



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA LA
DETECCIÓN DE ANTÍGENOS ASOCIADOS A
CÁNCER EN SUERO SANGUÍNEO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
QUÍMICA

PRESENTA:

I. Q. EVELIN GUTIÉRREZ MORENO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARIA LUÍSA SOARES DA SILVA

MINERAL DE LA REFORMA HGO., ENERO 2014



I. Q. Evelin Gutiérrez Moreno

**Desarrollo de un biosensor
para la detección de
antígenos asociados a cáncer
en suero sanguíneo**

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica: la voluntad”*
A. Einstein

Gracias

CONACYT, por la beca de maestría otorgada durante el periodo de mis estudios, con número de registro **440975**.

AAQ-UAEH, por la formación académica brindada a lo largo de mi estancia en sus instalaciones, y de manera particular al personal del laboratorio de Química Analítica, por el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto.

PROMEP, por el apoyo al proyecto PROMEP/103.5/13/7039.

Agradecimientos

Gracias Dios por todas las bendiciones que me has obsequiado, mi familia y seres queridos, por la vida, la salud y la capacidad para luchar por lo que anhelo.

A mi padre, Agustín Gutiérrez, por darme la vida, por estar siempre con mis hermanos y conmigo, y por los buenos momentos que compartimos.

A mi madre, Olga Moreno, mujer ejemplar e incansable, por darme la vida y su amor incondicional, por ser mi gran amiga y consejera. Gracias por estar conmigo en los momentos buenos y sobre todo por acompañarme y consentirme cuando más te necesito.

A mis hermanos Ivan y Agustín, por el apoyo que me han brindado, por compartir conmigo tristezas, alegrías, éxitos y fracasos. Gracias por ser personas maravillosas que me impulsan a superarme cada día.

Mi más sincero agradecimiento a mi asesor, Dr. José Antonio Rodríguez Ávila, por sus enseñanzas y ayuda en todo momento, por su paciencia y tolerancia, por el valioso tiempo que me ha brindado, y sobre todo por su amistad.

A mi asesora, Dra. María Luísa, por permitirme formar parte de este proyecto, le agradezco por sus enseñanzas, por la paciencia para el desarrollo de este trabajo y sobre todo gracias por estar pendiente de ayudarme cada vez que lo necesite.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Carlos Andrés Galán y al Dr. Gian Arturo, por el apoyo para la revisión de este proyecto durante ya casi dos años, por las valiosas ideas que han aportado a éste y por los conocimientos que han compartido en las aulas.

A Mario Oscar Ordaz por toda la ayuda y los momentos alegres que compartimos, a mis amigas Dinora y Amada, por brindarme su amistad desinteresada, a mi amigo Eduardo por su amistad y consejos.

A todos los amigos y compañeros que forman parte del laboratorio de Química Analítica por su amistad, ayuda y compañía.

A todas las personas que a lo largo de mi vida, han sido piezas fundamentales para traerme hasta este momento, gracias, porque en algún momento en este mundo nos encontramos, y me brindaron su amistad, consejo y ayuda.

Evelin Gutiérrez Moreno

Índice general

| | |
|--|-------------|
| Agradecimientos | V |
| Índice general | VII |
| Índice de figuras | IX |
| Índice de tablas | XI |
| Resumen | XIII |
| Abstract | XV |
| Abreviaturas | xvii |
| 1. Antecedentes | 1 |
| 1.1. Glicosilación de proteínas | 1 |
| 1.1.1. <i>N</i> -glicosilación | 3 |
| 1.1.2. <i>O</i> -glicosilación | 4 |
| 1.2. Alteraciones de la glicosilación en cáncer | 5 |
| 1.3. Biomarcadores | 6 |
| 1.4. Biomarcadores de cáncer | 7 |
| 1.5. Métodos de determinación de biomarcadores | 8 |
| 1.5.1. Técnicas de separación de proteínas glicosiladas | 9 |
| 1.5.2. Detección de proteínas por transferencia Western | 11 |
| 1.5.3. Caracterización de proteínas por espectrometría de masas | 11 |
| 1.5.4. Biosensores | 12 |
| 1.5.4.1. Técnicas electroquímicas de detección en biosensores | 13 |
| 1.5.4.2. Biosensores electroquímicos para la detección de cáncer | 14 |
| 1.6. Interacción lectina-glicoproteína | 16 |
| 1.7. Análisis multivariante | 18 |
| 1.7.1. Análisis de componentes principales | 19 |
| 1.7.2. Análisis discriminante | 22 |
| 2. Objetivos | 25 |
| 2.1. Objetivo general | 25 |
| 2.2. Objetivos específicos | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Parte experimental | 27 |
| 3.1. Materiales, reactivos y soluciones | 27 |
| 3.2. Preparación del biosensor | 28 |
| 3.3. Preparación de muestras | 28 |
| 3.4. Análisis por EIS | 30 |
| 3.5. Tratamiento de datos por PCA | 31 |
| 4. Discusión de resultados | 33 |
| 4.1. Optimización de la construcción del biosensor | 33 |
| 4.1.1. Concentración de MHDA | 33 |
| 4.1.2. Concentración EDC:Sulfo-NHS | 35 |
| 4.1.3. Cantidad de lectina SNA | 36 |
| 4.1.4. Optimización del tiempo de incubación | 38 |
| 4.1.5. Bloqueo de grupos activados | 39 |
| 4.1.6. Selección del potencial DC | 40 |
| 4.2. Caracterización analítica del biosensor | 43 |
| 4.3. Análisis de muestras de suero sanguíneo | 45 |
| 4.4. Análisis de componentes principales | 45 |
| 5. Conclusiones | 53 |
| Glosario | 55 |
| A. EIS | 56 |
| B. Tablas de datos para el análisis de EIS | 59 |
| Referencias | 65 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| 1.1. Enlaces glicosídicos entre proteínas y carbohidratos. | 2 |
| 1.2. Estructura de los <i>N</i> -oligosacáridos presentes en las glicoproteínas. . . | 3 |
| 1.3. Biosíntesis de los núcleos de los <i>O</i> -glicanos. | 4 |
| 1.4. Esquema generalizado de un biosensor. | 12 |
| 1.5. Reacción enzimática de AP para la producción de 4-AP. | 14 |
| 1.6. (a) Diagrama que ilustra los dos componentes principales, CP1 y CP2, para las dos variables, X_1 y X_2 . (b) Puntos referidos a los ejes de los componentes principales. | 21 |
| 1.7. Situación en la que el primer componente principal no proporciona una buena separación entre grupos. | 21 |
| 3.1. Simplificación de suero sanguíneo con el kit ProteoMiner (Bio-Rad) previo al análisis proteómico. | 29 |
| 4.1. Formación de la SAM. | 34 |
| 4.2. R_{ct} debidos a la modificación de la superficie de SPE con MHDA. . . | 34 |
| 4.3. Activación de grupos carboxílicos terminales de la superficie modificada. . . | 35 |
| 4.4. R_{ct} debidos a la adición de entrecruzantes EDC y Sulfo-NHS | 36 |
| 4.5. Inmovilización de la lectina de <i>Sambucus nigra</i> en la superficie del biosensor. | 37 |
| 4.6. R_{ct} debidos a la cantidad de SNA inmovilizada, a) control positivo BSM, b) control positivo Trf. | 38 |
| 4.7. Cambio de la resistencia respecto al tiempo de incubación a) BSM, b) Trf. | 39 |
| 4.8. Bloqueo de grupos activados residuales. | 39 |
| 4.9. Voltamperometría cíclica, a) electrodo de oro no modificado, b) biosensor analizado, velocidad de barrido 0.05 V s^{-1} , ventana de potencial de -0.9 a 1 V | 40 |
| 4.10. Efecto del potencial DC en la medición de EIS (Trf). | 41 |
| 4.11. Análisis por EIS. | 42 |

| | |
|---|----|
| 4.12. a) Diagrama de Nyquist para adiciones sucesivas de Trf sobre un SPE. | |
| b) Línea de calibración para el biosensor mostrado en el diagrama de Nyquist | 43 |
| 4.13. Gráfico de componentes principales en 25 frecuencias de análisis. . . . | 47 |
| 4.14. Gráfico de cargas del componente 1 y 2. | 48 |
| 4.15. Gráfico de componentes principales en 7 frecuencias de análisis. . . . | 51 |
| A.1. Circuito equivalente con la representación de las características interfaciales de un biosensor electroquímico en la presencia de una sonda redox. | 56 |
| A.2. Diagrama de Nyquist para un electrodo modificado. | 57 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| 1.1. O-glicanos y alteraciones en cáncer. | 6 |
| 1.2. Afinidad de lectina-estructura de carbohidratos. | 18 |
| 1.3. Matriz X de n variables originales para i objetos. | 19 |
| 3.1. Tipos de muestras tratadas con el kit ProteoMiner. | 29 |
| 4.1. Concentraciones experimentadas de agente bloqueante | 40 |
| 4.2. Análisis de efecto matriz. | 44 |
| 4.3. ΔZ en 7 frecuencias (4.217, 2.154, 1.101, 0.562, 0.287, 0.147, 0.075 Hz) obtenidos del análisis de EIS. | 49 |
| 4.4. Matriz de correlación de las variables | 50 |
| 4.5. Cargas para cada una de las variables examinadas | 50 |
| B.1. ΔZ (k Ω) en las frecuencias de análisis por EIS, para el conjunto de muestras de suero sanguíneo control y positivas. | 60 |
| B.2. Matriz de correlación de Pearson. | 61 |
| B.3. Componentes principales y varianzas acumuladas | 62 |
| B.4. Cargas de los componentes principales. | 63 |

Resumen

El cáncer hoy en día es una enfermedad de gran incidencia. La detección temprana de la enfermedad permite un tratamiento oportuno y mejora el pronóstico del paciente, el problema principal para lograrlo es la falta de síntomas específicos en etapas iniciales.

Durante la oncogénesis ocurren varias alteraciones a nivel celular. Una de ellas consiste en el acortamiento de las cadenas de *O*-glicanos de las glicoproteínas. Son ejemplos de *O*-glicanos truncados los siguientes antígenos: Tn, sialil-Tn (STn), T y sialil-T (ST). Estos antígenos han sido asociados a distintos tipos de cáncer, específicamente a carcinomas. Las glicoproteínas alteradas se pueden utilizar como biomarcadores de cáncer puesto que éstas no son sintetizadas por las células normales, con la ventaja de que están presentes desde las etapas iniciales de la enfermedad, y su incidencia es mayor con el desarrollo del tumor. El reconocimiento de las glicoproteínas alteradas es posible mediante el uso de lectinas, las cuales son glicoproteínas que presentan afinidad por secuencias específicas de carbohidratos.

Considerando esta característica de las lectinas, se propone el desarrollo de un biosensor capaz de reconocer un antígeno asociado al cáncer, el STn, secretado por las células tumorales y presente en el suero sanguíneo. El biosensor propuesto, se basa en el uso de la lectina *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) como agente de reconocimiento. El uso de electrodos serigrafiados permite el desarrollo de un biosensor portátil, sencillo y fácil de operar, con la ventaja de utilizar microvolúmenes de muestra. La técnica de análisis propuesta es la espectroscopía de impedancia electroquímica, que consiste en la medición del aumento de la resistencia del biosensor debido a la formación de un complejo SNA-STn, con esta técnica es posible lograr un ensayo de respuesta rápida.

Abstract

Nowadays cancer is a disease with high incidence. Early detection of this disease allows early treatment in order to improve patient prognosis, the main problem to achieve this lays in the lack of specific symptoms in early stages of the disease.

During oncogenesis, several changes occur at a cellular level, one of these consists in the shortening of *O*-glycan chains of glycoproteins. Examples of truncated *O*-glycans are the antigens: Tn, Sialyl-Tn (STn), T and Sialyl-T (ST). These antigens have been associated with different kinds of cancer, specifically carcinomas. Altered glycoproteins can be used as biomarkers for cancer since these are not synthesized by normal cells, with the advantage that they are present from the earliest stages of the disease, and its amount in serum increases with tumor development. Recognition of altered glycoprotein is possible through the use of lectins, which are glycoproteins which have affinity for specific sequences of carbohydrates.

Considering this characteristic of lectins, a lectin based biosensor capable of recognizing the cancer-associated STn antigen is proposed. The biosensor relies on the use of lectin *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) as recognition agent. The use of screen-printed electrodes allows the development of a portable, simple and easy to operate biosensor, with the advantage of using micro-volume samples. The analysis technique used to detect the glycan of interest is the electrochemical impedance spectroscopy, which implies the measurement of the sensor's resistance increment due to the formation of a SNA-STn complex. EIS allows to perform the analysis in short times, which represents an additional advantage to the proposed method.

Abreviaturas

| Símbolo | Descripción |
|----------|---|
| A | Nomenclatura de grupos en cromatografía de afinidad. |
| ABA | <i>Agaricus bisporus</i> aglutinina. |
| AC | Corriente alterna. |
| ADL | Análisis discriminante lineal. |
| AFP | α -fetoproteína. |
| ALL | <i>Amaranthus leucocarpus</i> lectina. |
| AP | Fosfatasa alcalina. |
| Asn | Asparagina. |
| BSA | Albúmina de suero bovino. |
| CA 125 | Antígeno asociado a cáncer de ovarios. |
| CA 19.9 | Antígeno asociado a cáncer de colon, páncreas y tracto biliar. |
| CA 27.29 | Antígeno asociado a cáncer de mama. |
| CEA | Antígeno carcinoembrionario. |
| CMP | Monofosfato de citosina. |
| Con A | Concanavalin A. |
| CP1 | Primer componente principal. |
| CP2 | Segundo componente principal. |
| CPLL | Biblioteca combinatoria de péptidos (Combinatorial peptide ligand library). |
| DC | Corriente directa. |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico. |
| DSA | <i>Datura stramonium</i> aglutinina. |
| EDC | N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida. |

| Símbolo | Descripción |
|----------|---|
| EIS | Espectroscopía de impedancia electroquímica. |
| ESI | Ionización por electrospray (Electrospray ionization). |
| F | Fuerza. |
| FDL | Función discriminante lineal. |
| Fuc | Fucosa. |
| Gal | Galactosa. |
| GalNAc | N-acetilgalactosamina. |
| GDP | Difosfato de guanina. |
| Glc | Glucosa. |
| GlcNAc | N-acetilglucosamina. |
| GlcUA | Glicosaminoglicano. |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución (High-Performance Liquid Chromatography). |
| hPRL-3 | Fosfatasa humana. |
| HRP | Peroxidasa de rábano. |
| LAPS | Light-addressable potentiometric sensor. |
| LCA | <i>Lens culinaris</i> aglutinina. |
| LPA | <i>Limulus polyphemus</i> aglutinina. |
| MAA | <i>Maackia amurensis</i> aglutinina. |
| MAH | <i>Maackia amurensis</i> hemaglutinina. |
| MAL | <i>Maackia amurensis</i> leucoaglutinina. |
| MALDI | Desorción/ionización láser asistida por matriz (Matrix-assisted laser desorption-ionization). |
| Man | Manosa. |
| MCF-7 | Células de cáncer de mama. |
| MDAMB231 | Células de adenocarcinoma mamario. |
| MHDA | Ácido mercaptohexadecanoico. |
| Neu5Ac | Ácido acetilneurámico o ácido siálico. |
| o-PD | o-fenilendiamina. |

| Símbolo | Descripción |
|--------------|---|
| PCA | Análisis de componentes principales. |
| PNA | <i>Arachis hypogaea</i> aglutinina. |
| RNA | Ácido ribonucleico. |
| RSD | Desviación estándar relativa. |
| SAM | Monocapa autoensamblada (Self-assembled monolayer). |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio. |
| Ser | Serina. |
| SELDI-TOF-MS | Espectrometría de masas en tiempo de vuelo mediante desorción-ionización por láser de superficie (Surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry). |
| SEM | Microscopía electrónica de barrido (Scanning electron microscopy). |
| SNA | <i>Sambucus nigra</i> aglutinina. |
| SPCE | Electrodo de carbón serigrafiado. |
| SPE | Electrodo serigrafiado (Screen printed electrode). |
| STn | Antígeno sialil-Tn. |
| sulfo-NHS | N-hidroxisulfosuccinimida. |
| SWNT | Nanotubo de carbón funcionalizado con grupos carboxilo. |
| T | Antígeno T. |
| Thr | Treonina. |
| Tn | Antígeno Tn |
| Trf | Transferrina humana. |
| UDP | Uridina difosfato. |
| VC | Voltamperograma cíclico. |
| WGA | <i>Wheat-germ</i> aglutinina. |
| Xil | Xilosa. |
| X | Cualquier aminoácido excepto prolina. |
| Z | Impedancia. |

| Símbolo | Descripción |
|-----------------|--|
| F | F de Fischer. |
| $F_{calculado}$ | Valor calculado de F de Fischer. |
| $F_{critico}$ | Valor crítico de F de Fischer. |
| Ω | Ohm. |
| \bar{x} | Valor promedio. |
| χ^2 | Contraste Chi-cuadrado. |
| χ_{calc}^2 | Coefficiente calculado en el contraste Chi-cuadrado. |
| χ_{crit}^2 | Coefficiente crítico en el contraste Chi-cuadrado. |
| \hat{y} | Variable dependiente (ajustada) de la línea de calibración. |
| λ' | Cociente de suma de cuadrados. |
| b_0 | Ordenada al origen de la línea de calibración. |
| b_1 | Pendiente de la línea de calibración. |
| p | Variables. |
| r | Coefficiente de pearson. |
| r_x | Conjunto reducido de variables. |
| s_e^2 | Varianza residual, donde los subíndices corresponden a la curva de calibración. |
| s_{ep}^2 | Varianza residual combinada. |
| $t_{calculado}$ | Valor calculado de t en el análisis t de student. |
| $t_{critico}$ | Valor crítico de t de student. |
| C_b | Capacitancia del electrodo no modificado. |
| C_{dl} | Capacitancia de la doble capa. |
| C_{immun} | Capacitancia variable de la estructura biológica. |
| E | Fuerza de campo eléctrico. |
| H_0 | Hipótesis nula. |
| H_1 | Hipótesis alternativa. |
| R_s | Resistencia de la solución. |
| R_b | Resistencia del electrodo no modificado. |
| R_{ct0} | Resistencia a la transferencia electrónica del blanco. |
| R_{ct} | Resistencia a la transferencia electrónica. |
| R_{immun} | Resistencia variable de la estructura biológica. |
| SC_1 | Suma de los cuadrados de las distancias entre los objetos que pertenecen a la misma categorías. |
| SC_D | Suma de los cuadrados de las distancias entre los objetos que pertenecen a distintas categorías. |
| Z_{Im} | Vector imaginario de la impedancia. |
| Z_{Re} | Vector real de la impedancia. |
| Z_W | Impedancia de Warburg. |

| Símbolo | Descripción |
|-----------------|--|
| ΔR_{ct} | Diferencial de resistencia a la transferencia electrónica. |
| ΔZ | Diferencial de impedancia, $Z_{muestra} - Z_{blanco}$. |
| η | Viscosidad del medio. |
| a | Aceleración. |
| d | Distancia entre dos puntos en un espacio n -dimensional. |
| f_v | Fricción viscosa. |
| f | Coefficiente de fricción. |
| m | Masa. |
| n | Número de dimensiones de la matriz en PCA. |
| q | Categorías. |
| t | t student. |
| v | Velocidad de migración de cualquier molécula. |
| w | Frecuencia. |
| z | Carga neta de la proteína. |
| 4-APP | 4-aminofenol fosfato. |
| 4-AP | 4-aminofenol. |
| 4-QI | 4-quinona imina. |

1. Antecedentes

El cáncer se origina por la acumulación de alteraciones que perturban el correcto funcionamiento celular, particularmente relacionadas con procesos de proliferación, reparación génica o muerte celular. Los mecanismos de regulación de estos procesos pueden dejar pasar inadvertidos algunos errores, los cuales se pueden acumular hasta producir cambios graves en la morfología, funcionamiento y comportamiento celular que terminan afectando no sólo el tejido donde se inició la lesión, sino que ocasionan la invasión de nuevos tejidos por la pérdida de adherencia celular que da inicio a la metástasis. Cuando una célula empieza a perder las características que la identifican como parte de un tejido y aumenta su tasa de proliferación, esta se ha transformado. Esta transformación puede tomar mucho tiempo, incluso años, hasta llegar a generarse una lesión cancerosa. Sólo aquellas células transformadas que logran escapar a los mecanismos regulatorios y de vigilancia de los organismos pueden dar origen a lesiones de tipo canceroso. Son muchos los factores que pueden inducir la acumulación de alteraciones y muchos los procesos celulares que se pueden alterar. Es por ello que se dice que el cáncer es una enfermedad multifactorial, cuyo diagnóstico temprano es difícil de lograr, así como la cura cuando la enfermedad está muy avanzada.

