, con el objetivo de desarrollar un genosensor capaz de detectar hibridación de ADN ⁶¹. Más recientemente, se han reportado resultados de trabajos relacionados a la construcción de macro y microelectrodos pPy/ADN y el estudio de los efectos catalíticos de las moléculas de ADN en el crecimiento del film de polipirrol. Como resultado, se ha obtenido que el crecimiento de pPy es drásticamente afectado por la presencia de guanina en el ADN usado como sonda, así como por la presencia de ADNdc o ADNsc ⁵⁷.

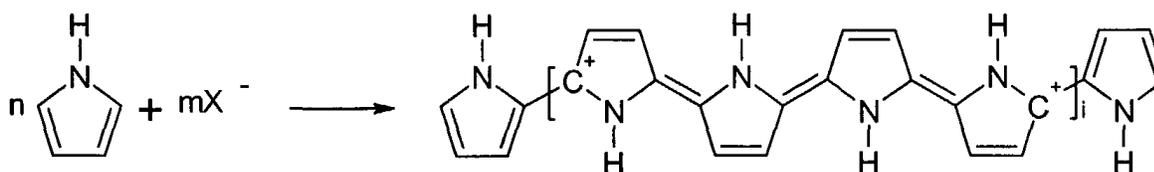


Figura 4. Representación del proceso de copolimerización de Py y un anión genérico ⁶⁰.

Como última metodología de inmovilización, se destaca el uso del sistema avidina (o streptavidina)-biotina. La avidina y la streptavidina son grandes proteínas tetraméricas (70 KDa) que presentan 4 sitios de unión idénticos, a los cuales es capaz de unirse, con alta afinidad, la biotina. Esto permite la construcción de “sandwiches” moleculares, donde la avidina unida a una superficie puede acoplarse a ADN biotinilado. La estabilidad del complejo lo hace fácilmente manejable, pero la capa de avidina puede promover la adsorción inespecífica y alterar la sensibilidad y selectividad del biosensor ⁵. Éste es uno de los métodos con el que se obtienen mejores resultados, pero requiere varias etapas de incubación, además de la síntesis de ADNdc biotinilado.

1.4- Diseño del sistema.

En este trabajo, se optó por evaluar tres de las estrategias de inmovilización mencionadas anteriormente, en la elaboración de un biosensor capaz de detectar anticuerpos anti-ADNc en muestras de laboratorio, a saber:

1. Inmovilización mediante electropolimerización de Py
2. Inmovilización mediante adsorción sobre electrodos preincubados con poli-L-lisina
3. Inmovilización mediante adsorción a potencial constante.

La adsorción física directamente a la superficie de los electrodos no fue tenida en cuenta debido a las desventajas ya mencionadas, mientras que las estrategias de inmovilización covalente, e inmovilización mediante sistema avidina-biotina, no se consideraron viables, dada la necesidad de reactivos especiales (de los cuales no se disponía) y la cantidad de etapas del procedimiento. Un especial interés presentó la estrategia de copolimerización con Py, en parte debido a la falta de aplicación de dicho sistema en la construcción de inmunosensores y a que brindó la posibilidad de aplicar los conocimientos acumulados en la Unidad en trabajos previos, en una nueva línea de investigación.

La finalidad del presente trabajo fue inmovilizar ADN sobre la superficie de electrodos de carbono, serigrafiados y detectar, mediante una señal electroquímica, la presencia de anticuerpos anti-ADNdc incubados sobre los mismos. Para la detección electroquímica de los anticuerpos, se plantearon dos estrategias diferentes:

1. Detección mediante el empleo de una cupla redox.
2. Registro de la corriente de reducción de la especie oxidada del TMB (TMBox)

En primer lugar, se planteó que la presencia de anticuerpos sobre el electrodo, afectaría el intercambio de electrones de una cupla redox, con lo cual, los picos de intensidades de corriente de oxidación/reducción de la misma, registrados mediante VC mostrarían variaciones, en función de la cantidad de anticuerpo unido, debido a la

imposibilidad de acercamiento a la superficie del electrodo. Este sistema de detección se evaluó únicamente para la técnica de inmovilización empleando pPy.

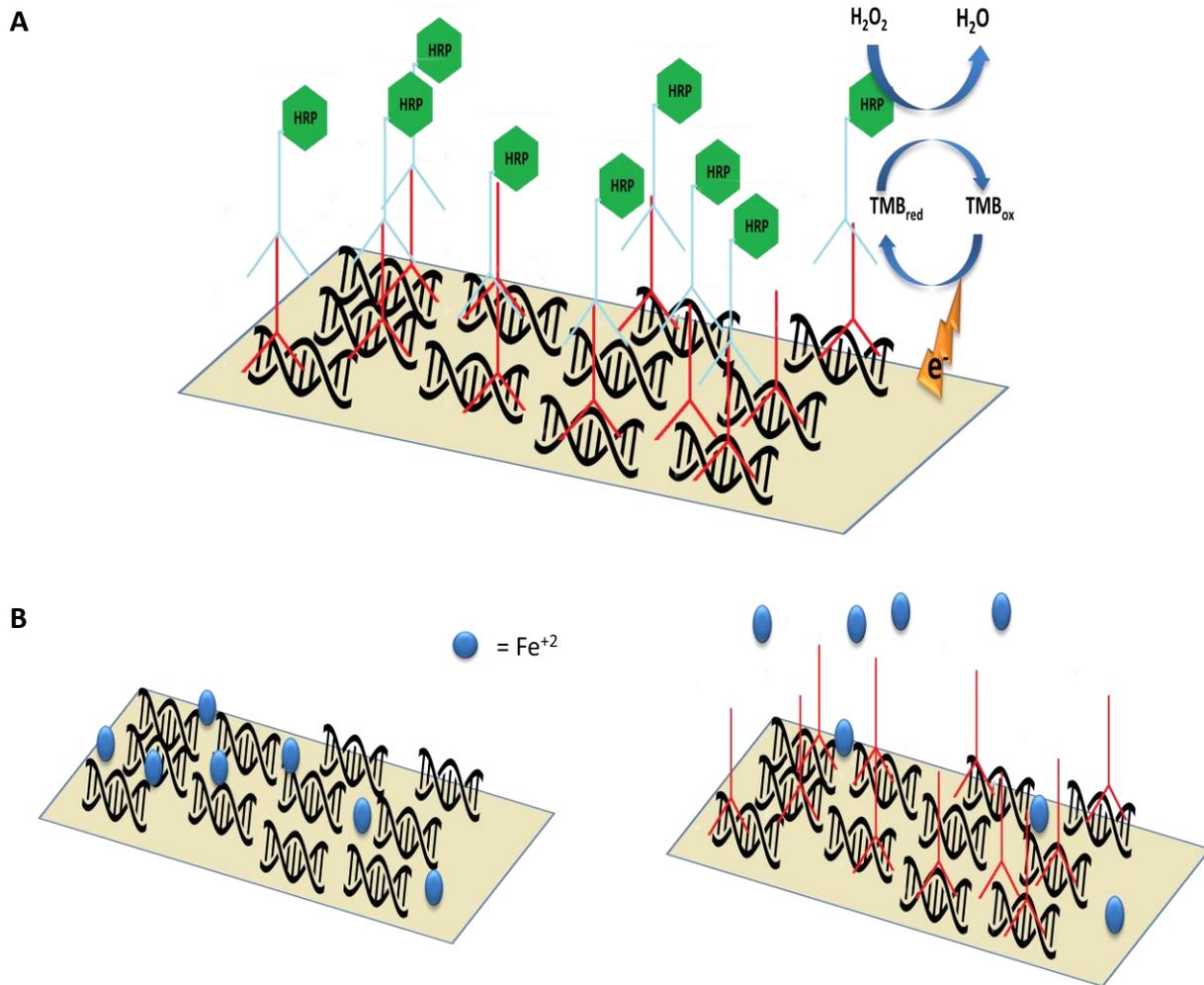


Figura 5. Diseño propuesto para el biosensor. **A.** estrategia de detección mediante TMB-H₂O₂. **B.** Detección mediante empleo de cupla redox. En rojo se representan los anticuerpos anti-ADNdc, y en celeste los anticuerpos secundarios conjugados a HRP.

Como segundo método de detección, se recurrió al fundamento de la técnica del ensayo de ELISA, en donde la interacción antígeno-anticuerpo, se evidencia mediante el agregado de un segundo anticuerpo conjugado a una enzima, capaz de catalizar, luego del agregado de los sustratos adecuados, una reacción colorimétrica. Este sistema ofrece, además de la posibilidad de realizar un ensayo colorimétrico sobre el

electrodo, la posibilidad de realizar un ensayo electroquímico, si se opta por un sustrato cromogénico y que sea capaz de oxidarse/reducirse.

En base a esto, se decidió emplear el 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB), uno de los sustratos más usados en análisis inmunológicos, basados en la reacción de la peroxidasa de rábano (HRP), debido a su baja toxicidad, alta sensibilidad y rapidez de sus reacciones en comparación con otros sustratos ⁶².

El funcionamiento del sistema HRP-TMB, esquematizado en la figura 5 y 6, implica la presencia en el medio de H_2O_2 , el cual es reducido por la HRP, que toma, a su vez, los electrones del TMB.

La oxidación del TMB se da en dos pasos, en donde la pérdida del primer electrón origina la formación del radical catión TMB^+ , y la pérdida de un segundo electrón origina la especie TMB^{2+} . El radical TMB^+ existe en solución en equilibrio rápido con un complejo de transferencia de carga (CTC), formado por la forma reducida TMB y la forma más oxidada TMB^{2+} ^{62,63}. El TMB es incoloro, mientras que el CTC es un compuesto azul, cuya absorbancia máxima se encuentra a los 350 nm y 672 nm. Cuando el medio se torna fuertemente ácido, el equilibrio se desplaza hacia la formación de la especie TMB^{2+} , de color amarillo, la cual presenta su máxima absorbancia a los 450 nm. Es esta última especie la que se detecta en ensayos espectrofotométricos ⁶⁴. En cuanto al carácter electroquímico del TMB, éste se encuentra muy influenciado por el pH y los potenciales de oxidación en un rango de pH de 4 a 7 son +0.33 V y +0.5 V (vs Ag/AgCl), consistentes con un proceso de oxidación en dos pasos ⁶⁵.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo general:

Desarrollar un biosensor capaz de detectar y cuantificar anticuerpos anti-ADNdc en muestras de laboratorio.

2.2- Objetivos específicos:

- Verificar la interacción ADNdc/anti-ADNdc, para los diferentes tipos de ADNdc empleados, mediante la técnica de ELISA.
- Evaluar tres diferentes estrategias para la inmovilización de ADN sobre la superficie de electrodos serigrafiados comerciales.
- Verificar la inmovilización mediante voltamperometría cíclica (VC).
- Analizar el comportamiento redox de la cupla ferri/ferrocianuro ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$) para el sistema pPy/ADN y pPy/ADN/anticuerpos mediante VC.
- Verificar la unión de los anti-ADNdc a la superficie de los electrodos modificados mediante métodos no electroquímicos.
- Definir el método de inmovilización más adecuado.
- Detectar la presencia de anti-ADNdc electroquímicamente.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Instrumental y equipamiento.

Todas las medidas electroquímicas fueron realizadas en la Unidad de Bioquímica Analítica del Centro de Investigaciones Nucleares, utilizando un bipotenciostato CH INSTRUMENTS MODELO 700D. Los ensayos de inmovilización de ADN y unión de anticuerpos fueron desarrollados en un sistema de tres electrodos serigrafiados sobre una placa de cerámica de la firma española DropSens®. El mismo se conforma de un electrodo central de carbono (electrodo de trabajo), un electrodo periférico de carbono (contraelectrodo) y un electrodo de Ag (electrodo de pseudoreferencia) (Ver figura 7). El potencial de dicho electrodo de referencia fue comparado frente al potencial del electrodo de referencia de Ag/AgCl, siendo la diferencia $E_{(Ag)} - E_{(Ag/AgCl)}$ igual a 0.080 V. De aquí en adelante, a menos que sea especificado, todos los potenciales están referidos al electrodo de pseudoreferencia de Ag de los electrodos serigrafiados, a menos que sea especificado.

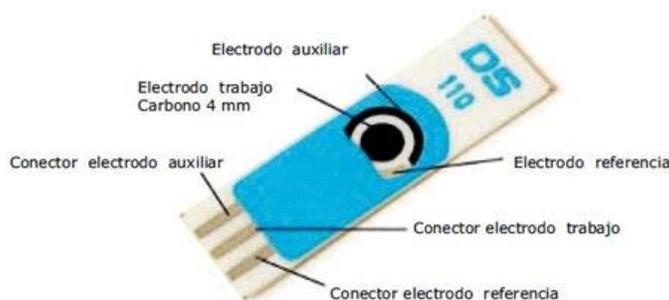


Figura 7. Sistema de tres electrodos serigrafiados comercializado por DropSens®. En la figura se pueden observar el electrodo de trabajo de carbono (central), contraelectrodo de carbono (periférico) y electrodo de pseudoreferencia de Ag (periférico).

Estos electrodos ofrecen la posibilidad de trabajar con volúmenes de muestras pequeños y ser incorporados en dispositivos portátiles miniaturizados, que a su vez pueden ser usados para medidas de campo, fuera de la infraestructura de un

laboratorio, a diferencia de los actuales métodos de diagnóstico y cuantificación. Además, en contraste con los electrodos convencionales, no requieren acondicionamiento especial previo a su uso, presentando además buenos niveles de reproducibilidad ⁶⁶.

Las medidas espectrofotométricas para la determinación de la concentración de ADN y la detección de anticuerpos sobre los electrodos DropSens® fueron llevadas a cabo en un Nanodrop marca Thermo serie 1000 del Instituto Pasteur de Montevideo.

Las lecturas espectrofotométricas de placas de ELISA, fueron realizadas en lector de placas Thermo Scientific modelo Multiskan EX, del Instituto Pasteur de Montevideo.

3.2- Reactivos y soluciones.

Todos los reactivos utilizados fueron calidad pura para análisis (PPA) o estándar de referencia. El agua empleada para la preparación de soluciones y lavado de electrodos fue de calidad ultrapura (milli Q).

Se emplearon las siguientes soluciones de ADN:

- ADN genómico de esperma de salmón liofilizado (Cat.No. D1626) obtenido de Sigma- Aldrich (ADNesp). Se preparó una solución stock disolviendo 0.010 g de ADN liofilizado en 2 mL de agua milliQ, concentración final 816.5 ng/μL
- ADN genómico de *Aspergillus nidulans* extraído mediante el método de fenol-cloroformo (ADNasp) de concentración 4.5 μg/μL.
- ADN genómico, de concentración 137.2 ng/μL, extraído de hígado de vaca mediante el kit Quick-gDNA™ MiniPrep de la empresa Zymo Research (ADNg).
- ADN plasmídico de *Escherichia Coli* (E. Coli) de aproximadamente 4000 pb de concentración 3.5 ng/μL, suministrado por el MSc. Gustavo Brañas (ADNplasm).
- ADN porcino, producto de PCR de aproximadamente 2000 pb, concentración 7.7 ng/μL, donado por la Dra. Gabriela Bedó, del laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias (ADN-PCR).

Se determinó en las soluciones stock de ADN los índices abs 260/230 y abs 260/280.

Se empleó pirrol (Py) 98% pureza, grado reactivo obtenido de Sigma. Luego de cada uso, el recipiente fue burbujado en una atmósfera de nitrógeno por dos minutos y tapado para evitar la oxidación química de los monómeros. Se prepararon alícuotas de concentración 50 mM diluyendo el reactivo en agua milliQ.

Se empleó ferrocianuro de potasio ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) de Sigma. Se preparó una solución stock 40 mM. La solución de trabajo (ferro/ferri) consistió en una dilución al décimo de la solución stock en buffer fosfato salino 2 mM, 0.1 M NaCl pH = 6.5 (PBS).

La seroalbúmina bovina liofilizada (BSA) se obtuvo de Spectrum, y se preparó una solución al 1 % en buffer PBS (PBS-BSA).

Los anticuerpos anti-ADNdc de ratón (ds DNA marker HYB331-01: sc-58749 epítoto no determinado) e IgGnm de ratón (normal mouse IgG: sc-2025) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology INC. El anticuerpo secundario policlonal anti-ratón de conejo (IgG-HRP) fue obtenido de Abcam (ab6728). Se obtuvo una solución stock 1/200 donada por el MSc. J. P. Tosar.

Se empleó 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB) \geq 99% pureza obtenido de Aldrich (Cat.-No.860336) Se preparó una solución stock de 6 mg/mL en etanol 10%.

Se empleó H_2O_2 100 vol estabilizado al 30% obtenido de ENTOX Laboratorios. (CAS 17722-84-13)

La solución de revelado para los ensayos con anticuerpos (TMB- H_2O_2) se preparó con 9 mL de H_2O milliQ, 1 mL de buffer acético/acetato 0.5 pH = 5 (HAc/Ac), 86.5 μ L de solución stock de TMB (concentración final: 0.5 mg/ml) y 50 μ L de solución H_2O_2 0.6 % (preparada el mismo día). El agregado de solución de TMB y H_2O_2 se realizó 5 min antes de realizar el ensayo.

El ácido clorhídrico (HCl) se obtuvo de Biopack. Se preparó una solución stock 2 N.

Las soluciones buffer empleadas fueron:

Solución buffer fosfato salino 2 mM, 100 mM NaCl, pH = 6.5 (PBS).

Solución buffer fosfato salino 2 mM, 100 mM NaCl, pH = 6.5, 4 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (ferro/ferri).

Solución buffer fosfato salino 2 mM, 100 mM NaCl, pH = 6.5 1% BSA (PBS-BSA).

Solución buffer fosfato salino 2 mM, 100 mM NaCl, pH = 6.5 0.05% Tween20 (PBS-T0.05).

Solución buffer fosfato salino 10 mM, 100 mM NaCl, pH = 6.5 0.1% Tween20 (PBS-T0.1).

Solución buffer fosfato salino 10 mM, 100 mM NaCl, pH = 6.5 0.3% Tween20 (PBS-T0.3).

Solución buffer Tris-HCl 10 mM, 150 mM NaCl, pH = 7.5 (TBS).

Solución buffer acético-acetato 0.2 M, pH = 5 (HAc/Ac).

Para el ensayo de ELISA, se empleó una placa de 96 pocillos estéril CELLSTAR (Cat.-No.655 180) y además solución stock de poli-L-lisina al 0.1 % (m/v) en agua de Sigma (Cat.No.P8920). Las diluciones de poli-L-lisina se realizaron a partir de la solución stock en agua milliQ.

3.3- Procedimientos.

3.3.1- Ensayo de ELISA para detección de anticuerpos anti-ADNdc.

Se realizaron dos ensayos de ELISA para verificar la capacidad del anticuerpo comercial anti-ADNdc de reconocer el ADN de trabajo y si este reconocimiento era específico de estos anticuerpos. En la bibliografía se encontró una gran diversidad de procedimientos referentes a la detección de anticuerpos anti-ADNdc mediante ELISA, además de los kits comerciales, donde las principales variaciones se encuentran en el método de inmovilización de ADN y en el tipo de ADN empleado. El ADN, por su naturaleza polianiónica, se adsorbe pobremente a los materiales de las placas de ELISA, por lo que se hace necesario el empleo de moléculas puentes policatiónicas

como sulfato de protamina y la poli-L-lisina³². En otros trabajos, se empleó el sistema streptavidina-biotina, mediante la síntesis de ADN biotinilado en el extremo 5' e incluso, en algunos casos, se trató a las placas de poliestireno con radiación UV para luego incubarlas con solución de ADN, generándose así una unión covalente^{67,34,33}.

El ADN a emplear puede ser de diferentes orígenes, dado que los anticuerpos anti-ADNdc reconocen epítopes del eje pentosa fosfato de cualquier especie. En la literatura, se encontraron trabajos en donde se empleó ADN plasmídico, ADN genómico humano o de timo de ternera, así como ADN sintético de longitudes entre 40 y 140 pb^{32,34,33}.

Debido a la disponibilidad y a la practicidad del procedimiento de recubrimiento, se optó por emplear poli-L-lisina para favorecer la unión del ADN a la placa de ELISA. A diferencia de los otros métodos mencionados, este procedimiento no necesitó de ningún equipamiento especial, y la manipulación fue sencilla, sin necesidad de emplear ADN modificado.

El protocolo de ELISA fue realizado de acuerdo a los trabajos de M. Zouali y B. David Stollar, y Debesa Padilla A. y Hernández Betancourt O. con modificaciones tomadas de los protocolos estándares de ELISA consultados^{32,33,68}.

Primeramente, se llevó a cabo un ensayo de ELISA para verificar la capacidad del anticuerpo anti-ADNdc de reconocer ADN de diferente origen, para lo cual se depositó sobre cada pocillo de la placa de ELISA, 100 µL de solución de poli-L-lisina de concentración 50 µg/mL y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente (Tamb). Una vez finalizada la incubación, se descartó la solución sobrenadante y se lavó con abundante buffer TBS. La solución remanente se descartó golpeando la placa sobre un colchón de papel absorbente, repitiéndose nuevamente el proceso hasta completar tres lavados. Inmediatamente después, se depositó 100 µL de solución de ADN de concentración 4 µg/mL y se incubó durante 2 horas a Tamb. En este caso, en cada columna de la placa de ELISA se incubó con soluciones de ADN de diferente origen, ADNesp, ADNplasm, ADNg y ADN-PCR, preparadas frescas a partir de cada stock, mediante dilución en buffer TBS. Los lavados se realizaron de la misma forma descripta

anteriormente. El bloqueo se realizó con solución PBS-BSA, depositando 100 μ L de la misma e incubando a Tamb durante toda la noche. Posteriormente, se lavó con solución PBS-T0.1, cubriendo completamente cada pocillo, agitando la placa durante 5 minutos en agitador orbital, descartando luego la solución mediante golpes de la placa sobre un colchón de papel absorbente. Este procedimiento se realizó tres veces.

En cada pocillo se depositó 100 μ L de solución de anticuerpos anti-ADNdc y se incubó durante 1 h a 37 °C en estufa. Una vez retirada la placa, se lavó con PBS-T 0.1 de la misma forma explicada anteriormente. Se emplearon soluciones de anticuerpo anti-ADNdc de concentraciones comprendidas entre 2 y 0.125 μ g/mL preparadas en buffer PBS-BSA. Para la detección, se colocó 100 μ L de solución de anticuerpo IgG-HRP en cada pocillo (dilución 1/1000 preparada en PBS-BSA) y se incubó durante 1 hora a 37°C lavándose posteriormente con solución PBS-T0.1 de acuerdo al procedimiento ya detallado. En cada pocillo se colocó luego 100 μ L de solución TMB-H₂O₂ y se incubó 30 min a Tamb, en oscuridad, deteniéndose la reacción con 50 μ L de solución HCl 2 N. Se midió posteriormente la absorbancia a 450 nm en lector de placas.

Como control positivo del ensayo, se sensibilizó uno de los pocillos con 100 μ L de una dilución de anticuerpo anti-ADNdc en PBS de concentración 0.250 μ g/mL y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Se llevaron a cabo tres controles negativos:

1. Se sensibilizó un pocillo únicamente con poli-L-lisina, y se incubó directamente con una dilución de anticuerpo anti-ADNdc de concentración 0.250 μ g/mL en PBS-BSA, procediendo luego a la detección con anticuerpo IgG-HRP de la misma forma expuesta anteriormente.
2. Se sensibilizó un pocillo con poli-L-lisina, ADN y se incubó directamente con solución de anticuerpo IgG-HRP.
3. Se sensibilizó con poli-L-lisina, ADN y se incubó con anticuerpo anti-ADNdc, y se procedió al revelado sin incubación con anticuerpo IgG-HRP.

La solución de ADN empleada para la sensibilización en los controles 2 y 3 consistió en 100 μL de una mezcla en partes iguales de los cuatro tipos de ADN empleados en el ensayo.

En cuanto al ELISA para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-ADNdc, se empleó el mismo procedimiento anteriormente descrito. Se empleó ADNesp para la sensibilización de la placa; una de las columnas fue sensibilizada con el ADNesp previamente sometido a agitación en vortex durante 30s (ADNesp-v). Se sensibilizó además un pocillo únicamente con solución de ADNesp 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En este caso, se trabajó con soluciones de anticuerpo más diluidas, en el rango de 0.250 a 0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$, comparando el comportamiento del anticuerpo anti-ADNdc con el del anticuerpo inespecífico, IgG normal de ratón (IgGnm).

Como control positivo se adsorbió IgGnm; para ello, se incubó 100 μL de solución 0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del mismo durante 1 hora a 37°C en estufa y, luego de los lavados correspondientes, se incubó con IgG-HRP y se reveló.

Se efectuaron dos controles negativos:

1. Se sensibilizó un pocillo únicamente con poli-L-lisina y se incubó directamente con solución de IgGnm de concentración 0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y posteriormente con IgG-HRP.
2. Se sensibilizó un pocillo únicamente con poli-L-lisina, y se incubó directamente con una dilución de anticuerpo anti-ADNdc de concentración 0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS-BSA, procediendo luego a la detección con anticuerpo IgG-HRP de la misma forma descrita anteriormente.

En un pocillo, se sensibilizó únicamente con ADNesp de concentración 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se incubó con dilución de anti-ADNdc 0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS-BSA, a fin de evaluar la importancia de la presencia de la poli-L-lisina para unir el ADN a la placa.

3.3.2- Inmovilización y análisis de electrodos pPy/ADN.

Análisis de la superficie de los electrodos desnudos.

Previamente a cada ensayo, se realizó un barrido mediante VC entre los potenciales -0.5 V y +0.5 V en buffer PBS a una velocidad de 0.05 V/s, como forma de evaluar la superficie del electrodo de trabajo. En todos los casos se trabajó con 50 μ L de buffer sobre los electrodos serigrafiados.

Inmovilización de ADN mediante electropolimerización de Py.

La electro polimerización de Py se llevó a cabo mediante el método de voltamperometría cíclica en un sistema de tres electrodos empleado en los trabajos del MSc. J.P. Tosar ⁶⁹. Para cada ensayo, se preparó una solución fresca de pirrol (concentración final 20 mM) y ADN de concentración variable, de la cual se depositaron 50 μ L sobre el sistema de tres electrodos serigrafiados, de forma de cubrir la totalidad de los mismos. Se realizaron diez ciclos variando el potencial entre -0.7 V y +0.7 V, a una velocidad de barrido de 0.05 V/s. Los electrodos fueron lavados, antes y después de la inmovilización, con agua milliQ. Inicialmente, se emplearon soluciones de Py con ADNasp, cuyas concentraciones estuvieron comprendidas entre 0.1 y 0.8 μ g/ μ L.

Para los ensayos de inmovilización de ADNesp, se trabajó con una concentración final de ADN de 0.5 μ g/ μ L, previamente sometido a vortex durante 30 segundos, de forma de fragmentar el ADN y permitir un mejor crecimiento del polímero (ver discusión y resultados).

El crecimiento del film de pPy, se analizó en tiempo real mediante el voltamperograma generado.

Análisis de la superficie posterior a la inmovilización.

La técnica de inmovilización de ADN empleada se encuentra desarrollada ampliamente en la literatura y puesta a punto en la Unidad de Bioquímica Analítica por el MSc. J.P

Tosar, quién demostró en sus trabajos la efectividad del método. En el presente estudio, se realizó un análisis de la superficie del electrodo, luego de la inmovilización mediante VC en PBS, a modo de constatar la presencia de un film pPy/ADN. La VC fue realizada entre potenciales de -0.5 V y +0.5 V, a una velocidad de barrido de 0.05V/s durante cuatro ciclos.

Comportamiento redox de la cupla ferro/ferri sobre la superficie de los electrodos desnudos y modificados con ADN/pPy.

El comportamiento de la cupla redox ferro/ferri fue evaluado tanto para electrodos desnudos, como para electrodos con pPy/ADNesp-v y electrodos pPy/ADNesp/anticuerpos. Para ello, se depositaron 50 μ L de solución ferro/ferri sobre la superficie de los electrodos y se llevó a cabo VC, entre los potenciales +0.5 V y -0.5 V, a una velocidad de barrido de 0.05 V/s durante cuatro ciclos. Luego de obtenidos los voltamperogramas, se analizó la corriente del pico, correspondiente a la oxidación del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, determinando su valor mediante la herramienta Manual Results del programa CHI760D Electrochemical Workstation Beta. La misma permite trazar una línea de base manualmente y, de forma automática, obtener el valor de corriente y potencial de los picos de oxidación/reducción (Ver figura 2.2). Este procedimiento se realizó para 4 electrodos pPy/ADNesp-v y se determinó el valor de intensidad de corriente promedio.

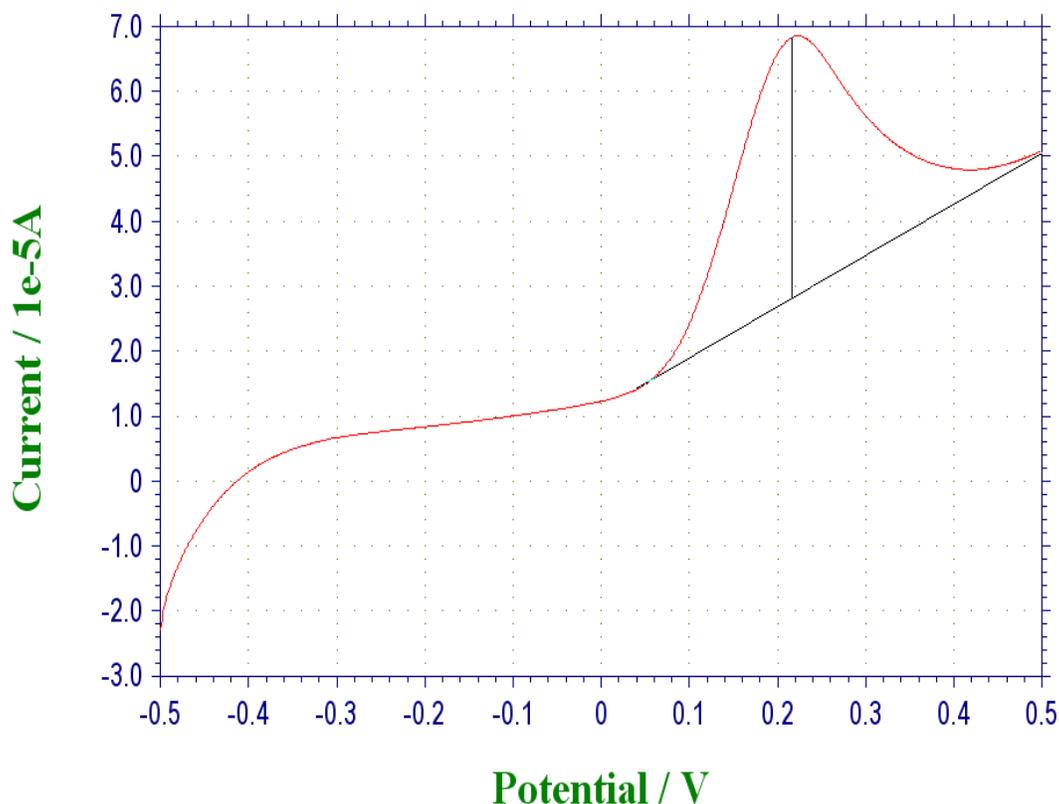


Figura 8. Determinación de la intensidad de corriente y potencial de oxidación para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ empleando la herramienta Results del programa CHI760D Electrochemical Workstation Beta.

Detección electroquímica de anticuerpos sobre la superficie de los electrodos pPy/ADN empleando la cupla ferro/ferri.

Una vez obtenidos los electrodos pPy/ADNesp-v, se procedió a evaluar el pegado de anticuerpos anti-ADNdc a la superficie de los mismos. Para ello se depositó 50 μL de dilución de anticuerpos anti-ADNdc sobre el sistema de tres electrodos y se incubó durante 1 hora en estufa a 37°C en cámara húmeda. Luego de la incubación se retiró la solución de anticuerpos de la superficie con micropipeta y se procedió al lavado.

Se evaluaron dos procedimientos de lavado con solución PBS-T0.05:

1. Se sumergió el sistema de tres electrodos en tubo Falcon de 50 mL, conteniendo solución PBS-T0.05, y se colocó el mismo sobre una placa agitadora durante 5

minutos a velocidad media. Luego de esto se extrajo el sistema y se lavó por arrastre con solución PBS. Este procedimiento fue realizado tres veces.

2. Se depositó sobre el sistema 50 μL de solución PBS-T0.05 y se lavó mecánicamente la superficie empleando micropipeta, cargando y descargando veinte veces. Se incubó durante 5 min a T_{amb} y se descartó la solución. Este procedimiento se llevó a cabo tres veces.

Se ensayaron dos concentraciones de anticuerpo anti-ADNdc (0.333 y 0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y se llevó a cabo un control de especificidad empleando diluciones de igual concentración de anticuerpo IgGnm. Todas las diluciones de anticuerpos empleadas se realizaron a partir del stock, mediante dilución en PBS-BSA. La detección de los anticuerpos se realizó mediante VC, empleando la cupla ferro/ferri de la forma descrita anteriormente.

Para evaluar los posibles efectos de la temperatura sobre los electrodos pPy/ADNesp-v se colocó 50 μL de PBS sobre el sistema y se incubó durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Se retiró el sistema de la estufa y se realizó VC con ferro/ferri.

Se analizó además la posibilidad de la interferencia de la solución de lavado PBS-T. Para ello se preparó un sistema pPy/ADNesp-v, y se llevó a cabo, sin previa incubación con anticuerpos, el procedimiento de lavado descrito en el punto 1 de esta sección. Posteriormente se sometió a VC en ferro/ferri.

En cuanto a posibles cambios en la superficie de los electrodos, a causa de factores ambientales dentro del laboratorio, se decidió incubar a T_{amb} , 50 μL de PBS sobre el sistema durante 5 horas. Los posibles cambios fueron evaluados mediante VC en solución ferro/ferri luego de 1 y 3 horas de incubación.

Pruebas no electroquímicas de detección de anticuerpos anti-ADNdc sobre la superficie de los electrodos pPy/ADNesp-v.

Buscando un procedimiento alternativo para constatar la presencia de los anticuerpos anti-ADNdc en la superficie del sistema pPy/ADNesp-v, se decidió realizar un ensayo colorimétrico. La idea se basó en el fundamento de la técnica de ELISA, es decir, se incubó en primera instancia con solución de anti-ADNdc y luego con IgG-HRP, obteniéndose una respuesta colorimétrica mediante el agregado de solución TMB-H₂O₂, la cual fue registrada espectrofotométricamente. A diferencia de la placa de ELISA, la superficie sobre la cual se depositó el film de pPy/ADN (que corresponde a la del electrodo de trabajo), presenta un diámetro aproximado de 4 mm, lo que ocasionó problemas a la hora de delimitar la superficie. Sumado a esto, el sistema de electrodos serigrafiados empleado, no fue concebido para contener volúmenes muy grandes, lo cual por un lado economizó el uso de reactivos, pero ocasionó dificultades a la hora de mantener la solución de anticuerpos sobre la superficie del electrodo durante las incubaciones. A esto se agregó, el efecto de la pérdida de solución por evaporación, dado los reducidos volúmenes empleados.

Debido a esto, y a que en la literatura no fue encontrado un procedimiento similar de incubación/detección de anticuerpos sobre este tipo de sistema, fue necesario llevar a cabo una optimización de la técnica.

Optimización de la técnica

En primera instancia se evaluó el funcionamiento del sistema. Se prepararon tres electrodos pPy/ADNesp-v, los cuales, previamente al ensayo con anticuerpos, fueron lavados con buffer PBS. Posteriormente, se depositó sobre la superficie del sistema (es decir de forma tal que cubriera los tres electrodos) 50 μ L de solución de anti-ADNdc 0.016 μ g/mL y se incubó durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Una vez retirado el sistema de la estufa, se descartó la solución sobrante y se lavó, depositando 50 μ L de PBS-T0.1, agitando mecánicamente la solución mediante micropipeta, cargando/descargando veinte veces. Posteriormente, se lavó con PBS, se depositaron 50 μ L de solución IgG-HRP cubriendo los tres electrodos y se incubó durante 1 hora a

37 °C en cámara húmeda. Una vez finalizada la incubación se lavó de la forma descrita anteriormente y se incubó con 50 µL de solución TMB-H₂O₂ durante 30 min, deteniéndose la reacción mediante el agregado de 6 µL de HCl 2 N. Se registró la absorbancia a 450 nm en Nanodrop. Sobre un segundo electrodo, se repitió el mismo procedimiento, incubando una solución de igual concentración de IgGnm en lugar de anti-ADNdc. El tercer sistema de electrodos fue incubado únicamente con la dilución de IgG-HRP empleada. Las diluciones de anticuerpo empleadas se realizaron en buffer PBS, y se utilizó en todos los casos una dilución 1/2000 de IgG-HRP.

Lavados y dilución de IgG-HRP

Para disminuir el pegado inespecífico, se ensayaron lavados con soluciones de PBS con mayor concentración de Tween20 y diluciones mayores del anticuerpo IgG-HRP. Para determinar cuál de las condiciones contribuía mayormente a la disminución del pegado inespecífico, se realizó el siguiente procedimiento:

Se prepararon cuatro sistemas de electrodos pPy/ADNesp-v, y dos de ellos se incubaron con dilución 1/2000 de IgG-HRP y los restantes con dilución 1/6000 de IgG-HRP a 37°C durante 1 hora en estufa. Una vez retirados, se lavaron depositando 50 µL de solución PBS-T y agitando mecánicamente mediante carga/descarga con micropipeta veinte veces, repitiéndose dicho procedimiento 3 veces para cada sistema. El revelado se llevó a cabo con el método realizado hasta el momento. En este caso, se emplearon soluciones de lavado con diferente concentración de Tween20; se empleó buffer PBS-T 0.1 y PBS-T 0.3; uno de los sistemas incubados con IgG-HRP 1/2000 se lavó con PBS-T 0.1, mientras que el otro fue lavado con PBS-T 0.3, de la misma forma se procedió para los sistemas incubados con dilución 1/6000 de IgG-HRP.

El ensayo se realizó únicamente para dos diluciones de IgG-HRP y dos concentraciones de Tween20, debido a la poca disponibilidad de electrodos comerciales en el laboratorio.

Dado que los resultados mostraron que el factor que influyó mayormente en la disminución del pegado inespecífico fue la dilución de IgG-HRP empleada, se ensayó

con diferentes diluciones hasta encontrar aquella que originara la menor señal posible en el ensayo colorimétrico. Se siguió el mismo procedimiento explicado anteriormente y se realizaron los lavados con PBS-T0.1. Se trabajó con diluciones de IgG-HRP en el rango de 1/2000 a 1/32000.

Evaluación del pegado inespecífico al carbono y cerámica

Hasta este punto, se trabajó incubando las soluciones de anticuerpo sobre todo el sistema de electrodos. Este procedimiento debió ser evaluado para verificar si la adsorción sobre el carbono expuesto en el contraelectrodo, y/o la adsorción a la placa cerámica sobre la que se asienta el sistema, eran posibles, y ocasionaban gran parte de la señal inespecífica registrada.

Para ello se depositó 4 μL de solución 1/32000 de IgG-HRP sobre el electrodo de trabajo de carbono desnudo (sin electropolimerización previa de pPy) y 4 μL de la misma solución sobre la región cerámica adyacente a los electrodos. Se incubó durante 1 hora a 37 °C, y se lavó con buffer PBS-T0.1 de la forma descrita en el procedimiento anterior. Luego se colocaron 10 μL de solución TMB-H₂O₂, y se incubó por 30 min, deteniéndose la reacción mediante el agregado de 2 μL de HCl 2N. La absorbancia fue medida a 450 nm.

Además, se incubó una región de carbono, y una región cerámica únicamente con 10 μL de solución de revelado siguiendo el mismo procedimiento anterior para evaluar la posibilidad de que parte del TMB sea oxidado de forma no enzimática.

Como control, se realizó un ensayo completo (incubación con anti-ADNdc e IgG-HRP) mediante el procedimiento seguido hasta el momento.

Como se discute más adelante, fue necesario limitar las incubaciones con anticuerpos al área del electrodo de trabajo. Para esto, se evaluaron tres estrategias:

1. Se colocó papel film, con una perforación de diámetro ligeramente menor al diámetro del electrodo de trabajo, de forma de cubrir las regiones cerámicas circundantes, el contraelectrodo y el electrodo de pseudoreferencia, y sobre la misma se depositó 10 μL de solución de anticuerpo.

2. Se realizó un orificio del diámetro del electrodo de trabajo a una placa de acrílico, la cual se colocó cubriendo el electrodo de pseudoreferencia y contraelectrodo así como las regiones cerámicas circundantes. La misma fue fijada al sistema de electrodos mediante el empleo de una pinza aprieta papeles, de forma de ejercer presión y evitar filtraciones. Las soluciones de anticuerpos se colocaron en el pocillo formado por la placa, cuya base correspondió al electrodo de trabajo.
3. Se ensayó con volúmenes de solución de anticuerpo muy inferiores a los 50 μL , empleados hasta el momento. Se trabajó incubando volúmenes de 10, 5 y 2 μL de solución de anticuerpo, buscando cubrir únicamente el área del electrodo de trabajo.

3.3.3- Inmovilización de ADN mediante el uso de poli-L-lisina.

Como segunda estrategia de inmovilización de ADN, se empleó la adsorción mediante poli-L-lisina. La capacidad de facilitar la adsorción del ADN a una superficie mediante el empleo de este polímero se constató previamente en el ensayo de ELISA y, a raíz de esto, se evaluó la posibilidad de emplearlo en la inmovilización de ADN_{esp-v} a la superficie de los electrodos de carbono.

El procedimiento utilizado fue similar al empleado en ese ensayo, con modificaciones realizadas a raíz de la menor superficie de adsorción disponible en los electrodos.

Se depositó sobre la superficie del electrodo de trabajo 2 μL de solución de poli-L-lisina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se incubó durante 30 min a T_{amb} . En este punto fue necesario reponer cada 10 min el volumen de solución, debido a la evaporación considerable de la misma, favorecida por el pequeño volumen de trabajo. Posteriormente, se retiró la solución sobrante y se depositó 50 μL de buffer TBS, agitándose la misma con micropipeta; este procedimiento se repitió tres veces. Luego, se incubó con 2 μL de solución de ADN_{esp-v} de concentración 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en TBS durante 2 horas a T_{amb} , reponiendo la solución cada 10 min. Se retiró la solución sobrante y se lavó con buffer PBS de la misma forma descripta anteriormente.

Verificación de la inmovilización de ADN.

Como prueba de la efectividad de la inmovilización del ADN empleando poli-L-lisina, se realizó VC, con la finalidad de registrar la señal de oxidación de la guanina. Primeramente, los electrodos modificados fueron lavados mediante 3 ciclos, con buffer PBS, luego se depositaron 50 μL de PBS y se realizó VC, entre los potenciales de -0.2 V a +1.0 V, a una velocidad de barrido de 0.05 V/s.

Paralelamente, se realizó VC en las mismas condiciones para un electrodo modificado con poli-L-lisina, con la finalidad de analizar cualquier posible comportamiento redox de la misma, en el rango de potenciales de trabajo.

3.3.4- Inmovilización de ADN mediante electrodeposición a potencial constante.

El ADN, en su carácter de polianión, puede ser adsorbido mediante la aplicación de un potencial positivo a la superficie del electrodo. El procedimiento, que se detalla a continuación, fue adaptado de los trabajos de Oliveira Brett, relacionados al estudio de la inmovilización y oxidación de moléculas de ADN sobre superficies de electrodos de carbono vítreo⁵¹.

En primer lugar, todos los electrodos fueron sometidos a un pretratamiento electroquímico en medio ácido, en buffer HAc/Ac. Para ello, fueron depositados 50 μL de buffer, de forma de cubrir la totalidad de los electrodos, y se aplicó un potencial constante de +1.7 V. El tiempo de pretratamiento se varió desde 1.5 a 3.0 minutos. Luego de esto, se retiró la solución de la superficie y se lavó mecánicamente con micropipeta, como en otras ocasiones, por triplicado.

Se colocó posteriormente 50 μL de solución de ADNesp-v de concentración 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y se sometió el electrodo a un potencial constante. En este punto, se analizó el efecto del tratamiento a +0.3 V y +0.5 V durante 3 minutos. Una vez definido el potencial de trabajo, se analizó el resultado de diferentes tiempos de electrodeposición, a saber 3, 5 y 10 minutos. La solución de ADNesp-v fue retirada posteriormente y se lavó, siguiendo

el mismo procedimiento detallado en el párrafo anterior, de forma de remover las moléculas que no hayan quedado adsorbidas a la superficie del electrodo de trabajo.

Verificación de la inmovilización.

Nuevamente se recurrió a la VC como técnica de análisis de la superficie, para registrar la presencia de moléculas de ADN mediante la señal de oxidación de la guanina y/o adenina. La VC, en este caso, se llevó a cabo en un buffer HAc/Ac, entre los potenciales de -0.2 V a +1.3 V, a una velocidad de barrido de 0.1 V/s durante 6 ciclos.

Bloqueo de la superficie.

Para cubrir las posibles regiones de carbono expuesto luego de la inmovilización de ADN, se recurrió al bloqueo con solución PBS-BSA 1%. Para ello, se depositaron 2 μ L de solución, únicamente sobre el electrodo de trabajo (previamente modificado) y se incubó durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda. Luego de esto, se retiró la solución remanente y se lavó con buffer PBS, con agitación mecánica. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado. En primera instancia, los lavados se realizaron con solución PBS-T 0.1, optándose luego por lavados con PBS (ver discusión y resultados).

Ensayos con anticuerpos sobre electrodos ADNesp-v/BSA.

Entre los métodos de inmovilización ensayados, el mejor resultado se obtuvo con el de la inmovilización mediante aplicación de potencial constante, lo cual motivó la elección de este método para lo que resta del desarrollo de este trabajo.

En primera instancia, previamente a los ensayos de detección electroquímicos, se analizó el sistema mediante el método colorimétrico, empleando un procedimiento similar al ensayo de ELISA.

Luego de preparados los electrodos ADNesp-v/BSA, se incubó con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-ADNdc, durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda. En este punto, se colocaron 2 μ L de solución de anticuerpos, de forma de cubrir únicamente la superficie del electrodo de trabajo. Posteriormente, se lavó

mediante agitación mecánica, con micropipeta, mediante 3 ciclos de carga/descarga de 50 μL de solución PBS sobre la superficie. Posteriormente, se depositaron 2 μL de solución IgG-HRP (dilución 1/10000) y se incubó durante 30 min a 37°C en cámara húmeda. Los lavados se realizaron de la misma forma descrita anteriormente.

Para la reacción de color, se incubó sobre la superficie del electrodo, 50 μL de solución TMB-H₂O₂, durante 30 min a Tamb, deteniéndose la misma mediante el agregado de 10 μL de HCl 2 N, y registrándose la absorbancia a 450 nm.

3.3.5- Comportamiento electroquímico del TMB sobre electrodos DropSens®.

Previo a la detección electroquímica, se estudió el comportamiento redox del TMB sobre el sistema de electrodos comercial. Para ello, se realizó VC sobre electrodos desnudos, colocando 50 μL de diferentes soluciones de TMB sobre la superficie de los mismos. Se realizaron tres ensayos:

1. VC de solución de TMB 0.5 mg/mL entre los potenciales de -0.5 V a +0.5 V
2. VC de solución de TMB 0.5 mg/mL-H₂O₂ 0.003% entre los potenciales de -0.5 V a +0.5 V
3. VC de solución TMB 0.5 mg/mL-H₂O₂ 0.003% luego del agregado de 6 μL de HCl 2 N, entre los potenciales de -0.5 a +0.8 V.

Todas las soluciones se prepararon en buffer HAc/Ac, y la velocidad de barrido empleada fue de 0.05 V/s.

3.3.6- Detección electroquímica de TMBox sobre la superficie de electrodos ADNesp-v/BSA/anticuerpo.

La técnica elegida para la detección del TMBox consistió en la realización de amperometría a potencial constante, en donde se registró la corriente de reducción del TMBox en función del tiempo, a un potencial aplicado de -0.1 V.

Se realizó el ensayo para dos electrodos ADNesp-v/BSA incubados con:

1. Anti-ADNdc 0.125 $\mu\text{g/mL}$
2. IgGnm 0.125 $\mu\text{g/mL}$

En ambos casos, se incubó posteriormente con dilución 1/10000 de IgG-HRP y 5 min con 50 μ L de solución TMB-H₂O₂. Luego, se sometió el electrodo a un potencial de -0.1 V y se registró la corriente durante 1000 segundos.

Como control, se realizó el mismo ensayo sin la etapa de incubación con IgG-HRP.

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1- ELISA para detección de anticuerpos anti-ADNdc.

Un punto clave en este trabajo es el reconocimiento específico del anticuerpo anti-ADNdc comercial y el ADN de trabajo. Si bien los anticuerpos anti ADNdc reconocen motivos en el esqueleto azúcar fosfato del ADN y, por tanto, serían capaces de reconocer ADN de cualquier origen, se planteó la duda de si los anticuerpos comerciales disponibles en el momento del ensayo eran capaces de hacerlo. Sumado a esto, la información brindada por el fabricante establecía que el epítipo no se encontraba determinado.

Ante estas dudas, se decidió realizar un ensayo para evaluar la capacidad de los anticuerpos de reconocer el ADN. Entre las posibilidades de ensayo para evaluar si un antígeno es reconocido por un anticuerpo, se encontraron técnicas tales como el DNA DOT BLOT, inmunodifusión radial y ELISA, entre otras. El ensayo de ELISA fue elegido en base a la disponibilidad de materiales en el laboratorio, su practicidad y la robustez del método. Además, se encontró un mayor número de trabajos referentes a esta técnica para la detección de anticuerpos anti-ADNdc, en comparación con las otras técnicas.

Como muestra la figura 9A, la presencia de coloración en todos los pocillos de la placa de ELISA, constató que el anticuerpo fue capaz de reconocer todos los tipos de ADN con los que fue sensibilizada, lo cual era esperable debido a la naturaleza de la interacción anticuerpo-ADNdc, la cual es independiente de la secuencia y el origen del

ADN. El gráfico de la figura 9B, mostró que existe saturación del sistema a partir de 0.800 $\mu\text{g/mL}$, mientras que, para concentraciones inferiores, se registró una relación de proporcionalidad entre absorbancia y concentración.

A

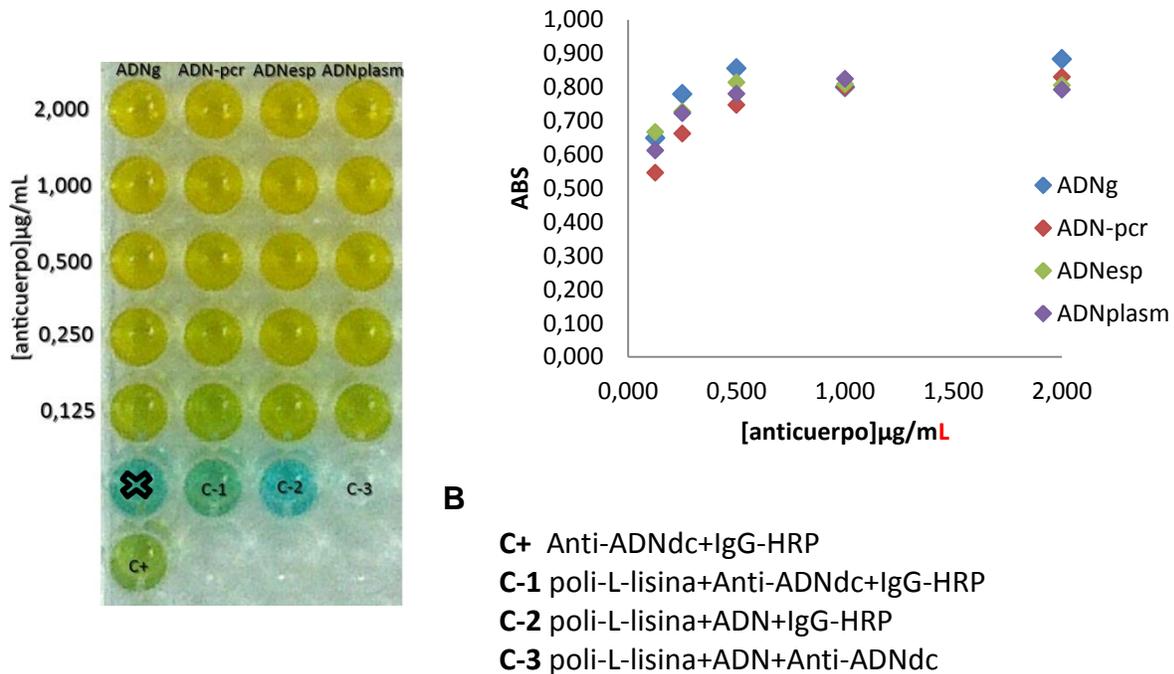


Figura 9. Resultados del ensayo de ELISA para detección de anticuerpos anti-ADNdc. En **A** se muestra la imagen de la placa una vez revelada. Cada columna fue sensibilizada con la misma cantidad de poli-L-lisina 50 $\mu\text{g/mL}$ y con soluciones de ADN de diferente origen, indicados en la parte superior de la imagen. Las concentraciones de anticuerpo anti-ADNdc empleadas en cada fila se indican en el eje vertical. En todos los casos, se empleó para la detección anticuerpo IgG-HRP en dilución 1/1000 y se reveló con solución TMB- H_2O_2 en buffer HAC/Ac. C+ corresponde al control positivo, C- a los controles negativos. El ADN empleado para sensibilizar la placa en el caso de los controles negativos 2 y 3 corresponde a una mezcla en partes iguales de los 4 tipos de ADN empleados en el ensayo. Para los controles, se empleó una solución de anticuerpo anti-ADNdc de concentración 0,250 $\mu\text{g/mL}$. En **B** se muestra gráficamente la variación de la absorbancia en función de la concentración de anticuerpo anti-ADNdc para los diferentes tipos de ADN empleados en la sensibilización. La absorbancia fue medida a 450 nm en lector de placas.

En cuanto a los controles efectuados, el pocillo donde se sensibilizó únicamente con anti-ADNdc fue el único donde se registró una coloración importante, constatando que el sistema funcionó correctamente. Además en los pocillos que carecían de anticuerpo

anti-ADNdc o IgG-HRP, no se observó un desarrollo apreciable de color. Una discusión especial merece el caso en donde no se sensibilizó con ADN; en este caso, se registró cierto desarrollo de color, mayor que los anteriores controles. Igualmente, el valor de absorbancia obtenido fue inferior al de los pocillos con ADN e igual concentración de anticuerpo. El hecho de que se observó un mayor desarrollo de color puede deberse a cierta reactividad de los anti-ADNdc con la poli-L-lisina, como se reportó en algunos trabajos, donde el recubrimiento de la placa con dicha molécula originó falsos positivos. Cabe aclarar, sin embargo, que, en dichos trabajos, los ensayos fueron realizados con suero de pacientes sanos y enfermos, lo que de por sí conlleva otras consideraciones que no contribuyeron en este trabajo ^{31,70}.

El pocillo señalado con una cruz en la figura 9A, corresponde a la sensibilización con anti-ADNdc 0.250 µg/ml en buffer PBS-BSA, el desarrollo de color es claramente menor al del pocillo sensibilizado con anti-ADNdc 0.250 µg/ml en buffer PBS, debido a que la presencia de proteína interfiere competitivamente en la adsorción de los anticuerpos a la placa.

Cuando se comparó la reactividad del anticuerpo anti-ADNdc con la del anticuerpo IgGnm a muy bajas concentraciones, se evidenció claramente que estos últimos no interaccionaron con el ADNesp empleado, lo cual dejó de manifiesto la gran especificidad de los anti-ADNdc por su antígeno. Los valores de absorbancia medidos para todas las concentraciones de anticuerpos IgGnm fueron inferiores a los controles negativos (ver figura 10).

Como muestra la figura 10, el tratamiento del ADNesp con vortex no alteró significativamente su capacidad de interaccionar con los anticuerpos anti-ADNdc, dado que las absorbancias obtenidas no se apartaron demasiado de las obtenidas con el ADNesp sin vortex.

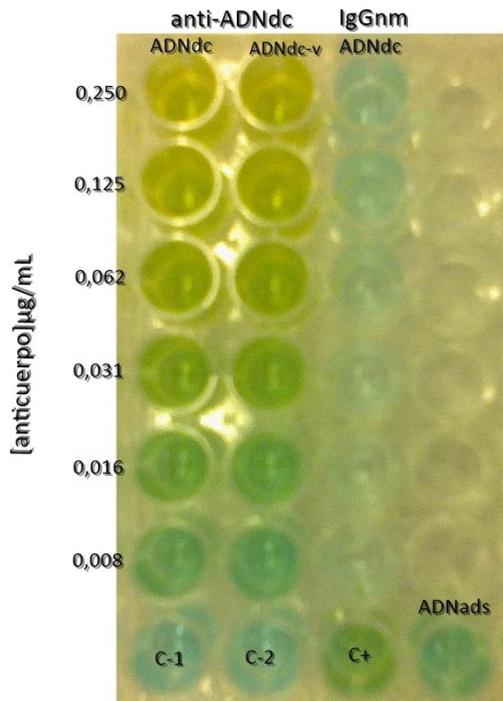
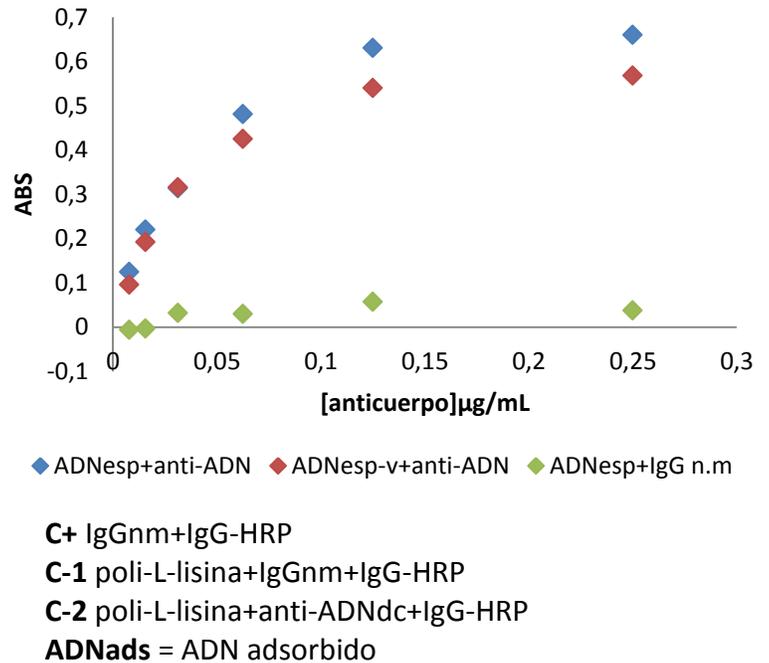
A**B**

Figura 10. Resultados del ensayo del ELISA de especificidad. En **A**, se muestra una imagen de la placa de ELISA en donde la primera y segunda columna corresponde al anti-ADNdc y la tercera columna a IgGnm. Las concentraciones de anticuerpo se muestran en el eje vertical. En todos los pocillos se sensibilizó con poli-L-lisina 50 $\mu\text{g/mL}$ y ADNesp 4 $\mu\text{g/mL}$. En la segunda columna, se empleó ADNesp sometido a agitación en vortex por 30 s. El pocillo correspondiente al ADNads fue sensibilizado únicamente con ADNesp. C+ corresponde al control positivo y C- al control negativo. En todos los casos, se empleó para la detección anticuerpo IgG-HRP en dilución 1/1000 y se reveló con solución TMB- H_2O_2 en buffer HAC/Ac. En **B** se muestra el gráfico de absorbancia en función de la concentración de anticuerpo anti-ADNdc e IgGnm. La absorbancia fue medida a 450 nm en lector de placas.

Por último, se evaluó si la adsorción del ADNesp directamente a la placa (sin poli-L-lisina) era un método con igual rendimiento que el tratamiento previo con poli-L-lisina. Claramente, se observó que, a igual concentración de ADN y de anticuerpos, la presencia de poli-L-lisina es relevante a la hora de inmovilizar el ADN.