En las últimas décadas ha surgido un gran interés tanto en el campo clínico como en el científico, por la investigación de biomarcadores de cáncer. El objetivo es generar un cambio en el diagnóstico de esta enfermedad [1]. Actualmente la detección temprana del cáncer es el factor primordial para llevar a cabo el tratamiento terapéutico lo que logra incrementar las posibilidades de vida de un paciente.

1.1. Glicosilación de proteínas

Los glicanos son uno de los componentes básicos de las células y son probablemente los más abundantes biopolímeros de la naturaleza. El total de estructuras de glicanos conforman el glicoma de un organismo, el cual se estima que puede poseer de cientos a miles de estructuras de glicanos [2].

La *glicosilación* proteica consiste en la adición de carbohidratos a proteínas mediante un enlace covalente. En este proceso se produce una gran diversidad de nuevas estructuras. Muchas de las proteínas secretadas por las células están glicosiladas, incluyendo la mayoría de las proteínas presentes en la sangre.

La glicosilación proteica abarca los *N*-glicanos, *O*-glicanos y glicosaminoglicanos. Los *N*-glicanos se encuentran enlazados al átomo de nitrógeno del residuo de asparagina (enlace *N*-) de las proteínas. El residuo asparagina puede aceptar un oligosacárido solamente si forma parte de una secuencia Asn-X-Ser/Thr (Fig.1.1), donde X denota cualquier aminoácido, excepto prolina. Los *O*-glicanos están unidos al átomo de oxígeno (enlace *O*-) de la de serina o treonina. Aunque los glicosaminoglicanos también están enlazados a serina y treonina, estos son lineales y se producen por una vía de síntesis distinta y frecuentemente son altamente sulfatados [3].

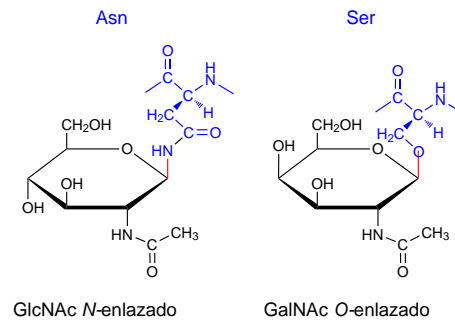


Figura 1.1: Enlaces glicosídicos entre proteínas y carbohidratos.

Los azúcares nucleótidos son la forma activada de los monosacáridos. Estos actúan como donadores glicosílicos en las reacciones de glicosilación. Estas reacciones son catalizadas por un grupo de enzimas llamadas *glicosiltransferasas*. Es decir, las glicosiltransferasas transfieren un grupo glicosil de un azúcar nucleótido a un aceptor. Existen nueve azúcares nucleótidos en los organismos complejos, los cuales actúan como donadores y pueden ser clasificados dependiendo del tipo de nucleosido que forman, como se puede ver a continuación:

- Uridina Difosfato (UDP): UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc, UDP-GlcUA, UDP-Xil
- Difosfato de Guanina (GDP): GDP-Man, GDP-Fuc
- Monofosfato de Citosina (CMP): CMP-Neu5Ac

Algunos sacáridos aceptores son: fucosa (Fuc), galactosa (Gal), Glucosa (Glc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), manosa (Man), ácido siálico (Neu5Ac), xilosa (Xil) y *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) [2]. Algunos aminoácidos aceptores son: serina (Ser), treonina (Thr) y asparagina (Asn).

Los glicanos son construidos en un orden secuencial involucrando tanto glicosiltransferasas como enzimas glicosidasas. Las glicosiltransferasas sintetizan cadenas de glicanos mientras las glicosidasas hidrolizan algunos enlaces específicos.

1.1.1. *N*-glicosilación

El proceso de la *N*-glicosilación empieza en el retículo endoplásmico rugoso y continua en el complejo de Golgi. En los oligosacáridos de los *N*-glicanos (Fig.1.2) se establece una unión de tipo *N*-glicosídico entre el carbohidrato GlcNAc y el grupo amino del aminoácido Asn de la proteína. Los *N*-glicanos se clasifican en grupos:

- a) los de alto *contenido de manosa* en la parte externa de su estructura, además de GlcNAc en la parte interna.
- b) los *complejos* que pueden contener además de los azúcares anteriores, Neu5Ac, Gal, GlcNAc y Fuc [4].

La característica principal de los oligosacáridos *N*-enlazados es que tienen en común un pentasacárido nuclear o central formado por tres manosas y dos *N*-acetilglucosaminas (Fig.1.2).

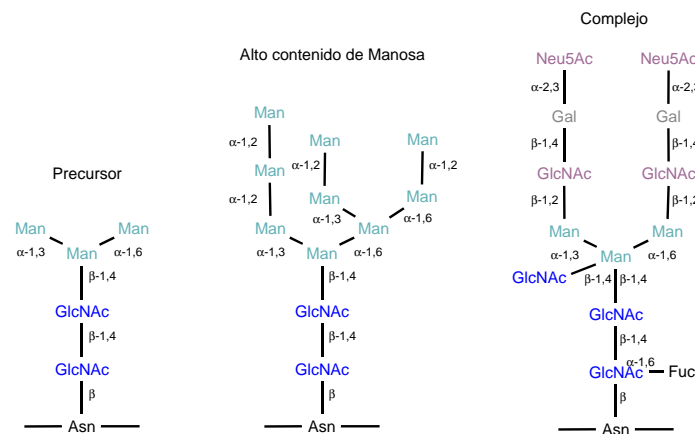


Figura 1.2: Estructura de los *N*-oligosacáridos presentes en las glicoproteínas.

1.1.2. O-glicosilación

La *O*-glicosilación tiene lugar únicamente en el complejo de Golgi, de forma concreta con una *N*-acetil galactosaminiltransferasa que transfiere un residuo de *N*-acetilgalactosamina a la cadena polipeptídica en los residuos serina o treonina. Posteriormente se produce la elongación enzimática mediante transferasas específicas que llevará a la formación de diferentes estructuras definidas, los núcleos. Estas estructuras son modificadas por la adición de otros grupos, entre ellos el ácido siálico (Fig.1.3).

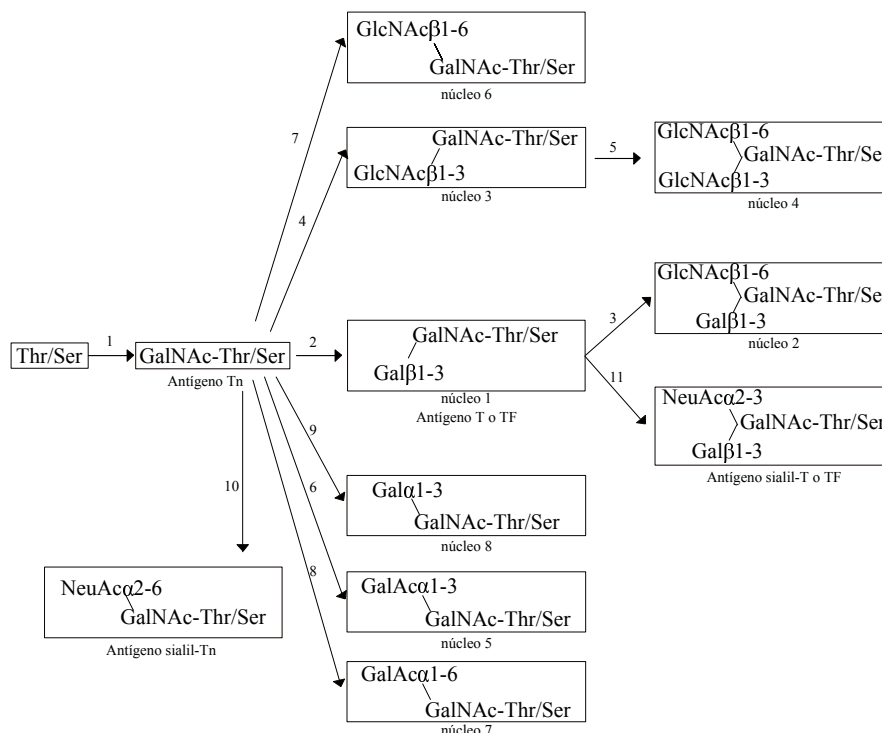


Figura 1.3: Biosíntesis de los núcleos de los *O*-glicanos.

Las estructuras de los *O*-glicanos presentan mayor variedad que los *N*-glicanos. Hasta el momento se han descrito ocho diferentes núcleos de los cuales se derivan el resto de estructuras oligosacarídicas presentes en las glicoproteínas [5]. Dentro de los *O*-glicanos se encuentra un grupo que comienza con GalNAc, los oligosacáridos tipo mucina. A diferencia de la *N*-glicosilación, la *O*-glicosilación no comienza con la transferencia de un oligosacárido, sino con la adición de un único monosacárido, que en este caso es la GalNAc, transferida por una UDP-GalNAc dentro de la cadena polipeptídica en un hidroxilo de los residuos Ser o Thr. La elongación de la GalNAc genera ocho estructuras indicadas en la Figura 1.3. Una mayor elongación y modificación se puede producir en los núcleos. Si esta elongación no se produce se genera el

antígeno Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr) que puede ser modificado por un grupo de ácido siálico unido por un enlace α 2-6 generando el antígeno sialil-Tn (STn).

1.2. Alteraciones de la glicosilación en cáncer

El desarrollo y la función del sistema inmunitario de los organismos es modulado en gran parte por el glicoma. Por ejemplo, el glicoma es alterado durante la diferenciación celular, activación y apoptosis, y estas alteraciones afectan la homeostasis, dando lugar a diversas enfermedades. Los estudios en inmunología y glicobiología pueden proporcionar nuevos conocimientos sobre el diagnóstico, pronóstico y estrategias terapéuticas para los trastornos relacionados con el sistema inmunológico.

Las alteraciones de los receptores de la superficie celular a través de la modificación de la estructura de los oligosacáridos es frecuentemente asociada a transformaciones malignas. En la actualidad existen más de 100 marcadores tumorales entre los cuales se encuentran principalmente glicoproteínas y glicolípidos. En el ambiente tumoral, los cambios en la glicosilación permiten que las células neoplásicas inicien la metástasis, por modulación de la activación de receptores, adhesión celular y motilidad. Las células tumorales tienden a producir niveles mayores de glicoconjugados que contienen ácido siálico, que se asocia con el aumento del potencial invasor de las células tumorales y por lo tanto se traduce en un pronóstico desfavorable. Por ejemplo la hipersialilación de integrinas β 1 en adenocarcinomas de colon y ovarios han mostrado conducir a una mayor metástasis. La fucosilación es considerada como otra modificación post-traduccional importante y se han observado otros incrementos dramáticos en tumores tales como el de hígado, pulmón y estómago. Los marcadores mejor conocidos para carcinoma hepatocelular y cáncer de pulmón son la α -fetoproteína fucosilada y el núcleo fucosilado E-caderina, respectivamente [1].

Varias alteraciones de *N*- y *O*-glicosilación producto de cambios neoplásicos ofrecen un excelente potencial como marcadores tumorales. Un cambio importante ocurre en la etapa de elongación de los *O*-glicanos. Esto ocasiona que algunos tipos de núcleos, que en las células normales se encuentran enmascarados por la adición de otros azúcares, queden expuestos en la superficie celular, resultando en la formación de nuevos antígenos asociados al cáncer (Fig.1.3).

Los *O*-glicanos asociados a cáncer en comparación con los *O*-glicanos de las células normales se pueden encontrar altamente sialilados y menos sulfatados [6], frecuentemente se encuentran truncados y comúnmente contienen el antígeno Tn (GalNAc-) y T (Gal β 1-3GalNAc-) así como sus versiones sialiladas (Tabla 1.1) [7]. Los antígenos

T y Tn pueden desencadenar una respuesta inmune y han sido analizados para el desarrollo de vacunas contra cáncer [8]. Los antígenos mejor caracterizados en cáncer de mama son los antígenos Tn, STn, T o TF y ST [7]. Dentro de los antígenos mencionados en distintos trabajos de investigación, uno de los más reconocidos es el antígeno STn, que se ha reportado en tumores de cáncer de mama, gástrico, colon, páncreas, próstata, pulmón y ovarios [9].

Tabla 1.1: O-glicanos y alteraciones en cáncer.

| | | Alteración en cáncer |
|---------------------------|--|----------------------|
| Antígeno Tn | GalNAc-Ser/Thr | ↑ |
| Antígeno STn | Sialil α 2-6GalNAc α -Ser/Thr | ↑ |
| Núcleo 1, antígeno T | Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr | ↑ |
| Antígenos sialil-T | Sialil α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr | ↑↑ |
| | Sialil α 2-6Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr | |
| Núcleo 2 | GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α -Ser/Thr | ↑↓ |
| Núcleo 3 | GlcNAc β 1-3GalNAc α -Ser/Thr | ↓ |
| Núcleo 4 | GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α -Ser/Thr | ↓ |
| Cadena tipo 1 | [GlcNAc β 1-3Gal β 1-3] _n | ↓ |
| Cadena tipo 2 | [GlcNAc β 1-3Gal β 1-4] _n | ↑ |
| | poli-N-acetilactosaminas | |
| Sialil-Lewis ^a | Sialil α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal- | ↑ |
| SLe ^x | Sialil α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal- | ↑ |
| Sialil-dimerico | Sialil α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3 | ↑ |
| Lewis ^x | Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3 | |

El símbolo ↑ denota un incremento en cáncer, mientras el símbolo ↓ denota una disminución en cáncer

1.3. Biomarcadores

Los biomarcadores son elementos biológicos correlacionados con un proceso patológico, es decir, indican alteraciones tanto cualitativas como cuantitativas y pueden ser detectados mediante algún ensayo específico [10].

La naturaleza de un biomarcador es diversa, por ejemplo, puede tratarse de DNA, RNA, enzimas, hormonas, proteínas, entre otros. Los biomarcadores pueden ser detectados en tejidos, plasma sanguíneo, saliva, orina y otros fluidos corporales [11]. En base a su utilidad, los biomarcadores se pueden dividir en las siguientes categorías [12]:

- De detección temprana, si se utiliza en pacientes para el diagnóstico temprano.
- Diagnóstico, si se utiliza para evaluar la presencia o ausencia de enfermedad.

- Pronóstico, si se utiliza para evaluar las probabilidades de supervivencia de los pacientes o para detectar el grado de agresividad y determinar la forma en la que la enfermedad se comportará.
- Predictivo, si se utiliza para predecir si el fármaco y otras terapias resultarán eficaces, o para monitorizar la eficacia del tratamiento.
- Objetivo, si se utiliza para identificar las moléculas blanco de nuevas terapias y que marcadores moleculares fueron afectados por la terapia.

1.4. Biomarcadores de cáncer

El gran interés en el desarrollo de biomarcadores para oncología es impulsado en parte por la presencia de condiciones precancerosas y la frecuente ausencia de alteraciones físicas previas a la aparición de tumores malignos. Se sabe que un diagnóstico precoz del cáncer es el factor más importante en el resultado terapéutico y que el desarrollo de biomarcadores validados es importante para el diagnóstico temprano, así como para la vigilancia de los pacientes con diferentes neoplasias, ya que los niveles séricos de los biomarcadores se modifican de acuerdo al curso clínico de la enfermedad.

Los marcadores tumorales séricos son aquellos detectados en sangre periférica de pacientes con cáncer y representan un recurso ideal para la detección de células tumorales debido a la facilidad de acceso al material biológico para el análisis de la muestra.

Aún cuando la rutina de diagnóstico de cáncer está basada principalmente en ensayos microscópicos de células y tejidos con alteraciones morfológicas, un grupo de biomarcadores han sido aceptados ampliamente por la comunidad clínica para la detección de cáncer. Dentro de estos marcadores podemos incluir como ejemplos a la α -fetoproteína, antígenos de cáncer 27.90, 15.3, 19.9 o 125, antígeno carcinoembrionario, antígeno T/Tn, antígeno prostático específico, virus del papiloma humano y telomerasa. A continuación se describen algunos de los biomarcadores mencionados.

- CA 27.29. Este marcador del tipo sialomucina está altamente asociado con el cáncer mamario, aunque también se encuentra presente en pacientes con trastornos de hígado, riñón y en mujeres con quistes ováricos. Los valores mayores a 100 U ml^{-1} son raros en condiciones benignas [13]. El nivel de CA 27.29 se eleva en aproximadamente un tercio de las mujeres con cáncer en fase inicial y en dos tercios de las mujeres en las últimas etapas de la enfermedad [14].
- Antígeno Carcinoembrionario (CEA). Es una glicoproteína producida durante el desarrollo fetal. En adultos sanos no se encuentran valores sanguíneos elevados.

El CEA se puede encontrar elevado en la sangre de personas fumadoras, o en algunos tipos de cánceres, especialmente en el cáncer colorrectal [15]. Existe elevación del CEA en cáncer pulmonar, adenocarcinoma de endometrio, carcinoma gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de mama y ovario [16].

- CA 19.9. También conocido como antígeno sialilado de Lewis (a), ha sido detectado en pacientes con cáncer de colon, páncreas y de tracto biliar. Este marcador es una glicoproteína producida por las células tumorales y liberada a la circulación sanguínea, en donde su concentración se modifica de acuerdo a la evolución de la enfermedad. También se puede detectar un incremento de CA 19.9 en otras enfermedades como cirrosis y pancreatitis, sin embargo los niveles se encuentran usualmente por debajo de 1000 U ml^{-1} [17].
- α -fetoproteína (AFP). Es la proteína más abundante del suero fetal, pero disminuye a niveles indetectables después del nacimiento. Cuando aparece en adultos puede servir como un marcador tumoral del carcinoma hepatocelular, además de otros como el cáncer gástrico, biliar y pancreático. Los niveles de AFP son anormales en el 80 % de los pacientes con carcinoma hepatocelular y excede de 1000 ng ml^{-1} en el 40 % de los pacientes con este tipo de cáncer [18].
- CA 125. Es una glicoproteína normalmente expresada durante el desarrollo fetal. Los valores elevados son frecuentemente asociados a cáncer de ovarios, aunque también puede encontrarse un incremento en otras enfermedades [19].

La modificación de la glicosilación celular es una alteración común observada en cáncer y la expresión de estructuras de carbohidratos sialilados en células de carcinoma han sido ampliamente reportadas. El antígeno STn es un antígeno simple tipo mucina que ha atraído especial atención [20]. Una de las razones es que el antígeno STn es raramente observado en tejidos normales, pero en cambio es altamente expresado en carcinoma gástrico [21], colorrectal [22], de ovarios [23], de mama [24] y pancreático [25].

1.5. Métodos de determinación de biomarcadores

Existe una necesidad urgente para el desarrollo de tecnologías que faciliten y aceleren la detección de los biomarcadores identificados con potencial de diagnóstico y terapéutico. Estas técnicas requieren de un elevado nivel de sensibilidad debido a las bajas concentraciones en que pueden ser encontrados los biomarcadores en los distintos fluidos biológicos, como son: suero/plasma, orina y saliva [11].

1.5.1. Técnicas de separación de proteínas glicosiladas

Una gran cantidad de proteínas glicosiladas pueden ser utilizadas como biomarcadores de distintos procesos patogénicos. Sin embargo, el primer paso para poder estudiar una proteína es su purificación. Estas se pueden separar en base a su solubilidad, tamaño, carga y afinidad específica de unión [26].