4.2- Inmovilización de ADN mediante electropolimerización de Py

El método de la electropolimerización mediante VC, presentó como ventaja la posibilidad de realizar un seguimiento del crecimiento del film polimérico, en tiempo real. El crecimiento de pPy se realizó de acuerdo a los trabajos del MSc. J.P. Tosar, en donde se sometió el electrodo a VC entre los potenciales de -0.7 V a $+0.7\text{ V}$ a una velocidad de barrido de 0.05 V/s durante 10 ciclos. El voltamperograma obtenido se muestra en la figura 11, en donde fue apreciable el incremento ciclo a ciclo de la corriente anódica, correspondiente a la oxidación del Py, en el entorno de los $+0.7\text{ V}$. A medida que el film crece, aumenta la intensidad de corriente de oxidación/reducción del pPy, en el entorno de $+0.1\text{ V}$ y -0.1 V , respectivamente, aunque estos potenciales varían, en función de la secuencia del ADN empleado^{57,61}.

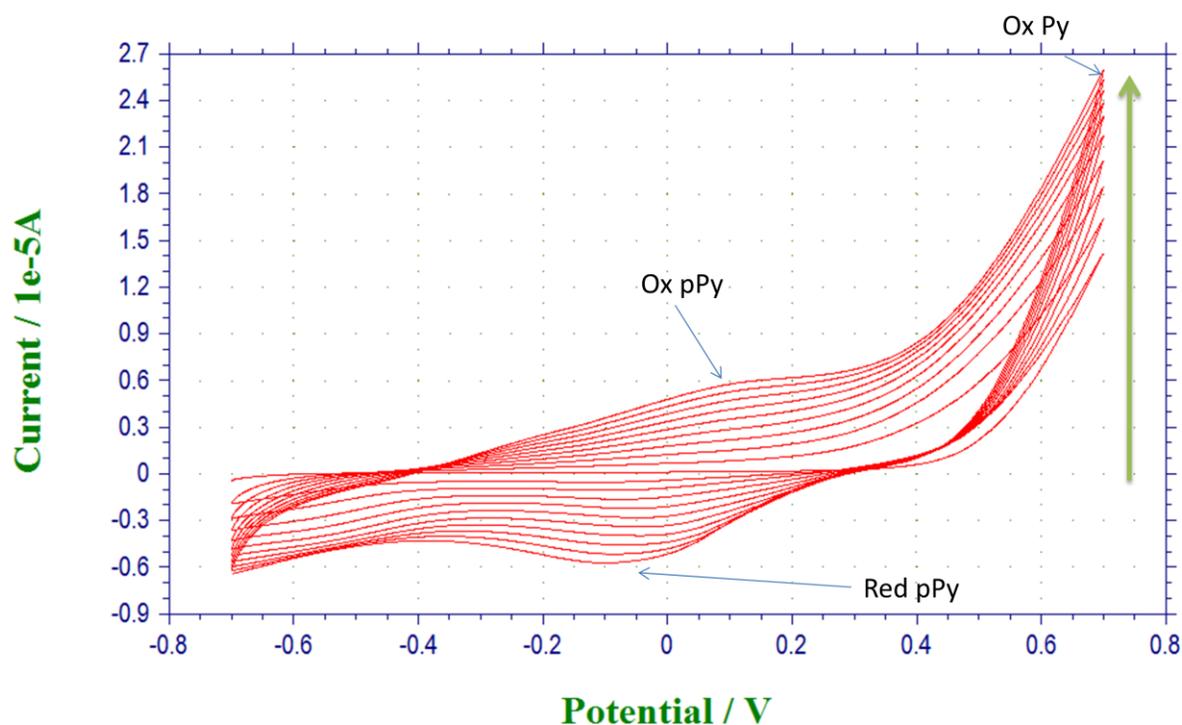


Figura 11. Electropolimerización de Py mediante VC. Se depositaron $50\ \mu\text{L}$ de solución 20 mM de Py y $0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADNasp y se sometió el electrodo a VC entre los potenciales de -0.7 V a $+0.7\text{ V}$ a una velocidad de barrido de 0.05 V/s durante 10 ciclos. Se puede apreciar el incremento ciclo a ciclo de la corriente de oxidación del Py a $+0.7\text{V}$.

La metodología empleada para la inmovilización de ADN ha sido muy estudiada en la Unidad de Bioquímica Analítica, con lo cual no existieron dudas acerca de su efectividad. De todas formas, como pruebas no destructivas de verificación, se realizó VC en buffer PBS, donde se constató, un aumento en la capacitancia de la superficie, reflejada en un ensanchamiento del voltamperograma, lo que señala la presencia de un film sobre el electrodo (ver figura 12).

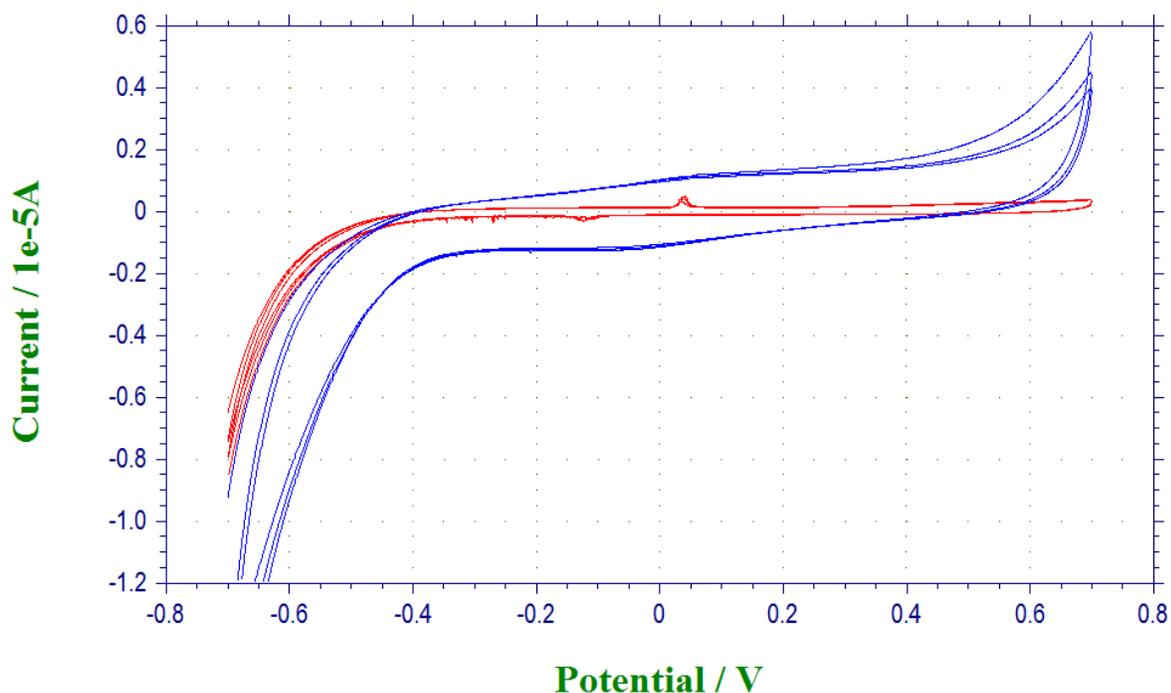


Figura 12. VC en buffer PBS para electrodo desnudo (—) y modificado con pPy/ADNasp 0.3 µg/µl (—). La VC se realizó entre los potenciales de -0.7V y +0.7V a una velocidad de barrido de 0.05 V/s

Los picos observados entorno a los 0 V para el voltamperograma del electrodo desnudo corresponderían a un fenómeno de adsorción de iones sobre la superficie.

Una segunda prueba llevada a cabo, consistió en la realización de VC, luego del agregado de una solución conteniendo la cupla ferro/ferri. La hipótesis manejada fue la siguiente: de estar presente el pPy/ADN sobre el electrodo, existiría un cambio sobre la intensidad de corriente de la cupla. Cuando se comparó la intensidad de los picos

obtenidos para un electrodo desnudo, y uno modificado con ADNasp 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, fue notorio el cambio en el voltamperograma, en donde se observó una disminución de la corriente, lo cual estaría de acuerdo, con la hipótesis planteada.

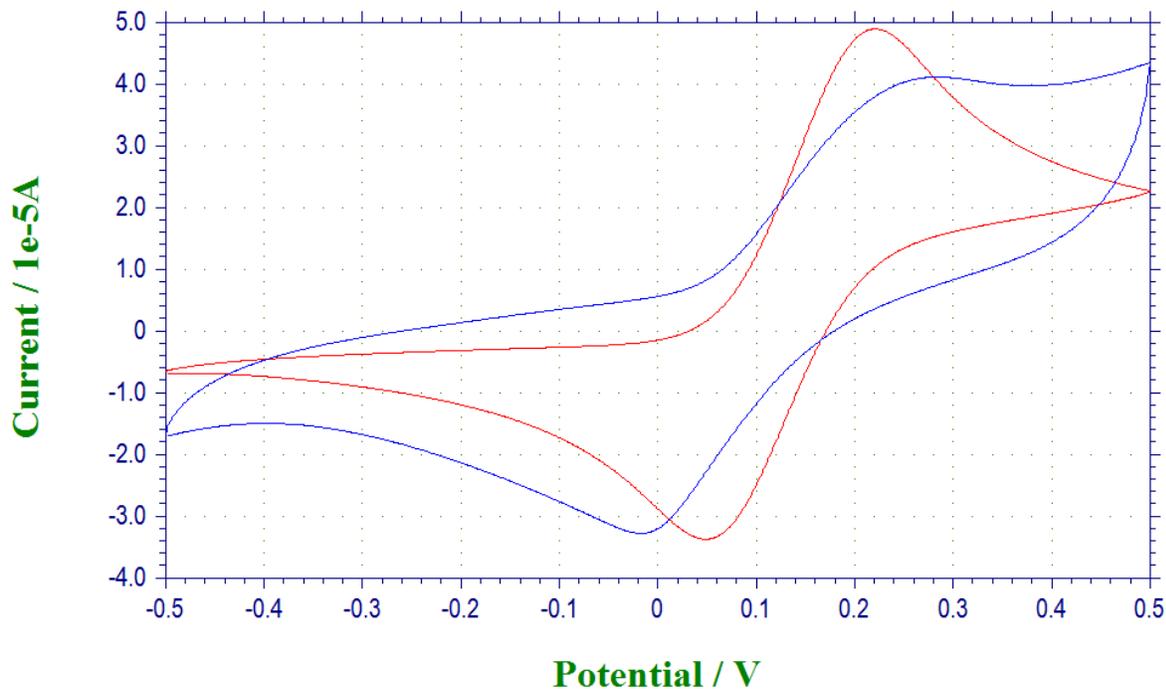


Figura 13. VC en ferro/ferri para electrodo desnudo (—) y modificado con ADNasp 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (—).

El corrimiento de los potenciales redox de la cupla se asoció a la modificación de la superficie.

Si la hipótesis de trabajo es correcta, debería además observarse que, a concentraciones mayores de ADN, la corriente de oxidación/reducción de la cupla debería disminuir progresivamente. Los resultados de VC, para electrodos electropolimerizados a diferentes concentraciones de ADNasp, se muestran en la figura 14. Se observó que, efectivamente, a medida que aumentaba la concentración de ADNasp empleada, la intensidad de los picos de oxidación/reducción disminuía, hasta ser prácticamente no advertida para la concentración de 1.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se constató además que, en todos los casos, la intensidad siempre estuvo por debajo de la registrada para electrodos desnudos, con la salvedad de los electrodos modificados

empleando ADNasp 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, en donde la intensidad fue llamativamente mayor. Dicho fenómeno fue constatado para varios electrodos modificados en esas condiciones, pero se desconocen las causas posibles y no fue un objetivo del presente trabajo ahondar en este punto.

Debido a esto, los restantes ensayos fueron llevados a cabo con dicha concentración de ADN, dado que si la presencia de anticuerpos anti-ADNdc redujera significativamente la intensidad de corriente de la cupla por un efecto estérico, sería favorable contar con una corriente de base lo suficientemente grande, a partir de la cual, registrar los posibles cambios, luego de los ensayos con anticuerpos.

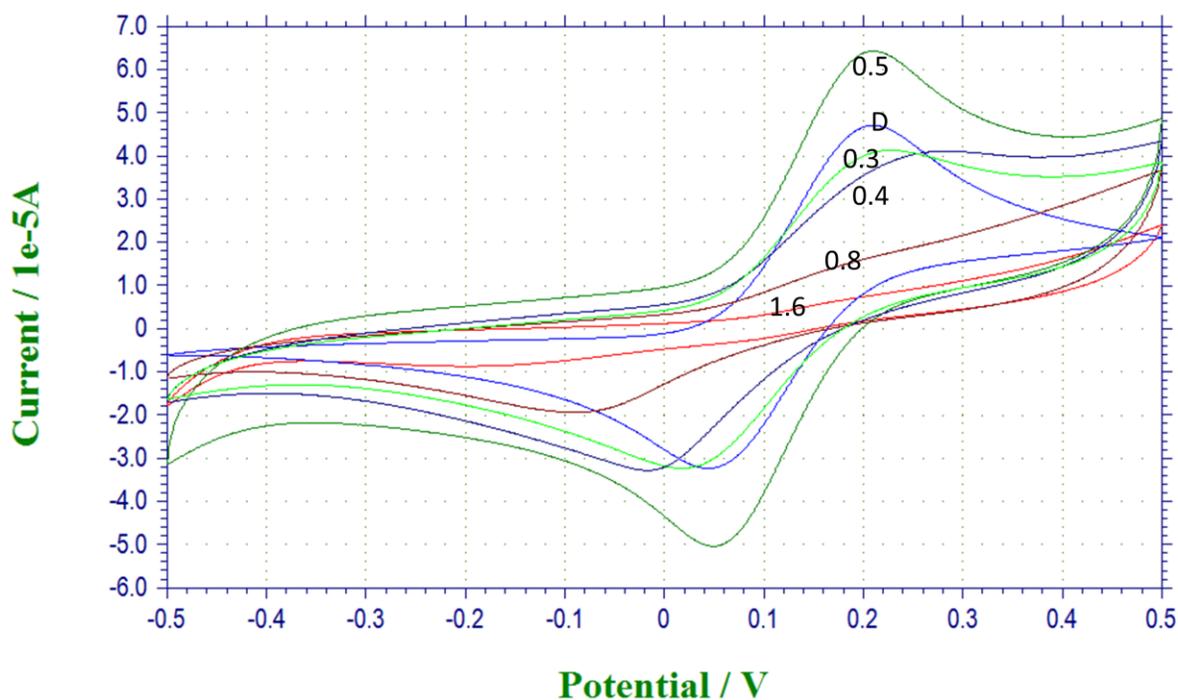


Figura 14. VC en ferro/ferri para electrodos modificados con diferentes concentraciones de ADNasp. La VC para electrodo desnudo se indica con la letra D. en todos los casos se empleó solución de Py 20 mM para la electropolimerización. La VC se realizó entre los potenciales de -0.5V a +0.5V a una velocidad de barrido de 0.05 V/s.

El ADNasp empleado en esta primera etapa, se obtuvo mediante extracción con los protocolos habituales de trabajo de los laboratorios de biología molecular. La cantidad de ADN obtenida en cada extracción fue variable, y además no se contó con una fuente constante de *Aspergillus nidulans*, lo cual motivó la búsqueda de una fuente más

accesible y con un mayor contenido de ADN. En lo que resta del trabajo, se empleó entonces ADN genómico de esperma de salmón liofilizado (ADNesp).

Dado que se trata de ADN de diferente origen, se comenzó evaluando el crecimiento del film de pPy a la concentración de $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se lo comparó frente al voltamperograma de crecimiento obtenido con ADNasp a la misma concentración (ver figura 15).

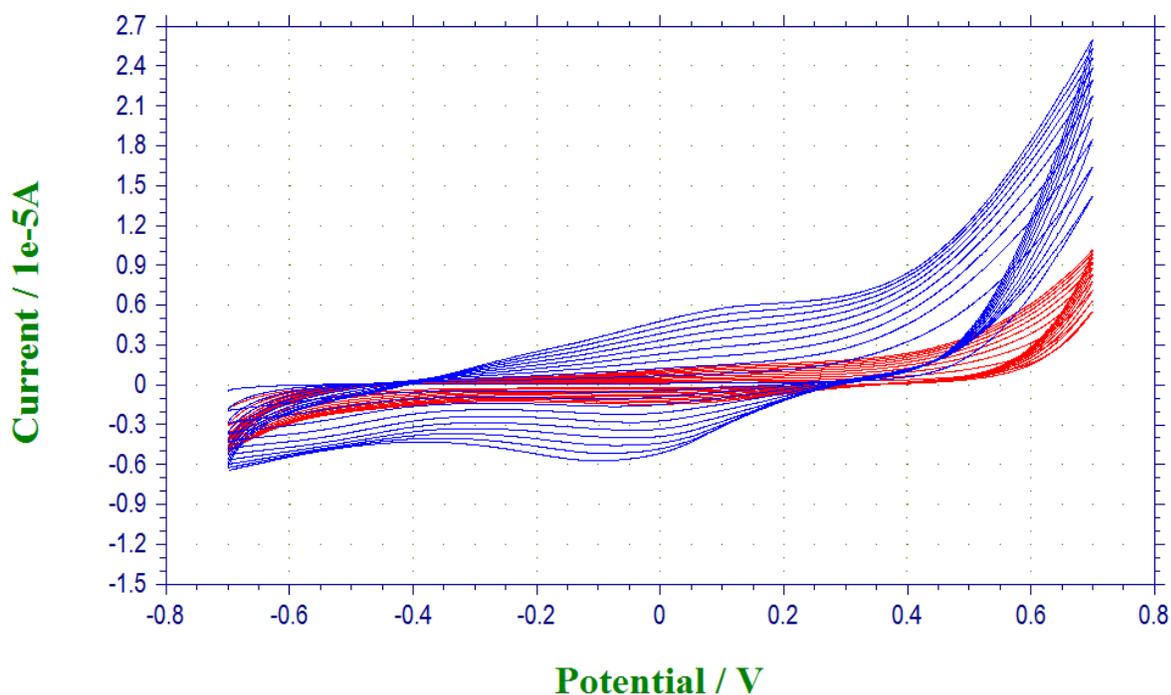


Figura 15. Voltamperogramas de crecimiento de film de pPy en presencia de ADNasp (—) y ADNesp (—). En ambos casos la concentración de ADN fue de $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Claramente, el crecimiento del film de pPy fue afectado por el cambio de ADN, lo cual era esperable, pero no en la magnitud observada. El hecho podría estar ligado estrictamente a la secuencia de ambos ADNs, ahora bien, dado que se trabajó con ADNg (de gran tamaño), en principio no podría haberse observado un cambio tan drástico. La respuesta a la interrogante llegó casi de forma “azarosa”, después de una observación sobre la viscosidad de la solución de ADNesp. La solución stock

presentaba una consistencia muy viscosa, que la hacía difícilmente manejable, con lo cual se decidió someterla a vortex por 10 s. Cuando se empleó dicha solución para la electropolimerización, se constató que los picos de oxidación/reducción del pPy, y de oxidación del Py aumentaban, en comparación al ensayo con ADNesp sin vortex. (Figura no mostrada). En base a esto, se evaluaron diferentes tiempos de tratamiento en vortex, hasta que para un tiempo de 30 s, el voltamperograma de electropolimerización fue muy similar al obtenido con ADNasp (ver figura 16). Este hecho indicaría que el crecimiento del film está influenciado claramente por la longitud de los fragmentos de ADN presentes en la solución, los cuales fueron mayormente fragmentados al aplicarle tratamiento en vortex. De aquí en adelante, se empleó ADNesp sometido a tratamiento con vortex durante 30 segundos en todos los ensayos (ADNesp-v).

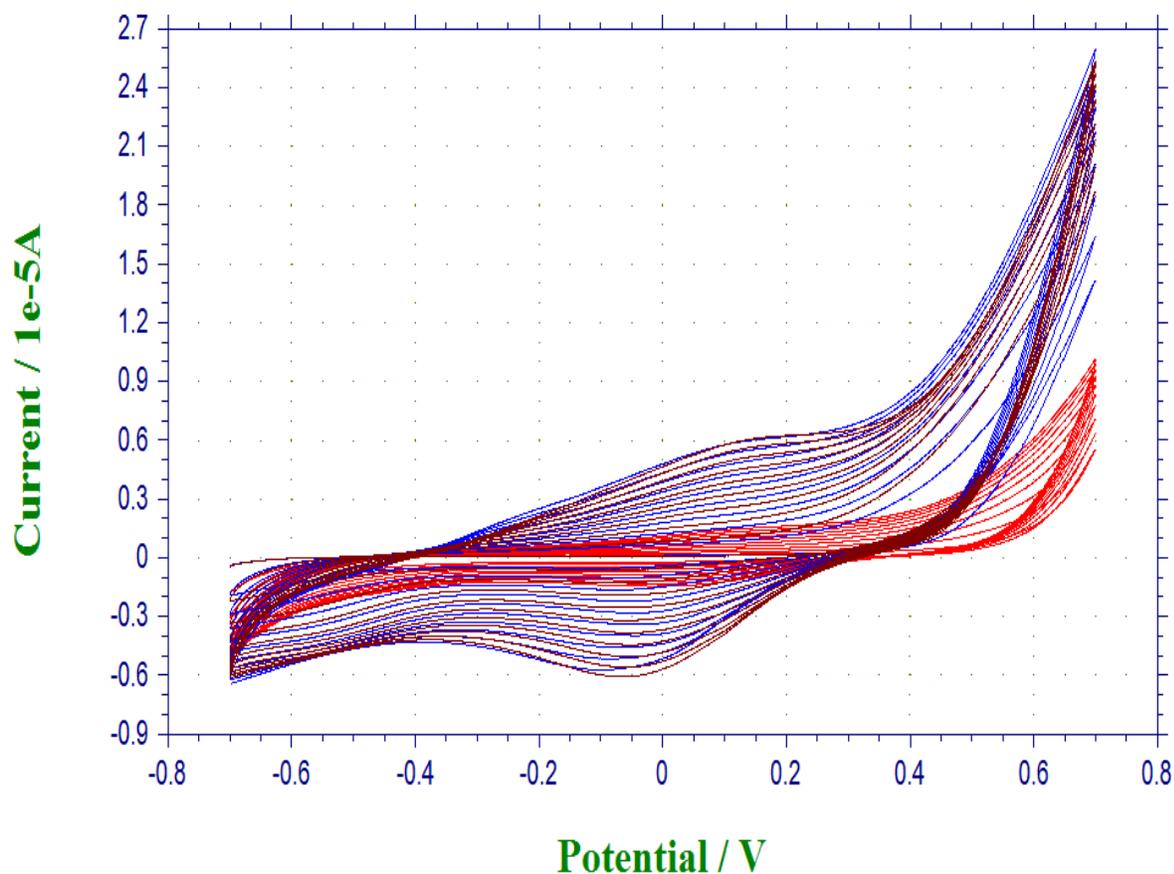


Figura 16. Voltamperogramas obtenidos para la electropolimerización empleando ADNasp (—), ADNesp (—) y ADNesp tratado durante 30 s en vortex (—). En todos los casos la concentración de ADN fue de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Para evaluar el posible efecto sobre la corriente de oxidación/reducción de la cupla ferro/ferri, luego de incubados los anticuerpos, se debe conocer el valor de intensidad de corriente de base a tomar como referencia. Para ello, se modificaron cuatro electrodos con pPy/ADNesp-v y se realizó VC, en presencia de la cupla ferro/ferri.

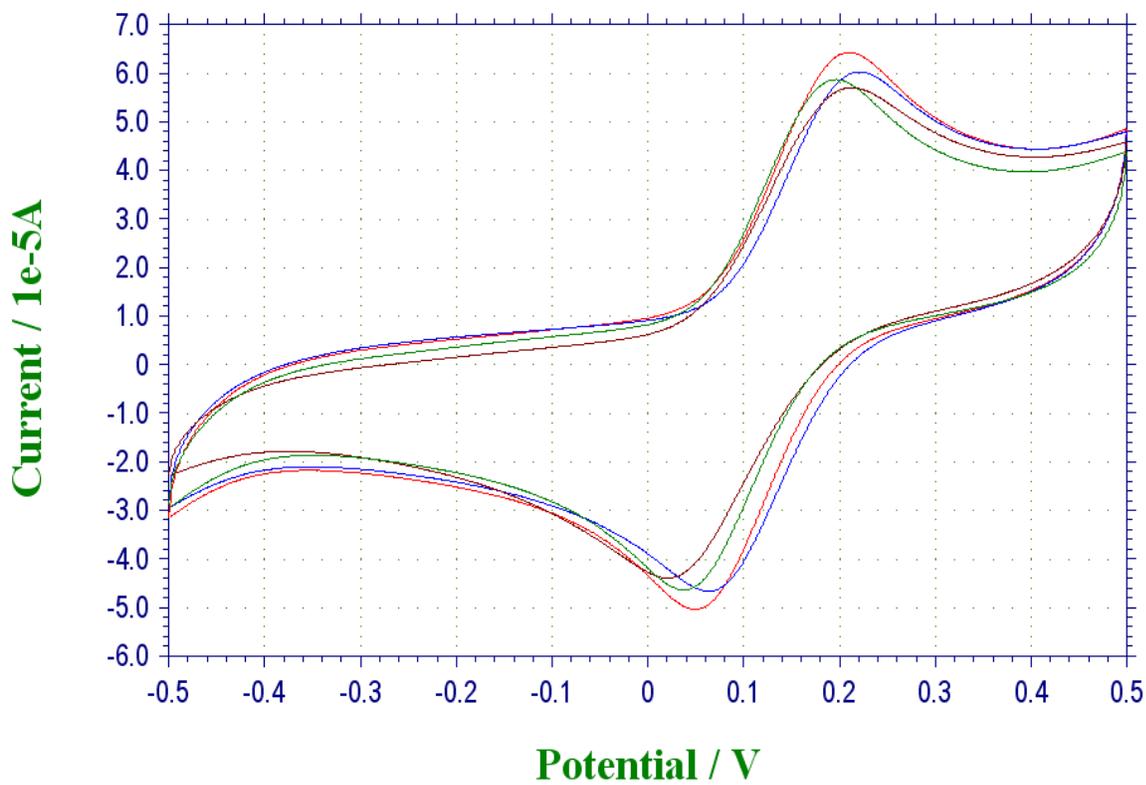


Figura 17. VC en presencia de ferro/ferri para diferentes electrodos modificados con pPy/ADNesp-v. En todos los casos, se empleó ADN de concentración $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. El valor de corriente de oxidación promedio obtenido fue de $37 \pm 1 \mu\text{A}$.

Como se muestra en la figura 17, existieron ligeras variaciones en las corrientes registradas, las cuales obedecieron a la variabilidad propia del sistema. Mediante la herramienta Manual Results del programa CHI760D Electrochemical Workstation Beta, se determinó el valor de la corriente de oxidación en cada caso, y se calculó la intensidad promedio y su desvío estándar, obteniéndose un valor de $37 \pm 1 \mu\text{A}$.

4.2.1- Ensayos con anticuerpos anti-ADNdc sobre electrodos pPy/ADNesp-v.

Los ensayos de incubación de electrodos modificados con anticuerpos, no mostraron los resultados esperados. En primer lugar, tanto el electrodo incubado con dilución de anticuerpo anti-ADNdc comercial como el incubado con dilución de IgGnm, mostraron cambios en los voltamperogramas de la cupla ferro/ferri. Los picos de óxido/reducción aparecen más ensanchados y menos definidos, si se los compara con los picos obtenidos con los electrodos previamente a la incubación, lo que hizo pensar que, si bien se observó un cambio en la señal, éste no fue lo suficientemente definido, ni específico de la interacción de los anticuerpos anti-ADNdc. Sumado a esto, no se apreciaron diferencias claras para los electrodos incubados con anti-ADNdc 0.333 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$, teniendo en cuenta que se trata de una concentración 10 veces superior en un caso que en otro (ver figura 18).

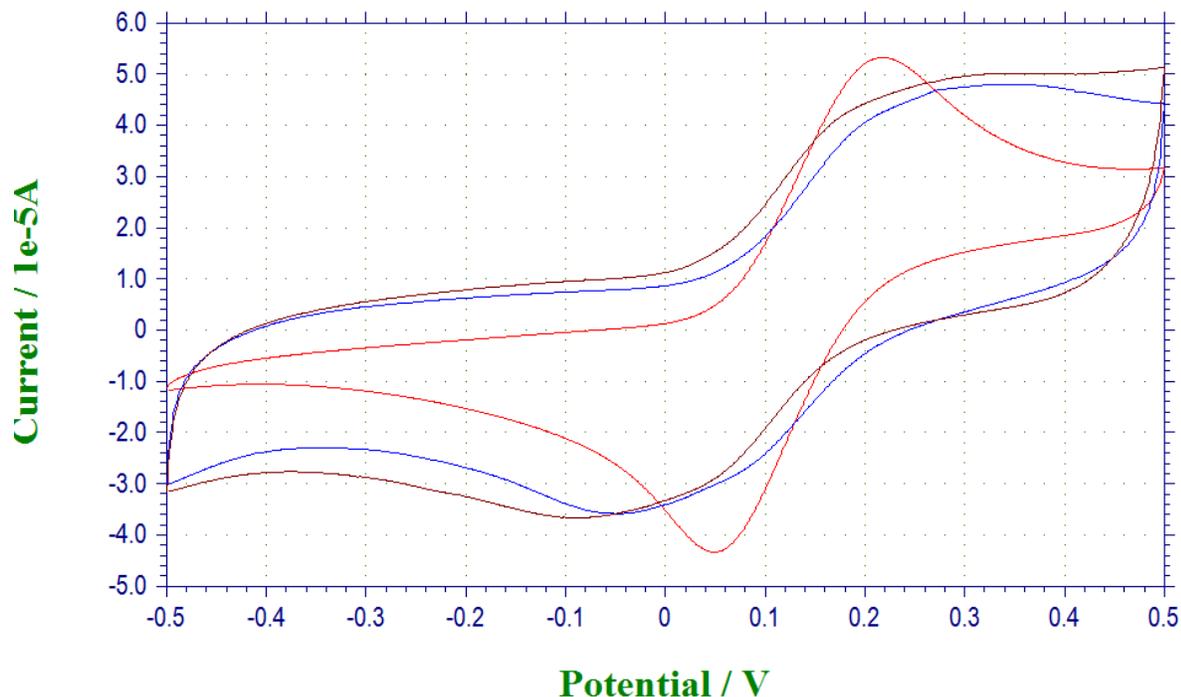


Figura 18. VC en presencia de ferro/ferri para electrodos pPy/ADNesp-v (—), pPy/ADNesp-v incubados con anti-ADNdc 0.333 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (—) y 0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (—)

En el caso de las incubaciones con IgGnm, el resultado fue aún más llamativo, dado que los picos se mostraron mucho menos definidos, y el voltamperograma mayormente distorsionado. En este caso, era esperable que los VC no fueran significativamente diferentes, luego de la incubación con anticuerpos (ver figura 19).

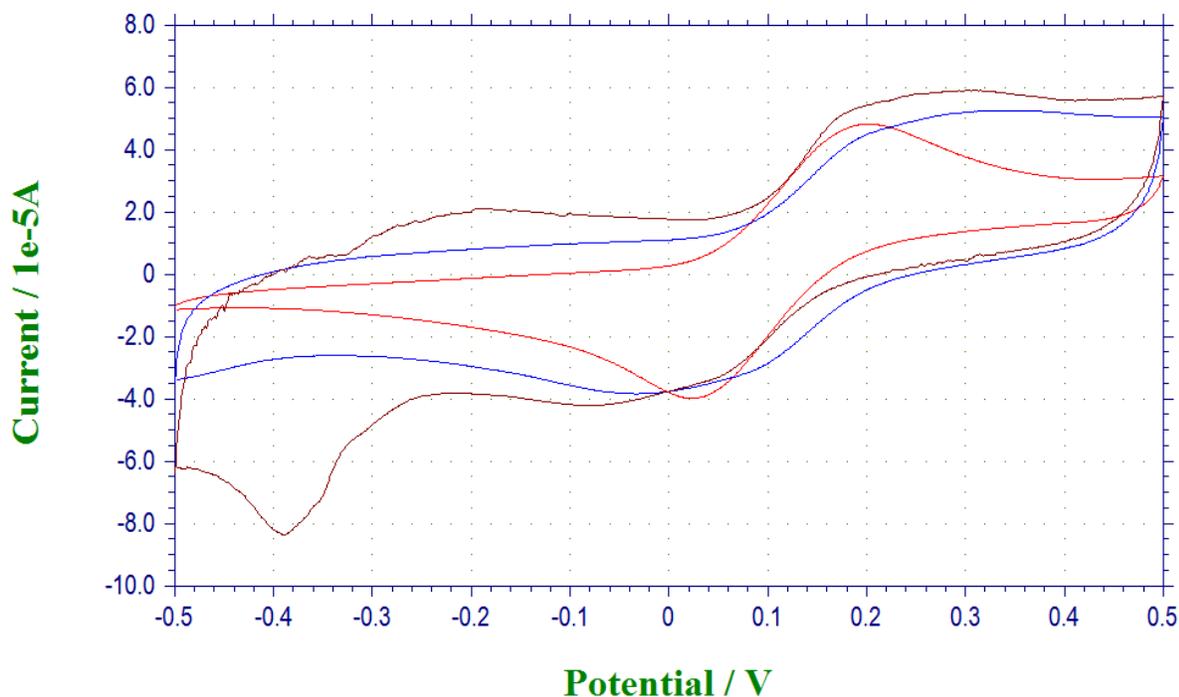


Figura 19. VC en presencia de ferro/ferrri para electrodos pPy/ADNesp-v (—), pPy/ADNesp-v incubados con IgGnm 0.333 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (—) y 0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (—).

Como control, se realizó la incubación únicamente con solución buffer PBS, y se sometió posteriormente el electrodo a VC, en presencia de ferro/ferrri. El voltamperograma obtenido se muestra en la figura 20. Claramente existió un cambio en el voltamperograma, aún en ausencia de anticuerpos, lo que obligó a pensar en otros factores que afectarían al sistema, ocasionando el comportamiento observado, e independiente de la presencia de anticuerpos.

Los factores que podrían estar afectando al sistema podrían ser: 1- alteración del film pPy/ADNesp-v por efecto de la incubación a 37°C, 2- cambios estructurales del film al mantenerse a T_{amb} , 3- interferencia del método de lavado empleado.

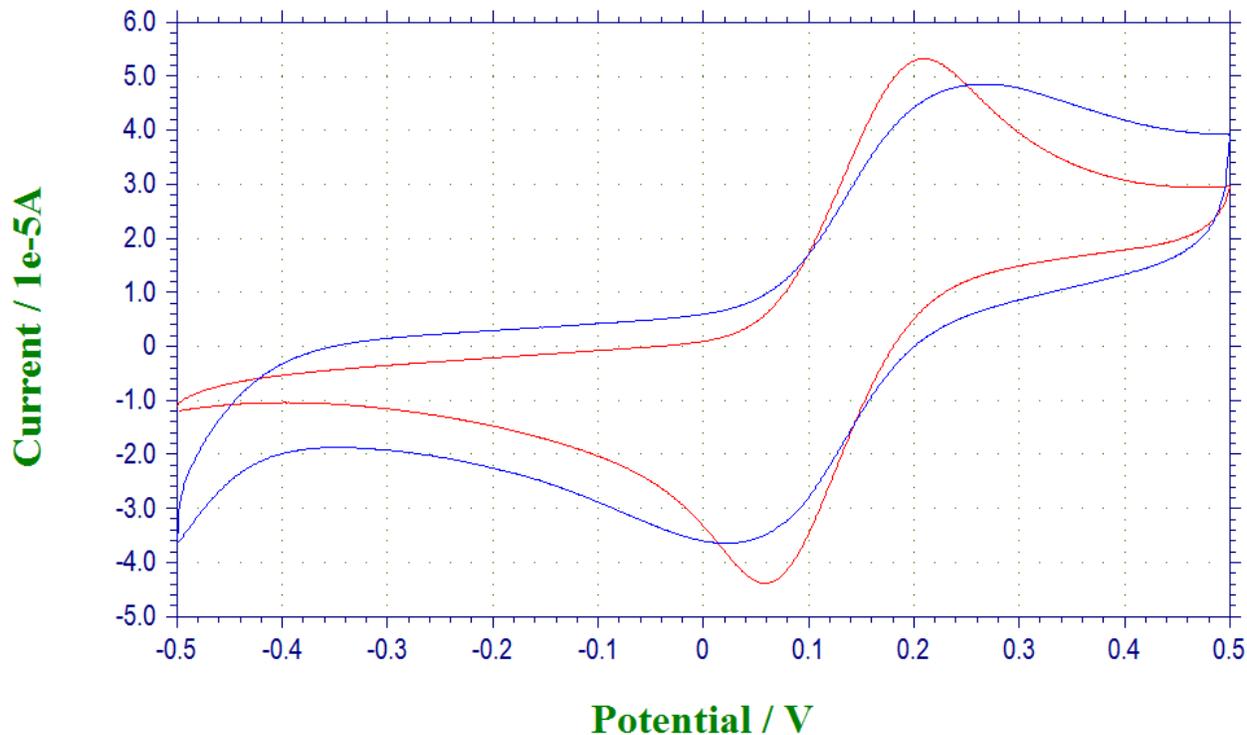


Figura 20. VC en presencia de ferro/ferrí para electrodo pPy/ADNesp-v antes (—) y después de incubación con PBS a 37 °C durante 1 hora (—). Los lavados fueron realizados con PBS-T0.05.

Para evaluar el primer punto, se preparó un electrodo pPy/ADNesp-v, y se incubó con solución PBS a 37°C en cámara húmeda durante 1 hora. Dado que se deseaba evaluar únicamente el efecto de las condiciones de incubación, no fue lavado el electrodo con PBS-T 0.05. En la VC realizada posteriormente en presencia de ferro/ferrí, no se observaron picos tan desplazados ni visiblemente ensanchados en el voltamperograma, aunque no fue despreciable el hecho de que existe cierta alteración en la respuesta del sistema. En virtud de esto, no se pudo atribuir el cambio observado únicamente a un efecto de las condiciones de incubación (ver figura 21).

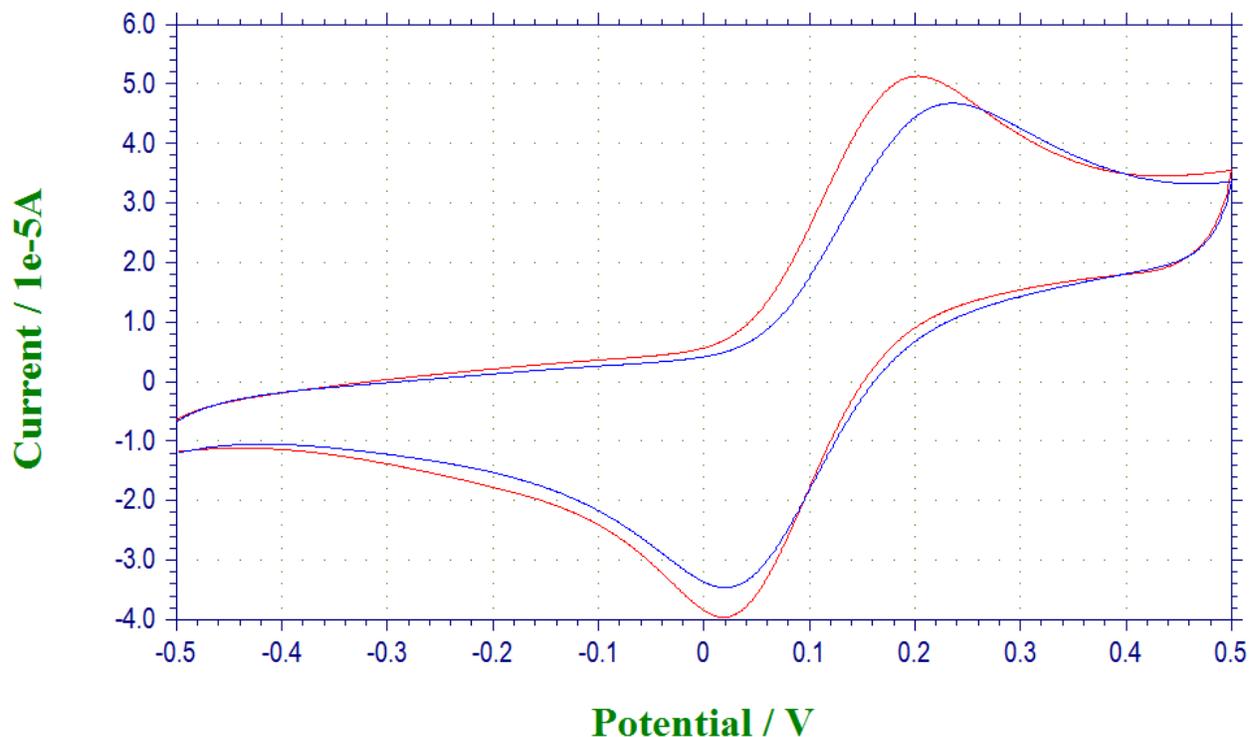


Figura 21. VC en presencia de ferro/ferri para electrodo modificado con pPy/ADNesp-v antes (—) y después de incubación a 37°C durante 1 hora (—). No fueron realizados los lavados con PBS-T0.05.

El análisis del punto número dos se realizó incubando solución PBS sobre el electrodo a T_{amb} durante 1 y 3 horas, realizándose VC, en presencia de ferro/ferri posteriormente. Cabe aclarar que en este punto se omitió nuevamente la etapa de lavado con PBS-T, dado que se buscó evaluar cada uno de los factores mencionados por separado. Como se aprecia en la figura 22, el voltamperograma se ve alterado con el transcurso del tiempo, lo que indicaría que el film pPy/ADNesp-v parece afectarse, cambiando las propiedades eléctricas de la superficie, lo que se reflejó en una disminución aparente de las intensidades de corriente en los picos de oxidación/reducción de la cupla ferro/ferri. Ahora bien, no se apreciaron las modificaciones obtenidas luego en los voltamperogramas de la figura 18 y 19, lo que hizo pensar, la existencia de otros factores que repercuten en el sistema.

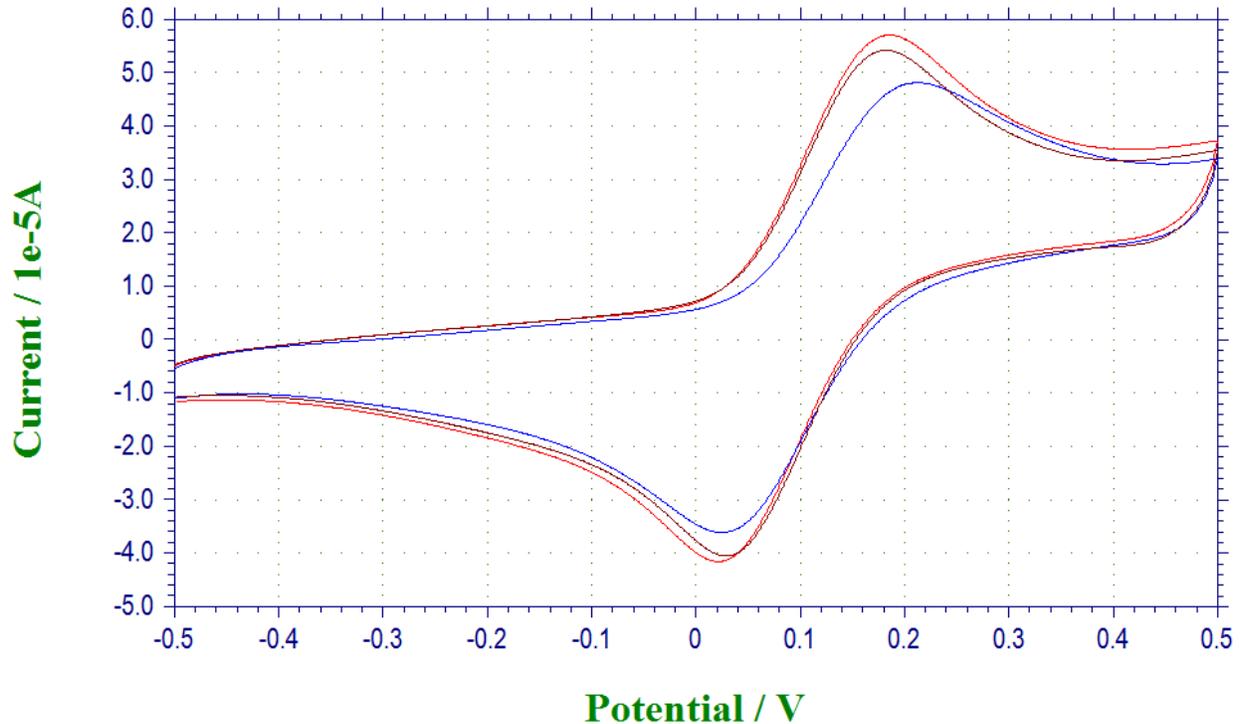


Figura 22. VC en presencia de ferro/ferri para electrodo modificado con pPy/ADNesp-v antes (—) y después de incubación a T_{amb} durante 1 hora (---) y 3 horas (---). No fueron realizados los lavados con PBS-T0.05.

Los lavados hasta el momento, para los ensayos con anticuerpos fueron realizados sumergiendo el electrodo en solución PBS-T0.05 e incubando con agitación durante 5 min, repitiéndose este procedimiento en tres ciclos. Para analizar separadamente el posible efecto de los lavados con PBS-T, se preparó un electrodo pPy/ADNesp-v y se sometió directamente al procedimiento de lavado mencionado, realizándose luego VC en presencia de la cupla ferro/ferri. El resultado en este punto fue notoriamente similar al obtenido durante los ensayos de incubación con anticuerpos. Si bien no fue apreciable una disminución de la intensidad de corriente, los picos de oxidación/reducción se vieron ensanchados y menos definidos (ver figura 23). La pregunta planteada en este punto fue si, el resultado obtenido era producto del mecanismo de lavado, o un efecto debido a la solución de PBS-T.

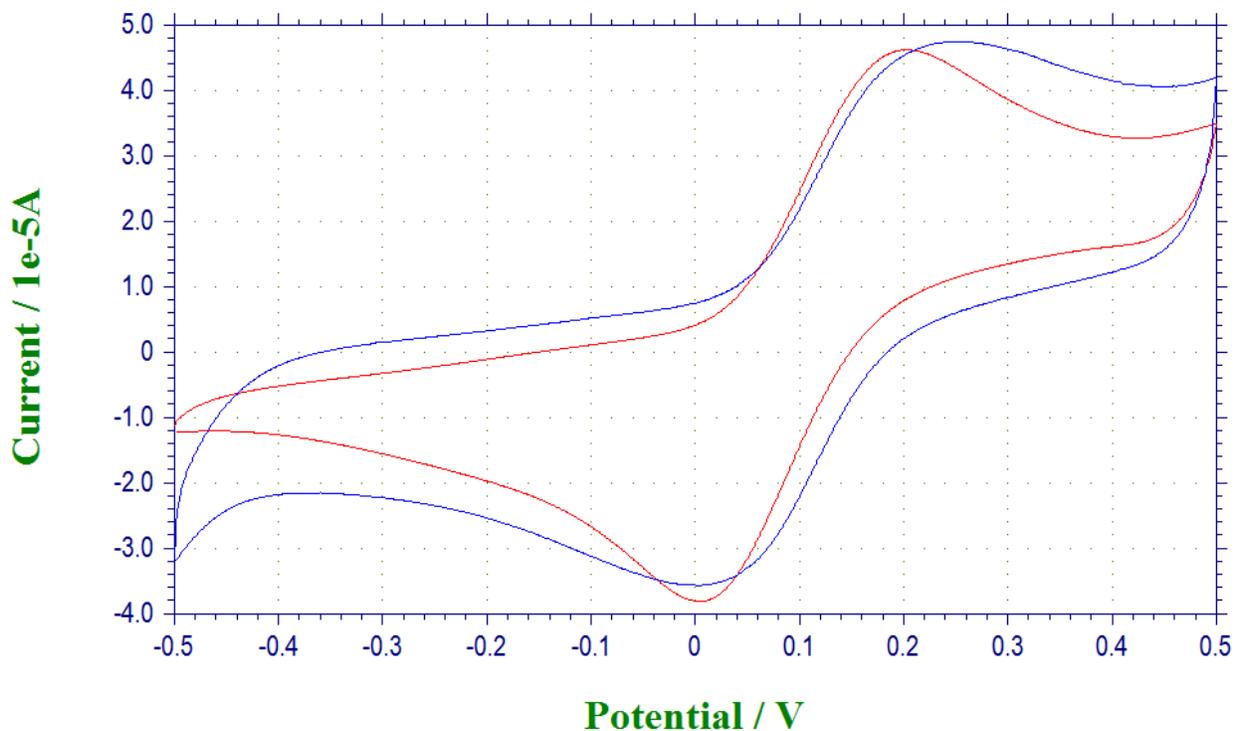


Figura 23. VC en presencia de ferro/ferri para electrodo pPy/ADNesp-v antes (—) y después de lavado mediante inmersión en solución PBS-T0.05 (—).

La variante propuesta en este punto fue evaluar los lavados sin inmersión del electrodo, y sin agitación, es decir depositando 50 μL de PBS-T0.05 sobre el sistema, e incubando durante 5 min a T_{amb} . Claramente, se desprende de los voltamperogramas de la figura 24 que la mayor variación observada se manifestó cuando los lavados se realizaron por inmersión y con agitación. No fue posible encontrar una explicación certera, ni evidencia de este fenómeno en otros trabajos; se especuló que la alteración apreciada, podría deberse a la adsorción del Tween sobre la superficie del electrodo, la cual se ve favorecida cuando el sistema se somete a un lavado mecánico.

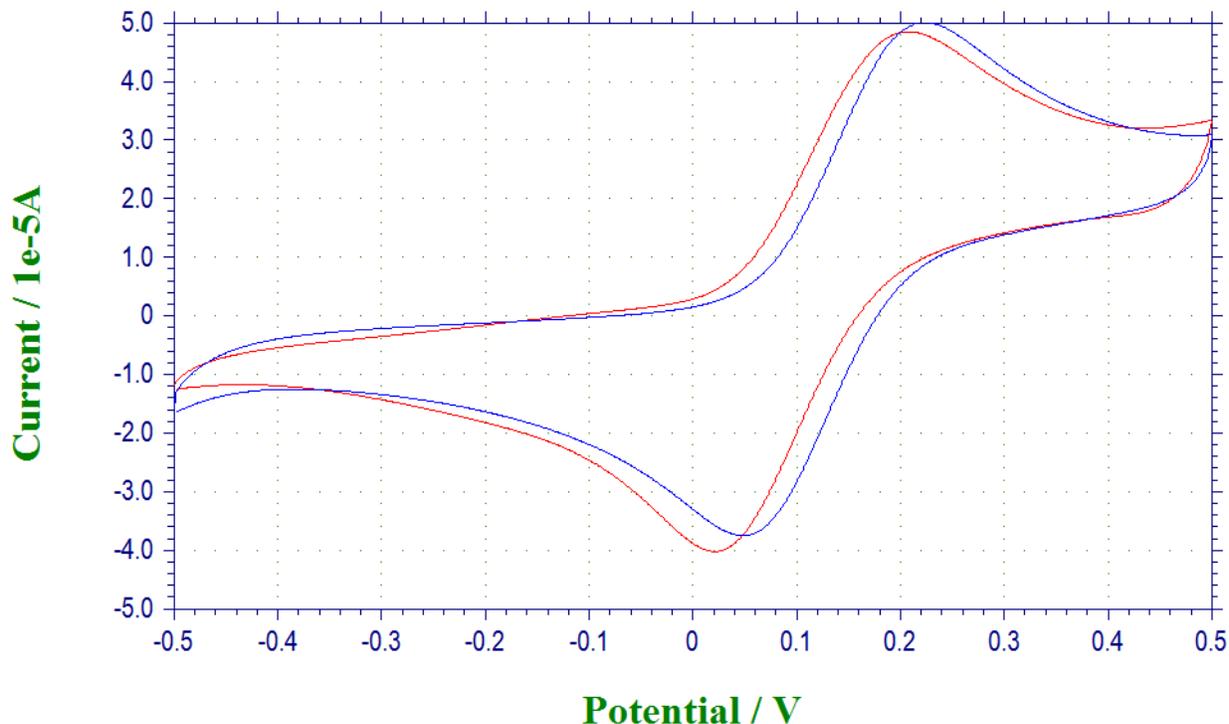


Figura 24. VC en presencia de ferro/ferri para electrodo pPy/ADNesp-v antes (—) y después de lavado mediante incubación (sin agitación) con 50 μ L de solución PBS-T0.05 (—).

Si bien los resultados hasta aquí mostraron que los tres factores analizados alteraron de una forma u otra el comportamiento electroquímico del sistema, el que mayormente pareció influir fue el del sistema de lavado.

Dado que los lavados mediante deposición de la solución de PBS-T sobre la superficie del electrodo no parecieron afectar significativamente el sistema, se decidió emplear este procedimiento y repetir el ensayo de incubación con anticuerpos.

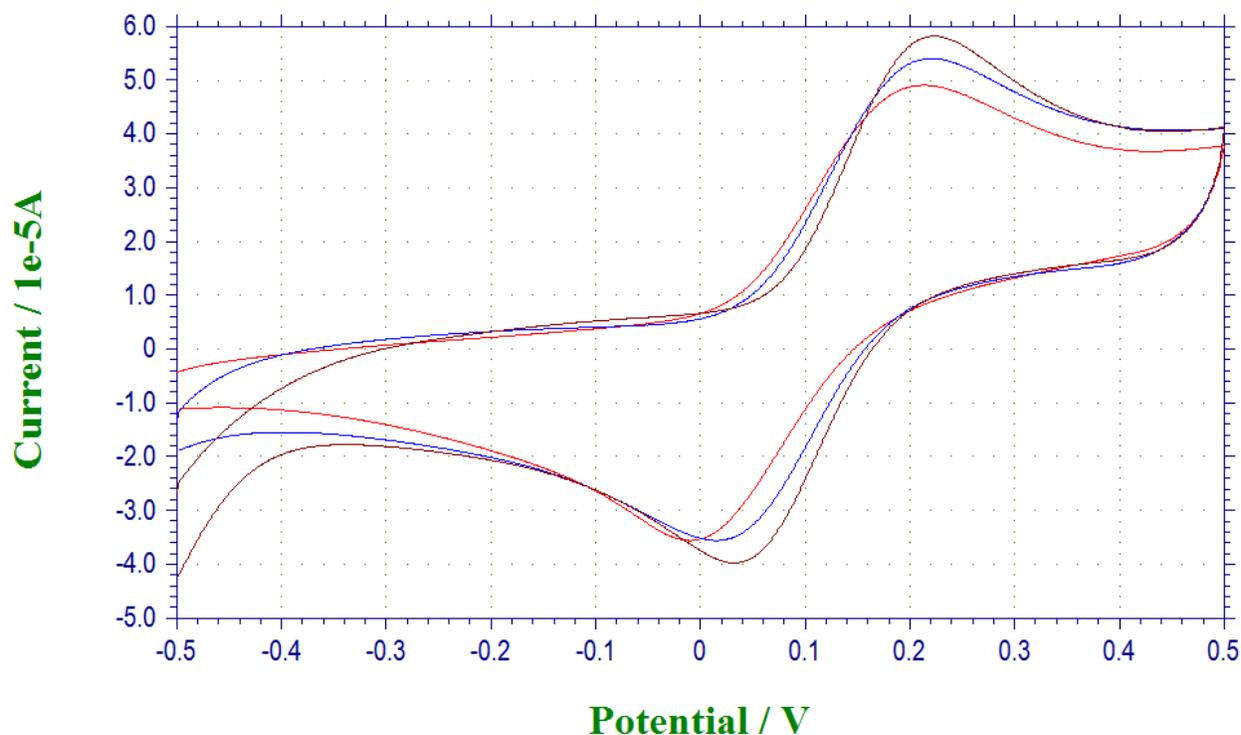


Figura 25. VC en presencia de ferro/ferrri para electrodos pPy/ADNesp-v (—), pPy/ADNesp-v incubados con anti-ADNdc 0.333 $\mu\text{g/mL}$ (—) y 0.033 $\mu\text{g/mL}$ (—). Los lavados se realizaron mediante la deposición de una solución de PBS-T 0.05 e incubación durante 5 minutos.

Comparando los resultados de este ensayo, con los obtenidos en primera instancia, se observó que efectivamente parece no estar presente el efecto del Tween. En cuanto a la presencia de anticuerpos, no se obtuvo el resultado esperado. Recordar que la hipótesis consistía en que la presencia de anticuerpos en la superficie podría interferir estéricamente en el acceso de la cupla a la superficie del electrodo, disminuyendo así las intensidades de corriente registradas. Este efecto no fue visualizado, más aún cuando los voltamperogramas para electrodos incubados con anticuerpos mostraron intensidades de corriente mayores. Además, al comparar los voltamperogramas obtenidos para dos electrodos incubados con diferentes concentraciones de anti-ADNdc, a saber 0.333 y 0.033 $\mu\text{g/mL}$, a pesar de mostrar diferencias, la misma no fue significativa, si se recalca el hecho de que una concentración es 10 veces mayor que la otra (ver figura 25).

Igualmente estos resultados, no permitieron confirmar si existe o no interacción entre el ADN inmovilizado y los anticuerpos. Cabe la posibilidad de que tal fenómeno no se dé, debido a la inaccesibilidad, y/o conformación inadecuada del ADN una vez integrado a la matriz de pPy. Fue necesario por lo tanto emplear ensayos de carácter espectrofotométrico para constatar la viabilidad de la interacción.

Un segundo aspecto que permaneció sin el análisis necesario fue que la cupla empleada, de pequeño tamaño (en comparación con otras cuplas redox), tuviera igualmente acceso a la superficie del electrodo, a través de las regiones expuestas. Para estudiar este aspecto, ensayos con cuplas de mayor tamaño podrían haber orientado la investigación y confirmado o descartado definitivamente la hipótesis del impedimento estérico. Dado que no se contó con una cupla de esta naturaleza, no fue posible llevar a cabo estos experimentos, y este método electroquímico de detección, propuesto inicialmente, fue dejado de lado para lo que resta de este trabajo.

4.2.2- Pruebas no electroquímicas de detección de anticuerpos anti-ADNdc sobre la superficie de los electrodos pPy/ADNesp-v.

A la hora de realizar un ensayo no electroquímico para la detección de anticuerpos anti-ADNdc sobre la superficie de los electrodos, se optó por la adaptación y puesta a punto del ensayo de ELISA debido a su alta sensibilidad, robustez y fácil adaptación en el sistema planteado; así como también, debido a los buenos resultados obtenidos en el ensayo de ELISA desarrollado al comienzo de este trabajo. En los trabajos de Konstantinov KN y Rubin RL, se planteó la construcción de un biosensor electroquímico para la detección de anti-ADNdc, cuyo funcionamiento es similar al del ensayo de ELISA, pero a diferencia de lo planteado aquí, se hace uso de un dispositivo plástico que se coloca sobre la superficie de los electrodos de forma de contener las soluciones de trabajo^{1,49}. Para el sistema desarrollado aquí, fue posible prescindir, en un principio, de un dispositivo capaz de contener las soluciones, empleando volúmenes inferiores a las capacidades de los pocillos de la placa de ELISA, consiguiéndose un recubrimiento óptimo de todo el sistema empleando 50 μ L de solución.

En este ensayo, no se realizó la etapa de bloqueo, dado que se consideró innecesaria de acuerdo a las características del film pPy/ADN. Se decidió trabajar con una concentración de anticuerpos que registrara una importante señal para el anti-ADNdc, y muy baja señal para el anticuerpo IgGnm, por lo cual se seleccionó la concentración intermedia dentro del rango trabajado en el ensayo de ELISA de especificidad.

Las absorbancias obtenidas en el primer ensayo realizado se muestran en la tabla 2, donde lo que se destacó fue el valor elevado de la misma, obtenido para el sistema que se incubó únicamente con IgG-HRP, y la escasa diferencia entre los valores obtenidos con los sistemas incubados con anticuerpos específicos e inespecíficos de ADN. No hay que perder de vista que igualmente los valores registrados fueron muy bajos.