De acuerdo con lo anterior existen algunas técnicas de separación de proteínas como son:

- *Precipitación salina.* Basada en el hecho de que las proteínas son menos solubles en concentraciones elevadas de sal. Por ejemplo, el sulfato amónico 0.8 M precipita el fibrinógeno, proteína de la coagulación sanguínea, mientras que se necesita una concentración 2.4 M para precipitar la albúmina del suero. La precipitación salina además es útil para concentrar disoluciones diluidas de proteínas. Para eliminar la sal, cuando sea necesario se puede utilizar la diálisis.
- *Diálisis.* Las proteínas se pueden separar mediante diálisis a través de una membrana semipermeable.
- *Cromatografía de filtración en gel.* Mediante esta técnica se pueden conseguir separaciones discriminatorias, basadas en el tamaño. Esta técnica también se conoce como cromatografía de exclusión molecular.
- *Cromatografía de intercambio iónico.* Las proteínas se pueden separar en base a su carga neta.
- *Cromatografía de afinidad.* Esta técnica se aprovecha de la alta afinidad de muchas proteínas por grupos químicos específicos. Por ejemplo, la proteína vegetal concanavalina A se puede purificar pasando un extracto crudo a través de una columna de esferas que contienen residuos de glucosa unidos covalentemente. La concanavalina A se une a esta columna debido a su afinidad por la glucosa, que no tienen otras proteínas. La concanavalina A unida se libera posteriormente de la columna si se añade una disolución concentrada de glucosa. La glucosa en disolución desplaza a la concanavalina A de los centros de unión de los residuos de glucosa fijados en la columna.
En general, la cromatografía de afinidad se puede utilizar de modo efectivo en el aislamiento de una proteína que reconoce a determinados grupos A por (1) la unión covalente de A o un derivado suyo a una columna, (2) adición de una mezcla de proteínas a esta columna, que luego se lava con amortiguador para eliminar las proteínas no unidas, y (3) elución de la proteína deseada añadiendo

una concentración elevada de una forma soluble de A o cambio de las condiciones para alterar la afinidad de la unión. La cromatografía de afinidad es más efectiva cuando la interacción de la proteína y la molécula que se usa como ligando es muy específica.

- *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*. Es una versión mejorada de las técnicas de columna. Los materiales propios de las columnas están mucho más finamente divididos y como consecuencia hay más centros de interacción y, por lo tanto, mayor poder de resolución. Dado que la columna se construye de material más fino, se debe aplicar presión para obtener las velocidades de flujo adecuadas. El resultado neto es una elevada resolución y una separación rápida.
- *Electroforesis en gel*. En esta técnica una molécula con carga eléctrica neta se desplazará en un campo eléctrico. Este fenómeno ofrece un procedimiento potente para separar proteínas y otra macromoléculas. La velocidad de migración (v) de una proteína (o cualquier otra molécula) en un campo eléctrico depende de la fuerza de ese campo eléctrico (E), la carga neta de la proteína (z), y el coeficiente de fricción (f).

$$v = Ez/f$$

La fuerza eléctrica Ez que arrastra a la molécula cargada hacia el electrodo de carga opuesta, sufre la resistencia f_v , debida a la fricción viscosa entre la molécula que se desplaza y el medio en el que lo hace. El coeficiente de fricción f depende tanto de la masa como de la forma de la molécula que migra y de la viscosidad del medio (η). Para una esfera de radio r .

$$f = 6\pi\eta r$$

Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre sobre geles (o sobre soportes sólidos como el papel) porque el gel sirve como un tamiz molecular que potencia la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros del gel se desplazan fácilmente a través de él, mientras que las moléculas mucho mayores que los poros permanecen casi inmóviles. Las moléculas de tamaño intermedio se desplazan a través del gel con diversos grados de dificultad. Las proteínas se pueden separar de acuerdo con sus masas moleculares. Las proteínas pequeñas se desplazan rápidamente a través del gel, mientras que las grandes se quedan arriba, junto al lugar de aplicación de la mezcla. El desplazamiento en estas condiciones es linealmente proporcional al logaritmo de su masa. Sin embargo, algunas proteínas ricas en carbohidratos no cumplen esta relación empírica.

1.5.2. Detección de proteínas por transferencia Western

Pequeñas cantidades de una proteína particular en una célula o un líquido corporal se pueden detectar por una técnica de inmunoensayos conocida como transferencia Western (del inglés, Western blotting). Se somete la muestra a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida. Las proteínas separadas en el gel se transfieren a la superficie de una membrana de polímero para hacerlas más accesibles a la reacción. Se añade a la membrana un anticuerpo que sea específico para la proteína de interés y éste reacciona con su antígeno. El complejo antígeno-anticuerpo en la membrana se puede detectar con un segundo anticuerpo específico para el primero [26].

1.5.3. Caracterización de proteínas por espectrometría de masas

Las medidas de masa se realizan determinando con que facilidad se acelera un ión al aplicarle un campo eléctrico. Se aplica la tercera ley de Newton $F = ma$, donde F es la fuerza, m es la masa y a la aceleración. Esta técnica se utiliza para analizar formas ionizadas de moléculas en fase gaseosa, dado que los péptidos y las proteínas no son volátiles. Para resolver el problema se han desarrollado dos métodos, MALDI (matrix-assisted laser desorption-ionization) y ESI (electrospray ionization). La diferencia entre estos métodos consiste en la forma en la cual se generan los iones. La técnica de SELDI-TOF-MS (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) utiliza láser de superficie y espectrometría de masas para analizar mezclas complejas de proteínas. Es un método de detección de proteínas rápido, reproducible y fiable. En medicina se utiliza para medir niveles de proteínas en muestras de tejidos, sangre, orina, entre otros. Se aplica en el diagnóstico precoz del cáncer.

La técnica de MALDI ha sido comúnmente utilizada para determinar estructuras de glicoproteínas y carbohidratos. Por ejemplo, las glicofomas de pequeñas glicoproteínas con un sitio único o limitado número de sitios de glicosilación puede ser analizado por espectroscopía de masas MALDI. Para analizar proteínas más grandes que presentan complejas modificaciones por carbohidratos mediante MALDI, las proteínas deben ser fragmentadas en especies más pequeñas por digestión enzimática y los glicanos tienen que ser tratados con glicosidasas para remover las modificaciones por carbohidratos de las proteínas. La medición del peso molecular de la proteína antes y después de la remoción del glicano unido puede proporcionar información acerca de la modificación [27].

1.5.4. Biosensores

Los biosensores son dispositivos que utilizan mecanismos o principios biológicos para el reconocimiento de especies particulares. En la naturaleza existe un amplio conjunto de biomoléculas o estructuras biomoleculares capaces de reconocer de forma específica alguna propiedad particular de una determinada molécula de entre una mezcla de ellas. El uso de biosensores en el diagnóstico de cáncer e incluso en su tratamiento tiene un enorme potencial. Los biosensores pueden ser diseñados para detectar biomarcadores de cáncer de manera rápida, así como para determinar la eficacia de un tratamiento.

En un biosensor el sistema de reconocimiento biológico debe inmovilizarse o retenerse sobre la superficie de un dispositivo, el *transductor*, que permite convertir la velocidad de la reacción bioquímica que se produce en el proceso de reconocimiento biológico en una respuesta medible, que usualmente es una señal eléctrica que posteriormente es amplificada, procesada y convertida a la forma deseada. En la Figura 1.4 se muestra la configuración generalizada de un biosensor [28].

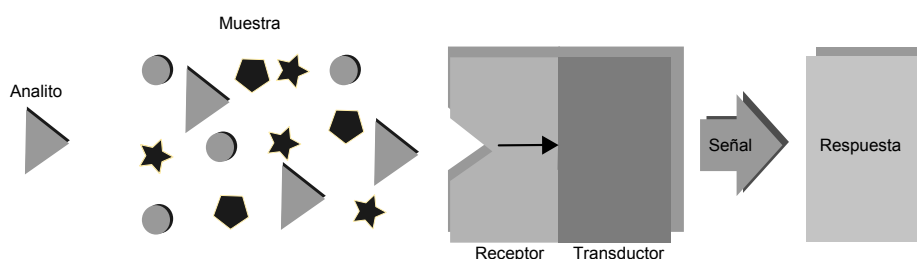


Figura 1.4: Esquema generalizado de un biosensor.

Los biosensores se pueden clasificar atendiendo a las siguientes variables:

- Tipo de interacción: biosensores catalíticos (los receptores pueden ser enzimas, tejidos o microorganismos), biosensores de afinidad (inmunosensores y sensores basados en quimiorreceptores).
- Fundamento del transductor: electroquímico, óptico, termoelectrónico, entre otros.

El buen funcionamiento de un biosensor depende, en gran medida, de la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico sobre el transductor. El objetivo fundamental es permitir un íntimo contacto entre el biorreceptor y el transductor manteniendo inalterable en lo posible la estabilidad de dicho sistema de reconocimiento. Los métodos de inmovilización comprenden *métodos físicos*, fundamentalmente por

adsorción o por *atrapamiento*, y métodos *químicos*, ya sea mediante *entrecruzamiento* o por *unión covalente*. En este último se implican los grupos funcionales de la biomolécula que no sean esenciales para su actividad biológica. Por ejemplo, en una proteína los lugares que pueden reaccionar químicamente son los grupos amino, residuos fenólicos de la tirosina, grupos carboxílicos o el grupo imidazol de la histidina.

1.5.4.1. Técnicas electroquímicas de detección en biosensores

El objetivo del desarrollo de un biosensor es la determinación de un analito de carácter biológico o la utilización de un elemento de reconocimiento biológico. Una vez inmovilizado el elemento de reconocimiento por alguno de los métodos antes mencionados se requiere de un medio de detección para determinar la presencia e incluso cuantificar al analito presente en una muestra. Las técnicas electroquímicas son frecuentemente usadas en la tecnología referente a los biosensores, esto debido a las ventajas que representan como son, la alta sensibilidad de los transductores analíticos, su compatibilidad con las tecnologías modernas de miniaturización/microfabricación, requerimientos mínimos de energía, costo económico y la independencia de la turbidez o color de la muestra. En inmunoensayos e inmunosensores, la mayoría de antígenos y anticuerpos son incapaces de actuar como un par redox, entonces una etiqueta es conjugada a un componente particular de el inmunocomplejo para promover una reacción electroquímica. La señal electroquímica producida es entonces usada para relacionar cuantitativamente la cantidad de analito presente en una muestra. La potenciometría, amperometría, voltamperometría y más recientemente espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se encuentran entre las técnicas de detección frecuentemente usadas en conjunción con sistemas de inmunoensayos e inmunosensores [29]. Los biosensores electroquímicos incluyen:

- ***Biosensores potenciométricos***

Los biosensores potenciométricos utilizan electrodos selectivos a iones para detectar la respuesta en el elemento de reconocimiento molecular. Estos biosensores generalmente se basan en el uso de enzimas, que generan productos de reacción que pueden ser detectados con este tipo de electrodos; es decir: H^+ , NH_4^+ , NH_3 , CO_2 , CN^- , etc. Los transductores potenciométricos más utilizados son los basados en membranas selectivas de iones, en las que, cuando se ponen en contacto con la disolución del analito, se produce una alteración de la densidad de carga en la interfase y por consiguiente un cambio en el potencial de membrana que es la magnitud medida. La actividad del ion está relacionada logarítmicamente con el potencial de membrana con la ecuación de Nernst.

■ *Biosensores amperométricos*

En amperometría, la corriente producida por la oxidación o reducción de un analito electroactivo en la superficie de un electrodo es monitoreada en condiciones de potencial controlado. Sin embargo, los sistemas biológicos no presentan condiciones de electroactividad, es por ello que se recurre a introducir algún elemento al sistema biológico para promover una reacción electroquímica en el biosensor. Respecto a esto, se pueden mencionar las enzimas oxidorreductasa, peroxidasa de rábano (HRP) y la enzima hidrolítica fosfatasa alcalina (AP) que son de uso frecuente debido a su capacidad de generar algún producto electroactivo después de la conversión catalítica de un sustrato. La magnitud de la corriente resultante de la reacción redox del producto puede ser cuantitativamente relacionada a la cantidad de analito presente. Un ejemplo de la generación de este tipo de señal puede ser ilustrado por la reacción enzimática de AP en su sustrato 4-aminofenil fosfato (4-APP) para producir 4-aminofenol (4-AP) como se muestra en la figura (1.5). Esta es seguida por la oxidación de 4-AP a 4-quinona imina (4-QI) para producir una corriente faradaica que es proporcional a la cantidad de analito.

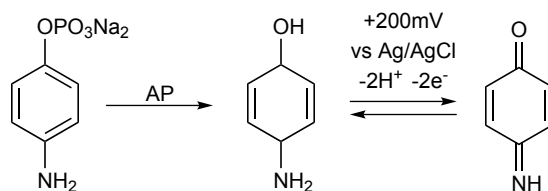


Figura 1.5: Reacción enzimática de AP para la producción de 4-AP.

■ *Biosensores impedimétricos*

De manera general se puede decir que el primer paso para la formación de un biosensor consiste en la inmovilización de un elemento de reconocimiento afin a cierto analito, ambos de carácter biológico. Una vez realizado el reconocimiento específico del analito de interés por medio de la especie inmovilizada, habrá cambios en la carga interfacial, capacitancia, resistencia, masa y espesor de la superficie del biosensor. Es por ello que existe un creciente interés en explotar las técnicas analíticas que siguen tales cambios interfaciales, un ejemplo es el uso de la EIS (ver Apéndice A).

1.5.4.2. Biosensores electroquímicos para la detección de cáncer

En años recientes, varios grupos de investigadores han realizado estudios para la detección de cáncer mediante el uso de biomarcadores y sensores electroquímicos. Yunfang Jia *et al.* reportaron el diseño de un sensor potenciométrico fago-LAPS

(light-addressable potentiometric sensor) para la detección de marcadores y células de cáncer. Los bacteriófagos fueron inmovilizados covalentemente sobre superficies de Si_3N_4 . El fago-LAPS fue utilizado para detectar fosfatasa humana (hPRL-3) en concentraciones de 0.04-400 nM, y las células de adenocarcinoma mamario (MDAMB231) en concentraciones de 0- 10^5 células ml^{-1} . Las máximas señales que encontraron fueron cercanas a 10 y 60 μV respectivamente, con lo cual demostraron que el sistema tendría mejor aplicación para la detección de células asociadas a cáncer, que para la identificación de biomarcadores de cáncer [30]. Jing Zhao *et al.* trabajaron con un biosensor amperométrico para la detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) extracelular en un ensayo en el cual promueven la liberación de H_2O_2 de células de cáncer de mama (MCF-7) con el uso de PMA (acetato de forbol miristato). Para ello caracterizaron un biosensor en el cual inmovilizaron HRP mediante una secuencia de péptidos. Esto favorece la actividad catalítica de la enzima inmovilizada hacia la reacción de o-fenilendiamina (o-PD) y H_2O_2 . Este grupo de investigadores utilizó tres técnicas, EIS, voltametría cíclica (CV) y cronoamperometría. La EIS fue utilizada para caracterizar la modificación de la superficie de oro, esto por los cambios de resistencia electrónica interfacial ocasionado por el impedimento estérico de las especies inmovilizadas. Este impedimento estérico reduce las posibilidades del acercamiento de las especies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a la superficie del electrodo de oro. La evaluación de la actividad catalítica de la HRP mediante el uso de o-PD como mediador fue realizada con CV y finalmente la cuantificación de H_2O_2 fue realizada mediante cronoamperometría. Con su biosensor lograron un intervalo lineal de detección de $1.0 \times 10^{-7}\text{M}$ a $1.0 \times 10^{-4}\text{M}$ con un límite de detección de $3 \times 10^{-8}\text{M}$ [31].

En los últimos años, varios grupos han basado sus estudios en EIS para el análisis de biosensores. Como un ejemplo se puede mencionar que Haiying *et al.* reportaron un biosensor para la detección y discriminación de α -fetoproteína en suero sanguíneo. El biosensor fue fabricado mediante la adsorción de nanotubos de carbono funcionalizados con grupos carboxilo (SWNTs) sobre un electrodo de carbón serigrafiado (SPCE). Sobre el electrodo modificado realizaron la inmovilización de varias lectinas, WGA (wheat-germ agglutinin), LCA (*Lens culinaris* agglutinin), Con A (concanavalin A), SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) y DSA (*Datura stramonium* agglutinin). Mediante EIS observaron los incrementos en la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct} en cada etapa de la modificación del biosensor) para lo cual utilizaron un par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Reportaron un incremento lineal en R_{ct} con respecto al logaritmo de la concentración de α -fetoproteína en un intervalo de 1 a 100 ng l^{-1} con un límite de detección de 0.1 ng l^{-1} . El biosensor fue utilizado en el análisis de suero sanguíneo de personas sanas y personas diagnosticadas con cáncer de hígado, para lo cual realizaron diluciones 1:100 (V/V) suero:tampón de fosfatos 10 mM. De acuerdo a los resultados publicados se obtienen diferencias importantes en R_{ct} entre las mues-

tras negativas y positivas en los biosensores modificados con SNA y LCA [32]. Tin *et al.* desarrollaron un inmunosensor impedimétrico para la detección de un antígeno asociado a algunos tipos de carcinoma, la interleucina-6. El biosensor se construyó mediante la deposición electroquímica de nanopartículas de oro sobre nanotubos de carbón que fueron preparados en un sustrato de SiO₂/Si. El inmunosensor fue caracterizado mediante SEM (Scanning Electron Microscopy) y el reconocimiento del antígeno fue determinado mediante los cambios en R_{ct} del inmunosensor en las distintas etapas de preparación. Este mostró una respuesta lineal de R_{ct} en un intervalo de concentraciones de 0.01 a 100 fg ml⁻¹ [33].

1.6. Interacción lectina-glicoproteína

La multitud de estructuras de oligosacáridos presentes en los glicoconjugados de la superficie celular, en su conjunto, proporcionan un perfil de glicosilación característico que puede ser determinado mediante el uso de lectinas.

Las lectinas son proteínas que reconocen y se unen específicamente a la estructura de los carbohidratos sin modificarlos; han sido identificadas en microorganismos, animales y plantas. Estas estructuras proporcionan modelos para el estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. Así mismo son herramientas para el análisis de carbohidratos, ya sea de forma libre o unidos a lípidos o proteínas [34]. También resultan útiles para la identificación de alteraciones en los patrones de glicosilación ante modificaciones del medio ambiente extracelular o durante la transformación neoplásica.

La función principal de las lectinas es facilitar el contacto intercelular. Cada lectina contiene normalmente dos o más sitios de unión para los carbohidratos. Los sitios de unión de lectinas situadas en la superficie de una célula interactúan con un conjunto de carbohidratos desplegados sobre la superficie de otra célula. Los carbohidratos interactúan con las lectinas a través de enlaces de hidrógeno, coordinación metálica, fuerzas de Van der Waals e interacción hidrofóbica. Los enlaces de hidrógeno son comunes en estructuras de sacáridos debido a la presencia de grupos hidroxilo, amina, y carboxilo [35]. Las interacciones entre lectinas y carbohidratos aseguran la especificidad, pero también permiten la separación cuando resulta necesario.

Las lectinas pueden clasificarse sobre la base de sus secuencias de aminoácidos y sus propiedades bioquímicas. Una clase numerosa es la de tipo C (C por requerir calcio) encontrada en animales. Esas lectinas tienen en común un dominio homólogo de 120 aminoácidos responsable de su unión a los carbohidratos. Las proteínas lla-

Las *selectinas* se unen a las células del sistema inmune en los sitios de lesión en la respuesta inflamatoria. Las formas L, E y P de las selectinas se unen de forma específica a los carbohidratos de los vasos de los nódulos linfáticos, endotelio o plaquetas sanguíneas activadas, respectivamente. Del conocimiento más profundo de cómo las selectinas se unen y distinguen a los diferentes carbohidratos pueden surgir nuevos agentes terapéuticos para controlar la inflamación. Las plantas también son ricas en lectinas. Aunque el papel exacto de las lectinas en las plantas no está claro, se cree que pueden servir como insecticidas potentes. Las bacterias también contienen lectinas, por ejemplo, la *Escherichia coli* que es capaz de adherirse a las células epiteliales del tubo digestivo ya que las lectinas de su superficie reconocen las unidades de oligosacárido de la superficie de las células intestinales. Algunos virus consiguen entrar en las células específicas porque se adhieren a los carbohidratos de la superficie celular. Así por ejemplo, el virus de la gripe reconoce a los residuos de ácido siálico presentes en las glicoproteínas de las superficies celulares. La proteína vírica que se une a esos azúcares se denomina *hemaglutinina*. Después de que han tenido lugar estas interacciones y el virus se ha introducido en la célula, otra proteína vírica, la neuraminidasa (sialidasa), rompe los enlaces glicosídicos con los residuos de ácido siálico, liberando al virus para que infecte a la célula. Los inhibidores de esta enzima son importantes agentes antigripales [26].