Tabla 2. Absorbancias obtenidas luego de la incubación con anti-ADNdc, IgGnm, e IgG-HRP para tres sistemas de electrodos pPy/ADNesp-v.

anticuerpo	abs
Anti-ADNdc	0.028
IgGnm	0.045
IgG-HRP	0.072

Lo esperable en este caso, era una muy baja señal debida al anticuerpo IgG-HRP, lo cual no fue así. Esto indicó que existía una fuerte interacción inespecífica en el sistema, más aún cuando el anticuerpo IgGnm dio una señal mayor a la de los anti-ADNdc. La alternativa que se planteó fue realizar los lavados con soluciones PBS con mayor concentración de detergente Tween20, y emplear diluciones de IgG-HRP mayores.

En virtud de esto, se realizaron ensayos sobre 4 sistemas pPy/ADNesp-v empleando dos concentraciones de IgG-HRP y dos soluciones de lavado con diferente concentración de Tween20. Los resultados de absorbancia obtenidos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Absorbancias obtenidas en el ensayo con diluciones de IgG-HRP mayores (1/2000 y 1/6000) y lavados con solución PBS-T 0.1 y PBS-T 0.3.

	Dilución de IgG-HRP	
Sol. de lavado	1/2000	1/6000
PBS-T 0,1%	0.040	0.015
PBS-T 0,3%	0.062	0.027

Como se apreció en el análisis de los datos de absorbancia, al emplear mayores diluciones de IgG-HRP se obtuvo un menor pegado inespecífico, aunque este no llegó a ser nulo como se deseaba, en cambio el empleo de Tween20 a mayores concentraciones parece tener un efecto contrario al buscado. En base a esto, se determinó que el mayor factor que contribuía a la señal inespecífica venía de la mano de la concentración de IgG-HRP empleada, por lo cual se decidió determinar la dilución óptima con la que se registrara la menor absorbancia posible. Una observación importante fue que al comparar el dato de absorbancia de la tabla 2 y el de la tabla 3, para la misma dilución de IgG-HRP, se vio que dichos valores diferían. Esto dio a entender que la variabilidad propia del sistema jugaba un rol importante, quizás originada posiblemente, por un diferente grado de adsorción inespecífica del anticuerpo IgG-HRP en uno u otro caso.

El gráfico mostrado en la figura 26 registra el efecto de las incubaciones con diluciones mayores de IgG-HRP. Claramente, se observó que la absorbancia disminuía gradualmente. Para el caso de las dos últimas diluciones, la variación de la absorbancia fue menor a la esperada si se tiene en cuenta que una dilución presentó la mitad de concentración respecto a la otra, con lo cual se consideró que el sistema

alcanzó el mínimo de señal posible, ocasionado por el pegado inespecífico del anticuerpo IgG-HRP. La dilución 1/32000 se tomó como la óptima para los próximos ensayos.

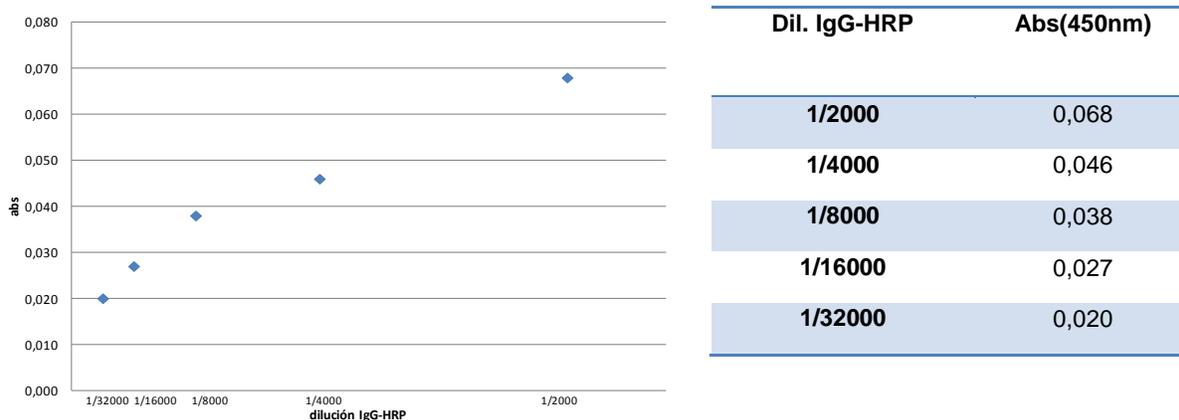


Figura 26. Se muestra la variación de la absorbancia para diferentes concentraciones de IgG-HRP incubadas sobre los electrodos modificados con pPy/ADNesp. Se observa claramente que a mayores diluciones de IgG-HRP, la absorbancia disminuye, alcanzando un punto donde la variación entre dos diluciones consecutivas es mínima.

Cuando se ensayó con diluciones de anti-ADNdc e IgGnm empleando diluciones 1/32000 de IgG-HRP, se obtuvo señal en ambos casos, siendo levemente mayor la absorbancia obtenida con el sistema incubado con anti-ADNdc. Estos resultados indicaron que, a pesar de emplear una solución de IgG-HRP muy diluida, el pegado inespecífico en el sistema aún era importante (ver tabla 4).

Tabla 4. Absorbancias obtenidas luego de la incubación con anti-ADN e IgGnm, empleando una dilución 1/32000 de IgG-HRP.

anticuerpo	Abs
IgGnm	0.055
anti-ADNdc	0.081

Cuando se analizó con mayor detenimiento el procedimiento empleado, se advirtió que la posible causa del fuerte pegado inespecífico podría estar relacionada a la adsorción

sobre el contraelectrodo de carbono y/o a la región cerámica del sistema, las cuales quedan expuestas en los espacios entre electrodos (ver figura 7). El procedimiento empleado hasta este momento consistió en incubar las soluciones de anticuerpo sobre los tres electrodos, y por consiguiente también los mismos tomaron contacto con los espacios ocupados por la cerámica.

Para evaluar la posible adsorción de los anticuerpos al carbono y/o a la cerámica, se incubó una solución de IgG-HRP únicamente sobre estas regiones. Las absorbancias obtenidas se resumen en la tabla 5. En este caso, se registró una absorbancia importante en los ensayos, tanto sobre carbono, como sobre la región cerámica. Dado que la incubación únicamente con solución de revelado, sobre estos mismos materiales, mostró un valor de absorbancia despreciable, se pudo afirmar que la señal registrada en los ensayos anteriores, obedece a un fuerte pegado inespecífico de los anticuerpos a las regiones que permanecen expuestas.

Tabla 5. Absorbancias obtenidas en el ensayo de pegado inespecífico sobre carbono y cerámica. Se incluyen además los resultados de absorbancia de la incubación únicamente con solución de revelado sobre los mismos materiales.

Sistema	abs(450nm)
Carbono/pPy/ADNesp-v/IgG-HRP/sol. revelado (depositando sol. de IgG-HRP sobre los 3 electrodos)	0.070
Carbono/IgG-HRP/sol. revelado	0.040
Cerámica/IgG-HRP/sol. revelado	0.037
Cerámica/sol. revelado	0.002
Carbono/sol. revelado	0.006

El hecho de que sobre las regiones de carbono y cerámica se adsorbieron inespecíficamente los anticuerpos, obligó a evitar las incubaciones sobre las mismas. Se pensó en primera instancia, en aumentar la concentración de Tween20 en los lavados, o llevar a cabo los mismos con una mayor agitación de forma de lograr

remover todas aquellas moléculas unidas débilmente, pero como ya se constató anteriormente, el empleo de soluciones con mayor concentración de detergente no contribuyó significativamente al objetivo buscado. Sumado a esto, cuando se procedió al lavado con mayor agitación mecánica, sumergiendo los electrodos en la solución de lavado, se vio cierta interferencia originada posiblemente por la adsorción de Tween20.

Como alternativa, se buscó limitar la incubación con anticuerpos únicamente a la superficie del electrodo de trabajo, para lo cual se evaluaron tres estrategias. Primeramente se cubrió el sistema de electrodos con papel film, dejando un pequeño orificio, en donde quedó expuesto el electrodo de trabajo, y sobre el cual se depositaron las soluciones de anticuerpo. Esta estrategia mostró algunas dificultades; primeramente y a pesar de ajustar fuertemente el papel a la superficie, luego de cierto tiempo de colocada la solución sobre la región del electrodo de trabajo expuesta, la misma se filtró por debajo, contactando todo el sistema, y derramándose en algunos casos. Como segunda desventaja, fue difícil obtener todas las veces perforaciones de diámetro similar, con lo cual el área de recubrimiento varió de un ensayo a otro, alterando la reproducibilidad de los resultados. En base a estos aspectos se buscó una segunda estrategia, la cual consistió en diseñar una placa de acrílico, con una perforación central, a modo de reproducir un pocillo similar a los de la placa de ELISA, que contuviera las soluciones encima del electrodo de trabajo. Una de las ventajas que se obtuvo con este sistema fue eliminar la variación en el área de recubrimiento pero, a pesar de sujetar fuertemente la placa de acrílico al sistema de electrodos, luego de depositada la gota, está igualmente se filtraba.

La tercera estrategia, y más efectiva, fue ensayar con incubaciones de volúmenes pequeños de solución, de forma de poder ser colocados únicamente encima del electrodo de trabajo. Cuando se trabajó con volúmenes de 10 y 5 μL , no fue posible evitar cubrir todo el sistema, en cambio, sí se logró empleando 2 μL de solución.

El empleo de un volumen tan pequeño de solución trajo algunos inconvenientes. La evaporación rápida de la solución de la superficie del electrodo mientras el sistema se

encontraba a Tamb obligó a trabajar de forma rápida, introduciendo el mismo dentro de la cámara húmeda inmediatamente después al depósito de la solución. Si bien este procedimiento fue bastante engorroso por momentos, fue el único con el cual se logró limitar el área de trabajo.

Aplicando este procedimiento, se ensayó nuevamente con dilución de anti-ADNdc e IgGnm de concentración 0.0625 µg/mL. Como se aprecia en la tabla 6, los valores de absorbancia obtenidos en ambos casos fueron prácticamente nulos, lo cual indicó que ni los anti-ADNdc, ni IgGnm fueron capaces de unirse a la superficie. Es importante destacar que las absorbancias obtenidas estuvieron en el orden de la obtenida para un ensayo sin anticuerpo, con lo cual se confirmó el bajo nivel de pegado inespecífico.

Tabla 6. Absorbancias obtenidas con el sistema pPy/ADNesp-v, en el ensayo con anticuerpos incubados únicamente sobre el electrodo de trabajo. Se empleó dilución 1/32000 de IgG-HRP.

anticuerpo	abs(450nm)
anti-ADNdc	0.004
IgGnm	0.006
sin anticuerpo	0.005

Ante la duda de si las concentraciones de anticuerpos empleados en el anterior ensayo fueron demasiado pequeñas para el límite de detección del sistema, se repitió el ensayo con diluciones de anti-ADNdc e IgGnm de concentración 0.125 µg/mL y dilución 1/8000 de IgG-HRP. Nuevamente se constató la inexistencia de respuesta del sistema, lo cual confirmó que los anticuerpos anti-ADNdc no se unieron al ADNesp-v depositado sobre el electrodo de trabajo.

En el ensayo de ELISA, los anticuerpos anti-ADNdc, fueron capaces de reconocer específicamente a varios tipos de ADN, entre ellos el ADNesp-v, con lo cual la causa de la no interacción fue debida a otros factores. El porqué de la no interacción antígeno-anticuerpo en la superficie del sistema pPy/ADNesp-v, escapó a los objetivos del presente trabajo, donde únicamente se evaluó la viabilidad del sistema como base

para el desarrollo de un futuro biosensor. Igualmente se sugirieron dos posibles causas: 1. El ADNesp-v, al depositarse como contra ión durante la electropolimerización de Py, podría adoptar una conformación compacta, que imposibilitaría la correcta interacción entre el esqueleto azúcar fosfato y los anticuerpos, 2. La disposición compacta del film de pPy/ADNesp-v, dejaría a este último inmerso, e inaccesible, para la interacción con los anticuerpos, más aun considerando que los mismos son biomoléculas proteicas de gran tamaño.

En recientes trabajos del MSc. J. P. Tosar, se analizó la topografía de la superficie del film pPy/ADNesp, obtenido mediante VC y a potencial constante, empleando microscopia electrónica de barrido (SEM). En dicho trabajo se vio que el film obtenido mediante VC fue más compacto, incluso independientemente del contraíón empleado durante los ciclos de electropolimerización⁵⁷. En el presente trabajo no fue analizada la superficie de los electrodos obtenidos, resultados que podrían haber complementado aún más la discusión y orientar hacia una explicación del problema que se planteó.

La posibilidad de que el tratamiento en vortex del ADNesp previamente a la electropolimerización originara fragmentos demasiado pequeños, como para que pudiera existir reconocimiento por parte de los anti-ADNdc, fue descartada desde un principio, debido a que el ADNesp-v fue igualmente reconocido en los ensayos de ELISA.

Por último, no se realizaron en este trabajo, ensayos variando el tipo de ADN, en donde tal vez podrían haberse obtenido diferentes resultados, los cuales podrían analizarse comparativamente mediante SEM.

4.3- Ensayos con poli-L-lisina.

Como segunda estrategia de inmovilización de ADN se recurrió a los ensayos con poli-L-lisina, cuya eficacia en la mejora de la adsorción del ADN a una superficie se evidenció en los ensayos de ELISA.

En primer lugar, se comparó el voltamperograma obtenido para un electrodo modificado con poli-L-Lisina, y un electrodo sin modificar. Los resultados se muestran en la figura 27, donde se observó un ensanchamiento del voltamperograma en el caso del electrodo modificado. Este ensanchamiento se relacionó con un aumento de la capacitancia de la superficie, ocasionado por la inmovilización de poli-L-lisina sobre el electrodo.

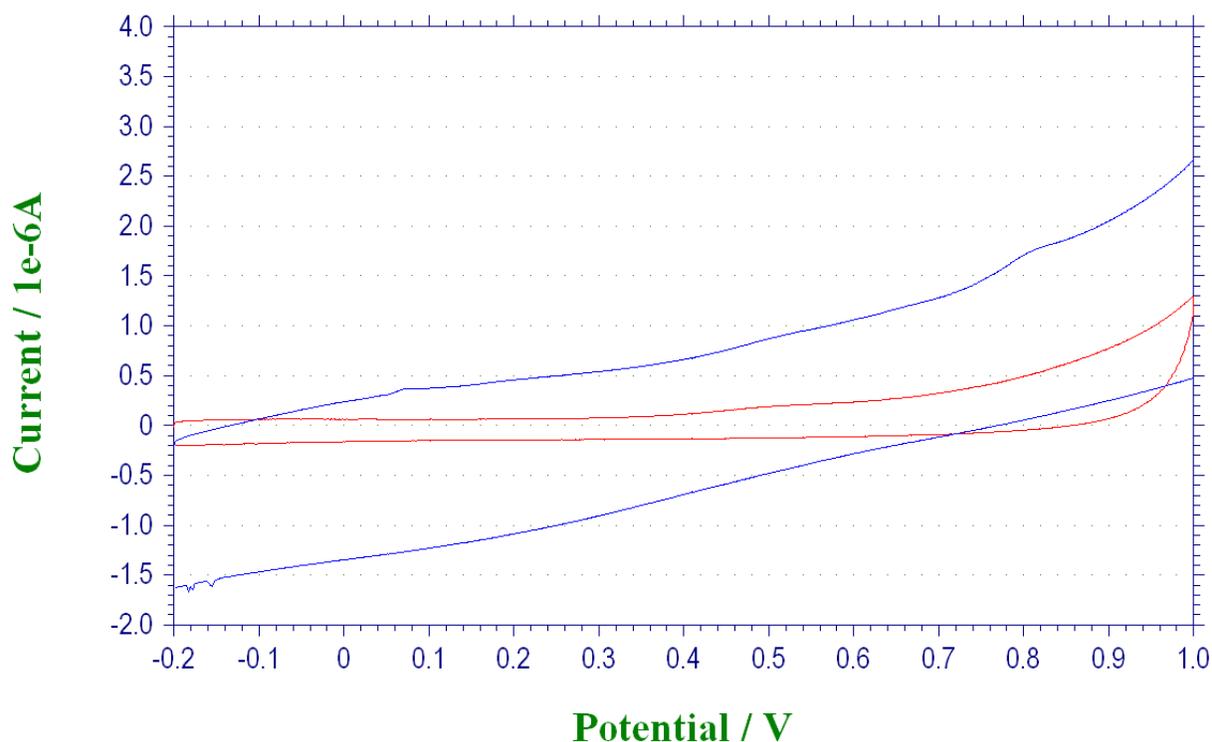


Figura 27. VC en PBS de electrodo sin modificar (—), y tratado con poli-L-lisina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 30 min (—).

Un hecho que merece atención, es la aparición de una señal (en el entorno de los +0.6 V) en el primer ciclo del voltamperograma realizado en buffer PBS, para un electrodo sin modificar (ver figura 28). Si bien no se llevaron a cabo experimentos para la dilucidación del origen de dicha señal, se sospechó que la misma fue causada por un fenómeno de adsorción de las especies de fosfato. Este fenómeno fue reportado primariamente por Clavilier y colaboradores ⁷¹, en ensayos voltamperométricos sobre electrodos de platino, y más tarde en los trabajos de Taguchi y Aramata se reportaron

voltamperogramas característicos de la adsorción de especies de fosfato, y se comprobó la dependencia de dicho fenómeno con el pH del medio ⁷². Recientemente, mediante simulaciones computacionales, se ha analizado el fenómeno para electrodos de platino, de donde surgió que los fosfatos, así como otros iones tales como acetato, se orientan con los átomos de oxígeno hacia la superficie del electrodo. En este trabajo además, se logró simular el voltamperograma correspondiente a la adsorción de dichos iones, reportándose el fenómeno entre los potenciales de +0.35V a +0.6V, aunque existe variación en función de la concentración y el pH de la solución ⁷³.

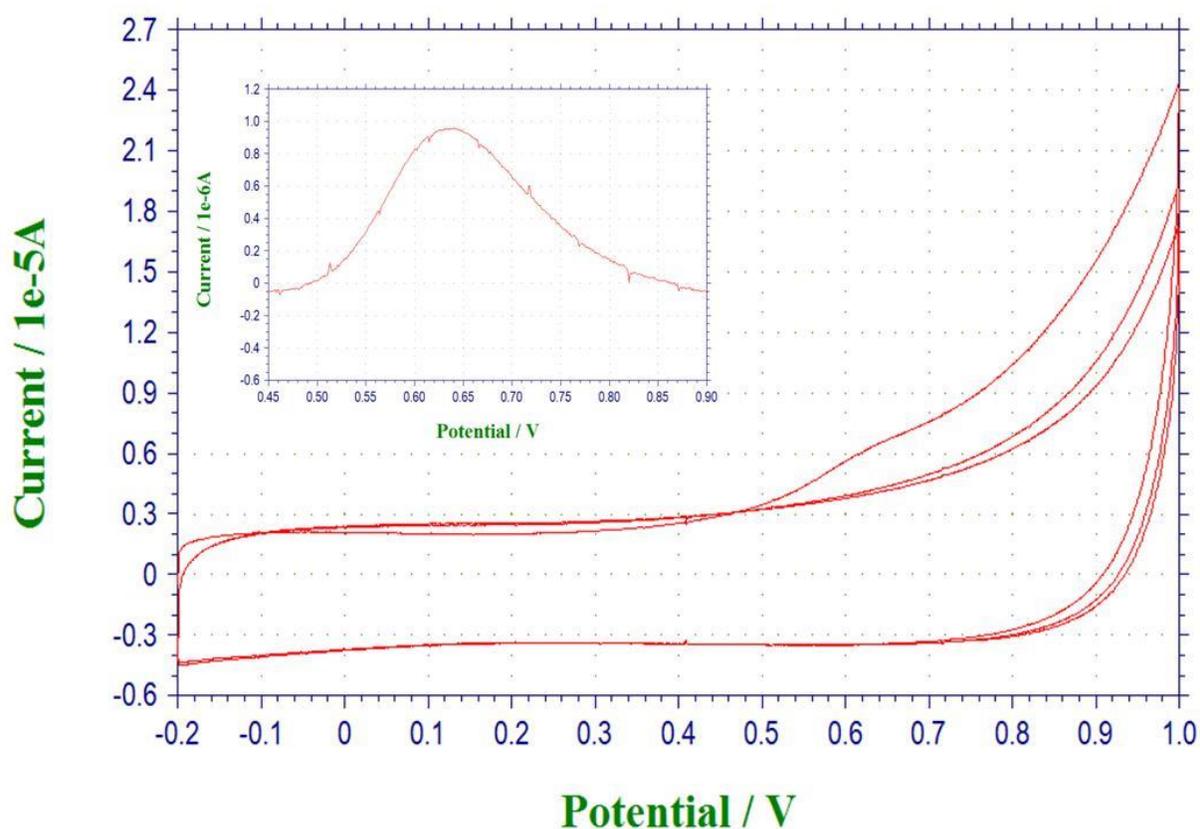


Figura 28. VC electrodo sin modificar en buffer PBS. Inserto: resultado de la corrección mediante el trazado de línea de base, empleando la herramienta baseline fitting and subtraction disponible en el software CHI760D Electrochemical Workstation. El mejor resultado se obtuvo mediante el empleo del ajuste ortogonal de grado 6.

La presencia de ADN sobre la superficie de los electrodos modificados con poli-L-lisina/ADN se verificó mediante VC. Los voltamperogramas obtenidos para un electrodo modificado, y uno sin modificar se aprecian en la figura 29. La señal de oxidación de la

guanina, se registró en el entorno de los +0.8V a +0.9V, siendo máxima la corriente a los +0.84 V, lo cual concuerda con los registros encontrados en trabajos previos referentes al estudio de la oxidación de bases libres sobre electrodos, así como también estudios de la oxidación de adenina y guanina dentro de la molécula de ADNdc ^{51,69,74-78}. Como se esperaba, la señal de oxidación de la guanina sólo se registró en el primer ciclo, debido a la irreversibilidad del proceso. Nuevamente, se visualizó la señal correspondiente a la adsorción de fosfatos sobre la superficie de los electrodos en el entorno de los +0.6 V.

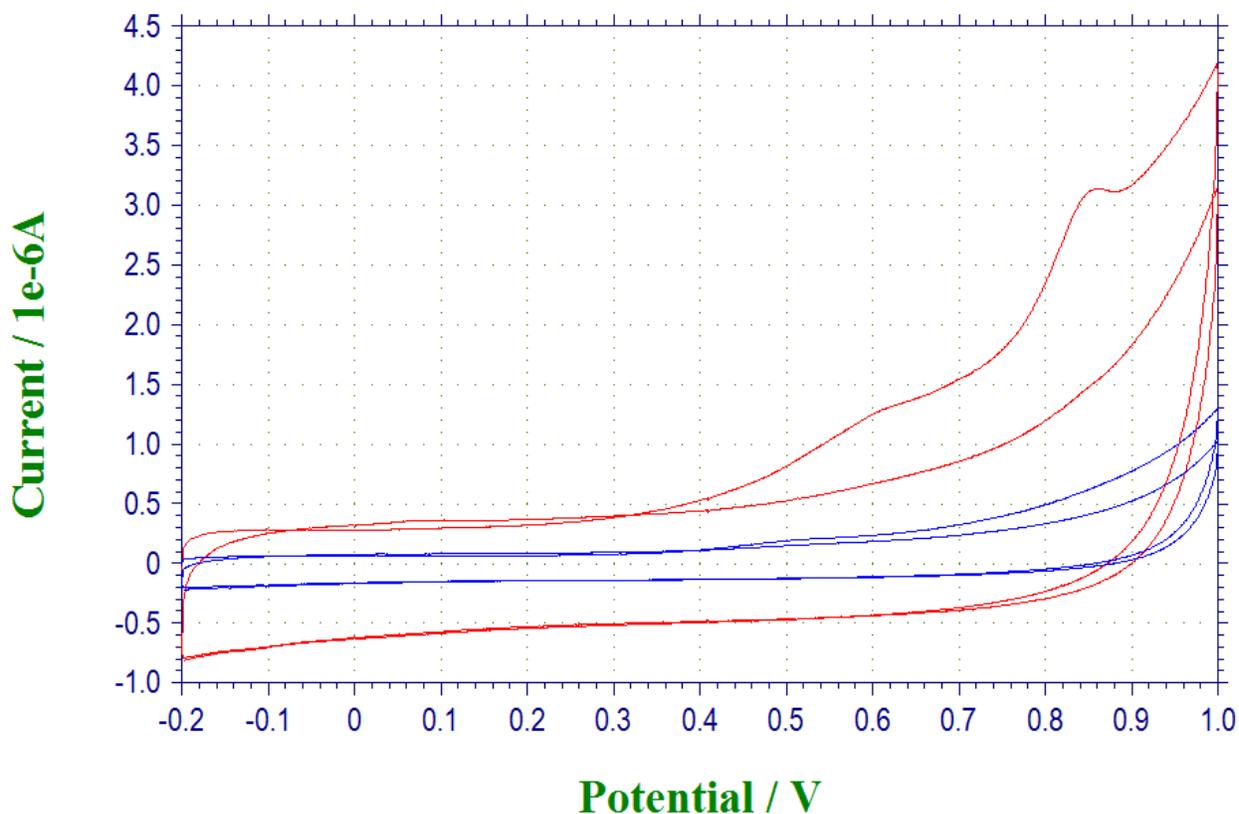


Figura 29. VC en PBS para electrodo modificado con poli-L-lisina/ADNesp-v (—), y electrodo sin modificar (—). Se muestran los dos primeros ciclos de cada voltamperograma.

A la hora de evaluar la reproducibilidad del método de inmovilización, se evaluó el procedimiento en tres electrodos diferentes. Los resultados en este punto fueron poco alentadores, la señal de oxidación característica de la guanina se visualizó únicamente, de forma definida para un solo electrodo en los voltamperogramas mostrados en la

figura 30A. Cuando se aplicó la corrección mediante el trazado de línea de base, se registró la señal de oxidación para un segundo electrodo, pero no para el tercero. El análisis de la figura 30B, muestra que la cantidad de ADN que se depositó en dos ensayos diferentes varió significativamente, hecho que se evidenció en las diferencias en la corriente de oxidación para los dos electrodos analizados. Las diferencias observadas radicarón en ciertas dificultades que se presentaron a la hora de adaptar la técnica, aplicada inicialmente para el ensayo de ELISA con buenos resultados, a la superficie de los electrodos DropSens®.

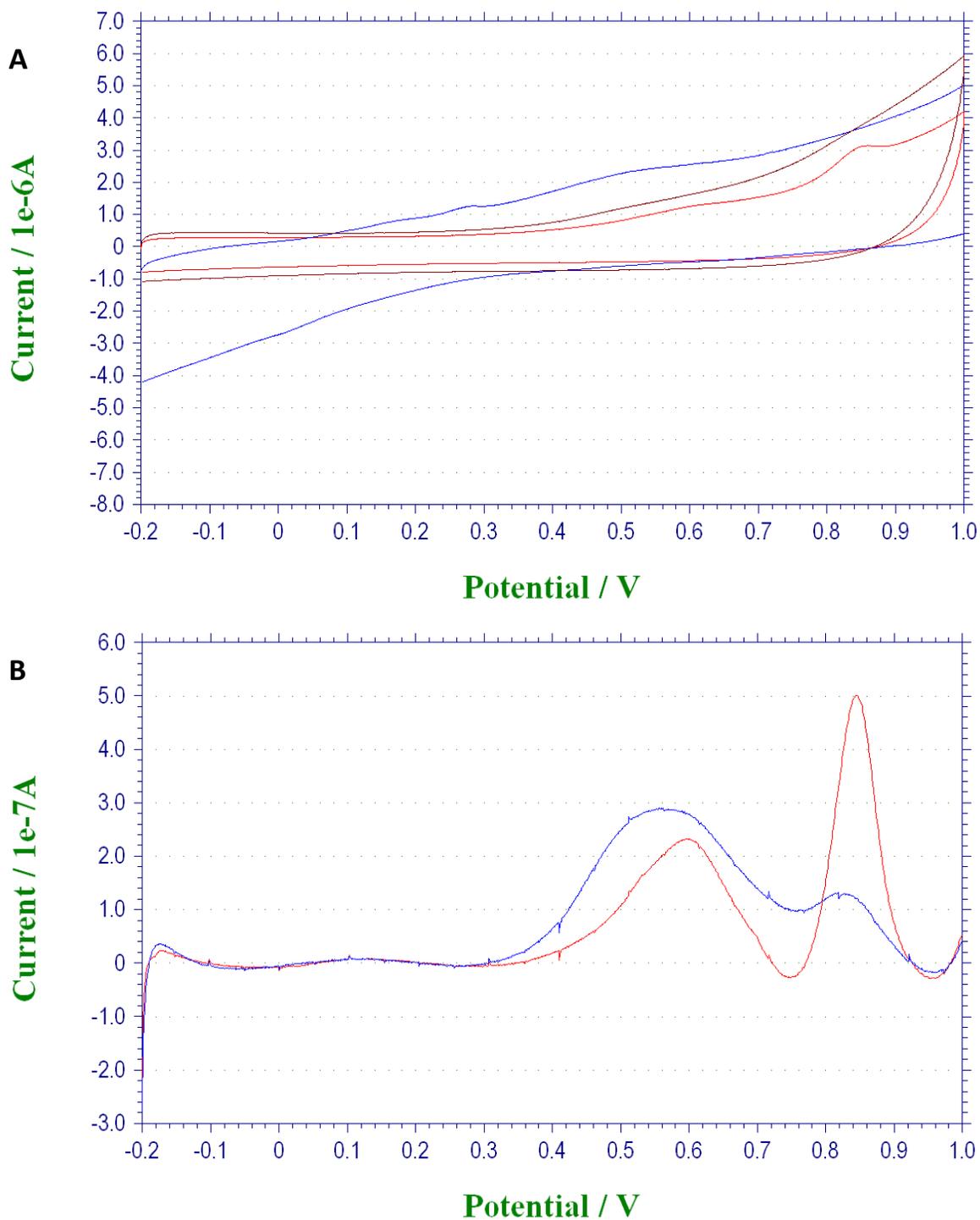


Figura 30. En **A** se muestran los voltamperogramas obtenidos para tres electrodos diferentes, modificados con poli-L-lisina/ADNesp-v. En **B** se muestra el resultado de la sustracción de la línea de base en los picos obtenidos para dos de los electrodos modificados.