Debido a la alta especificidad de las lectinas, estas han sido exploradas como biorreceptores para aplicaciones en biosensores en el análisis de carbohidratos y proteínas. Algunos biosensores basados en el uso de lectinas han sido desarrollados para el diagnóstico de cáncer, así como para la detección de infecciones bacterianas y virales [35]. Oliveira *et al.* diseñaron un biosensor sobre un electrodo de oro, cuya superficie fue modificada con la lectina Con A. Mediante las técnicas de voltametría y EIS analizaron el suero de pacientes con fiebre por dengue, fiebre hemorrágica por dengue y de personas sanas. La EIS mostró un incremento claro en la R_{ct} cuando el biosensor fue expuesto al suero de personas infectadas, respecto de cuando fue incubado con el suero de personas sanas [36]. En la Tabla 1.2 se muestra la afinidad de algunas lectinas hacia determinadas estructuras de carbohidratos. Esto corresponde a los resultados de un análisis de determinación de perfil de glicosilación de los glicoconjugados de la línea celular A427 de adenocarcinoma pulmonar humano [37].

Otro ejemplo de la aplicación de lectinas es para la detección de ácido siálico con enlaces $\alpha 2,6-$ y $\alpha 2,3-$, la lectina de sauco, *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) y dos lectinas de leguminosa *Maackia amurensis* leukoagglutinin (MAL) y *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) han sido utilizadas respectivamente y de manera importante para tal propósito [38].

Tabla 1.2: Afinidad de lectina-estructura de carbohidratos.

| Lectina | Abreviatura | Elemento detectado |
|---|-------------|---|
| <i>Canavalia ensiformis</i> lectin (Concanavalin A) | Con A | N-glicanos Manosa |
| <i>Lens culinaris</i> Agglutinin | LCA | N-glicanos Fucosa con manosa |
| <i>Maackia amurensis</i> Agglutinin | MAA | Ácido siálico |
| <i>Limulus polyphemus</i> Agglutinin | LPA | Ácido siálico |
| <i>Sambucus nigra</i> Agglutinin | SNA | Sialil Tn Ácido siálico |
| <i>Wheat-germ</i> Agglutinin | WGA | Poli-lactosamina Ácido siálico |
| <i>Amaranthus leucocarpus</i> Lectin | ALL | O-glicanos Antígeno T Antígeno Tn |
| <i>Arachis hypogaea</i> Agglutinin (Peanut Agglutinin) | PNA | O-glicanos Antígeno T |
| <i>Agaricus bisporus</i> Agglutinin | ABA | O-glicanos Antígeno T |

1.7. Análisis multivariante

Los métodos modernos de análisis facilitan el desarrollo de investigaciones de muestras de gran complejidad, en donde el conjunto de datos obtenidos puede ser de una gran magnitud. Por ejemplo, en química clínica es una tarea cotidiana la determinación de muchos analitos en cada muestra de sangre, orina, etc. Los métodos espectroscópicos y cromatográficos pueden proporcionar datos analíticos sobre muchos componentes de una única muestra. Situaciones como estas, en que se miden varias variables para cada muestra, proporcionan *datos multivariantes*. En Química Analítica estos datos se emplean, entre otras cosas, para la discriminación [39]. Por ejemplo para determinar si una muestra dada procede de una fuente concreta o para la clasificación de muestras en grupos de acuerdo a sus características. En algunos casos, sería posible comparar muestras considerando una variable por vez, pero los métodos estadísticos y software moderno permiten métodos de procesado más sofisticados en los que todas las variables se consideran simultáneamente.

El campo de análisis multivariante consiste en aquellas técnicas estadísticas que consideran dos o más variables aleatorias relacionadas como una entidad única, e intenta producir un resultado global que tenga en cuenta la relación entre las variables [40].

1.7.1. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) es probablemente la más antigua y conocida de las técnicas de análisis multivariante. Fue introducido por primera vez por Pearson (1901), y fue desarrollada de forma independiente por Hotelling (1933). Al igual que muchos métodos multivariados, no se utilizó ampliamente hasta el advenimiento de los computadores electrónicos. La idea central del análisis de componentes principales es reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos, en el cual hay un gran número de variables interrelacionadas, mientras se retiene tanta variación presente en la serie de datos como sea posible. Esta reducción se consigue mediante la transformación a un nuevo conjunto de variables, los componentes principales (PCs), los cuales no están correlacionados, estos son ordenados de tal manera que los primeros retengan la mayor variación presente en todas las variables originales. El cálculo de componentes principales se reduce a la solución de un eigenvalor-eigenvector por una matriz simétrica positiva-semidefinida [41]. Las hipótesis que contempla el PCA son las siguientes:

- No todos los objetos contienen información relevante sobre las muestras.
- Algunas variables están correlacionadas entre sí por lo que la reducción en su número no implica una pérdida significativa de información.

Tabla 1.3: Matriz X de n variables originales para i objetos.

| Objetos | Variables | | | | |
|---------|-----------|----------|----------|-----|----------|
| | X_1 | X_2 | X_3 | ... | X_n |
| 1 | a_{11} | a_{12} | a_{13} | ... | a_{1n} |
| 2 | a_{21} | a_{22} | a_{23} | ... | a_{2n} |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| i | a_{i1} | a_{i2} | a_{i3} | ... | a_{in} |

Un problema que aparece en el análisis multivariante es que el volumen de los datos puede dificultar el reconocimiento de pautas y relaciones. El objetivo de muchos métodos del análisis multivariante es la reducción de datos. Precisamente, el análisis de componentes principales (PCA) es una técnica para reducir la cantidad de datos cuando está presente la correlación, es decir el PCA es un método matemático para la reducción de datos y no supone que los datos tengan ninguna distribución concreta, y también puede revelar conglomerados. La idea que se encuentra detrás del PCA es encontrar componentes principales Z_1, Z_2, \dots, Z_n que sean combinaciones lineales de

las variables originales X_1, X_2, \dots, X_n , que describen cada muestra de la matriz X de datos (Tabla 1.3), es decir,

$$\begin{aligned} Z_1 &= a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1n}X_n \\ Z_2 &= a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots + a_{2n}X_n \\ &\text{etc.} \end{aligned}$$

Los coeficientes a_{11}, a_{12} , etc., se eligen de manera que las nuevas variables, a diferencia de las variables originales no se encuentren correlacionadas unas con otras. Se obtienen n nuevas variables en lugar de las n originales, la reducción de datos comienza con la elección de componentes principales, de manera que el primer componente principal (CP1), Z_1 , recoge la mayor parte de la variación que hay en el conjunto de datos, el segundo (CP2), Z_2 , recoge la siguiente mayor parte de la variación y así sucesivamente. Por tanto, cuando haya correlación significativa el número de CPs útiles será mucho menor que el número de variables originales. La Figura 1.6 aclara el método cuando sólo hay dos variables, y por tanto, sólo dos componentes principales. En la Figura 1.6 (a) los componentes principales se muestran mediante líneas de trazos suspensivos. Los componentes principales forman ángulos rectos unos con otros, propiedad conocida como *ortogonalidad*. La Figura 1.6 (b) muestra los puntos referidos a estos dos nuevos ejes y también la proyección de los puntos sobre CP1 y CP2. Se puede ver que en este ejemplo CP₁ recoge la mayor parte de la variación y así sería posible reducir la cantidad de datos a manejar, trabajando con CP₁ en una dimensión en lugar de trabajar en dos dimensiones con X_1 y X_2 (en la práctica esto es útil cuando se tienen más de dos variables y resulta complejo el manejo de estas).

La Figura 1.6 muestra que el PCA es equivalente a una rotación de los ejes originales, de tal manera que CP1 se encuentra en la dirección de la máxima variación, pero manteniendo el ángulo entre los ejes. A menudo resulta que entre CP1 y CP2 recogen la mayor parte de la variación en el conjunto de datos. Como resultado los datos se pueden representar en sólo dos dimensiones en lugar de las n originales.

En términos matemáticos los componentes principales son los autovectores o vectores propios de la matriz de correlación y la técnica para encontrar estos autovectores se llama análisis propio. A cada componente principal (es decir, autovector) le corresponde un autovalor que proporciona la cantidad de varianza en el conjunto de datos que se encuentra explicada por ese componente principal. El PCA se puede realizar mediante distintos paquetes informáticos como Minitab [39], que es un software diseñado para ejecutar funciones estadísticas avanzadas.

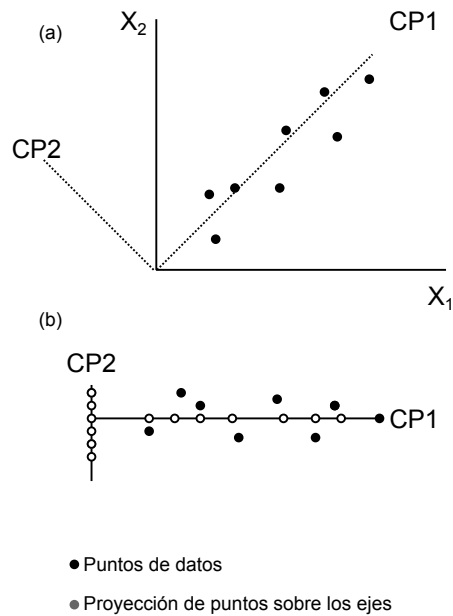


Figura 1.6: (a) Diagrama que ilustra los dos componentes principales, CP1 y CP2, para las dos variables, X_1 y X_2 . (b) Puntos referidos a los ejes de los componentes principales.

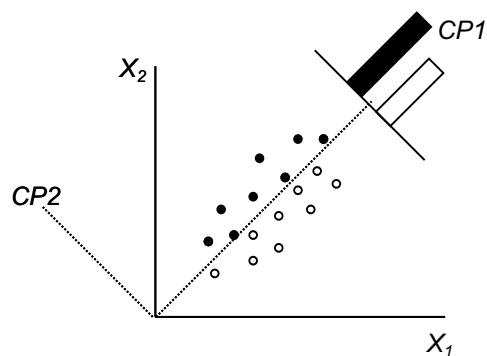


Figura 1.7: Situación en la que el primer componente principal no proporciona una buena separación entre grupos.

Aunque el PCA puede revelar grupos de objetos similares, no siempre resulta eficiente al hacerlo. La Figura 1.7 muestra una situación en la que el primer componente principal no proporciona una buena separación entre dos grupos. Existen algunos métodos cuyo propósito explícito es la búsqueda de grupos. Uno de estos métodos es el *análisis discriminante*.

1.7.2. Análisis discriminante

Los métodos donde se busca la formación de grupos de objetos y no se espera ningún conocimiento *a priori*, son los métodos llamados de *reconocimiento de pautas no supervisado*. El análisis discriminante por otra parte forma parte del grupo del *reconocimiento de pautas supervisado*. Que parte de una serie de objetos cuya pertenencia a un grupo es conocida.

El punto de partida del análisis discriminante lineal (ADL) es encontrar una función discriminante lineal (FDL), Y , que sea una combinación lineal de las variables originales $X_1, X_2, \text{etc.}$, que maximizan la varianza entre categorías, a la vez que minimizan las varianzas intra-categorías. Para construir el modelo, es necesario asignar los objetos del conjunto de entrenamiento a una categoría dada. Para ello, se añade una variable categórica a la matriz de datos conteniendo tantas categorías como sean necesarias. El ADL estima los coeficientes a_1, a_2, \dots, a_n , de la función discriminante lineal, Y :

$$Y = a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_nX_n$$

La función es capaz de predecir la pertenencia de los objetos a una u otra categoría. Las n medidas originales para cada objeto se combinan en un único valor de Y , de manera que los datos se han reducido de n dimensiones a una dimensión. Los coeficientes de los términos se eligen de manera que Y refleje la diferencia entre los grupos tanto como sea posible: los objetos en el mismo grupo tendrán valores similares de Y y los objetos en grupos diferentes tendrán valores muy diferentes de Y . En consecuencia, la función discriminante lineal (FDL) proporciona un medio de discriminación entre los dos grupos.

Las funciones discriminantes se construyen de una en una, buscando las direcciones del espacio que hacen máxima la expresión:

$$\lambda' = \frac{SC_D}{SC_1}$$

donde SC_D es la suma de los cuadrados de las distancias euclídeas entre los objetos que pertenecen a distintas categorías, en la dirección que indica la función discriminante, y SC_1 es la suma de los cuadrados de las distancias euclídeas entre los objetos que pertenecen a la misma categoría, también en la dirección de la función discriminante. A partir de q categorías se obtienen $q-1$ funciones discriminantes, en orden decreciente de su valor de λ' , y manteniendo la ortogonalidad entre ellas. La distancia, d , entre dos puntos en un espacio n -dimensional con coordenadas (x_1, x_2, \dots, x_n) y (y_1, y_2, \dots, y_n) se calcula habitualmente a través de la *distancia euclídea* definida por:

$$d = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2}$$

La función discriminante es la dirección del espacio en la que los grupos se ven más separados entre sí, y a la vez más compactos internamente [39] [42].

Tomando en cuenta la creciente necesidad de desarrollar métodos de análisis de respuesta rápida para diagnóstico de enfermedades como el cáncer, el presente proyecto se enfoca al desarrollo de un biosensor impedimétrico para la detección del antígeno STn reportado para diversos tipos de carcinoma. El biosensor propuesto se basa en el uso de electrodos serigrafiados de oro, que presentan la ventaja de ser dispositivos portables, y además la cantidad de muestra requerida para el análisis es pequeña ($<50 \mu\text{l}$). Como elemento de reconocimiento del antígeno STn se utiliza a la lectina SNA, reportada como específica para el antígeno de interés. La presencia del antígeno STn se relaciona con los cambios en R_{ct} ocasionados en la superficie del sensor obtenidos mediante EIS. Con la finalidad de clasificar las muestras negativas y positivas a cáncer se utiliza la combinación de PCA y EIS.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Desarrollar un biosensor impedimétrico, utilizando electrodos serigrafados de oro y la lectina SNA como elemento de reconocimiento, para la detección del antígeno STn asociado a cáncer en muestras de suero sanguíneo.

2.2. Objetivos específicos

- Optimizar las variables involucradas en la preparación del biosensor, evaluando el efecto de las concentraciones de los reactivos aplicados en los cambios en R_{ct} .
- Evaluar las características analíticas del biosensor, mediante técnicas estadísticas, para determinar la aplicabilidad del mismo.
- Aplicar el biosensor construido al análisis de muestras de suero sanguíneo, para determinar su funcionamiento en el análisis de muestras de suero sanguíneo humano.

3. Parte experimental

3.1. Materiales, reactivos y soluciones

Los biosensores fueron preparados sobre la superficie de electrodos serigrafados con pasta de oro de curado a baja temperatura (DropSens 220BT). El electrodo de trabajo (12.5 mm^2) y el auxiliar son de oro, el electrodo de referencia es de plata al igual que los contactos.

Se preparó una solución tampón de fosfatos (PBS) que contenía una concentración 137 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 10 mM de Na_2HPO_4 y 2 mM de KH_2PO_4 a la cual se adicionaron CaCl_2 , ZnCl_2 y MgCl_2 cada uno en concentración 0.5 mM. El pH de la solución fue ajustado a 7.4 mediante adición de NaOH. Para la dilución del PBS se utilizó agua desionizada con una conductividad específica menor de $0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$, obtenida a partir de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore).

La modificación de la superficie de los electrodos inicia con la adición de ácido mercaptohexadecanoico 25 mM (Sigma-Aldrich) disuelto en etanol (Química Meyer). La lectina fue inmovilizada mediante N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (Sigma-Aldrich) 20 mM y N-hidroxisulfosuccinimida (Sigma-Aldrich) 5 mM, diluidos en conjunto en PBS. Esta solución presenta poca estabilidad por lo que se prepara antes de su aplicación y debe ser desechada una vez utilizada.

Se preparó una solución patrón 2.5 mg ml^{-1} de lectina de *Sambucus nigra* tipo I (SNA) (EY-Laboratories) en PBS. Dicha solución fue almacenada a -20°C hasta su uso.

Para el bloqueo de grupos carboxilo activados durante la inmovilización se utilizó etanolamina (Sigma-Aldrich), la cual fue preparada en agua desionizada en una concentración 10 mM.

Las distintas etapas de optimización del biosensor fueron evaluadas de acuerdo a los cambios en impedancia (Z) y resistencia a la transferencia de carga R_{ct} observadas en EIS, para lo cual se trabajó con dos controles positivos, transferrina humana (Trf) y mucina submaxilar bovina (BSM) (Sigma-Aldrich), las soluciones de las glicoproteínas se prepararon en PBS, partiendo de una solución patrón de 1 mg ml^{-1} .

Las determinaciones electroquímicas se realizaron en un potenciostato AUTOLAB PGSTAT 30 controlado a través del software FRA versión 2.4. Se utilizó una solución redox que contenía 5 mM de ferrocianuro de potasio $K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y 5 mM de ferricianuro de potasio $K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, preparada en PBS.

3.2. Preparación del biosensor

El primer paso para la preparación del biosensor consiste en la adición de $10 \mu\text{l}$ de la solución de ácido mercaptohexadecanoico (MHDA) a la superficie del electrodo. Se deja secar el electrodo durante 24 h a temperatura ambiente. Después de lo cual se realiza un lavado con etanol para retirar el exceso de MHDA. Posteriormente se realiza la activación de la superficie modificada mediante la aplicación de $10 \mu\text{l}$ de la solución de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), y se deja secar la superficie del electrodo durante 1 h a temperatura ambiente. Después de dicho tiempo se realiza un lavado con PBS y se aplican $60 \mu\text{g}$ de lectina SNA (en solución), la cual se deja en contacto en la superficie del sensor durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez realizado este paso se lleva a cabo el bloqueo de grupos activados para lo cual se sumerge el electrodo en 10 ml de la solución de etanolamina durante un periodo de 30 min . Una vez concluida la preparación del biosensor, este debe ser conservado en PBS a una temperatura de 4°C hasta su uso.

3.3. Preparación de muestras

Para evaluar la eficiencia de los biosensores en muestras reales, se contó con el apoyo de pacientes del Hospital General de Pachuca, Hidalgo y del Hospital General de São João, Porto (Portugal). Se logró conseguir un total de 50 muestras, 25 de las cuales corresponden a personas sanas y 25 a personas con distintos tipos de carcinomas (pulmonar, testículo, cérvico uterino, próstata, páncreas, mama y gástrico).

El volumen promedio de sangre obtenido de cada paciente fue de 7 ml . Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C . La fracción correspondiente al suero fue separada y colocada en un contenedor

etiquetado para cada individuo. Finalmente las muestras de suero fueron almacenadas a una temperatura de -80°C .

Posteriormente las muestras de suero sanguíneo fueron sometidas a un tratamiento (Tabla 3.1) con el Kit ProteoMiner (Bio-Rad). La finalidad del tratamiento de las muestras es disminuir las interacciones inespecíficas en el biosensor, debidas a la matriz de la muestra.

Tabla 3.1: Tipos de muestras tratadas con el kit ProteoMiner.

| Muestras |
|--|
| Suero sanguíneo de pacientes negativos a cáncer |
| Mezcla de suero sanguíneo de 25 pacientes negativos a cáncer |
| Suero sanguíneo de pacientes positivos a distintos tipos de carcinoma |
| Mezcla de suero sanguíneo de 25 pacientes positivos a distintos tipos de carcinoma |

El kit ProteoMiner o Combinatorial Peptide Ligand Library (CPLL) está compuesto de una gran variedad de hexapéptidos sintetizados, inmovilizados sobre un grupo de esferas como soporte. Los hexapéptidos actúan de ligandos para las proteínas de la muestra, con la característica de que cada uno de los hexapéptidos se enlazarán solamente a una secuencia proteica determinada. Cuando la muestra se añade, la limitada capacidad de la columna hará que los ligandos específicos correspondientes a las proteínas mayoritarias se saturen rápidamente, permitiendo que el exceso de éstas fluya a través de la misma. Contrariamente, las proteínas minoritarias se concentrarán en sus ligandos, por lo que la elución posterior permite reducir el intervalo del conjunto de proteínas (Fig. 3.1).

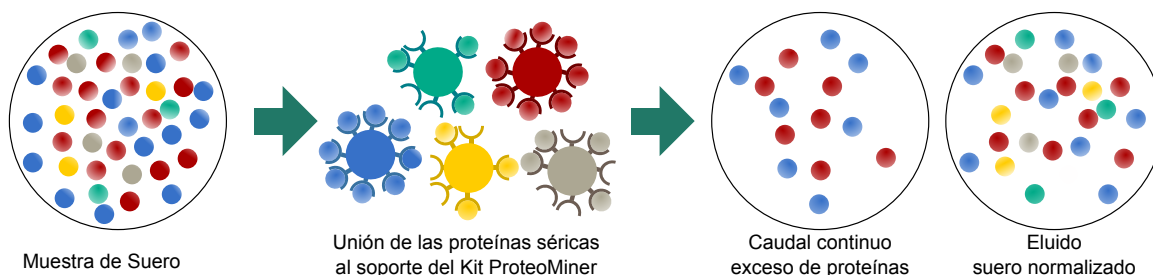


Figura 3.1: Simplificación de suero sanguíneo con el kit ProteoMiner (Bio-Rad) previo al análisis proteómico.

El CPLL es una herramienta útil para reducir el intervalo dinámico de concentraciones en diversos tipos de muestras, como plasma y suero sanguíneo, actúa disminuyendo la concentración de las proteínas más abundantes y “enriqueciendo” las proteínas de menor abundancia. Esta técnica se usa con el objetivo de la detección de proteínas poco abundantes, puesto que generalmente las proteínas menos abundantes en las muestras biológicas son potencialmente de gran interés para el estudio de nuevos biomarcadores en distintas enfermedades [43].

La secuencia del tratamiento de la muestra con el kit ProteoMiner es la siguiente:

- Retirar la solución de almacenamiento y activar las columnas haciéndoles pasar en dos ocasiones 200 μl de solución amortiguadora.
- Una vez lavada la fase activa, adicionar 200 μl de muestra y dejar en agitación durante 2 h a temperatura ambiente.
- Centrifugar las muestras a 1,000 x g durante 30-60 seg y descartar el material recolectado en los tubos.
- Adicionar 200 μl de solución amortiguadora, agitar 5 min y centrifugar a 1,000 x g durante 30-60 seg, descartar la solución amortiguadora y repetir esta operación un par de ocasiones.
- Lavar la columna con 200 μl de agua desionizada.
- Eluir las proteínas retenidas en cada columna con 20 μl del reactivo de elución, agitando 15 min y centrifugar a 1,000 x g durante 30-60 seg. El eluido obtenido se almacena a -20°C hasta su análisis.

3.4. Análisis por EIS

Para la determinación de los cambios de impedancia de los biosensores debidos a las modificaciones en la superficie, se fijan como condiciones de trabajo en el potenciostato un potencial de corriente directa de 350 mV y un potencial de corriente alterna de 5 mV de amplitud. Las mediciones de EIS son determinadas en 25 frecuencias (de 0.01 Hz a 100 kHz), distribuidas en una relación 2:1, de frecuencias altas a bajas.

Previamente a realizar el análisis por EIS se realiza un lavado del biosensor con aproximadamente 5 ml de PBS. Una vez lavado el biosensor y colocado en el adaptador se aplican 40 μl de la solución redox a la superficie del biosensor y se inicia un

primer análisis de EIS que se considera como etapa de activación. Una vez concluida esta operación se realiza una nueva lectura de EIS considerada como blanco. Entonces se realiza un lavado del biosensor con aproximadamente 5 ml de PBS y se coloca un volumen de 10 μl de la muestra por un periodo de 5 min. Transcurrido el tiempo se realiza un nuevo lavado con PBS para retirar la muestra, y una vez colocado el biosensor en el adaptador se aplican 40 μl de la solución redox a la superficie y se realiza la lectura de EIS correspondiente a la etapa de reconocimiento del analito retenido por la lectina inmovilizada en el biosensor.

Los datos evaluados en el proyecto corresponden al análisis tanto de diferenciales de impedancia (ΔZ), como de resistencia a la transferencia de carga (ΔR_{ct}). Es decir el cambio determinado por EIS antes y después de la incubación de la muestra.

3.5. Tratamiento de datos por PCA

Las muestras de suero sanguíneo procesadas con el Kit ProteoMiner fueron diluidas en una proporción 1:10 en PBS. Fueron analizadas 7 muestras positivas y 8 muestras control, entre estas se incluían algunas individuales y las mezclas de las 25 muestras control y positivas.

Los datos de diferencial de impedancia (ΔZ) obtenidos del análisis de las muestras normalizadas se utilizaron para llevar a cabo el análisis de componentes principales (PCA).

Los espectros de impedancia fueron analizados en un total de 25 frecuencias. No todas ellas aportan información realmente útil para el análisis, por lo que se descartaron las frecuencias más altas que están más asociadas a la resistencia de la solución (R_s) y las frecuencias más bajas puesto que normalmente son un tanto más ruidosas que el resto de estas. Finalmente se eligieron 7 frecuencias para evaluar por PCA los diferenciales de impedancia.

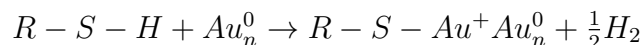
4. Discusión de resultados

4.1. Optimización de la construcción del biosensor

La preparación y optimización del biosensor es uno de los factores clave previos a poder iniciar el análisis de muestras de suero sanguíneo. Es por ello que se realizó la búsqueda de las concentraciones óptimas de reactivos que forman parte del biosensor.

4.1.1. Concentración de MHDA

La manera en la cual el elemento de reconocimiento es inmovilizado en una fase sólida es un aspecto crítico que requiere de cuidadosas consideraciones. Una característica deseable del método es que el elemento de reconocimiento, es decir la lectina de *Sambucus nigra* quede orientada con un mínimo de impedimento estérico para interactuar favorablemente con el antígeno de interés STn. De igual manera es deseable inmovilizar la lectina con un cambio mínimo en su capacidad para unirse a su antígeno. Un método útil para la inmovilización de anticuerpos en inmunoensayos y de glicoproteínas en algunos biosensores es mediante la formación de monocapas autoensambladas (SAMs, Self-assembled monolayers). Se pueden formar capas altamente ordenadas en metales como oro y plata mediante la quimisorción espontánea de los alcanotioles. El primer paso en la formación de un alcanotiol SAM es la quimisorción del grupo sulfhidrilo del alcanotiol a la superficie de oro a través de la formación de un enlace oro-azufre. Un modelo (aún controversial) descrito para la formación de este enlace sugiere que se trata de una adición oxidativa del enlace S-H a la superficie de oro, seguida por la eliminación reductiva de hidrógeno como se muestra en la siguiente ecuación:



La superficie expuesta de la monocapa consiste de grupos de ácido carboxílico que en condiciones de activación pueden ser covalentemente enlazados a grupos amino de anticuerpos o proteínas [29].

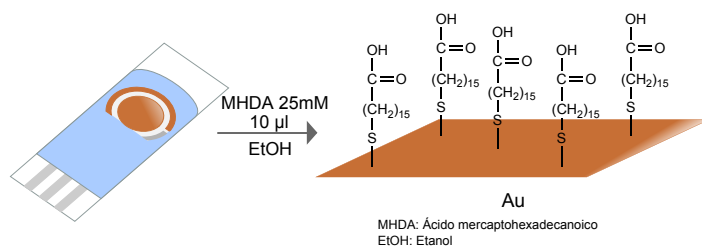


Figura 4.1: Formación de la SAM.

Para la determinación de la concentración óptima de MHDA se realizó el análisis de EIS de un grupo de biosensores en los cuales fueron aplicadas distintas concentraciones de MHDA (0.5, 1.0, 10.0, 25.0, 40.0 mM), el análisis se llevó a cabo por duplicado. El efecto de la concentración fue determinado sin la inmovilización de lectina o algún otro elemento. Los valores en la resistencia a la transferencia electrónica (R_{ct}) respecto al blanco se muestran en la Figura 4.2.

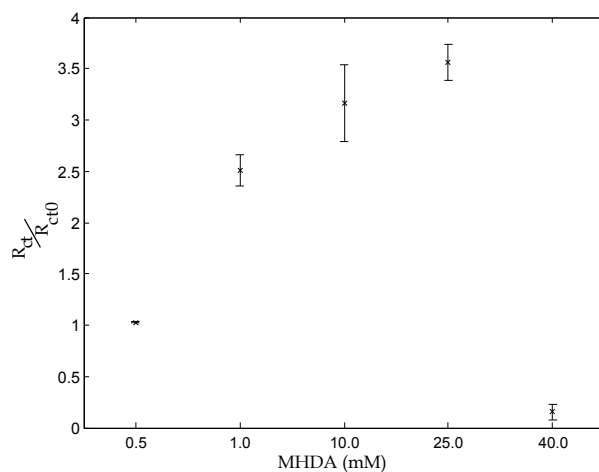


Figura 4.2: R_{ct} debidos a la modificación de la superficie de SPE con MHDA.

De acuerdo con la Figura 4.2, se puede observar un mayor incremento en R_{ct} con una mayor cobertura de la superficie por los grupos tiol inmovilizados en la superficie del electrodo hasta la concentración de 25.0 mM de MHDA. Para la concentración de 40 mM se observa una disminución en la R_{ct} . Se ha reportado que este comportamiento puede asociarse con la agregación y auto-oxidación de la molécula en concentraciones muy elevadas [44]. Es por ello que se seleccionó como concentración óptima de MHDA 25.0 mM para la formación de la SAM en la superficie del electrodo (Figura 4.2).

4.1.2. Concentración EDC:Sulfo-NHS

Las carbodiimidas son agentes entrecruzantes utilizadas típicamente para mediar la formación de enlaces amida o fosforamidata entre carboxilato-amina o fosfato-amina respectivamente. La ventaja de estos reactivos es que la formación de los enlaces mencionados no requiere la introducción de una estructura química adicional. Las carbodiimidas n-sustituídas pueden reaccionar rápidamente con el ácido carboxílico para formar derivados O-acilisourea que reaccionan rápidamente con nucleófilos tales como los de las aminas primarias para formar enlaces. Una desventaja es que en soluciones acuosas la hidrólisis es una importante reacción de competencia, lo que ocasiona que si la molécula objetivo no encuentra el grupo activado antes de que este se hidrolize, el complejo deseado no se forma. Esto representa un problema especialmente cuando la molécula blanco se encuentra en una baja concentración como es el caso del antígeno STn respecto de otras proteínas presentes en el suero sanguíneo. La ventaja de la adición de Sulfo-NHS a EDC es incrementar el periodo de estabilidad de los intermediarios activados. El uso de Sulfo-NHS en combinación con EDC genera la formación de intermediarios Sulfo-NHS ésteres que reaccionan con aminas presentes en el agente de reconocimiento para la formación de enlaces amida altamente estables (Figura 4.3) [45].

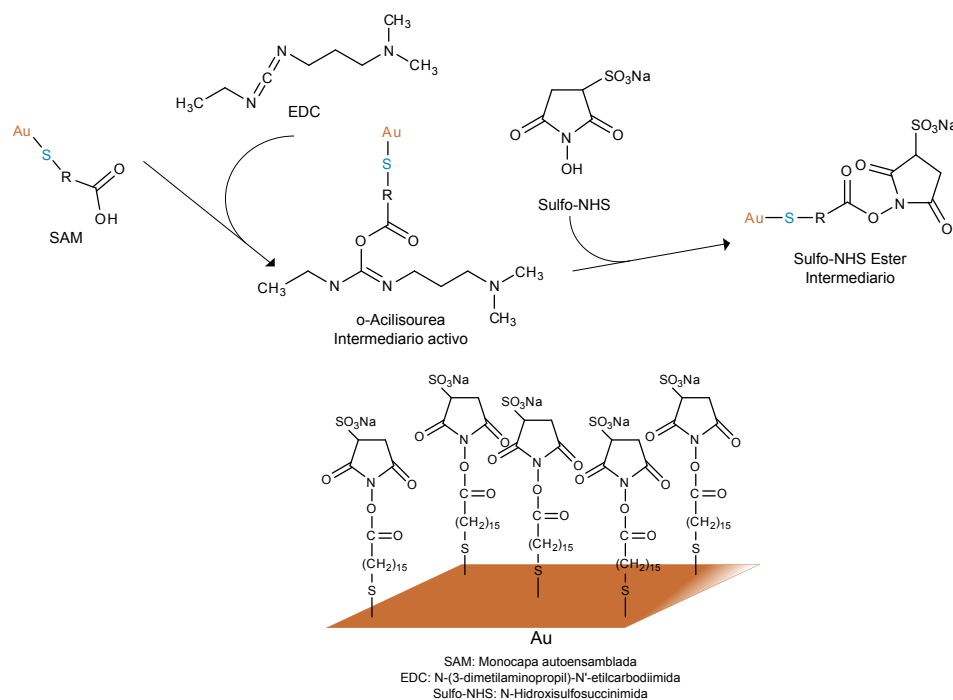


Figura 4.3: Activación de grupos carboxílicos terminales de la superficie modificada.

Para determinar la concentración óptima de los reactivos entrecruzantes se realizó un análisis en un grupo de sensores modificados con 25 mM de MHDA. En esta etapa no se realizó la inmovilización de SNA. Se aplicaron una serie de concentraciones de los reactivos EDC y Sulfo-NHS y se dejó secar durante un periodo de 1 h. Posteriormente se realizó la determinación de la impedancia del sensor por EIS y se obtuvieron los valores de R_{ct} respecto al blanco que se muestran en la Figura 4.4. De acuerdo con esto es posible observar incrementos notables en R_{ct} cuando se utilizan concentraciones 20.0:5.0 y 20.0:10.0 mM de EDC y Sulfo-NHS respectivamente. Con base a los incrementos de R_{ct} se eligió trabajar con la combinación 20.0 mM EDC y 5.0 mM Sulfo-NHS que sugiere una mejor cobertura de la superficie del sensor y además presenta mayor reproducibilidad.

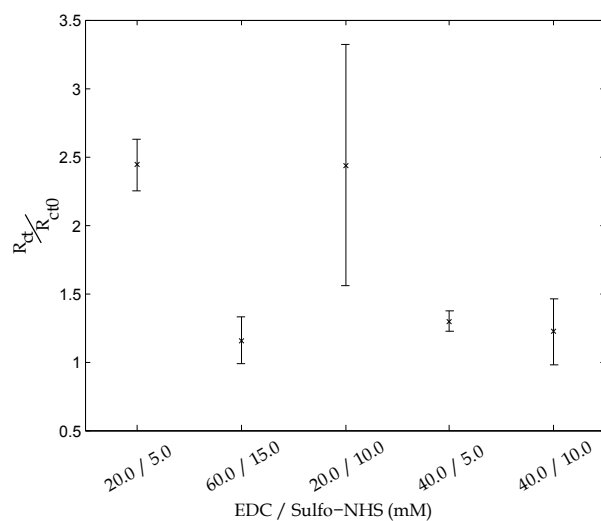


Figura 4.4: R_{ct} debidos a la adición de entrecruzantes EDC y Sulfo-NHS

4.1.3. Cantidad de lectina SNA

Una vez definidas las concentraciones ideales de MHDA y de los entrecruzantes EDC y Sulfo-NHS, se realizó el análisis del efecto de la cantidad del elemento de reconocimiento en el biosensor.

El efecto de la concentración de lectina sobre la superficie del electrodo de trabajo es una de las variables críticas en el desarrollo del biosensor. Dicha concentración debe ser suficiente para lograr la adición de una cantidad adecuada de unidades de SNA a la superficie del biosensor (Figura 4.5) y lograr el reconocimiento del antígeno STn que indudablemente se encuentra en concentraciones reducidas en las muestras de suero sanguíneo.

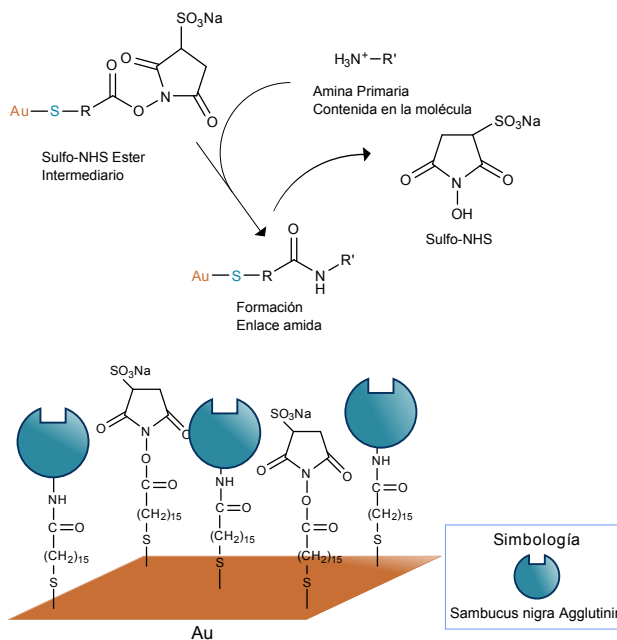


Figura 4.5: Inmovilización de la lectina de *Sambucus nigra* en la superficie del biosensor.

Para determinar la cantidad ideal de SNA a inmovilizar en la superficie del sensor, se realizó la aplicación de distintas cantidades de SNA (25, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{SPE}$) en un grupo de biosensores con las concentraciones de MHDA y EDC/Sulfo-NHS establecidas en los experimentos anteriores. Se analizaron los controles positivos BSM y Trf en concentraciones de 0.01-0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

De acuerdo a la Figura 4.6 no existen cambios significativos en Z y R_{ct} a concentraciones de 80 y 100 μg . Así mismo se observa una disminución de impedancia respecto a la concentración de 80 μg probablemente debidos a la saturación de la superficie. Por lo tanto se decidió trabajar con 60 μg de SNA por SPE. A pesar de obtener valores similares al utilizar 25 μg de SNA se descartó este valor para asegurar con ello la existencia de suficientes especies de SNA en la solución aplicada para la preparación del biosensor que permitan el reconocimiento de antígenos STn en cantidades diversas. Gamella et al. desarrollaron un electrodo serigrafiado para la detección y cuantificación de microorganismos, usando como elemento de reconocimiento inmovilizado la Con A. Se observaron incrementos en la R_{ct} en concentraciones hasta 0.06 mg ml^{-1} , en concentraciones mayores de lectina reportan una disminución en R_{ct} lo cual asocian a un fenómeno de aglutinación a elevadas concentraciones de lectina [46].

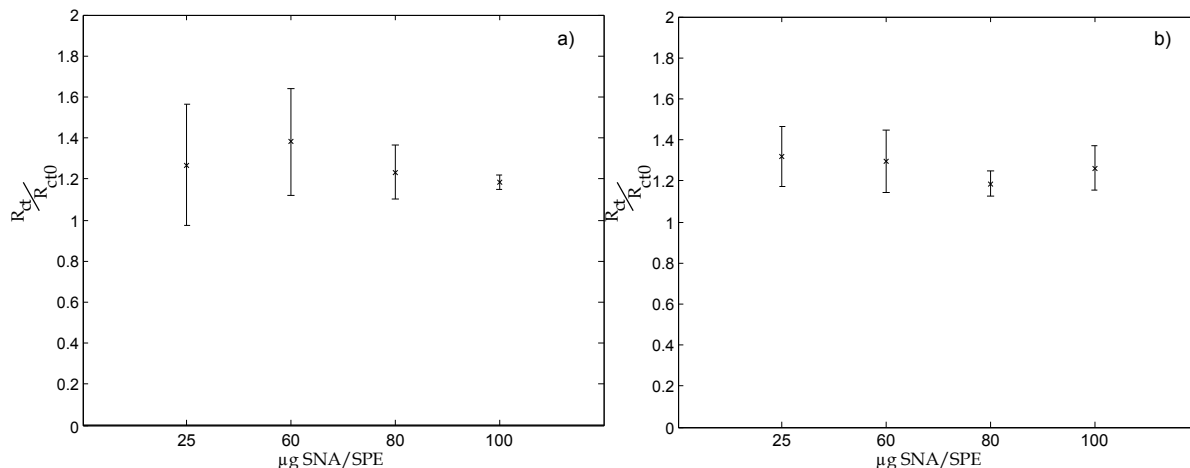


Figura 4.6: R_{ct} debidos a la cantidad de SNA inmovilizada, a) control positivo BSM, b) control positivo Trf.