La superficie de los electrodos de trabajo es claramente diferente a la de la placa de ELISA y, sumado a esto, sólo fue posible depositar 2 μL de solución sobre la misma, sin que se cubriera todo el sistema. Debido al reducido volumen que fue empleado, la evaporación jugó un papel importante, con lo cual la incubación durante 30 minutos se realizó mediante reposición de la solución, a medida que la solución se evaporaba. En ningún momento se dejó que el volumen depositado se evaporara a sequedad, por lo que fue difícil controlar en qué momento exacto debía ser repuesta la solución, y además la velocidad de evaporación difería entre los diferentes electrodos y con el día de ensayo. El tiempo estimado, en el que debía ser repuesta la gota fue de 10 minutos, pero dadas las razones anteriores, el mismo varió entre los diferentes electrodos. Además, no fueron realizados todos los ensayos el mismo día, con lo cual se agrega un factor más de variación, que pudo afectar el resultado, al variar ciertas condiciones, tales como la humedad ambiente. La misma dificultad se presentó a la hora de la incubación con la solución de ADNesp-v. Además, si se comparan las cantidades netas de poli-L-lisina y ADNesp-v que se emplearon en el ensayo de ELISA, con las empleadas en los ensayos sobre los electrodos, claramente estas últimas fueron muy inferiores a las primeras. La cantidad de poli-L-Lisina colocada en el pocillo de la placa de ELISA fue de 5 μg , mientras que en el ensayo sobre el electrodo fue de 0.3 μg , la de ADNesp-v fue de 0.04 μg para el ensayo de ELISA, y 0.0096 μg para el ensayo sobre los electrodos.

Los resultados obtenidos, por tanto, podrían ser el producto del poco control de la cantidad de poli-L-lisina y ADNesp-v que se depositó realmente sobre los electrodos, lo cual, sumado a la poca practicidad del procedimiento, fundamentalmente en las etapas de incubaciones por largos periodos, hicieron que esta estrategia de inmovilización no fuera adecuada, ni fácilmente aplicable a los electrodos DropSens®, por lo cual no fue considerada y no se profundizó en ella. Cabe destacar que se podrían haber realizado ensayos con soluciones de ADN y poli-L-lisina más concentradas, a fin de lograr igualar las cantidades netas de poli-L-lisina y ADNesp-v empleadas para el ensayo de ELISA.

4.4- Inmovilización mediante electrodeposición a potencial constante

Como tercera alternativa de inmovilización de ADN, se recurrió a la electrodeposición mediante la aplicación de un potencial constante positivo a la superficie del electrodo de trabajo, durante un lapso de tiempo, de forma que, en contacto con una solución de ADN, el mismo, por su carácter de polianión (en un rango de pH de 5 a 9), se irá adsorbiendo a la superficie.

La bibliografía encontrada, referente a este tema, fue amplia: entre los autores consultados, resultaron ser claves para el desarrollo de esta tesina, los trabajos de la Dra. M. Oliveira Brett, y los de M. L. Pedano y G. A. Rivas.

La primera autora mencionada cuenta con muchas publicaciones referentes al tema y ha desarrollado su trabajo, fundamentalmente, en el estudio de la adsorción y oxidación electroquímica de moléculas de ADN y nucleótidos libres en superficies de electrodos de carbono vítreo, analizando los mecanismos subyacentes en la oxidación de los nucleótidos de guanina y adenina. El trabajo de Pedano y Rivas, se enfocó en el análisis de la influencia de las condiciones del medio empleado en el proceso de inmovilización, así como también los diferentes pretratamientos realizados sobre los electrodos^{51,74,79}.

En la figura 31, se aprecia un voltamperograma obtenido para un electrodo pretratado a +1.7 V durante 1.5 min, luego de la deposición de ADNesp-v a +0.3 V por un período de 3 min. En el voltamperograma, se apreció claramente la señal de oxidación correspondientes a las bases guanina y adenina a los potenciales de +0.88 V y +1.15 V, respectivamente. Nuevamente se constató la irreversibilidad del proceso de oxidación, dado que las señales se registraron únicamente para el barrido en sentido positivo y durante el primer ciclo.

Un punto importante fue el pretratamiento de la superficie; en la mayoría de los artículos referentes a la inmovilización de ADN, se sugería un pretratamiento electroquímico a potenciales constantes de entre +1.6 V a +1.8 V en buffer HAc/Ac a pH 5. En los trabajos de Joseph Wang, se analizó la señal de oxidación de la guanina

sobre electrodos con y sin pretratamiento previo a +1.7 V. Los ensayos por VC, mostraron que para el caso de los electrodos no pretratados, luego de un periodo de acumulación de ADN a potencial constante (+0.5 V), la señal de oxidación de la guanina no era registrada, mientras que, para el caso de los electrodos pretratados, luego de un período de acumulación se obtenían buenos registros de corrientes anódicas a potenciales asociados a la oxidación de la guanina. Esto demostró la necesidad de realizar una activación de la superficie previa a la adsorción de ADN, que ocasiona un aumento de la señal anódica registrada posteriormente. La razón real de este aumento en la señal no es aun suficientemente entendida, pero se presume que se relaciona con un aumento de la hidrofiliidad y rugosidad de la superficie de carbono, que favorece la adsorción de moléculas de ADN, y con un aumento de la cinética de transferencia electrónica en la superficie^{80,81}.

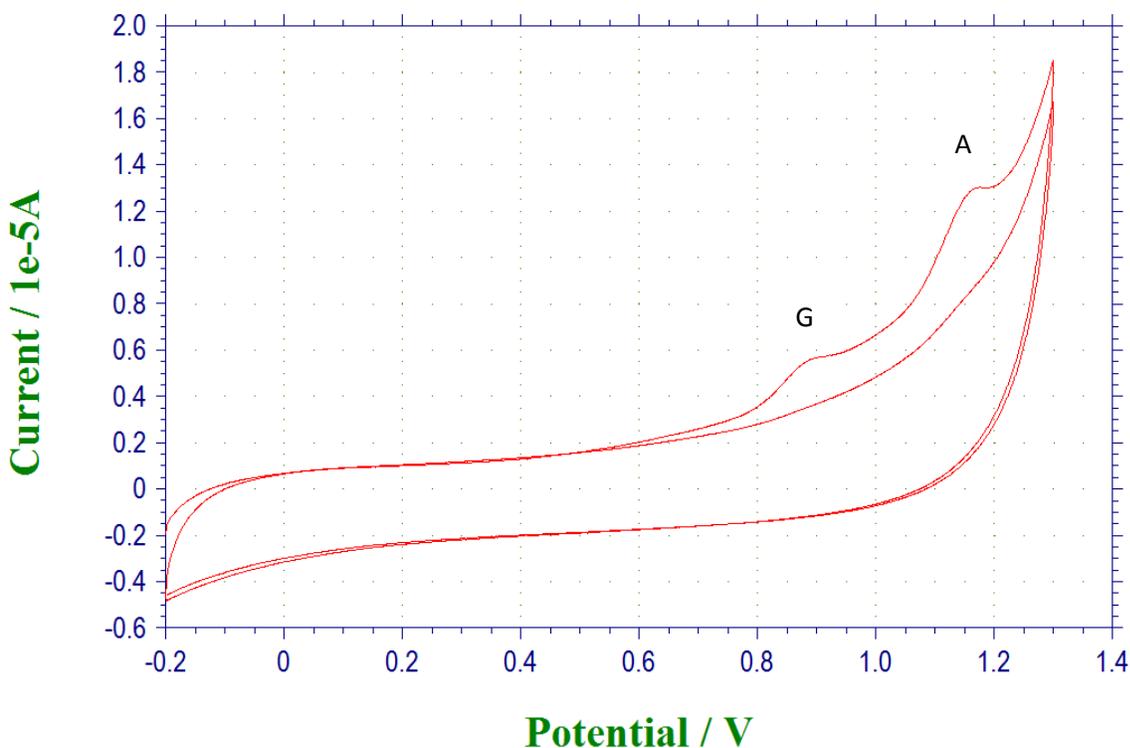


Figura 31. VC para electrodo pretratado a +1.7 V durante 1.5 min, con posterior deposición de ADNesp-v (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a +0.3 V durante 3 min. Tanto la VC, como las soluciones de ADNesp-v fueron preparadas en buffer HAC/Ac 0.2 M, pH = 5. Velocidad de barrido 0.1 V/s. G-guanina; A-adenina.

En este trabajo, no se llevó a cabo un estudio de electrodos con y sin pretratamiento previo, aplicándose, en todos los casos, el mismo pretratamiento a +1.7 V en medio ácido; en cambio, sí fue analizado el efecto de diferentes tiempos de pretratamiento, cuyos resultados se muestran en la figura 32.

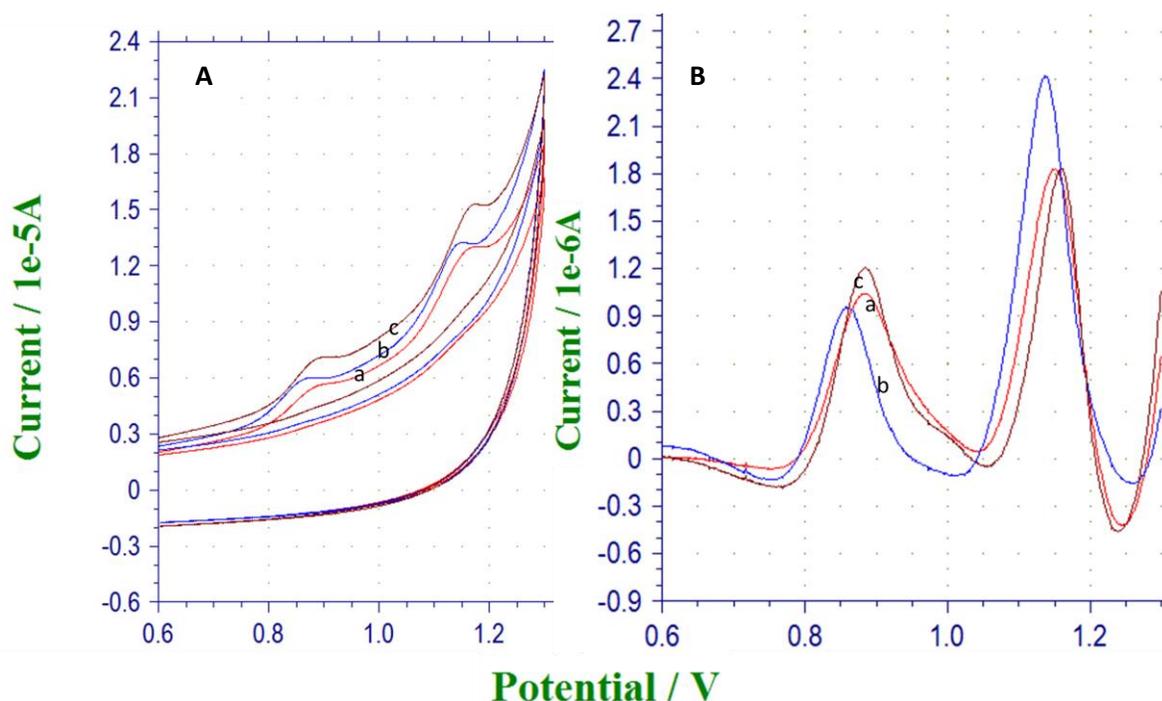


Figura 32. Variación de la señal de oxidación de la guanina en electrodos pretratados a +1.7 V durante (a, —) 1,5 min, (b, —) 2,0 min, y (c, —) 3,0 min. Luego de cada pretratamiento se depositó ADNesp-v 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, durante 3 min a 0,3V. En A, se aprecia la VC llevada a cabo en buffer HAC/Ac (0,2 M, pH= 5), entre -+0,2 y +1,3 V, a una velocidad de barrido de 0,1V/s. En B, se aprecia resultado de la corrección mediante el trazado de línea de base, empleando la herramienta baseline fitting and subtraction disponible en el software CHI760D Electrochemical Workstation. El mejor resultado se obtuvo mediante el empleo del ajuste ortogonal de grado 8.

En los voltamperogramas obtenidos, se observó que la corriente registrada a los potenciales de oxidación de la adenina, fue máxima para el electrodo pretratado durante 2 minutos; ahora bien, esto debería coincidir, con un aumento de la corriente de oxidación de la guanina para este electrodo, lo cual no ocurrió. Para los electrodos pretratados a 1.5 y 3 minutos, no se apreciaron diferencias significativas, con lo cual los resultados obtenidos en este punto no fueron concluyentes, por lo que se optó por realizar el pretratamiento durante 2 minutos, de acuerdo a los trabajos consultados.

Los parámetros empleados en la deposición de ADN sobre el electrodo son cruciales para el desarrollo de este trabajo, dado que la base del biosensor que se pretende desarrollar, descansa en la inmovilización de dicha molécula. El procedimiento que se empleó en este trabajo consistió en someter al electrodo de trabajo a un potencial positivo, el cual facilitó el proceso de adsorción de las moléculas de ADN, mediante la formación de interacciones electrostáticas entre la superficie del electrodo y el esqueleto de fosfatos de la molécula. En trabajos previos de la Dra. Oliveira Brett, se analizó comparativamente el procedimiento de inmovilización con y sin potencial aplicado, y como el pH puede favorecer el proceso. Las imágenes y medidas obtenidas mediante microscopia de fuerza atómica, revelaron que la inmovilización a pH 7, en buffer fosfato, presenta un bajo grado de recubrimiento, dejando amplias regiones del electrodo expuestas, más aún cuando el procedimiento se realizó a potencial constante de +0.3 V. En cambio, cuando el mismo procedimiento se llevó a cabo en soluciones de ADN a pH 5.3 en buffer HAc/Ac, el recubrimiento fue total. Según el trabajo, el grosor de la capa formada supera el diámetro de la molécula de ADN hidratada, lo que sugirió, la formación de un complejo entramado, donde las moléculas se superponen. La ventaja de la inmovilización a potenciales positivos radica en la formación de un entramado de moléculas más estables, y con interacciones más fuertes con la superficie del electrodo, a diferencia de las capas obtenidas por adsorción simple ⁸².

Según Pedano y Rivas, no hay grandes diferencias en los registros de corriente de oxidación de la guanina, cuando el potencial aplicado se varía entre +0.1 V y +0.6 V ⁷⁹. Sin embargo, en este trabajo se registraron diferencias cuando se sometió el electrodo a dos potenciales diferentes. En la figura 33, se visualizan los voltamperogramas obtenidos luego de inmovilizar ADN a los potenciales de +0.3 V y +0.5 V. El hecho de que a un potencial de deposición más positivo se haya obtenido una señal anódica mayor para ambas bases (adenina y guanina), podría ser explicado sobre la base de una adsorción de un mayor número de moléculas de ADN. Es importante resaltar en este punto, que el potencial aplicado no deber ser lo suficientemente positivo como para provocar la oxidación de las bases, dado que esto alteraría la estructura de la

molécula de ADN, afectando el proceso de adsorción. Además, no sería posible el seguimiento de la señal de oxidación de las bases del ADN, como prueba de la inmovilización sobre la superficie del electrodo, debido a la irreversibilidad del proceso

82.

Se analizó el efecto de la aplicación de un potencial de +0.5 V durante diferentes lapsos de tiempo, a saber 3, 5 y 10 min. En los voltamperogramas registrados posteriormente a la exposición, se constató que, para la señal de oxidación correspondiente a la adenina, no existen diferencias importantes luego de los 5 min de deposición; hecho que coincidió con los trabajos de Pedano y Rivas, en donde se observó un aumento lineal de la corriente de oxidación, en función del tiempo de deposición ensayado, entre los 0 y 5 min, y permaneciendo prácticamente invariante para lapsos de tiempo mayores ^{79,83}. Era esperable que el mismo efecto se registrara para la señal de oxidación de la guanina, sin embargo, como se aprecia en la figura 34 B, la señal anódica correspondiente a la misma, aumenta en función del tiempo de

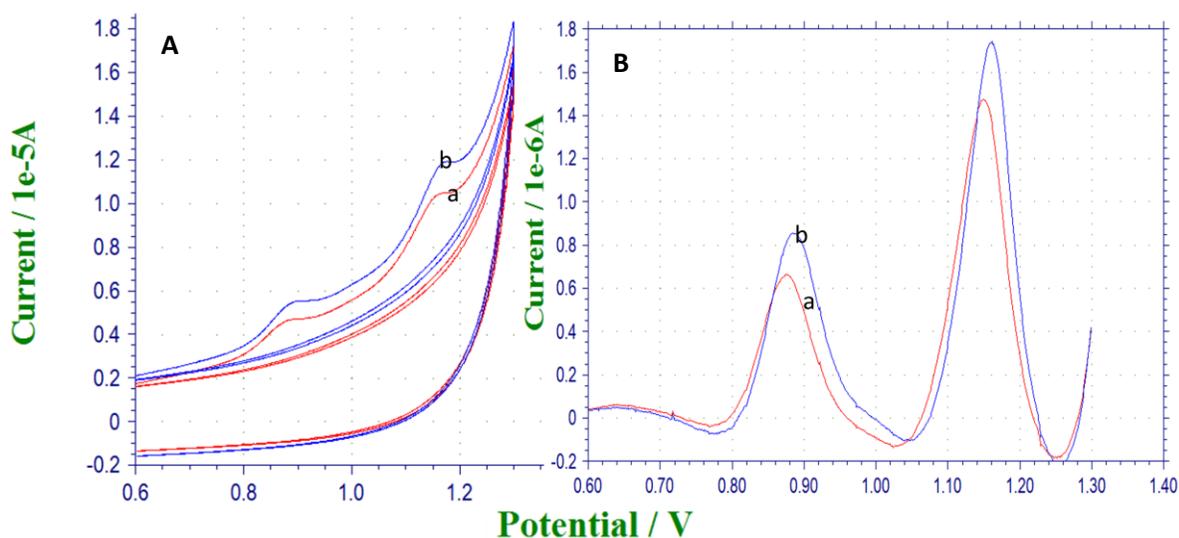


Figura 33. En A, se aprecian los voltamperogramas obtenidos luego de deposición de ADNsp-v 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 3 min a (a,—) +0,3 V y a (b, —) +0,5 V. En B, se aprecia resultado de la corrección mediante el trazado de línea de base, empleando la herramienta baseline fitting and subtraction disponible en el software CHI760D Electrochemical Workstation. El mejor resultado se obtuvo mediante el empleo del ajuste ortogonal de grado 8. Los electrodos fueron pretratados a +1,7 V durante 2 min. La VC se realizó en buffer acético-acetato (0,2 M, pH= 5), entre -0,2 y +1,3 V, a una velocidad de barrido de 0,1 V/s

deposición. Las causas de este fenómeno no han sido profundizadas. En base a los datos de la literatura, y a los resultados parciales obtenidos se decidió realizar la deposición electroquímica durante un lapso de 5 min.

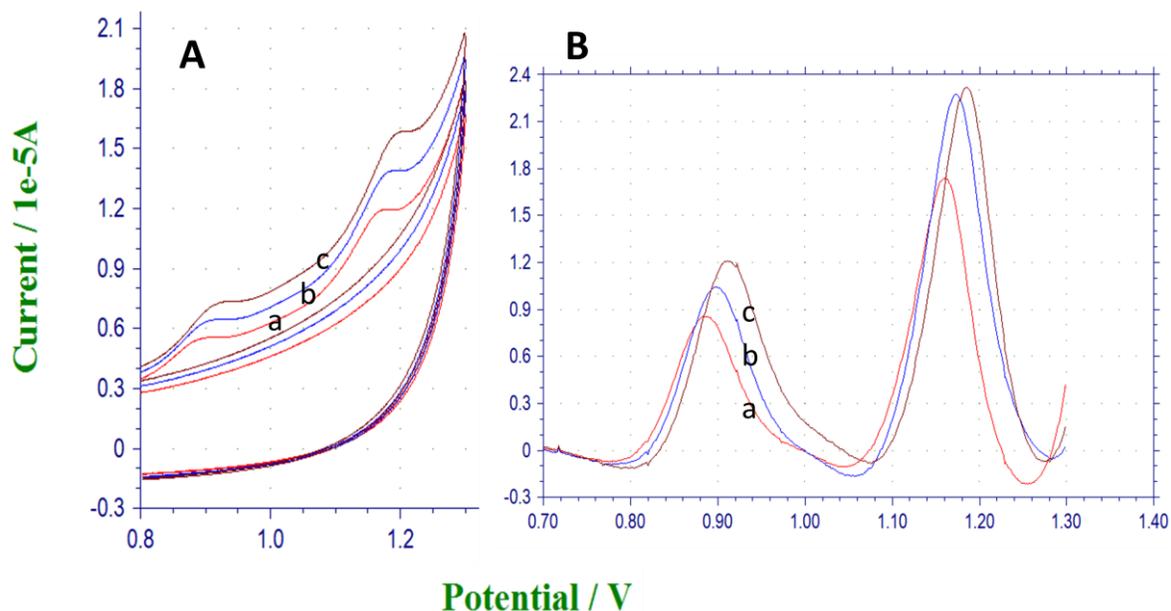


Figura 34. Efecto de la variación del tiempo de deposición a +0,5V de ADNesp-v sobre la señal de oxidación de la guanina. (a,—) deposición durante 3 min, (b, —) deposición durante 5 min y (c,—) deposición durante 10 min. En A, se muestran los voltamperogramas registrados luego de la deposición. En B, se aprecia resultado de la corrección mediante el trazado de línea de base, empleando la herramienta baseline fitting and subtraction disponible en el software CHI760D Electrochemical Workstation. El mejor resultado se obtuvo mediante el empleo del ajuste ortogonal de grado 8. Los electrodos fueron pretratados a +1.7 V durante 2 min. La VC se realizó en buffer acético-acetato (0.2 M, pH= 5), entre -0,2 y +1,3 V, a una velocidad de barrido de 0,1V/s. Los electrodos fueron pretratados 2 min a +1.7 V, y modificados con ADNesp-v 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por deposición electroquímica a 0,5 V antes de cada medida. La VC se realizó en buffer acético-acetato (0.2 M, pH= 5), entre -0.2 y 1.3 V, a una velocidad de barrido de 0.1V/s.

Todos los registros voltamperométricos, realizados luego de la etapa de inmovilización mediante esta técnica, fueron llevados a cabo en solución buffer HAc/Ac 0.2 M pH 5, (como sugieren los trabajos de Oliveira). En cambio, cuando se realizó VC en PBS y TBS a pH 7.4, se observó la desaparición de la señal asociada a la adenina, y una disminución en la señal correspondiente a la guanina, sumado a un corrimiento del pico de oxidación a potenciales más positivos (ver figura 35).

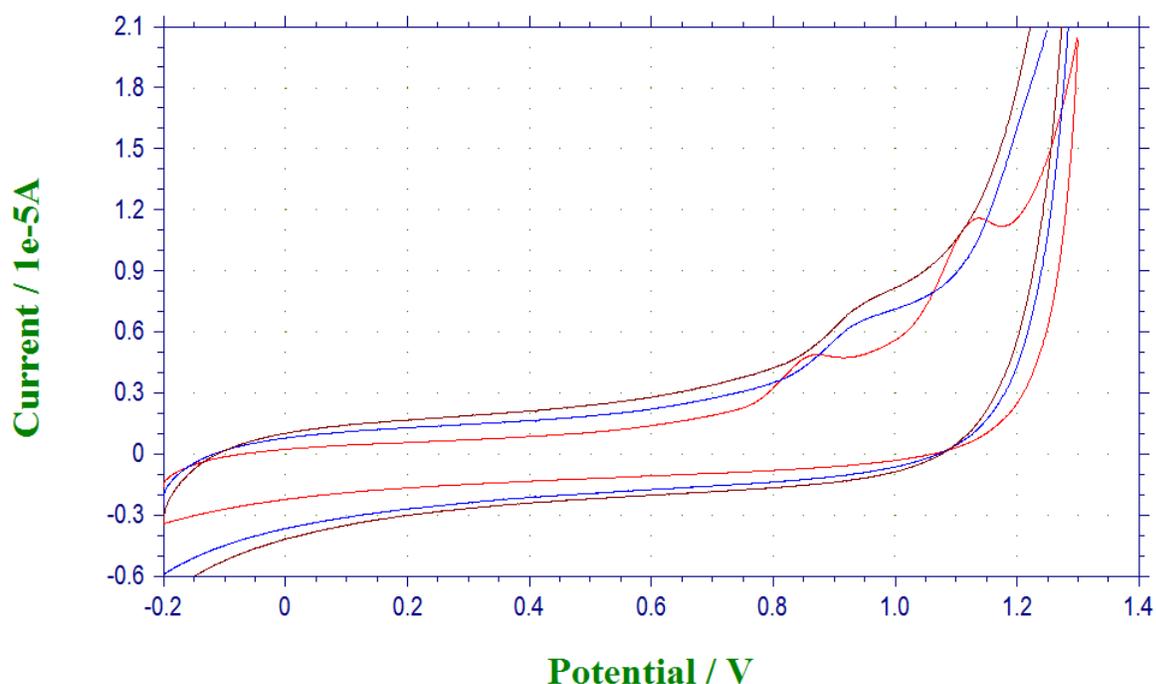


Figura 35. Voltamperogramas de electrodos modificados con ADNesp-v en buffer acético-acetato 0,2 M pH= 5 (a, —), PBS 10mM, 140 mM NaCl, pH=7,4 (b, —) y Tris-HCl 10mM, 150 mM NaCl, pH=7,4 (c,—). Todos los electrodos fueron pretratados a +1.7 V por 2 min, modificados con ADNdc 0.5 μ g/ μ L por deposición electroquímica a 0,5 V por 5 min antes de cada medida. La VC se realizó a una velocidad de barrido de 0,1V/s, entre -0,2 y +1,3 V.

El bloqueo de la superficie fue un punto importante en el desarrollo del biosensor. Regiones de carbono expuestas al contacto con anticuerpos, serian una importante fuente de error, debido al fuerte pegado inespecífico de los anticuerpos. El bloqueo se llevó a cabo con buffer PBS-BSA, cubriendo únicamente el electrodo de trabajo. Un punto importante fue comprobar, la presencia del ADN sobre el electrodo luego del procedimiento de bloqueo y los posteriores lavados. Para ello se analizó la señal de oxidación de la guanina/adenina mediante VC en buffer HAc/Ac. En primera instancia, los lavados posteriores al bloqueo fueron realizados con PBS-T0.1, mediante deposición, e incubación por 5 min, obteniéndose resultados que merecieron ser analizados en profundidad. En el voltamperograma de la figura 36, se apreció que luego del bloqueo y lavados, el voltamperograma se ensanchó significativamente, en comparación con el obtenido para un electrodo sin bloquear y sin lavar con PBS-T0.1,

lo cual en parte era esperable, dado que la adsorción de moléculas de BSA, aumentaría la capacitancia de la superficie. Además, la señal de oxidación de la guanina/adenina no fue visualizada, posiblemente a causa de que el ADN se desorbió de la superficie, o a que la señal quedó oculta, debido al ensanchamiento del voltamperograma.

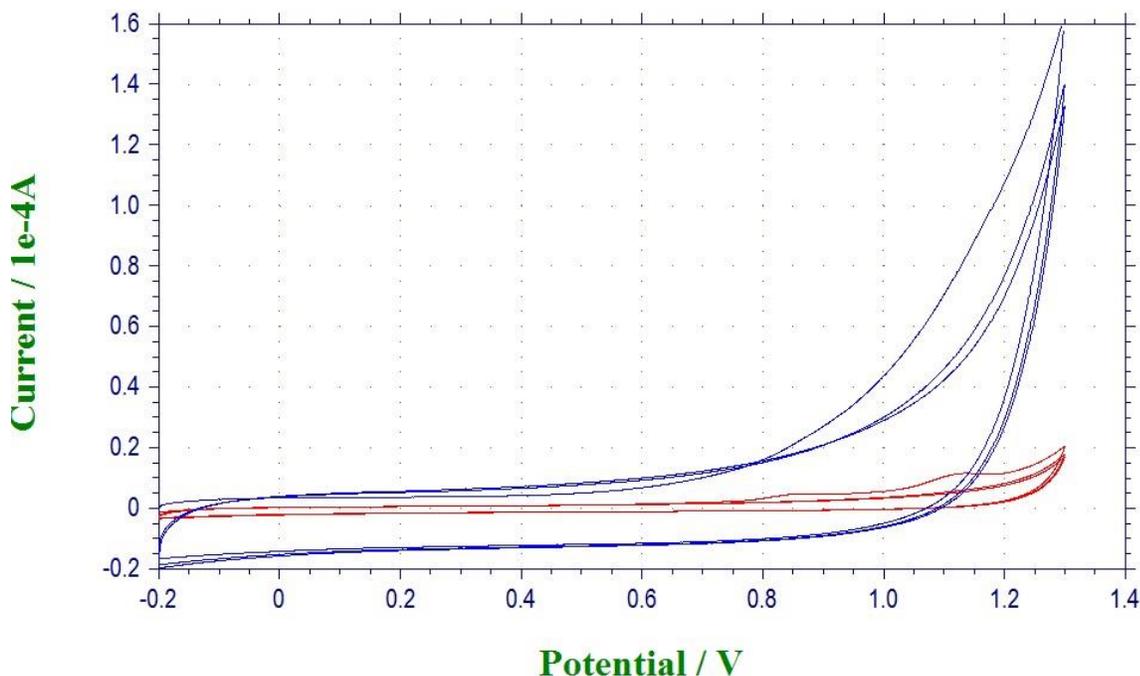


Figura 36. Voltamperogramas de electrodos modificados ADNesp-v antes (a, —) y después de lavados con PBS-Tween20 (10mM, 140 mM NaCl, 0,1% Tween20, pH=7,4) por deposición de gota (b, —). Los electrodos fueron pretratados 2 min a +1.7 V, y modificados con ADNesp-v 0.5 μ g/ μ L por deposición electroquímica a +0.5 V por 5 min antes de cada medida. La VC se realizó en buffer HAc/Ac (0,2 M, pH= 5), entre -0.2 y +1.3 V, a una velocidad de barrido de 0.1 V/s.

Debido a que, en anteriores ensayos, los lavados con PBS-T sobre electrodos pPy/ADNesp-v (aplicando agitación mecánica) afectaron la señal obtenida en los voltamperogramas, se sospechó que, nuevamente, el Tween podría estar interfiriendo. Para ello, se realizó VC para un electrodo no modificado, luego de una serie de lavados con PBS-T0.1, por deposición e incubación sobre la superficie; los resultados se muestran en la figura 37.