4.1.4. Optimización del tiempo de incubación

Una de las variables críticas en el proyecto es la optimización del tiempo de incubación, puesto que tratándose de un ensayo clínico, uno de los objetivos principales es reducir el tiempo de detección del biomarcador de interés.

Una respuesta rápida en el biosensor presenta una gran ventaja en el análisis clínico. Se han publicado varios trabajos de investigación en los cuales los tiempos de incubación del biomarcador de interés varían ampliamente. Por ejemplo, para la determinación del antígeno IL-6 (asociado a cáncer colorrectal y gastrointestinal) Yang et al. desarrollaron un biosensor cuyo elemento de reconocimiento es el anticuerpo anti-IL-6. Para llevar a cabo la determinación del antígeno realizaron una incubación de 30 min a 37°C [33]. Otro grupo de investigadores desarrolló biosensores con nanotubos de carbono en los cuales inmovilizaron las lectinas WGA, LCA, Con A, SNA y DSA, para la determinación de α -fetoproteína, sumergieron los biosensores durante 60 min en distintas concentraciones de esta proteína [32].

Con la finalidad de determinar el tiempo necesario para poder observar la respuesta de la asociación SNA-STn. Se preparó una serie de sensores con 25 mM de MHDA y EDC/Sulfo-NHS 20.0 y 5.0 mM respectivamente, en la superficie se inmovilizó 100 μg de SNA. Se evaluaron distintos tiempos de incubación (5, 15 y 30 min) con BSM y Trf en concentraciones de 0.01, 0.1 y 1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$. El análisis mostró que no existen variaciones significativas en los incrementos de resistencia en los biosensores en los distintos tiempos de incubación (Figura 4.7), de acuerdo con esto se eligió trabajar

con un tiempo de incubación de 5 min para los controles y las muestras de suero sanguíneo.

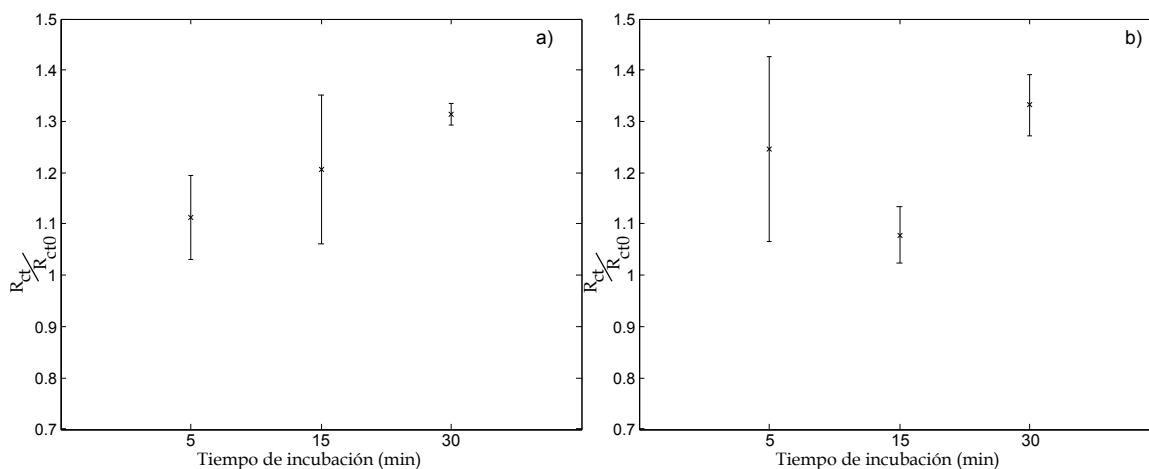


Figura 4.7: Cambio de la resistencia respecto al tiempo de incubación a) BSM, b) Trf.

4.1.5. Bloqueo de grupos activados

Una vez inmovilizada la lectina, existe una alta probabilidad de la existencia de sitios activos que no fueron ocupados por la lectina, por lo que resulta conveniente el bloqueo de estos grupos, para evitar subsecuentes interacciones no específicas en el análisis de muestras (Figura 4.8).

Para determinar las condiciones adecuadas para llevar a cabo el bloqueo de grupos se realizó un experimento en el cual se sumergieron los electrodos en un volumen de 10 ml de etanolamina o glicina en distintas concentraciones (Tabla 4.1).

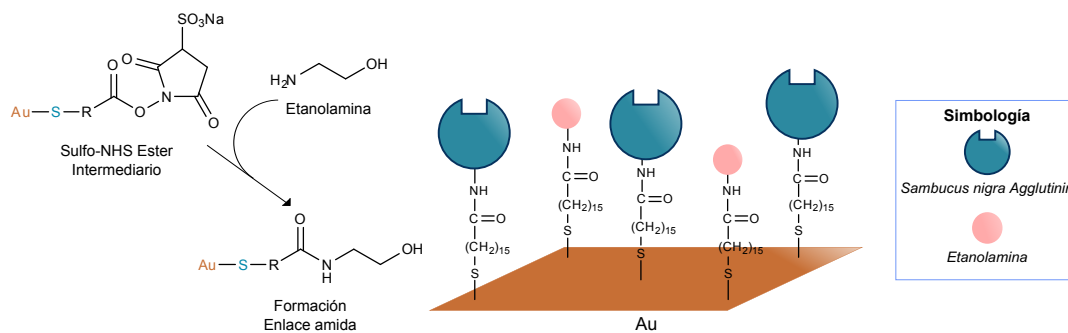


Figura 4.8: Bloqueo de grupos activados residuales.

Tabla 4.1: Concentraciones experimentadas de agente bloqueante

| Reactivo | Tiempo (min) | Concentración (mM) |
|-------------|--------------|--------------------|
| Etanolamina | 30 | 1.0, 10.0, 20.0 |
| Glicina | 60 | 25.0, 50.0 |

Se realizaron las mediciones de impedancia sin llevar a cabo la incubación con control positivo, no se observaron cambios relevantes Z por interacciones inespecíficas, por lo que no se considera que existan diferencias importantes, entre el bloqueo con etanolamina y glicina en concentraciones superiores a 10 mM. Por lo que se seleccionó la etanolamina como reactivo para el bloqueo.

4.1.6. Selección del potencial DC

Se utilizó voltamperometría cíclica para evaluar el comportamiento de los electrodos modificados por la preparación del biosensor, como se muestra en la Figura 4.9(a) el VC de un electrodo de oro no modificado en el cual se utilizó la sonda electroquímica $K_4[Fe(CN)_6] / K_3[Fe(CN)_6]$, presenta un comportamiento reversible. La Figura 4.9(b) muestra el VC para un electrodo modificado hasta la etapa de reconocimiento del antígeno STn, en este caso se dejan de observar los picos de corriente anódica y catódica, debido al incremento en la resistencia a la transferencia de carga ocasionado por el recubrimiento de la superficie de oro.

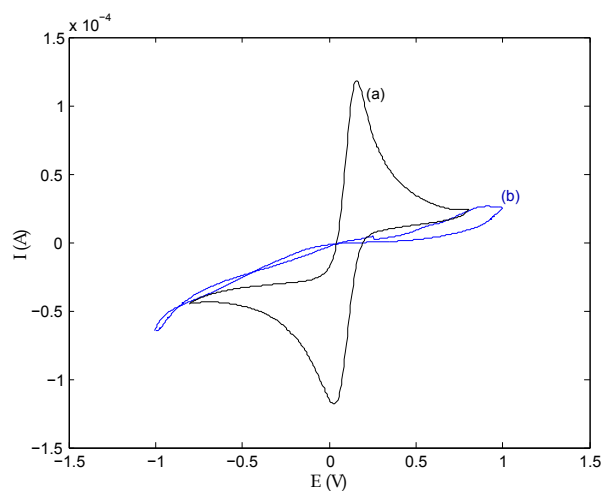


Figura 4.9: Voltamperometría cíclica, a) electrodo de oro no modificado, b) biosensor analizado, velocidad de barrido 0.05 V s^{-1} , ventana de potencial de -0.9 a 1 V.

En EIS se deben fijar dos potenciales uno de corriente directa (DC) y un potencial de corriente alterna (AC) que debe ser de baja amplitud (Apéndice A). Para el presente proyecto se realizó un análisis de la influencia del potencial DC en la respuesta de impedancia del biosensor, para lo cual se preparó un grupo de biosensores en las condiciones optimizadas, a los cuales se aplicó el control positivo Trf en concentración de $0.01 \mu\text{g ml}^{-1}$ y se realizaron las lecturas de impedancia, variando el potencial DC de la siguiente manera: 0.10, 0.20, 0.25, 0.35 y 0.45 V, el potencial de corriente alterna se fijó en 5 mV.

En la Figura 4.10 es posible observar un mayor incremento en R_{ct} al potencial 0.10 V, sin embargo la desviación es alta. Al potencial de 0.35 V se observa un incremento de R_{ct} con una desviación menor a la ocasionada en 0.10 V, es por ello que este se definió como óptimo.

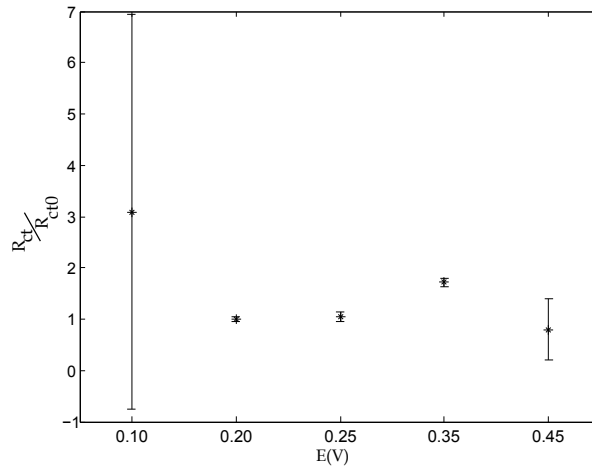


Figura 4.10: Efecto del potencial DC en la medición de EIS (Trf).

La Figura 4.11 muestra el esquema completo de la preparación de los biosensores.

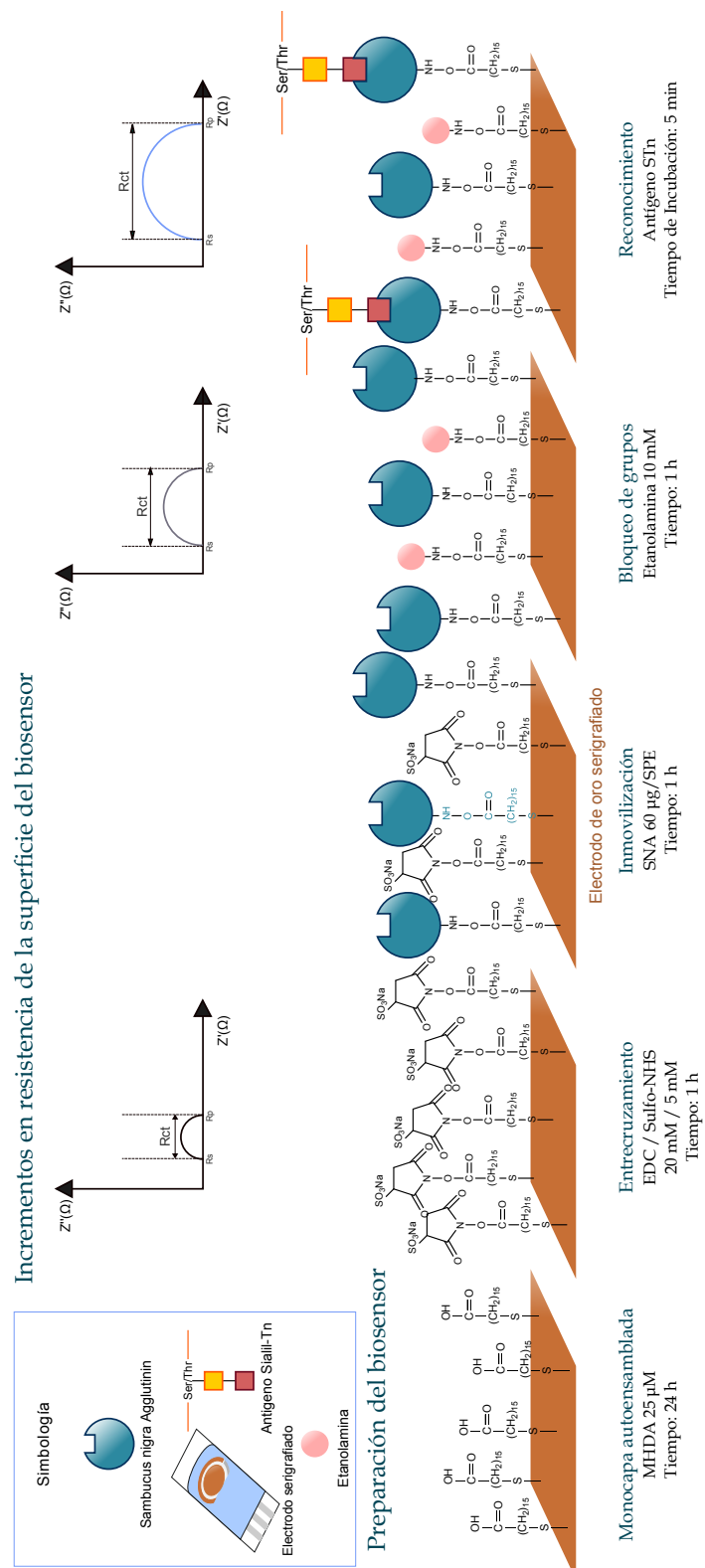


Figura 4.11: Análisis por EIS.

4.2. Caracterización analítica del biosensor

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la preparación de los biosensores, utilizando como control positivo Trf. Se realizó un análisis para determinar el límite de detección. Para ello se construyeron una serie de biosensores y en cada uno de ellos se realizaron adiciones sucesivas de Trf (10 ng cada vez). Para cada una de las adiciones se realizó la medida de impedancia. En la Figura 4.12 se muestra el diagrama de Nyquist obtenido para uno de los biosensores utilizados en el ensayo. En este diagrama es posible observar un incremento en la R_{ct} proporcional a la concentración de transferrina adicionada, en un intervalo de 10-70 ng de transferrina.

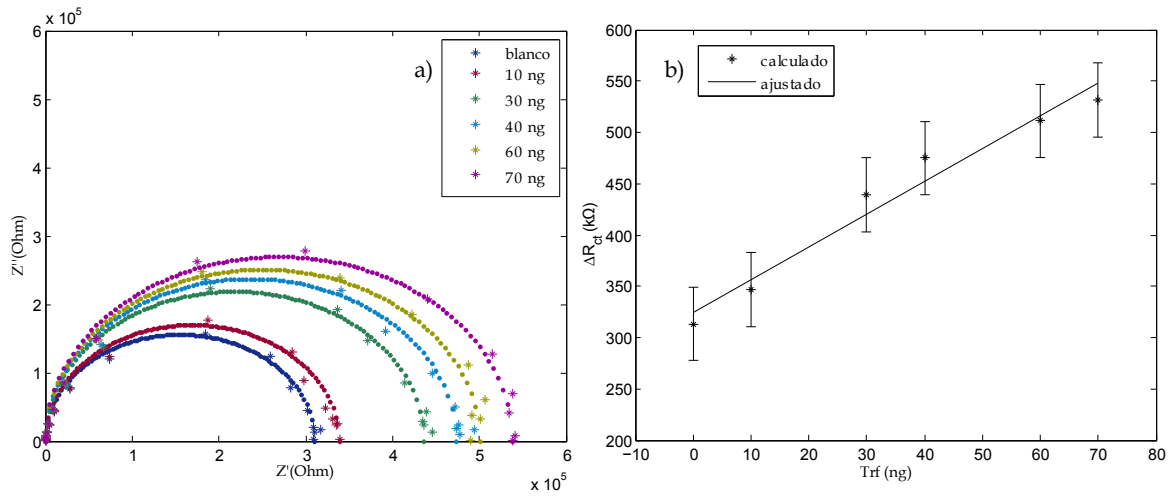


Figura 4.12: a) Diagrama de Nyquist para adiciones sucesivas de Trf sobre un SPE. b) Línea de calibración para el biosensor mostrado en el diagrama de Nyquist

A partir de los datos de R_{ct} obtenidos se realiza la curva de calibración, la cual cumple con la ecuación $\Delta R_{ct} = 3.18(\pm 0.70)C + 324.86(\pm 27.79)$ donde C tiene unidades de ng con un coeficiente de determinación $R^2=0.965$. El límite de detección obtenido fue de 20 ng contenidos un volumen de muestra de 10 μl .

El biosensor del presente proyecto fue diseñado para la aplicación al análisis de muestras de suero sanguíneo, por lo que fue necesario considerar el análisis de interferentes. Dentro de los principales componentes del suero sanguíneo se encuentran la albúmina y las inmunoglobulinas. La albúmina puede considerarse como el principal interferente para nuestro análisis debido a su elevada concentración (0.04 g ml^{-1}) en sangre [47].

En un biosensor se construyó una línea de calibración, para la cual se realizaron adiciones sucesivas de 10 μl de una solución de Trf de concentración 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ preparada en PBS. La cual fue incubada en la superficie del biosensor en las condiciones optimizadas. Después de cada adición se realizó la medición del reconocimiento del antígeno mediante EIS. En el resto de los biosensores se incubaron soluciones de Trf de concentración 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y concentraciones de albúmina de suero bovino (0.2, 2.0 y 20 mg ml^{-1}). De igual manera se realizó la lectura de EIS transcurridos los 5 min de incubación y se realizaron las posteriores adiciones de 10 μl de Trf 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y sus correspondientes lecturas de EIS.

Los datos obtenidos de $\Delta R_{ct}(\text{k}\Omega)$ se utilizaron para hacer un análisis de comparación de pendientes [48] mediante un estadístico t . En la Tabla 4.2 se muestran los valores de los coeficientes de la línea de calibración ($\hat{y} = b_1x + b_0$) tanto para las muestras como para el estándar. En una primera etapa se requiere del análisis de los valores de varianza residual ($s_e^2 = \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}$), mediante una prueba F se determina si estos son comparables o no, a partir de ello se determina la ecuación que se debe aplicar para el cálculo de la varianza residual combinada (s_{ep}^2), puesto que para el caso expuesto en el presente proyecto $F_{calculado}$ para todas las concentraciones siempre es menor que el $F_{critico}$ se aplica la ecuación que se muestra a continuación $s_{ep}^2 = \frac{(n_1-2)s_{e1}^2 + (n_2-2)s_{e2}^2}{n_1+n_2-4}$. Al aplicar la ecuación correspondiente para el análisis t :

$$t = \frac{b_{11} - b_{12}}{\sqrt{s_{ep}^2 \left(\frac{1}{\sum (x_{i1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum (x_{i2} - \bar{x}_2)^2} \right)}}$$

Se obtienen los valores que se muestran en la Tabla 4.2, al ser comparados con el $t_{critico}$ se puede decir que en concentraciones elevadas de BSA puede existir efecto matriz en la determinación del analito de interés. Es por lo anterior que se recomienda el procesamiento de la muestra para reducir la cantidad de proteínas más abundantes que interfieren en la determinación, sin perder las glicoproteínas de interés que están en menor cantidad. Este procedimiento se hace utilizando el kit ProteoMiner.