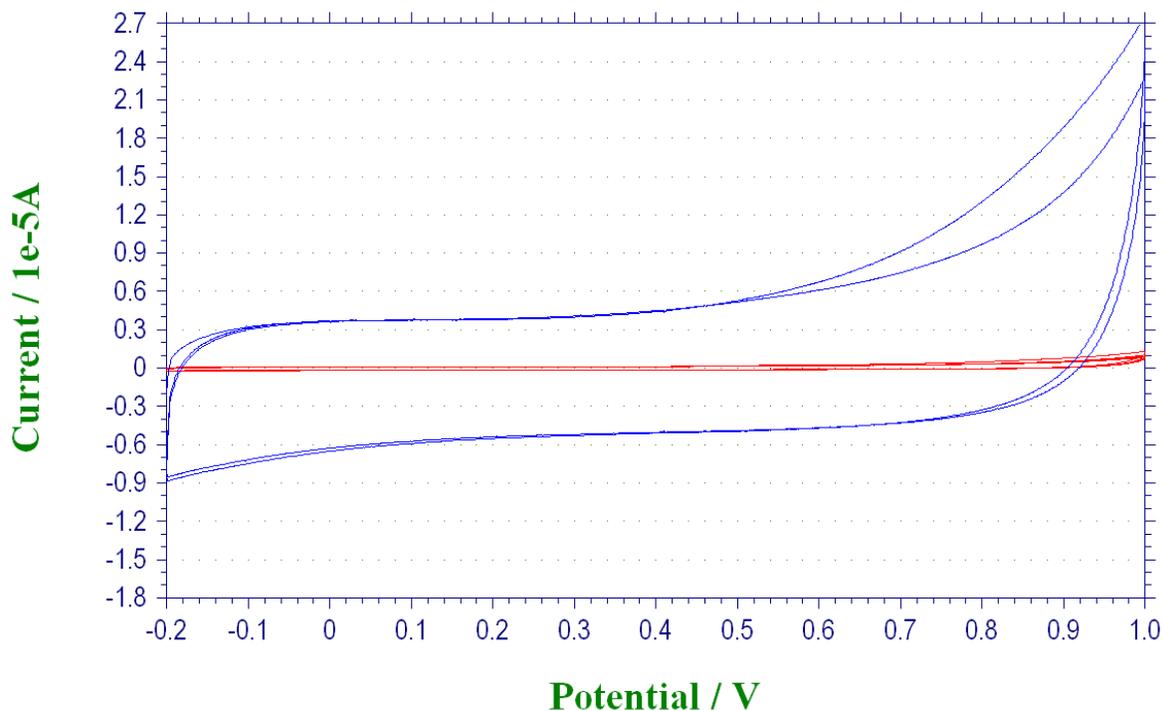


Figura 37. Efecto de los lavados con PBS-T0.1 sobre la superficie de electrodos de carbono sin modificar. (—) Electrodo lavado con PBS. (—) Electrodo lavado con PBS-T0.1. La VC se realizó en buffer HAc/Ac entre -0.2 V y +1.0 V, a una velocidad de barrido de 0.05 V/s.

El voltamperograma obtenido, luego de los lavados con PBS-T0.1, mostró claramente que la superficie del electrodo fue modificada, posiblemente por causa de una adsorción de las moléculas de Tween, lo que, a la hora de realizar la VC, se traducen en un aumento de la capacitancia de la superficie, evidenciada en voltamperogramas más anchos. Luego de una búsqueda bibliográfica, sin resultados similares que avalaran los datos obtenidos, se sugirió la posibilidad de emplear detergentes diferentes para los lavados. En última instancia, se decidió evaluar el sistema, únicamente empleando para los lavados, buffer PBS.

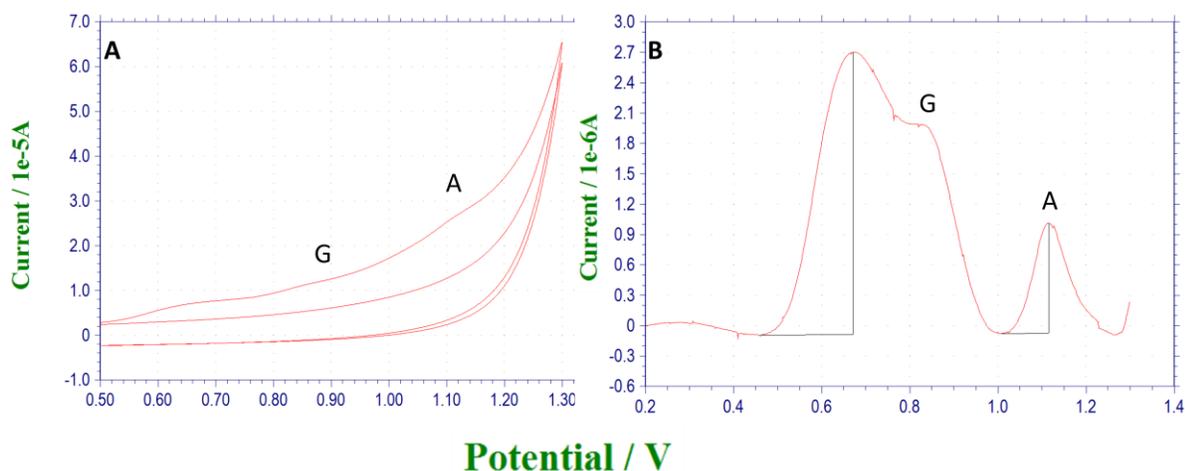


Figura 38. En A, se aprecia el voltamperograma para un electrodo modificado con ADNesp-v/BSA, luego de lavado con PBS. En B, se aprecia resultado de la corrección mediante el trazado de línea de base, empleando la herramienta baseline fitting and subtraction disponible en el software CHI760D Electrochemical Workstation. El mejor resultado se obtuvo mediante el empleo del ajuste ortogonal de grado 9. Se indica en ambos gráficos las señales correspondientes a la oxidación de la guanina (G) y adenina (A). La VC se realizó en buffer HAc/Ac pH 5, entre los potenciales de -0.2 V a +1.3 V, a una velocidad de barrido de 0.1 V/s.

Los resultados, luego de los lavados con PBS, fueron alentadores. Como se aprecia en la figura 38, fue posible registrar los picos de oxidación correspondientes a la adenina y guanina, aunque claramente, los mismos se encuentran menos definidos. Como ya fue expuesto anteriormente, la presencia de BSA en la superficie, es responsable en parte del aumento de la capacitancia de la superficie, lo que se refleja en voltamperogramas con picos menos definidos y más anchos. Una tercera señal pudo ser visualizada, en el entorno de los +0.6V a +0.7V; la misma podría deberse, una vez más, a la adsorción de fosfatos (recordar que, tanto la solución de bloqueo, como los lavados, se efectuaron con buffer PBS).

Este primer ensayo permitió confirmar que, luego del primer procedimiento de lavado, el ADN permaneció sobre la superficie del electrodo. Ahora bien, a la hora de incubar con anticuerpos (primario y secundario), aumentan las etapas de lavado (en total tres ciclos), con lo cual fue necesario evaluar si, luego de culminados todos los lavados, el ADN permanecía sobre el electrodo. Para esto último, se preparó un electrodo ADNesp-v/BSA, y se lavó por tres ciclos (de tres lavados cada uno), realizándose posteriormente VC.

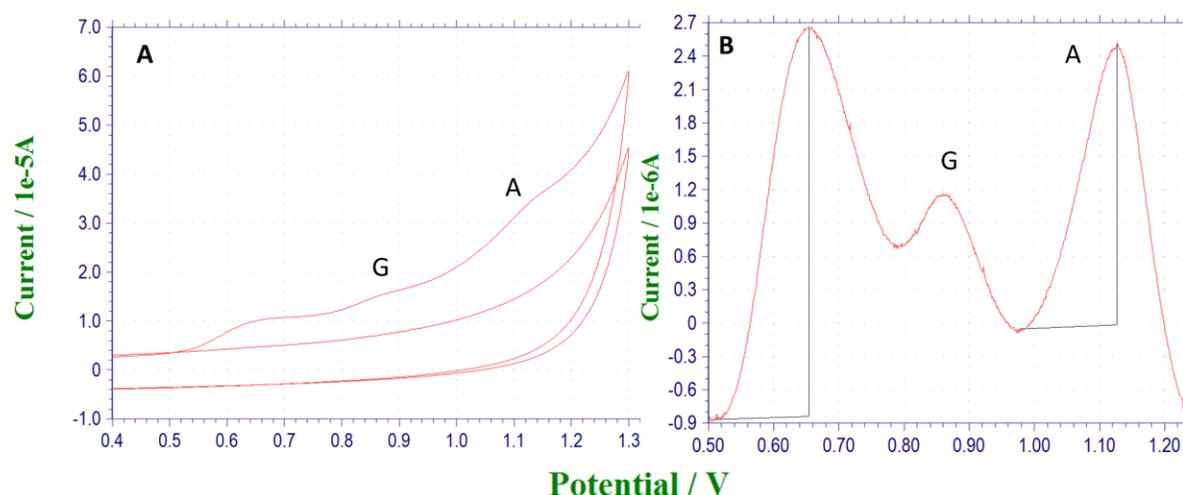


Figura 39. En **A** se muestra el voltamperograma obtenido para un electrodo modificado con ADNesp-v/BSA, luego de aplicados 3 ciclos de lavado con PBS. En **B**, se aprecia el resultado de la corrección mediante el trazado de línea de base, empleando la herramienta baseline fitting and subtraction disponible en el software CHI760D Electrochemical Workstation. El mejor resultado se obtuvo mediante el empleo del ajuste ortogonal de grado 9. Se indica en ambos gráficos las señales correspondientes a la oxidación de la guanina (G) y adenina (A). La VC se realizó en buffer HAc/Ac pH 5, entre los potenciales de -0.2 V a +1.3 V, a una velocidad de barrido de 0.1 V/s.

El voltamperograma obtenido permitió constatar la presencia de ADN sobre la superficie del electrodo, aún después de realizados todos los ciclos de lavado. En este punto, se podrían haber ensayado condiciones diferentes en la VC, o emplear otras técnicas sugeridas en la literatura, que mejorarían en gran medida la visualización de la señal de oxidación; sin embargo, el objetivo en todo momento fue constatar la presencia de ADN, y no llevar a cabo un estudio exhaustivo sobre la oxidación de las bases nitrogenadas.

Como último punto, se evaluó el comportamiento electroquímico de la proteína BSA, una vez inmovilizada sobre el electrodo, tratando un electrodo desnudo únicamente con solución PBS-BSA de acuerdo al procedimiento de bloqueo. Como se observa en la figura 40, la presencia de proteína en la superficie, no manifiesta ninguna señal redox; además en la figura se compara el voltamperograma obtenido con un electrodo modificado con ADNesp-v y otro modificado con ADNesp-v/BSA. En este punto se pudo apreciar claramente el efecto capacitivo generado al agregar componentes a la

superficie, pero que, de todas formas, no impidió detectar la oxidación de la adenina y guanina.

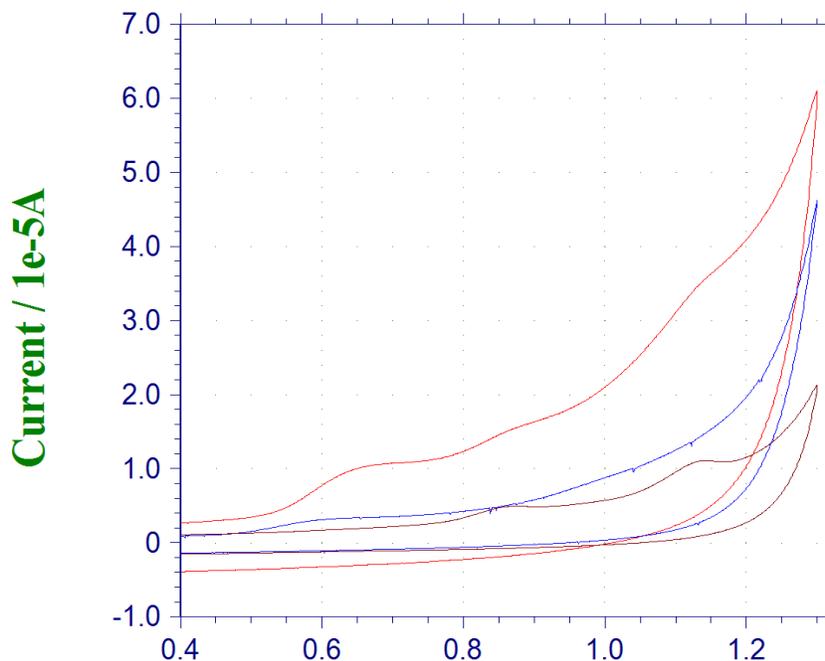


Figura 40. (a, —) VC para electrodo modificado con ADNesp-v/BSA, (b, —) electrodo modificado con BSA y (c, —) electrodo modificado con ADNesp-v. La VC se realizó en buffer HAc/Ac pH 5, entre los potenciales de -0.2 V a +1.3 V, a una velocidad de barrido de 0.1 V/s.

4.4.1- Ensayos con anticuerpos sobre electrodos modificados con ADNesp-v/BSA mediante electrodeposición.

Una vez obtenidos los electrodos modificados mediante el método de electrodeposición, se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-ADNdc de reconocer al ADNesp-v inmovilizado sobre la superficie. La capacidad de dichos anticuerpos comerciales de reconocer ADNesp, fue verificada en el ensayo de ELISA, ahora bien, esto no confirmaba (y de hecho no fue así para el sistema pPy/ADNdc), que dicha interacción también se verificara sobre los electrodos modificados. Con la finalidad de evaluar la presencia de anticuerpos sobre la superficie, se realizó un ensayo colorimétrico sobre el sistema, incubándose varias diluciones de anti-ADNdc. Los resultados de absorbancia vs concentración de anticuerpo se muestran en la figura 41.

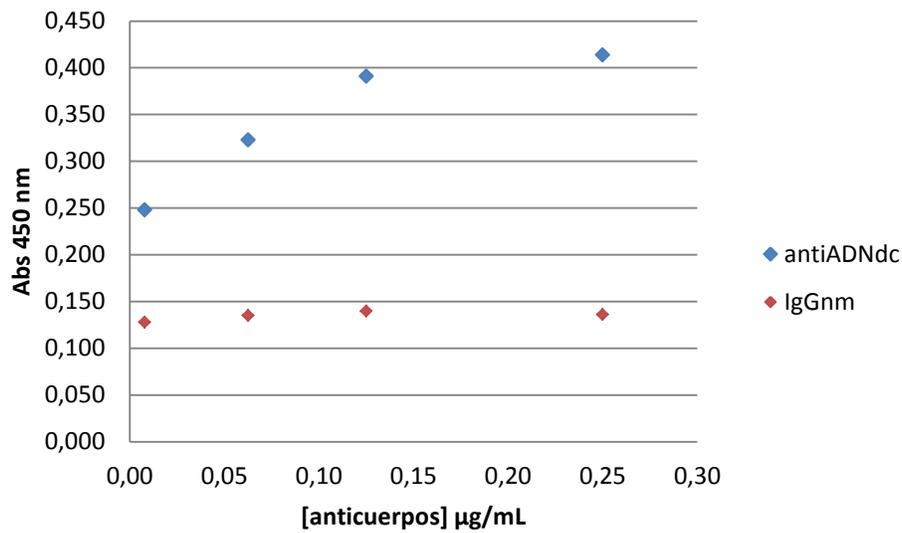


Figura 41. Gráfico de absorción vs concentración de anticuerpos. Para electrodos modificados ADNesp-v/BSA, se incubaron concentraciones de anti-ADNdc e IgGnm en el rango de 0.0078 a 0.2500 µg/mL. Se empleó como anticuerpo secundario IgG-HRP, y solución TMB-H₂O₂ para la reacción de color. La reacción se detuvo a los 30 min mediante al agregado de HCl 2N y se registró la absorción a 450 nm.

En este punto, es importante decir que dichos ensayos no fueron realizados por duplicado, debido al stock limitado de electrodos disponibles. En el ensayo, se visualizó una correlación entre la absorción y la concentración de anti-ADNdc, ahora bien, el número reducido de datos, no permitió concluir la naturaleza de dicha tendencia. Paralelamente, se realizó el mismo ensayo, con diluciones de IgGnm, es decir, un anticuerpo cuyo epítipo no fuera parte de la molécula de ADNdc. El comportamiento observado fue el esperado, a pesar de aumentar la concentración de IgGnm, los valores de absorción se mantuvieron en el entorno de 0.120 a 0.150. Cuando se ensayó únicamente con IgG-HRP, el valor de absorción obtenido fue de 0.110, lo que indicó que la absorción basal registrada, en los ensayos con IgGnm, se debió mayoritariamente al pegado inespecífico del anticuerpo secundario. Este valor de absorción de fondo, tal vez, pudo ser reducido si los lavados se hubieran llevado a cabo con soluciones de PBS-detergente, ahora bien, dadas las interferencias constatadas al emplear PBS-T, habría sido necesario ensayar con otros detergentes, lo cual no se llevó a cabo debido al limitado stock de electrodos, los cuales se destinaron

para los ensayos electroquímicos. A pesar de esto, se constató que los lavados con PBS fueron suficientes. Si bien no se pudo afirmar que el comportamiento de la absorbancia vs concentración de anti-ADNdc presentara una tendencia definida, por lo ya expuesto, el hecho de que no se registrara variación de la absorbancia para los ensayos con IgGnm, y que ésta fuese menor a la registrada para la mínima concentración de anti-ADNdc, confirmó que la interacción fue específica para los anti-ADNdc, lo que fue suficiente para poder comenzar la siguiente etapa del trabajo.

4.5- Comportamiento electroquímico del TMB sobre electrodos de carbono.

Como se especifica en el título del presente trabajo, se buscó establecer las bases para el desarrollo de un biosensor de naturaleza electroquímica. Hasta este punto, la detección de la interacción anti-ADNdc/ADNdc se realizó colorimétricamente, registrando la absorbancia de la especie más oxidada del TMB. Fue deseable, por lo tanto, cuantificar de forma electroquímica dicha especie. En este punto, fue realizado previamente un análisis electroquímico del TMB sobre la superficie de los electrodos de carbono, mediante VC, con la finalidad de registrar los potenciales redox de dicha especie y, así, definir posteriormente un potencial de trabajo para llevar a cabo las medidas amperométricas. Como se observa en la figura 42, fueron detectables dos picos de oxidación/reducción cuando se llevó a cabo VC en buffer HAc/Ac, los cuales son atribuibles a que el proceso de oxidación/reducción de TMB, se desarrolla en dos pasos sucesivos y que, además, dicho proceso es reversible, lo cual concuerda con la información de trabajos consultados^{63,64,84}.

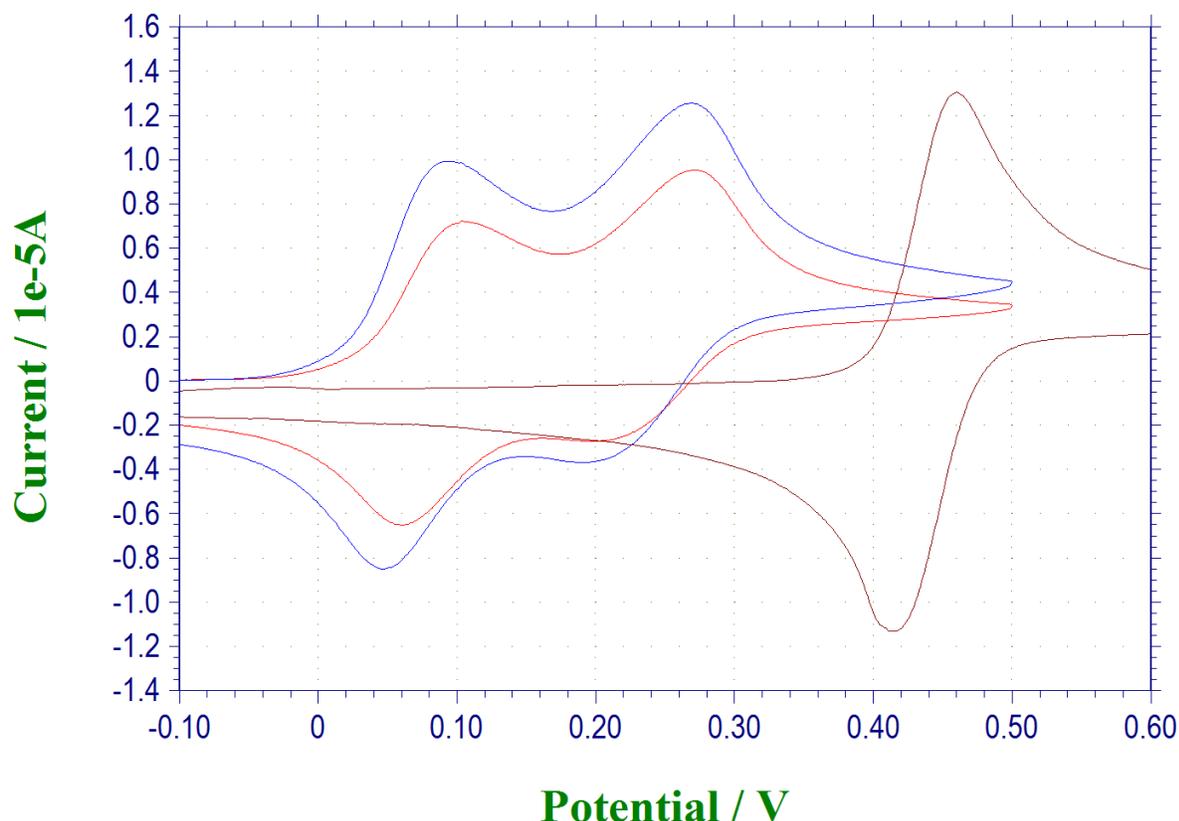


Figura 42. VC de TMB en buffer Hac/Ac 0.5 M, pH 5. (a, —) VC TMB. (b, —) TMB+H₂O₂. (c, —) TMB+H₂O₂ luego del agregado de 6 µL de HCl 2 N. La VC se realizó entre los potenciales de -0.5 V a +0.5 V a una velocidad de barrido de 0.050 V/s.

Cuando la VC se realizó en presencia de TMB-H₂O₂ no se observaron cambios significativos, mientras que luego del agregado de HCl, se apreció la aparición de un único pico de oxidación/reducción, correspondiente únicamente a la generación de la especie TMB²⁺, la cual se ve favorecida en medio fuertemente ácido. Lo que se buscó fue lograr detectar la generación del TMBox, sin alterar el sistema, por lo cual en los ensayos electroquímicos con anticuerpos, no fue agregado el HCl previamente a cada medida. Dado que los picos de oxidación/reducción aparecen a potenciales por encima de 0 V, se decidió llevar a cabo una amperometría a un potencial constante de -0.1 V, de forma que, únicamente se registre la reducción del TMBox generado enzimáticamente, y no se genere mayor cantidad de forma electroquímica.

4.6- Detección electroquímica del TMB_{ox}.

La finalidad de este trabajo fue establecer un método de detección electroquímica, capaz de responder a los cambios de concentración de anti-ADN_{dc} incubados sobre la superficie del electrodo. Como se detalló en el apartado “diseño del sistema” de este trabajo, la HRP conjugada al anticuerpo secundario es capaz de oxidar el TMB, con lo cual la medida de la corriente generada durante la reducción electroquímica del TMB_{ox}, podría ser relacionada con la concentración de anti-ADN_{dc} incubada. La técnica elegida para efectuar dichas determinaciones, fue la amperometría a potencial constante, por tratarse de una técnica sencilla y de fácil implementación.

Se prepararon dos electrodos ADN_{esp-v}/BSA, y se incubaron con soluciones de anticuerpos primarios. En uno de los casos, se incubó con anti-ADN_{dc} y en el otro con IgG_{nm}, ambos en concentración 0.125 µg/mL. Luego de las incubaciones con IgG-HRP, se depositó una solución de TMB-H₂O₂ y se incubó durante 5 min para que la reacción se inicie, registrándose luego la corriente de reducción a -0.1 V.

Paralelamente, se realizó el mismo ensayo, incubando un electrodo únicamente con anti-ADN_{dc}, sin la etapa de incubación con IgG-HRP, y se rebeló con TMB-H₂O₂. Los resultados de estos ensayos se resumen en la figura 43.

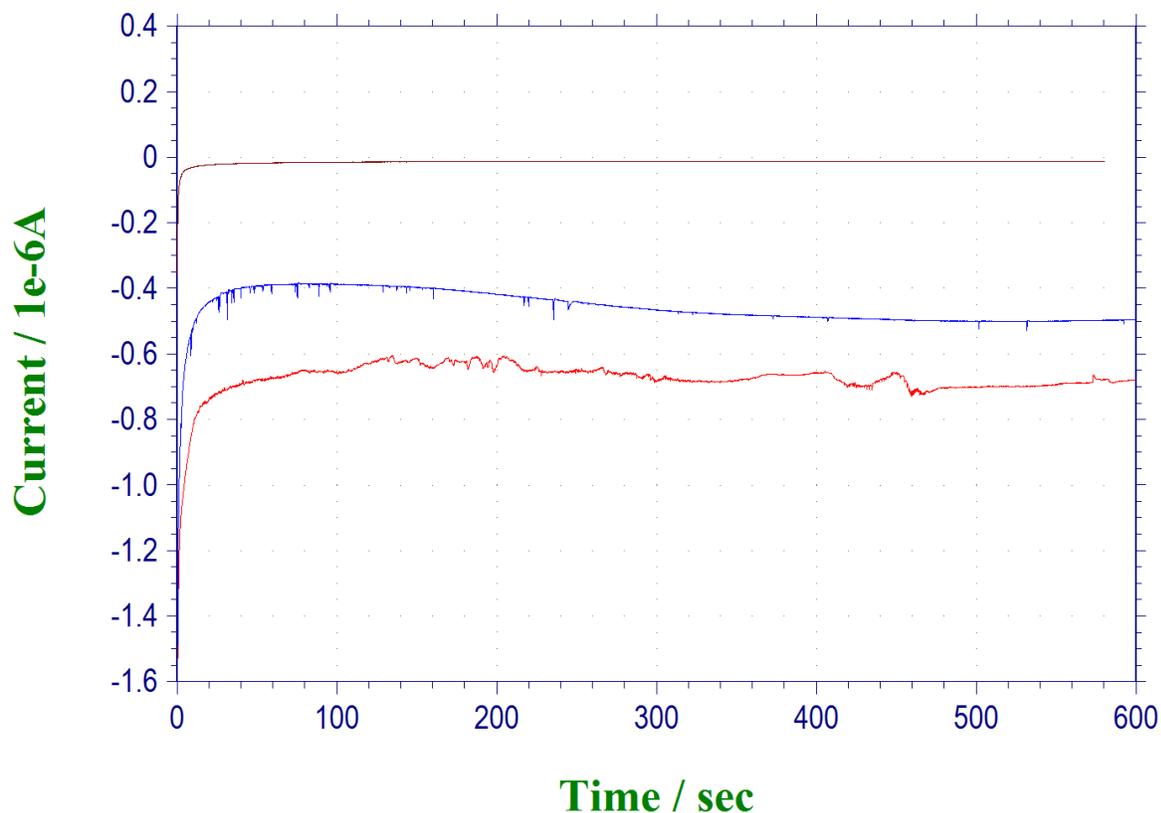


Figura 43. Corriente vs tiempo para la reducción de TMBox sobre tres electrodos ADNesp-v/BSA incubados con (a, —) antiADNdc 0.125 $\mu\text{g/mL}$, (b, —) IgGnm 0.125 $\mu\text{g/mL}$. En ambos casos se incubó además con IgG-HRP (Dil 1/1000). (c, —) control negativo, sin incubación con IgG-HRP.

En primer lugar, se observó que las corrientes registradas fueron negativas, lo cual es compatible con la idea de que el fenómeno observado es efectivamente la reducción del TMBox. Como segundo aspecto destacable, se apreció que, al comienzo del registro, la corriente fue muy negativa, alcanzando rápidamente un valor menos negativo, y estabilizándose luego de transcurridos 400 segundos. La hipótesis sugerida fue que, al inicio, el valor de corriente disminuye rápidamente debido al consumo de las moléculas de TMBox, que se encuentran en la cercanía de la superficie del electrodo, alcanzándose un valor mínimo de corriente, previamente a que la migración de moléculas desde el seno de la solución juegue su rol. Luego de este período, se alcanza un estado estacionario, en donde la cantidad de moléculas de

TMBox que se reducen, depende de su velocidad de migración hacia el electrodo, y de su velocidad de formación enzimática.

De acuerdo a esto, el hecho de que la corriente de reducción fue mayor para el caso del electrodo incubado con anti-ADNdc en comparación con el incubado con IgGnm, se explicaría por la presencia de mayor cantidad de enzima, que cataliza la reducción de una mayor cantidad de TMBox.

En el control negativo realizado, como era esperable, la corriente registrada fue nula, lo que permitió constatar que el fenómeno observado es provocado por la presencia de anticuerpos.

En cuanto a la detección del TMBox generado enzimáticamente, en los trabajos de Konstantinov y Rubin se emplea la medida a potencial constante de -0.1 V mediante la técnica amperometría de pulso intermitente, lo que avalaría la elección del potencial de trabajo para la técnica empleada aquí ^{1,49}.

Para evaluar el efecto de la incubación con diferentes concentraciones de anti-ADNdc, se trabajó en un sistema conformado por dos electrodos de trabajo serigrafados, de la empresa DropSens® (bielectrodos). En uno de los electrodos de trabajo se ensayó con anti-ADNdc, mientras que en el otro se incubó dilución de IgGnm, ambos a la misma concentración. Luego de las incubaciones con TMB-H₂O₂, se realizó amperometría a un potencial de -0.1 V para ambos electrodos en simultáneo. El registro de corriente en función del tiempo para el ensayo a una concentración de anticuerpo se muestra en la figura 44.

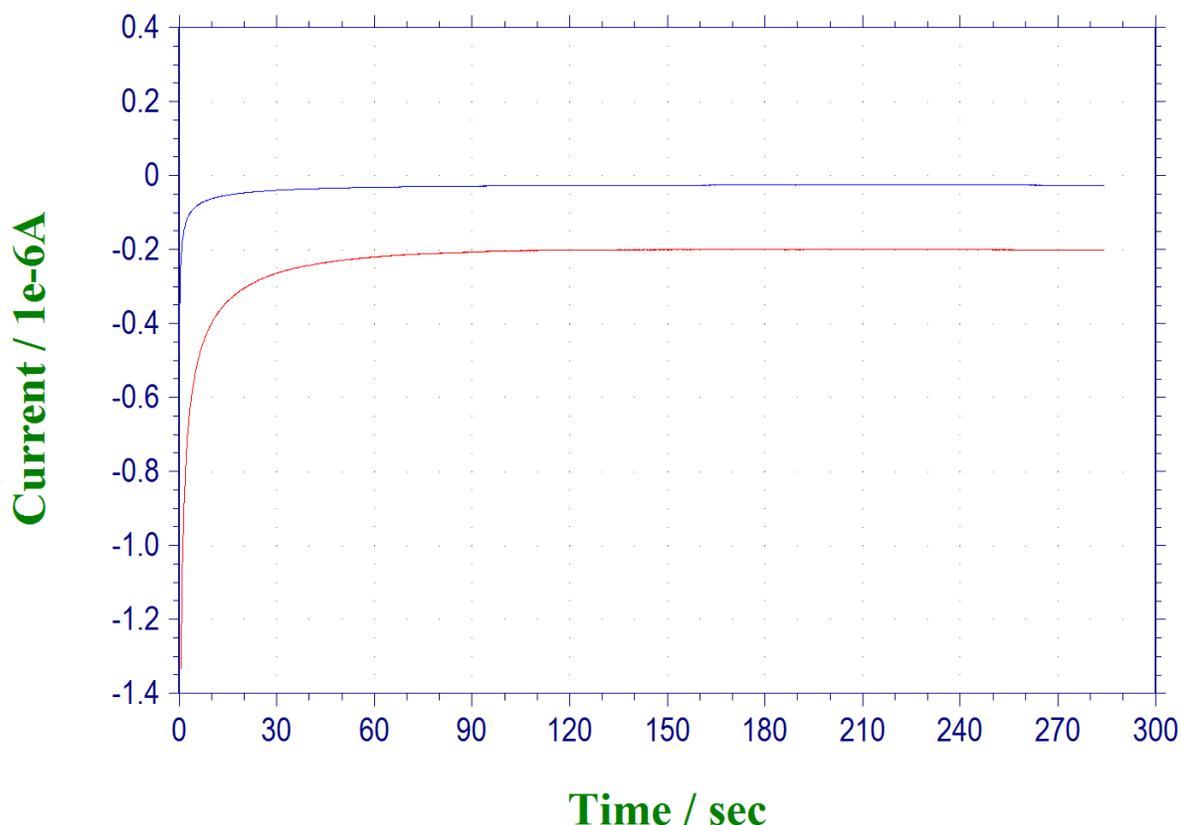


Figura 44. Corriente vs tiempo para la reducción de TMBx sobre un sistema de bielectrodos ADNesp-v/BSA incubados con (a, —) anti-ADNdc 0.125 µg/mL, (b, —) IgGnm 0.125 µg/mL. En ambos casos se incubó además con IgG-HRP (Dil 1/1000).

En primer lugar, el comportamiento observado fue el mismo que en el caso del sistema de tres electrodos. La corriente de reducción del TMBx, fue mayor una vez más, en el electrodo incubado con anti-ADNdc, lo que reafirmó, la capacidad de la técnica en la discriminación entre ambos anticuerpos, más aún, la corriente para el electrodo incubado con IgGnm, se encontró más próxima a 0 en comparación con los resultados amperométricos obtenidos con el sistema de tres electrodos. Si se analizan los valores de corriente registrados en las amperometrías de la figura 43, estos son mayores, lo cual se fundamentó en una menor área de los electrodos de trabajo para el sistema de bielectrodos.

Loa ensayos fueron realizados sobre el sistema de bielectrodos para diferentes concentraciones de anti-ADNdc e IgGnm, y se tomó el valor de corriente a los 100 s de ensayo. Los resultados se muestran en la figura 45.

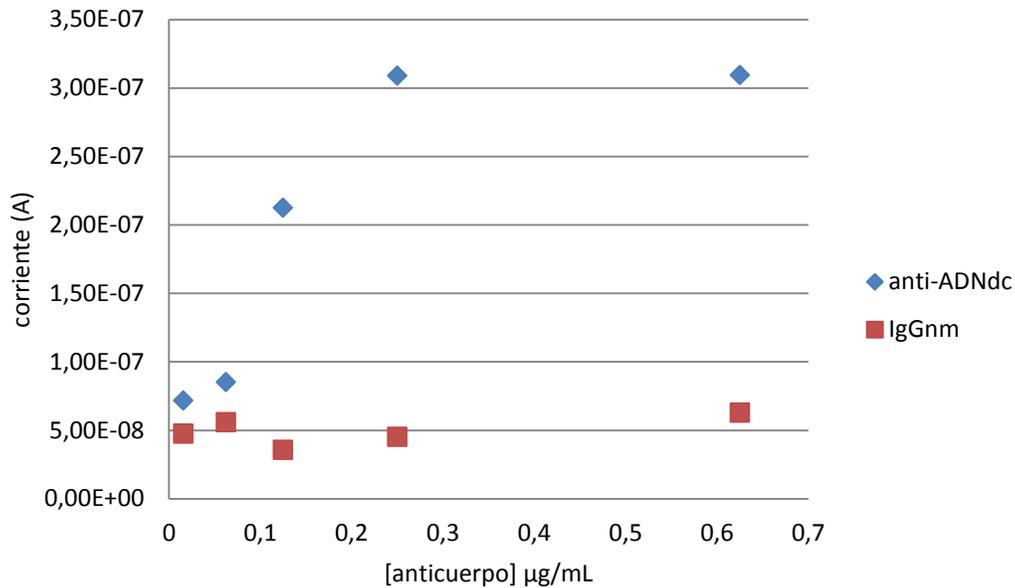


Figura 45. Corriente vs concentración de anticuerpo.

Como era esperable, los valores de corriente registrados para los electrodos incubados con anti-ADNdc, mostraron variaciones en función de la concentración de los mismos, mientras que para el caso de los anticuerpos IgGnm, no se apreciaron cambios significativos. A pesar del reducido número de puntos, y la falta de réplicas en los ensayos, queda claro que existe una tendencia clara, en donde a medida que se aumenta la concentración de anticuerpo anti-ADNdc, se registran corrientes de reducción mayores. Además es notorio el hecho de que el sistema presenta un comportamiento típico de saturación para concentraciones mayores a 0.25 µg/mL.

A pesar de que no se realizaron réplicas, se llevó a cabo un ajuste matemático a una función de saturación, de donde a partir de la ecuación se estimó el límite de detección del sistema resultando igual a 0.05 µg/mL (ver figura 46).

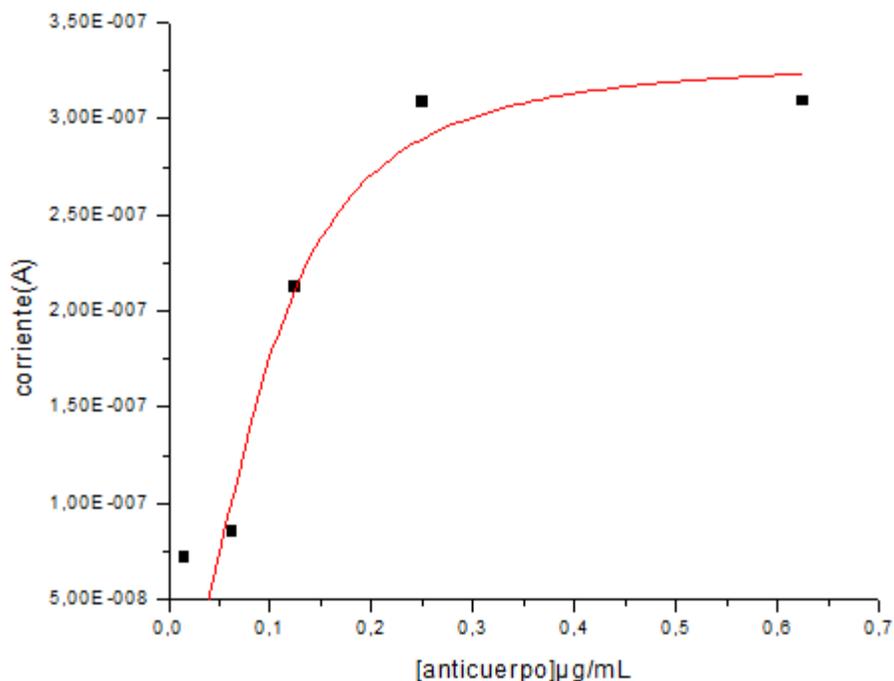


Figura 46. Corriente vs concentración de anticuerpo. Se muestra el ajuste a una curva de saturación, $y = \frac{Ax^n}{B+x^n}$. El límite de detección se determinó considerando el promedio de las intensidades de corriente para el anticuerpo inespecífico, más tres veces el desvío estándar, y se interpoló en la curva. Los ajustes se llevaron a cabo empleando el software Origin 6.0.

El empleo del sistema de bioelectrodos, ofrece la posibilidad de analizar en simultáneo el comportamiento del sistema frente a anticuerpos específicos, e inespecíficos, de forma que, estos último pueden jugar el rol de patrón interno del sistema, y permitir la normalización de los datos, eliminando así los efectos de las variaciones causadas por la matriz en donde se incuben los anticuerpos. Atendiendo a esto, una mejor evaluación y más aún al momento de trabajar con muestras de suero de pacientes, se obtendría graficando la relación de intensidades de corriente, (anti-ADNdc/IgGnm) en función de la concentración.

En comparación con los trabajos de Konstantinov y Rubín, el sistema planteado en esta tesina, presenta algunas características que lo hacen fácilmente adaptable al análisis de tipo “point of care”. En primer lugar, el método de inmovilización de ADN utilizado aquí, a diferencia de lo planteado en los trabajos de los autores mencionados, en

donde el ADN se inmoviliza sobre una membrana sintética de fluoruro de polivinilideno, ofrece la ventaja de realizarse en menor tiempo y no requiere el uso de reactivos extras.

En segundo lugar, los autores basan su sistema, en el pasaje de las soluciones de suero a través de las membranas, mediante el empleo de una bomba peristáltica, hecho que hace al dispositivo poco adecuado para el análisis de rutina y fuera de un laboratorio, además de requerir equipamiento extra que aumentaría el costo del dispositivo. El sistema planteado en este trabajo, requeriría únicamente la incubación con soluciones de suero durante un lapso de tiempo, y además permitiría trabajar con volúmenes reducidos de muestra.

La técnica de detección elegida por Konstantinov y Rubin (amperometría de pulso intermitente) requiere el empleo de equipos más sofisticados, en cambio, la amperometría a potencial constante aparece como uno de los métodos más sencillos en electroanálisis, haciendo a la técnica fácilmente compatible con la miniaturización.

Es importante agregar que, en trabajos anteriores, referentes a la detección de anti-ADNdc, el sistema fue evaluado directamente con muestras de suero de pacientes con LES, con las complicaciones que conlleva el manejo y análisis de muestras biológicas reales. En ningún momento, se estableció, en dichos trabajos, una relación medible, entre concentración de anti-ADNdc (en unidades de masa/volumen) y señal registrada, estableciéndose correlaciones entre parámetros como absorbancia e intensidad de corriente.

El análisis del sistema planteado aquí, empleando diluciones de anticuerpo comercial, de concentración conocida, permitiría lograr establecer una relación de proporcionalidad, de forma de informar la cantidad de anticuerpos en unidades de concentración universales, evitando así, los problemas derivados de la falta de consenso sobre los títulos de anticuerpos tomados como valor de corte. Sumado a esto, la evaluación del sistema, primariamente con muestras controladas, permitiría, la aproximación al análisis de muestras reales, con la posibilidad de evaluar, y cuantificar, el grado de afectación derivado de la complejidad de las matrices biológicas.

Es importante dejar en claro, que en ningún momento se pretendió, ni se pretende, desarrollar un dispositivo para diagnóstico de LES, sino que, lo que se buscó fue aproximarse a un sistema plausible de ser empleado en el seguimiento de la enfermedad, posibilitando la predicción de períodos de empuje.

5- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

El aspecto más destacable de este trabajo, es que se logró diseñar y optimizar un sistema prometedor en el campo del análisis de anticuerpos anti-ADNdc. La estrategia de inmovilización elegida puede realizarse en forma sencilla sobre los electrodos serigrafiados, sin demandar el empleo de reactivos especiales ni equipos costosos, con lo cual se abarataría la construcción del biosensor. Si bien no se cuentan con datos suficientes, los resultados de las medidas amperométricas preliminares mostraron que, el sistema HRP-TMB, permite discriminar entre anticuerpos anti-ADNdc y anticuerpos inespecíficos, y que su cantidad podría ser cuantificable en términos de intensidades de corriente. A su vez, la reacción de la HRP y el TMB, ofrecen la posibilidad de contar con un ensayo no electroquímico en el mismo sistema, que puede reafirmar los resultados registrados con la amperometría.

La implementación del sistema al análisis de muestras reales requiere, aún, un mayor esfuerzo e investigación. El uso de concentraciones conocidas de anticuerpo, abre la ventana al establecimiento de una relación entre señal y concentración, punto que los ensayos actuales, para test de anti-ADNdc, aún no han cubierto.

Teniendo conocimiento del comportamiento del sistema, las posibilidades de desarrollo de un dispositivo aplicable al análisis de tipo POCT, son aún mayores. En un futuro inmediato, los ensayos deberán confirmar los resultados mostrados aquí y evaluar la reproducibilidad y sensibilidad del sistema, frente a muestras de laboratorio. El paso siguiente sería evaluar el desempeño del dispositivo, en muestras de concentración conocida de anticuerpos, pero preparadas en suero de pacientes normales. Este punto permitirá evaluar el efecto de la matriz biológica. De confirmarse la existencia de una cierta relación entre intensidad de corriente, y concentración, restaría únicamente analizar el sistema, ahora sí, con muestras de pacientes de LES.

6- AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis familiares por el apoyo brindado durante estos años.

A mis compañeros y amigos, por bancarme siempre. Agradecer especialmente a la barra de ciencias por tantas horas de “estudio” y diversión.

A mis compañeros de la Unidad, tutor y co-tutor por permitirme realizar este trabajo y brindarme su apoyo y orientación durante este proceso. Especialmente agradecer al MSc. Juan Pablo Tosar por sus gestiones a la hora de posibilitarme materiales y su buena voluntad para analizar resultados y brindar su experiencia en la discusión de los mismos.

Al Dr. Eduardo Méndez por su buena disposición a la hora de atender consultas y aportar sugerencias al trabajo.

Agradecer también a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por el apoyo financiero brindado a través de su programa de becas de iniciación a la investigación.

7- BIBLIOGRAFÍA

1. Konstantinov, K. N. *et al.* Rapid detection of anti-chromatin autoantibodies in human serum using a portable electrochemical biosensor.
2. Tosar, J. P., Brañas, G. & Laíz, J. Electrochemical DNA hybridization sensors applied to real and complex biological samples. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 1205–1217 (2010).
3. Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G. S. *Biosensors: Fundamentals and Applications.* (Oxford University Press, Oxford., 1987).
4. Tosar Rovira, J. P. Estudio de la inmovilización de oligonucleótidos a electrodos modificados de oro: polipirrol, y detección electroquímica de secuencias complementarias. (Facultad de Ciencias-UdelaR, 2008).
5. Pividori, M. I. Sistemas de inmovilización y detección de biomoléculas en sensores. *Curso de Posgrado*
6. Wang, Y., Xu, H., Zhang, J. & Li, G. Electrochemical sensors for clinic analysis. *Sensors* **8**, 2043–2081 (2008).
7. INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial). Plataforma biosensora para diagnóstico de enfermedades. *Ministerio de Industria-Presidencia de la Nación* (2011). at <<http://www.inti.gov.ar/sabercomo/sc107/inti3.php>>
8. A. Julio Reviejo & José M. Pingarrón. Biosensores electroquímicos. Una herramienta útil para el análisis medioambiental, alimentario y clínico. *Anales de la Real Sociedad Española de Química* **2**, 5–15 (2000).
9. Lippa, P. B., Sokoll, L. J. & Chan, D. W. Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta.* **314**, 1–26 (2001).
10. Keel, K. Tosar, J.P. , Laíz, J. Desarrollo de superficies modificadas oro-anticuerpo anti-PSPB para su uso como biosensor en la detección de preñez bovina. *INNOTEC* **5**, 29–38 (2010).
11. Shui-Lian, Y., Woon-Pang, K., Chun-Kwok, W., Edmund, K. L. & Lai-Shan, T. Immunopathological Roles of Cytokines, Chemokines, Signaling Molecules, and Pattern-Recognition Receptors in Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, (2012).

12. Li, C. K. & Isenberg, D. A. Systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)*. **34**, 445–452 (2006).
13. Yung, S. & Chan, T. M. Anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis — The emerging mechanisms. *Autoimmun. Rev.* **7**, 317–321 (2008).
14. Dra. Ellen Ginzler, D. J. T. Lupus Eritematoso Sistémico. **2014**, (2013).
15. Teh, C., Wong, J., Ngeh, N. & Loh, W. Systemic lupus erythematosus pregnancies: the Sarawak experience and review of lupus pregnancies in Asia. *Rheumatol. Int.* **31**, 1153–1157 (2011).
16. Laube, T. Desarrollo de electrodos de carbono grafito modificados con ADNds para su utilización en biosensores destinados a la detección de anticuerpos anti-ADNds. *Unidad de Bioquímica Analítica-Centro de Investigaciones Nucleares (UDELAR-Facultad de Ciencias-Centro de Investigaciones Nucleares-Unidad de Bioquímica Analítica* , 2007).
17. Manuscript, A. & Initiation, A. NIH Public Access. **37**, 104–112 (2012).
18. Gómez-Puerta, J. a., Burlingame, R. W. & Cervera, R. Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies: Diagnostic and clinical value. *Autoimmun. Rev.* **7**, 606–611 (2008).
19. Sherer, Y., Gorstein, A., Fritzler, M. J. & Shoenfeld, Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: More than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin. Arthritis Rheum.* **34**, 501–537 (2004).
20. Rekvig, O. P., Kalaaji, M. & Nossent, H. Anti-DNA antibody subpopulations and lupus nephritis. *Autoimmun. Rev.* **3**, 1–6 (2004).
21. Yung, S. & Chan, T. M. Anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis — The emerging mechanisms. *Autoimmun. Rev.* **7**, 317–321 (2008).
22. Fiegel, F. *et al.* Autoantibodies to double-stranded DNA--intermethod comparison between four commercial immunoassays and a research biosensor-based device. *Lupus* **19**, 957–964 (2010).
23. Rouquette, a M. & Desgruelles, C. Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays. *Lupus* **15**, 403–407 (2006).
24. Mm, C. *et al.* Frecuencia de los patrones de anticuerpos anti-nucleares en pacientes con sospecha clínica de LES Frequency of antinuclear antibody patterns in patients with SLE clinical suspicion. **6**, 27–33 (2010).
25. BIO-RAD Laboratories. KALLESTAD™ HEp-2 Cell Line Substrate. (2006).

26. Aarden, L. a, de Groot, E. R. & Feltkamp, T. E. Immunology of DNA. III. *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **254**, 505–515 (1975).
27. Carballo, O. G. *et al.* Primer Consenso Argentino para la Estandarización de la Determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta – HEP-2 First Argentine Consensus for Standardization. **46**, 3–13 (2012).
28. Dellavance, A. *et al.* 3^o Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2 (FAN): recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2, controle de qualidade e associações clínicas. *Rev. Bras. Reumatol.* **49**, 89–98 (2009).
29. Tan, E. M. *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **25**, 1271–1277 (1982).
30. Joan Marie Von Feldt. Antinuclear Antibodies (ANA). *American College of Rheumatology* (2012). at http://www.rheumatology.org/practice/clinical/patients/diseases_and_conditions/ana.asp
31. Emlen, W., Jarusiripipat P Fau - Burdick, G., Burdick, G. & Methods, J. I. A new ELISA for the detection of double-stranded DNA antibodies.
32. Debesa Padilla, A. & Hernández Betancourt, O. Estandarización de un ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos anti-ADN doble cadena en el lupus eritematoso sistémico. *Rev. Cuba. Investig. Biomédicas* **31**, 467–479 (2012).
33. Zouali M Fau - Stollar, B. D., Stollar, B. D. & Methods, J. I. A rapid ELISA for measurement of antibodies to nucleic acid antigens using UV-treated polystyrene microplates.
34. Radice, A., Sinico, R. A. & Autoimmunity. A new oligonucleotide-based ELISA for the detection of anti-double-stranded DNA antibodies.
35. Hylkema, M. N. *et al.* Clinical evaluation of a modified ELISA, using photobiotinylated DNA, for the detection of anti-DNA antibodies.
36. Launay, D. *et al.* Comparison of the Farr radioimmunoassay, 3 commercial enzyme immunoassays and *Crithidia luciliae* immunofluorescence test for diagnosis and activity assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin. Chim. Acta* **411**, 959–964 (2010).

37. Perret, a. *et al.* La technique Luminex®-FIDIS®, a une meilleure concordance avec le test de Farr que l'Elisa dans la recherche d'anticorps anti-ADN natifs. *La Rev. Médecine Interne* **34**, A71 (2013).
38. Kim, Y., Park, Y., Lee, E. Y. & Kim, H. S. Comparison of automated multiplexed bead-based ANA screening assay with ELISA for detecting five common anti-extractable nuclear antigens and anti-dsDNA in systemic rheumatic diseases. *Clin. Chim. Acta* **413**, 308–311 (2012).
39. Martin, J. *et al.* Evaluation of two antibodies against double-stranded DNA assays in discriminating between active and non-active systemic lupus erythematosus: Correlation between the cut-off and the specificity. *Pathol. Biol.* **60**, 387–391 (2012).
40. D'Orazio, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. *Clin. Chim. Acta* **412**, 1749–1761 (2011).
41. Shen, G., Lu, J. & Cai, C. The fabrication of a piezoelectric immunosensor based on DNA-antibody conjugate layer. *Anal. Biochem.* **418**, 167–171 (2011).
42. Buhl, A. *et al.* Novel biosensor-based analytic device for the detection of anti-double-stranded DNA antibodies. *Clin. Chem.* **53**, 334–341 (2007).
43. Buhl, A., Page, S., Heegaard, N. H. H., von Landenberg, P. & Lippa, P. B. Optical biosensor-based characterization of anti-double-stranded DNA monoclonal antibodies as possible new standards for laboratory tests. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 198–203 (2009).
44. Evtugyn, G. *et al.* Affinity biosensors based on disposable screen-printed electrodes modified with DNA. *Anal. Chim. Acta* **479**, 125–134 (2003).
45. Babkina, S. S., Ulakhovich, N. a. & Zyavkina, Y. I. Amperometric DNA biosensor for the determination of auto-antibodies using DNA interaction with Pt(II) complex. *Anal. Chim. Acta* **502**, 23–30 (2004).
46. Konstantinov, K. N., Sitdikov, R. a., Lopez, G. P., Atanassov, P. & Rubin, R. L. Rapid detection of anti-chromatin autoantibodies in human serum using a portable electrochemical biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1949–1954 (2009).
47. Rubin, R. L., Wall, D. & Konstantinov, K. N. Electrochemical biosensor for quantitation of anti-DNA autoantibodies in human serum. *Biosens. Bioelectron.* **51**, 177–183 (2014).
48. Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D. & Blum, L. J. DNA biosensors and microarrays. *Chem. Rev.* **108**, 109–139 (2008).

49. Rubin, R. L., Wall D Fau - Konstantinov, K. N., Konstantinov, K. N. & Biosens, B. Electrochemical biosensor for quantitation of anti-DNA autoantibodies in human serum.
50. Guo, M., Chen, J., Nie, L. & Yao, S. Electrostatic assembly of calf thymus DNA on multi-walled carbon nanotube modified gold electrode and its interaction with chlorpromazine hydrochloride. *Electrochim. Acta* **49**, 2637–2643 (2004).
51. Brett, C. M. a., Oliveira Brett, A. M. & Serrano, S. H. P. On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **366**, 225–231 (1994).
52. Ligaj, M., Tichoniuk, M., Gwiazdowska, D. & Filipiak, M. Electrochemical DNA biosensor for the detection of pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*. *Electrochim. Acta* **128**, 67–74 (2013).
53. Mannelli, I. *et al.* Direct immobilisation of DNA probes for the development of affinity biosensors. *Bioelectrochemistry* **66**, 129–38 (2005).
54. Guimard, N. K., Gomez, N. & Schmidt, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 876–921 (2007).
55. Lange, U., Roznyatovskaya, N. V. & Mirsky, V. M. Conducting polymers in chemical sensors and arrays. *Anal. Chim. Acta* **614**, 1–26 (2008).
56. Pang, D.-W. *et al.* Modification of glassy carbon and gold electrodes with DNA. *J. Electroanal. Chem.* **403**, 183–188 (1996).
57. Tosar, J. P. *et al.* Template and catalytic effects of DNA in the construction of polypyrrole/DNA composite macro and microelectrodes. *Biosens. Bioelectron.* **41**, 294–301 (2013).
58. Wang, J., Jiang, M., Fortes, A. & Mukherjee, B. New label-free DNA recognition based on doping nucleic-acid probes within conducting polymer films. *Anal. Chim. Acta* **402**, 7–12 (1999).
59. Sassolas, A., Blum, L. J. & Leca-Bouvier, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **30**, 489–511 (2012).
60. Li, B. *et al.* Electrosynthesis of large polypyrrole films by multi-potential steps method. *Sci. China Technol. Sci.* **54**, 1697–1702 (2011).
61. Tosar, J. P., Keel, K. & Laíz, J. Two independent label-free detection methods in one electrochemical DNA sensor. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 3036–3042 (2009).

62. Baldrich, E., del Campo, F. J. & Muñoz, F. X. Biosensing at disk microelectrode arrays. Inter-electrode functionalisation allows formatting into miniaturised sensing platforms of enhanced sensitivity. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 920–926 (2009).
63. Volpe, G., Draisci, R., Palleschi, G. & Compagnone, D. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study. *Analyst* **123**, 1303–1307 (1998).
64. Li, B., Du, Y., Li, T. & Dong, S. Investigation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as colorimetric substrate for a peroxidatic DNAzyme. *Anal. Chim. Acta* **651**, 234–240 (2009).
65. Liu, M., Zhang, Y., Chen, Y., Xie, Q. & Yao, S. EQCM and in situ FTIR spectroelectrochemistry study on the electrochemical oxidation of TMB and the effect of large-sized anions. *J. Electroanal. Chem.* **622**, 184–192 (2008).
66. Palchetti, I., Mascini, M. et al. Disposable electrochemical sensor for rapid determination of heavy metals in herbal drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 251–256 (2003).
67. Hylkema, M. N. *et al.* Clinical evaluation of a modified ELISA, using photobiotinylated DNA, for the detection of anti-DNA antibodies. *J. Immunol. Methods* **170**, 93–102 (1994).
68. Inmunología, D. de. Diagnóstico de Toxoplasmosis por metodologías inmunológicas. *UTI Biología Tisular* (2008).
69. Tosar, J. P. *et al.* Template and catalytic effects of DNA in the construction of polypyrrole/DNA composite macro and microelectrodes. *Biosens. Bioelectron.* **41**, 294–301 (2013).
70. Kroubouzos G Fau - Tosca, A., Tosca A Fau - Konstadoulakis, M. M., Konstadoulakis Mm Fau - Varelzidis, A., Varelzidis, A. & Methods, J. I. Poly-L-lysine causes false positive results in ELISA methods detecting anti-dsDNA antibodies.
71. Climent, M. a., Valls, M. J., Feliu, J. M., Aldaz, A. & Clavilier, J. The behaviour of platinum single-crystal electrodes in neutral phosphate buffered solutions. *J. Electroanal. Chem.* **326**, 113–127 (1992).
72. Taguchi, S. & Aramata, A. Correlation of the underpotential deposition (upd) of zinc ions on Pt(111), Pt(100), and Pt(110) with anion specific adsorption. *J. Electroanal. Chem.* **457**, 73–81 (1998).

73. Savizi, I. S. P. & Janik, M. J. Acetate and phosphate anion adsorption linear sweep voltammograms simulated using density functional theory. *Electrochim. Acta* **56**, 3996–4006 (2011).
74. Oliveira-Brett, A. M., Piedade, J. A. P., Silva, L. A. & Diculescu, V. C. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Anal. Biochem.* **332**, 321–329 (2004).
75. Oliveira-Brett, a. ., Diculescu, V. & Piedade, J. a. . Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode. *Bioelectrochemistry* **55**, 61–62 (2002).
76. Švorc, L. & Kalcher, K. Modification-free electrochemical approach for sensitive monitoring of purine DNA bases: Simultaneous determination of guanine and adenine in biological samples using boron-doped diamond electrode. *Sensors Actuators B Chem.* **194**, 332–342 (2014).
77. Wang, H.-S., Ju, H.-X. & Chen, H.-Y. Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA using an electrochemically pretreated glassy carbon electrode. *Anal. Chim. Acta* **461**, 243–250 (2002).
78. Yin, H. *et al.* Electrochemical oxidation behavior of guanine and adenine on graphene–Nafion composite film modified glassy carbon electrode and the simultaneous determination. *Process Biochem.* **45**, 1707–1712 (2010).
79. Pedano, M. & Rivas, G. Immobilization of DNA on glassy carbon electrodes for the development of affinity biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 269–277 (2003).
80. Wang, J., Cai, X., Jonsson, C. & Balakrishnan, M. Adsorptive stripping potentiometry of DNA at electrochemically pretreated carbon paste electrodes. *Electroanalysis* **8**, 20–24 (1996).
81. Wang, J., Cai, X. & Rivas, G. Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips. *Biosens. ...* **12**, 587–599 (1997).
82. Brett, A. O. & Chiorcea, A. Effect of pH and applied potential on the adsorption of DNA on highly oriented pyrolytic graphite electrodes. Atomic force microscopy surface characterisation. *Electrochem. commun.* **5**, 178–183 (2003).
83. Pedano, M. L. & Rivas, G. A. Critical Study of Adsorbed Layer. 424–447 (2005).
84. Wu, Y., Zheng, J., Li, Z., Zhao, Y. & Zhang, Y. A novel reagentless amperometric immunosensor based on gold nanoparticles/TMB/Nafion-modified electrode. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1389–1393 (2009).