Tabla 4.2: Análisis de efecto matriz.

| Concentración BSA mg ml^{-1} | b_1 | b_0 | s_e^2 | $F_{calculado}$ | $F_{tabulado}$ | $t_{calculado}$ | $t_{critico}$ | Efecto matriz |
|---------------------------------------|-------|--------|-------------------|-----------------|----------------|-----------------|---------------|----------------------|
| 0.2 | 4.93 | 60.68 | 5.3×10^3 | 2.13 | | 0.32 | | no existe |
| 2.0 | 5.44 | 42.58 | 1.2×10^3 | 0.48 | 6.39 | 0.73 | 1.94 | no existe |
| 20.0 | 17.70 | -89.04 | 3.5×10^3 | 1.41 | | 4.6 | | existe efecto |
| 0 | 4.03 | 120.33 | 2.5×10^3 | | | | | |

Se realizó un análisis de reproducibilidad de un grupo de tres biosensores preparados en las condiciones seleccionadas como óptimas. Se incubaron los biosensores con una solución problema de Trf y se construyó la curva de calibración mediante adición patrón de Trf de concentración $1 \mu\text{g ml}^{-1}$. Se calculó la concentración de Trf en la solución inicial por interpolación de las curvas construidas, a partir de la concentración calculada se obtuvo un valor de RSD de 13.4 %.

4.3. Análisis de muestras de suero sanguíneo

Se realizó un análisis de recuperación de 10 muestras de suero sanguíneo tratadas y diluidas 1:10 en PBS, a las cuales se adicionaron volúmenes de $10 \mu\text{l}$ de una concentración $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de Trf cada vez y se incubaron durante 5 min. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura del biosensor. Con los valores de ΔR_{ct} se construyeron las líneas de calibración para cada uno de los biosensores analizados y se calcularon las concentraciones de glicoproteínas con el antígeno STn contenidas en la muestra. El valor medio de concentración para las muestras control con su respectiva desviación estándar es $\bar{x}_{control} = 48.24(37.96)$, así mismo los valores para las muestras positivas $\bar{x}_{positivas} = 51.44(35.25)$.

Con las concentraciones se realizó un estadístico t para muestras positivas y negativas a cáncer. Se plantearon dos hipótesis:

- H_0 $t_{calculado} < t_{critico}$: No existen diferencias significativas entre las muestras.
- H_1 $t_{calculado} > t_{critico}$: Existen diferencias significativas entre las muestras

Con un $t_{critico} = 2.1$ y un $t_{calculado} = 0.13$ se acepta la hipótesis nula y se establece entonces que no hay diferencias entre las muestras, lo cual incurre en un grave error puesto que se ha realizado el análisis entre sueros sanguíneos positivos y negativos, debido a que este método no permite discriminar entre ambos tipos de muestras se recurre en adelante a un método de análisis más sofisticado, como es el *análisis de componentes principales*.

4.4. Análisis de componentes principales

Un problema central en el análisis de datos multivariantes es la reducción de la dimensionalidad: si es posible describir con precisión los valores de p variables por un pequeño subconjunto $r_x < p$ de ellas, se habrá reducido la dimensión del problema a costa de una pequeña pérdida de información.

El análisis de componentes principales tiene el objetivo: dadas n observaciones de p variables, se analiza si es posible representar adecuadamente la información con un número menor de variables construidas como combinaciones lineales de las originales.

La técnica de componentes principales permite:

1. Representar óptimamente en un espacio de dimensión pequeña, las observaciones de un espacio general p -dimensional.
2. Transformar las variables originales, en general correlacionadas, en nuevas variables no correlacionadas, facilitando la interpretación de los datos.

Para llevar a cabo el PCA de la información obtenida a partir de los 15 biosensores utilizados para el análisis de suero sanguíneo de personas sanas y personas con distintos tipos de carcinoma, se cuenta con los datos obtenidos por EIS, a los cuales además les fue determinado el ΔZ . En la Tabla 1 del Apéndice B, se encuentra contenida la totalidad de la información. Es decir se dispone de una matriz X de dimensiones $n \times p$, donde p son variables (muestras positivas y control) y n son los elementos analizados (frecuencias).

El primer paso en el PCA es construir la matriz de correlación de Pearson para identificar cualquier correlación entre las variables (Tabla 2 del Apéndice B), para poder determinar el grado de correlación entre variables se utiliza el valor de r para 23 grados de libertad y $\alpha=0.05$ que para estas condiciones es de 0.396, de acuerdo con este valor en la matriz de correlación la mayoría de los coeficientes resultan significativos. Para comprobar globalmente si el PCA conduce a ahorros significativos, se realizó la prueba de esfericidad de Bartlett que se basa en comprobar si los valores están distribuidos uniformemente en el hiperespacio de las p variables, es decir conforman una hiperesfera. En caso afirmativo, las variables no estarán correlacionadas entre sí y todas serán necesarias para explicar la información de la tabla de datos original. Cuando la prueba resulta negativa, significa que existen elongaciones en ciertas direcciones del hiperespacio, lo que implica que existen correlaciones entre las variables. Por lo cual se ha calculado el estadístico χ^2_{calc}

$$\chi^2_{calc} = - \left(n - 1 - \frac{(2p+5)}{6} \right) \ln |R|$$

Siendo $|R|$ el valor absoluto del determinante de la matriz de correlación, cabe recordar que se trata de una matriz simétrica por lo que en la Tabla 2 del Apéndice B solo se muestran los valores correspondientes a la mitad inferior de la matriz. Con un determinante $|R|=7.15 \times 10^{-31}$ se obtiene un $\chi^2_{calc} = 1261$, el valor χ^2_{crit} se busca con $p(p-1)/2g.d.l.$ con lo cual se obtiene un $\chi^2_{crit} = 129.18$ a un nivel de confianza del 95%. Las hipótesis planteadas son las siguientes:

- $H_0 \chi_{calc}^2 < \chi_{crit}^2$: Las variables están correlacionadas entre sí y no es posible reducir el sistema de datos.
- $H_1 \chi_{calc}^2 > \chi_{crit}^2$: Solo algunas variables están correlacionadas entre sí y por tanto se puede reducir el sistema de datos.

El comparativo $\chi_{calc}^2 = 1261 > \chi_{crit}^2 = 129.18$ demuestra que se debe rechazar H_0 , lo que implica que se puede reducir la dimensionalidad de la matriz. Eso significa a su vez que algunas variables pueden ponerse en función de otras, por lo que se puede reducir la dimensionalidad de forma apreciable mediante el PCA usando un número reducido de “nuevos factores”. En la Tabla 3 del Apéndice B se muestran los componentes principales para la matriz de correlación junto con los porcentajes de varianza explicada para cada uno de los factores analizados. El primer componente principal se define como la combinación lineal de las variables originales que tiene varianza máxima. El número de vectores que es necesario retener en el modelo no es mayor que el número de fuentes significativas de varianzas presentes en los datos. Los dos primeros componentes explican el 96.3 % de la información, el tercer componente solo explica el 2.7 % de los datos. Los componentes principales pueden verse como un conjunto nuevo de variables y se puede estudiar su distribución individual y conjunta, pueden representarse de una forma plana, puesto que de acuerdo con lo anterior puede ser modelada adecuadamente con tan sólo dos vectores. Cuando el componente principal 1 es graficado contra el componente principal 2 (Figura 4.13), es posible observar una división de las muestras en dos grupos. En la parte superior del gráfico es posible observar los datos correspondientes a las muestras de suero sanguíneo positivas a distintos tipos de carcinomas y en la parte inferior se han agrupado el conjunto de datos para las muestras de suero sanguíneo controles o negativas.

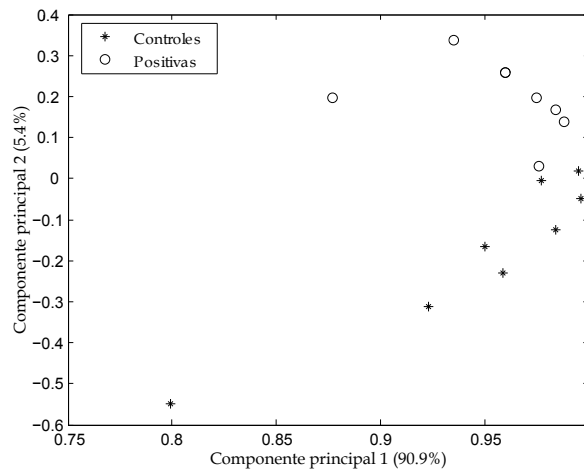


Figura 4.13: Gráfico de componentes principales en 25 frecuencias de análisis.

A pesar de lograr observar una separación de las 15 muestras analizadas, la varianza no se encuentra distribuida de forma razonable entre los dos componentes principales, por lo que el uso de las 25 frecuencias analizadas no representa un modelo adecuado.

Con la finalidad de encontrar las variables que tienen una mayor contribución a la respuesta del sistema, se construyó un gráfico de cargas de los componentes 1 y 2 vs la frecuencia (Tabla 4 Apéndice B). En la Figura 4.14 es posible observar el conjunto de frecuencias que aportan información útil en el intervalo 4.217-0.075 Hz. El test de Bartlett en este intervalo indica que es posible la reducción de datos del sistema.

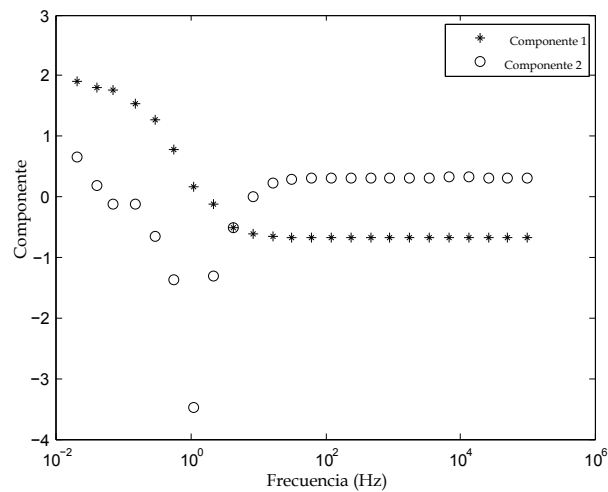


Figura 4.14: Gráfico de cargas del componente 1 y 2.

Las nuevas frecuencias seleccionadas para el PCA son: 4.217, 2.154, 1.101, 0.562, 0.287, 0.147, 0.075 Hz, los valores de ΔZ correspondientes a cada muestra (control y positiva) en las distintas frecuencias se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: ΔZ en 7 frecuencias (4.217, 2.154, 1.101, 0.562, 0.287, 0.147, 0.075 Hz) obtenidos del análisis de EIS.

| Muestra | Diferencial de impedancia ΔZ (k Ω) | | | | | | |
|------------|--|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Frecuencia (Hz) | | | | | | |
| | 4.217 | 2.154 | 1.101 | 0.562 | 0.287 | 0.147 | 0.075 |
| Control 1 | 6.131 | 38.955 | 58.841 | 69.765 | 81.919 | 92.425 | 90.943 |
| Control 2 | 20.529 | 72.192 | 186.780 | 224.794 | 272.047 | 286.984 | 307.948 |
| Control 3 | 15.693 | 52.619 | 181.912 | 148.187 | 170.274 | 177.945 | 177.263 |
| Control 4 | 11.124 | 66.079 | 86.797 | 225.731 | 306.193 | 351.263 | 398.406 |
| Control 5 | 24.772 | 55.921 | 110.560 | 94.711 | 100.302 | 100.290 | 99.824 |
| Control 6 | 11.769 | 71.303 | 125.502 | 164.894 | 204.784 | 226.181 | 252.912 |
| Control 7 | 12.637 | 84.664 | 107.724 | 162.164 | 205.857 | 223.664 | 256.858 |
| Control 8 | 39.989 | 60.902 | 69.867 | 76.720 | 78.370 | 77.309 | 98.039 |
| Positiva 1 | 6.829 | 30.807 | 28.517 | 205.282 | 290.761 | 336.648 | 355.779 |
| Positiva 2 | 3.847 | 23.140 | 30.332 | 124.916 | 194.346 | 236.306 | 250.067 |
| Positiva 3 | 12.839 | 16.353 | -70.408 | 112.380 | 164.609 | 191.527 | 199.067 |
| Positiva 4 | -4.570 | 13.461 | -95.115 | 77.545 | 135.919 | 173.317 | 221.143 |
| Positiva 5 | 0.958 | 7.104 | 121.450 | 72.935 | 143.885 | 176.514 | 216.165 |
| Positiva 6 | 2.889 | 32.649 | 5.182 | 192.811 | 336.905 | 399.307 | 429.356 |
| Positiva 7 | 1.200 | 26.470 | 13.281 | 94.427 | 183.702 | 259.438 | 283.087 |

Una vez definida la matriz de datos, en esta ocasión de dimensiones 15×7 , se construye la matriz de correlación de Pearson para identificar la correlación entre variables (Tabla 4.4), el valor de r para 13 grados de libertad y $\alpha = 0.05$ es de 0.514, de acuerdo con este valor en la matriz de correlación se encuentran indicados con letras en negritas los coeficientes que resultan significativos.

Nuevamente para determinar si el PCA conduce en este caso a ahorros significativos se hace la prueba de Bartlett, el determinante de la matriz (Tabla 4.4) es $|R|=1.545 \times 10^{-6}$, con este se obtiene un $\chi_{calc}^2 = 145.0$, el valor χ_{crit}^2 se busca con $p(p-1)/2g.d.l.$ con lo cual se obtiene un $\chi_{crit}^2 = 32.7$ a un nivel de confianza del 95%. Las hipótesis planteadas son las mismas que se aplicaron la primera vez. El comparativo $\chi_{calc}^2 = 145.0 > \chi_{crit}^2 = 32.7$ demuestra que se debe rechazar H_0 , lo que implica que se puede reducir la dimensionalidad de la matriz, entonces algunas variables pueden ponerse en función de otras y se puede reducir la dimensionalidad mediante el PCA usando un número menor de “nuevos factores”.

Tabla 4.4: Matriz de correlación de las variables

| | | | | | | | |
|-------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|-------|
| | 4.217 | 2.154 | 1.101 | 0.562 | 0.287 | 0.147 | 0.075 |
| 4.217 | 1.000 | | | | | | |
| 2.154 | 0.615 | 1.000 | | | | | |
| 1.101 | 0.448 | 0.660 | 1.000 | | | | |
| 0.562 | 0.028 | 0.489 | 0.324 | 1.000 | | | |
| 0.287 | -0.280 | 0.161 | 0.055 | 0.907 | 1.000 | | |
| 0.147 | -0.405 | 0.023 | -0.069 | 0.819 | 0.981 | 1.000 | |
| 0.075 | -0.431 | 0.016 | -0.095 | 0.789 | 0.965 | 0.990 | 1.000 |

Contenido de las celdas: correlación Pearson

Número de observaciones: 15 $r_{critico}(0.05,13)=0.514$

Tabla 4.5: Cargas para cada una de las variables examinadas

| Variable | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Factor 4 | Factor 5 | Factor 6 | Factor 7 |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|----------|----------|----------|----------|
| 4.217 | 0.332 | -0.793 | 0.439 | -0.255 | -0.045 | -0.002 | 0.001 |
| 2.154 | -0.164 | -0.911 | 0.084 | 0.365 | -0.053 | 0.008 | -0.001 |
| 1.101 | -0.051 | -0.828 | -0.534 | -0.163 | -0.031 | -0.001 | 0.001 |
| 0.562 | -0.898 | -0.384 | 0.065 | -0.008 | 0.202 | -0.024 | 0.012 |
| 0.287 | -0.996 | -0.021 | 0.042 | -0.064 | 0.015 | 0.029 | -0.038 |
| 0.147 | -0.984 | 0.137 | 0.031 | -0.054 | -0.070 | 0.050 | 0.028 |
| 0.075 | -0.975 | 0.163 | 0.029 | -0.012 | -0.136 | -0.061 | 0.000 |
| Autovalor | 3.857 | 2.338 | 0.493 | 0.232 | 0.070 | 0.008 | 0.002 |
| Varianza explicada | 0.551 | 0.334 | 0.070 | 0.033 | 0.010 | 0.001 | 0.000 |
| Varianza acumulada | 0.551 | 0.885 | 0.955 | 0.988 | 0.998 | 0.999 | 0.999 |

En la Tabla 4.5 se muestran los componentes principales para la matriz de correlación junto con los porcentajes de varianza explicada para cada uno de los factores analizados. El CP1 explica el 55.1% de la varianza, y el CP2 el 33.4%, así en conjunto se acumula el 88.5% de la varianza de la información de la Tabla 4.3, el CP3 únicamente explica el 7% de los datos. De este modo la varianza queda distribuida principalmente en 2 componentes y el modelo es más adecuado respecto del primero.

Al graficar el componente principal 1 contra el componente principal 2 (Figura 4.15), es posible observar una división de las muestras en dos grupos. Debido a la complejidad de la matriz de la muestra, se requirió de la construcción de una función discriminante lineal (FDL) que también se puede observar en la Figura 4.15. En la parte superior de la FDL es posible observar los datos correspondientes a las muestras de suero sanguíneo positivas a diferentes carcinomas y en la parte inferior se han agrupado el conjunto de datos para las muestras de suero sanguíneo negativas o controles.

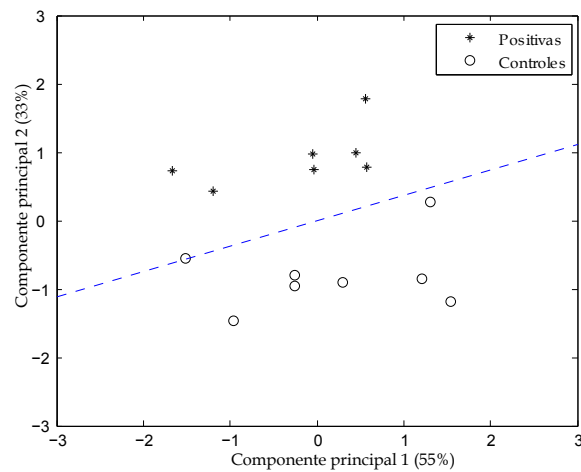


Figura 4.15: Gráfico de componentes principales en 7 frecuencias de análisis.

5. Conclusiones

Con base en la necesidad del desarrollo de métodos de análisis rápido para la detección de enfermedades como cáncer y a la especificidad de las lectinas por determinadas estructuras de carbohidratos, que en algunos casos son biomarcadores, se propuso el desarrollo de un biosensor para la detección del antígeno STn presente en distintos tipos de carcinoma, en el cual el elemento de reconocimiento utilizado fue la lectina SNA.

Para la preparación del biosensor se analizaron las distintas variables involucradas en el sistema. Se observó mediante EIS el reconocimiento de la lectina hacia el antígeno de interés y con base en este reconocimiento se optimizó cada una de las variables; una vez resueltas las condiciones de preparación se evaluaron las características analíticas del biosensor y se logró un tiempo de respuesta corto para llevar a cabo el análisis. Mediante un estadístico t se determinó que pueden existir interferencias debido a las proteínas más abundantes del suero sanguíneo, por lo cual se realizó un tratamiento de muestras con el kit ProteoMiner, esto para incrementar la concentración de glicoproteínas menos abundantes, que son las que presentan al antígeno de interés en su estructura.

La construcción de curvas de calibración mediante adición patrón a las distintas muestras tratadas con el kit ProteoMiner, permitió el cálculo de concentración de glicoproteínas con el antígeno STn contenidas en dichas muestras, el comparativo de la concentración media de muestras de suero sanguíneo de personas sanas y de personas con cáncer, mostró un incremento no significativo respecto al análisis de muestras negativas.

El biosensor construido fue utilizado para la determinación del antígeno STn, que se encuentra presente en las muestras de suero sanguíneo tratadas con el kit. Los resultados de impedancia obtenidos se utilizaron para llevar a cabo un análisis de componentes principales, mediante esta técnica y el análisis discriminante fue posible observar una clasificación de dos grupos de muestras, positivas y negativas. Por lo

tanto se concluyó que es posible discriminar entre muestras positivas y negativas utilizando el biosensor construido y la técnica de análisis de componentes principales.

Se puede concluir que el biosensor construido y optimizado es capaz de reconocer el antígeno STn. Una vez preparado el biosensor el tiempo para la determinación es menor a 10 minutos, que es una de las principales ventajas del biosensor. El uso de muestras de suero sanguíneo para la detección del antígeno STn, representa un impacto importante para el campo clínico, puesto que favorecería además del diagnóstico, el monitoreo continuo de la evolución de la enfermedad.

En trabajos futuros resultaría conveniente la colección de un mayor número de muestras de suero sanguíneo de personas sanas y personas enfermas, para tener un banco de datos de tamaño considerable y con significado estadístico.

Glosario

Apoptosis. Es una forma de muerte celular que está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente, hace posible la destrucción de las células dañadas genéticamente, evitando la aparición de enfermedades como el cáncer.

Glicobiología. Área de la biología que se encarga del estudio de los carbohidratos, así como de la influencia de éstos en las funciones de las células.

Glicoma. Conjunto de carbohidratos de un organismo.

Glicoproteína. Se refiere a la proteína modificada por la unión covalente de un monosacárido o un oligosacárido.

Glicosilación. Es una modificación que consiste en la adición de carbohidratos a proteínas y lípidos.

Homeostasis. Es la propiedad de los organismos vivos para mantener una condición interna estable, compensando los cambios que se producen en su entorno, mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior (metabolismo).

Inmunología. Rama de la biología y de las ciencias biomédicas, se ocupa del estudio del sistema inmunitario.

Metástasis. Proceso de propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició.

Mucina. Las mucinas son una familia de proteínas de alto peso molecular y altamente glicosiladas.

Neoplasia. Término que se utiliza en medicina para designar una masa anormal de tejido, provocada porque las células que lo constituyen se multiplican a un ritmo superior al normal.

Apéndice A.

EIS

La *espectroscopía de impedancia electroquímica* (EIS) es un método efectivo para analizar las características de la superficie de un electrodo modificado química o biológicamente.

En un experimento de EIS, se aplica sobre un sistema electroquímico una señal de tipo sinusoidal de baja amplitud (5 a 10 mV), la cual se superpone a un potencial fijo de corriente directa (DC). Con base a la ley de Ohm, la impedancia puede ser determinada respecto al potencial sinusoidal aplicado, y la corriente sinusoidal generada. Como el potencial y la corriente sinusoidales difieren en magnitud y fase, la impedancia resultante, Z , es usualmente representada por un vector con dos componentes, uno real (Z_{Re}) y uno imaginario (Z_{Im}) como una función de la frecuencia (ω):

$$Z(\omega) = Z_{Re} + jZ_{Im}$$

En ocasiones la interfase electrodo-solución puede ser representada por un circuito equivalente como se muestra en la Figura (A.1), donde R_s denota la resistencia óhmica de la solución electrolito, C_{dl} , la capacitancia de doble capa, R_{ct} la resistencia a la transferencia de carga que existe si una sonda redox esta presente en la solución electrolito y Z_W la impedancia de Warburg resultado de la difusión de los iones redox del seno de la solución de electrolito a la interfase del electrodo.

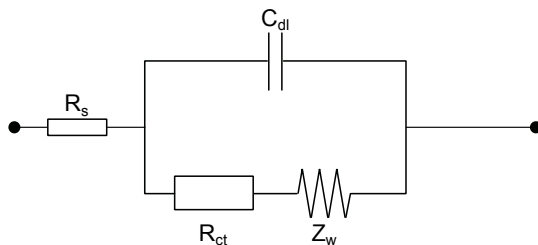


Figura A.1: Circuito equivalente con la representación de las características interfaciales de un biosensor electroquímico en la presencia de una sonda redox.

La R_s y Z_W representan propiedades del seno de la solución y por tanto no resultan afectadas por las especies biológicas inmovilizadas en la superficie del sensor. Por otro lado, C_{dl} y R_{ct} dependen de las propiedades dieléctricas y aislantes de la interface electrodo-electrolito. Por ejemplo, para un electrodo cuya superficie ha sido modificada por la inmovilización de especies químicas y biológicas, la capacitancia de la doble capa debe consistir de una constante de capacitancia del electrodo no modificado (C_b) y una capacitancia variable resultado de la estructura biológica o inmunocomplejo (C_{immun}), como se expresa en la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_b} + \frac{1}{C_{immun}}$$

La estructura biológica o inmunocomplejo es generalmente electroinactiva, su cobertura en la superficie del electrodo disminuye la capacitancia de la doble capa y retarda la cinética de transferencia electrónica de la sonda redox presente en la solución del electrolito. En este caso, R_{ct} puede ser expresada como la suma de la resistencia de transferencia electrónica del electrodo no modificado (R_b) y la del electrodo modificado con un inmunocomplejo (R_{immun}):

$$R_{ct} = R_b + R_{immun}$$

Existen diferentes maneras para representar los datos obtenidos de impedancia Faradaica de un electrodo inmovilizado con elementos químico-biológicos en la presencia de una sonda redox, por ejemplo, Z_{Im} es graficada vs Z_{Re} como una función de frecuencia decreciente para obtener un diagrama de Nyquist como se muestra en la Figura (A.2).

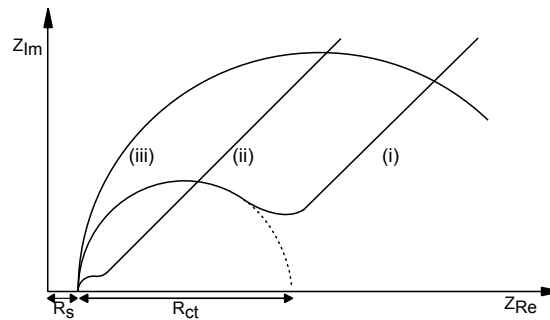


Figura A.2: Diagrama de Nyquist para un electrodo modificado.

Una serie de características pueden ser rápidamente identificadas en un diagrama de Nyquist en función de los procesos de la interface electrodo-solución. En el trazo (i) de la Figura A.2 se muestra un semicírculo con centro localizado en el eje Z_{Re} en

frecuencias altas, seguido por una línea recta a bajas frecuencias. El semicírculo es una característica asociada con el proceso limitado por la transferencia de electrones, mientras que la porción lineal está relacionada con el proceso limitado por difusión del sistema. Para procesos muy rápidos de transferencia de electrones en el diagrama de Nyquist solo se observaría la parte lineal del espectro de impedancia como se observa en el trazo (ii). Por el contrario, si el proceso de transferencia de electrones es el paso determinante, el espectro de impedancia mostrará un gran semicírculo sin línea recta como se observa en (iii). El diámetro del semicírculo corresponde a R_{ct} y la extrapolación del semicírculo producirá una intersección correspondiente a $(R_s + R_{ct})$ [29].

Apéndice B.

Tablas de datos para el análisis de EIS

A continuación se muestran los tabulares de datos para el análisis de componentes principales, en cual se consideró el total de 25 frecuencias de análisis.

Tabla B.1: ΔZ (k Ω) en las frecuencias de análisis por EIS, para el conjunto de muestras de suero sanguíneo control y positivas.

| Frecuencias (Hz) | Diferencial de impedancia ΔZ (k Ω) | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Control | | | | | | | Positiva | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 10000.400 | -0.012 | -0.005 | -0.003 | -0.028 | -0.010 | 0.001 | -0.008 | -0.001 | -0.003 | -0.014 | -0.011 | -0.025 | -0.015 | -0.009 | -0.009 |
| 51089.290 | -0.013 | -0.004 | -0.003 | -0.030 | -0.011 | 0.002 | -0.009 | 0.000 | -0.002 | -0.015 | -0.011 | -0.027 | -0.016 | -0.010 | -0.010 |
| 26101.590 | -0.012 | -0.003 | -0.001 | -0.029 | -0.012 | 0.002 | -0.009 | 0.000 | -0.002 | -0.015 | -0.011 | -0.028 | -0.017 | -0.010 | -0.010 |
| 13335.230 | -0.004 | -0.001 | 0.003 | -0.016 | -0.010 | 0.001 | -0.007 | 0.002 | -0.001 | -0.012 | -0.004 | -0.019 | -0.014 | -0.007 | -0.008 |
| 6812.930 | 0.006 | 0.003 | 0.006 | 0.001 | -0.002 | 0.001 | -0.004 | 0.004 | 0.000 | -0.004 | 0.008 | -0.005 | -0.003 | -0.002 | -0.006 |
| 3480.718 | 0.008 | 0.008 | 0.007 | 0.005 | 0.004 | 0.003 | 0.000 | 0.006 | 0.003 | 0.001 | 0.011 | -0.002 | 0.004 | 0.000 | -0.007 |
| 1778.282 | 0.005 | 0.015 | 0.009 | 0.002 | 0.007 | 0.010 | 0.004 | 0.010 | 0.007 | 0.002 | 0.010 | -0.008 | 0.004 | 0.002 | -0.008 |
| 908.522 | 0.003 | 0.028 | 0.016 | -0.001 | 0.012 | 0.022 | 0.010 | 0.019 | 0.017 | 0.005 | 0.011 | -0.017 | 0.005 | 0.007 | -0.008 |
| 464.163 | 0.004 | 0.055 | 0.030 | -0.003 | 0.021 | 0.045 | 0.021 | 0.041 | 0.034 | 0.010 | 0.018 | -0.033 | 0.012 | 0.018 | -0.005 |
| 237.137 | 0.002 | 0.106 | 0.057 | -0.010 | 0.038 | 0.087 | 0.045 | 0.091 | 0.073 | 0.021 | 0.035 | -0.067 | 0.033 | 0.031 | 0.002 |
| 121.154 | -0.011 | 0.183 | 0.097 | -0.036 | 0.069 | 0.157 | 0.084 | 0.198 | 0.137 | 0.041 | 0.062 | -0.133 | 0.066 | 0.043 | 0.018 |
| 61.897 | -0.038 | 0.302 | 0.154 | -0.096 | 0.139 | 0.271 | 0.151 | 0.457 | 0.256 | 0.070 | 0.103 | -0.250 | 0.095 | 0.051 | 0.046 |
| 31.623 | -0.077 | 0.578 | 0.269 | -0.112 | 0.404 | 0.506 | 0.271 | 1.387 | 0.441 | 0.186 | 0.179 | -0.381 | 0.106 | 0.077 | 0.091 |
| 16.156 | 1.743 | 2.428 | 2.808 | -1.640 | 2.165 | 0.737 | 1.826 | 5.190 | 0.804 | 1.740 | 2.371 | -4.448 | 3.903 | -2.288 | 1.430 |
| 8.254 | 1.222 | 5.418 | 3.020 | 0.952 | 7.817 | 2.648 | 4.687 | 18.099 | 2.401 | 1.435 | 1.060 | -2.068 | 0.315 | -0.227 | 0.900 |
| 4.217 | 6.131 | 20.529 | 15.693 | 11.124 | 24.772 | 11.769 | 12.637 | 39.989 | 6.829 | 3.847 | 12.839 | -4.570 | 0.958 | 2.889 | 1.200 |
| 2.154 | 38.955 | 72.192 | 52.618 | 66.079 | 55.921 | 71.303 | 84.664 | 60.902 | 30.807 | 23.140 | 16.353 | 13.461 | 7.104 | 32.649 | 26.470 |
| 1.101 | 58.841 | 186.780 | 181.912 | 86.797 | 110.560 | 125.502 | 107.724 | 69.867 | 28.517 | 30.332 | -70.408 | -95.115 | 121.450 | 5.182 | 13.281 |
| 0.562 | 69.765 | 224.794 | 148.187 | 225.731 | 94.711 | 164.894 | 162.164 | 76.720 | 205.282 | 124.916 | 112.380 | 77.545 | 72.935 | 192.811 | 94.427 |
| 0.287 | 81.919 | 272.047 | 170.274 | 306.193 | 100.302 | 204.784 | 205.857 | 78.370 | 290.761 | 194.346 | 164.609 | 135.919 | 143.885 | 336.905 | 183.702 |
| 0.147 | 92.425 | 286.984 | 177.945 | 351.263 | 100.290 | 226.181 | 223.664 | 77.309 | 336.648 | 236.306 | 191.527 | 173.317 | 176.514 | 399.307 | 259.438 |
| 0.075 | 90.943 | 307.948 | 177.263 | 398.406 | 99.824 | 252.912 | 256.858 | 98.039 | 355.779 | 250.067 | 199.067 | 221.143 | 216.165 | 429.356 | 283.087 |
| 0.038 | 100.878 | 300.834 | 183.120 | 395.071 | 116.840 | 245.858 | 246.722 | 75.603 | 366.949 | 248.970 | 249.047 | 211.951 | 219.065 | 563.610 | 240.887 |
| 0.020 | 126.566 | 268.278 | 185.937 | 424.527 | 110.809 | 198.811 | 250.519 | 82.719 | 376.044 | 300.696 | 245.363 | 238.590 | 244.338 | 563.676 | 280.928 |
| 0.010 | 132.829 | 287.822 | 233.484 | 290.333 | -15.797 | 106.554 | 236.734 | 71.431 | 366.638 | 288.447 | 289.026 | 56.848 | 222.143 | 626.661 | 285.753 |

Tabla B.2: Matriz de correlación de Pearson.

| | Control | | | | | | | Positiva | | | | | | | |
|------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Control 1 | 1.000 | | | | | | | | | | | | | | |
| Control 2 | 0.971 | 1.000 | | | | | | | | | | | | | |
| Control 3 | 0.975 | 0.982 | 1.000 | | | | | | | | | | | | |
| Control 4 | 0.954 | 0.969 | 0.919 | 1.000 | | | | | | | | | | | |
| Control 5 | 0.747 | 0.830 | 0.794 | 0.808 | 1.000 | | | | | | | | | | |
| Control 6 | 0.906 | 0.969 | 0.919 | 0.963 | 0.916 | 1.000 | | | | | | | | | |
| Control 7 | 0.982 | 0.991 | 0.964 | 0.986 | 0.810 | 0.964 | 1.000 | | | | | | | | |
| Control 8 | 0.920 | 0.948 | 0.938 | 0.901 | 0.877 | 0.938 | 0.943 | 1.000 | | | | | | | |
| Positiva 1 | 0.958 | 0.958 | 0.913 | 0.988 | 0.716 | 0.922 | 0.977 | 0.866 | 1.000 | | | | | | |
| Positiva 2 | 0.967 | 0.948 | 0.914 | 0.980 | 0.689 | 0.900 | 0.972 | 0.856 | 0.995 | 1.000 | | | | | |
| Positiva 3 | 0.912 | 0.879 | 0.829 | 0.935 | 0.563 | 0.820 | 0.917 | 0.770 | 0.974 | 0.975 | 1.000 | | | | |
| Positiva 4 | 0.776 | 0.797 | 0.687 | 0.918 | 0.688 | 0.850 | 0.846 | 0.716 | 0.902 | 0.886 | 0.887 | 1.000 | | | |
| Positiva 5 | 0.970 | 0.961 | 0.952 | 0.964 | 0.749 | 0.915 | 0.969 | 0.877 | 0.961 | 0.971 | 0.905 | 0.817 | 1.000 | | |
| Positiva 6 | 0.950 | 0.915 | 0.884 | 0.953 | 0.618 | 0.852 | 0.945 | 0.806 | 0.982 | 0.989 | 0.987 | 0.866 | 0.956 | 1.000 | |
| Positiva 7 | 0.948 | 0.935 | 0.893 | 0.974 | 0.666 | 0.893 | 0.963 | 0.842 | 0.990 | 0.994 | 0.971 | 0.895 | 0.963 | 0.982 | 1.000 |

Contenido de las celdas: correlación Pearson

Número de observaciones: 25 $r_{critico} (0.05,23)=0.396$

Tabla B.4: Cargas de los componentes principales.

| Frecuencias (Hz) | Componente | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 100000.400 | -0.680 | 0.315 | 0.139 | -0.319 | 0.168 | -0.058 | 0.180 | -0.142 | 0.118 | -0.062 | -0.254 | 0.344 | -0.420 | -0.339 | 0.000 |
| 51089.290 | -0.680 | 0.315 | 0.139 | -0.319 | 0.168 | -0.058 | 0.179 | -0.142 | 0.118 | -0.062 | -0.254 | 0.342 | -0.400 | -0.383 | 0.000 |
| 26101.590 | -0.680 | 0.315 | 0.139 | -0.319 | 0.168 | -0.058 | 0.180 | -0.142 | 0.119 | -0.063 | -0.255 | 0.340 | -0.398 | -0.387 | 0.000 |
| 13335.230 | -0.679 | 0.315 | 0.139 | -0.319 | 0.168 | -0.058 | 0.181 | -0.142 | 0.118 | -0.072 | -0.258 | 0.344 | -0.497 | -0.024 | 0.000 |
| 6812.930 | -0.679 | 0.315 | 0.139 | -0.319 | 0.167 | -0.058 | 0.182 | -0.142 | 0.117 | -0.082 | -0.254 | 0.354 | -0.666 | 0.615 | 0.000 |
| 3480.718 | -0.679 | 0.315 | 0.139 | -0.319 | 0.167 | -0.058 | 0.181 | -0.141 | 0.116 | -0.082 | -0.248 | 0.359 | -0.721 | 0.824 | 0.000 |
| 1778.282 | -0.679 | 0.315 | 0.139 | -0.319 | 0.167 | -0.058 | 0.181 | -0.141 | 0.116 | -0.076 | -0.245 | 0.356 | -0.664 | 0.720 | 0.000 |
| 908.522 | -0.679 | 0.315 | 0.139 | -0.318 | 0.167 | -0.058 | 0.180 | -0.141 | 0.115 | -0.071 | -0.244 | 0.347 | -0.589 | 0.659 | 0.000 |
| 464.163 | -0.679 | 0.314 | 0.139 | -0.317 | 0.168 | -0.057 | 0.177 | -0.139 | 0.114 | -0.068 | -0.239 | 0.331 | -0.504 | 0.727 | 0.000 |
| 237.137 | -0.679 | 0.313 | 0.138 | -0.315 | 0.168 | -0.055 | 0.172 | -0.136 | 0.113 | -0.059 | -0.221 | 0.291 | -0.309 | 0.536 | 0.000 |
| 121.154 | -0.679 | 0.311 | 0.136 | -0.309 | 0.168 | -0.051 | 0.159 | -0.129 | 0.112 | -0.033 | -0.183 | 0.215 | 0.300 | -0.525 | 0.000 |
| 61.897 | -0.678 | 0.307 | 0.134 | -0.294 | 0.164 | -0.041 | 0.133 | -0.111 | 0.111 | 0.028 | -0.137 | 0.033 | 1.527 | -3.184 | 0.000 |
| 31.623 | -0.675 | 0.293 | 0.130 | -0.237 | 0.138 | 0.003 | 0.064 | -0.047 | 0.085 | 0.133 | -0.250 | -0.304 | 4.058 | 0.688 | 0.000 |
| 16.156 | -0.657 | 0.219 | 0.024 | -0.090 | -0.077 | 0.134 | -0.147 | 0.239 | -0.184 | -0.874 | 4.359 | -1.606 | -0.237 | 0.047 | 0.000 |
| 8.254 | -0.622 | -0.005 | 0.063 | 0.748 | -0.558 | 0.574 | -0.942 | 0.965 | -0.132 | 2.243 | -1.302 | -3.532 | -0.635 | 0.032 | 0.000 |
| 4.217 | -0.506 | -0.499 | -0.027 | 1.955 | -1.371 | 0.582 | -2.212 | 2.546 | -0.971 | -1.030 | -0.079 | 1.757 | 0.143 | -0.004 | 0.000 |
| 2.154 | -0.128 | -1.301 | -0.065 | 2.647 | -1.477 | 0.019 | 0.725 | -3.220 | -0.961 | 0.460 | 0.206 | 0.266 | 0.032 | 0.003 | 0.000 |
| 1.101 | 0.159 | -3.481 | -2.353 | -2.187 | -0.394 | 0.572 | -0.267 | 0.045 | 0.027 | -0.076 | -0.113 | -0.026 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 0.562 | 0.770 | -1.359 | 0.048 | 1.807 | 1.237 | -2.242 | 1.144 | 1.017 | 1.941 | -1.792 | -0.592 | -1.049 | -0.050 | -0.016 | 0.000 |
| 0.287 | 1.267 | -0.650 | 0.401 | 0.451 | 1.406 | -0.795 | 0.260 | 0.944 | 0.227 | 3.508 | 1.358 | 1.696 | 0.067 | 0.016 | 0.000 |
| 0.147 | 1.536 | -0.122 | 0.685 | -0.219 | 1.417 | 0.706 | 1.555 | 0.678 | -3.655 | -0.880 | -0.524 | -0.595 | -0.027 | 0.010 | 0.000 |
| 0.075 | 1.764 | -0.119 | 1.157 | 0.372 | 0.957 | 3.508 | -0.656 | -0.686 | 1.989 | -0.595 | -0.046 | 0.033 | -0.003 | -0.005 | 0.000 |
| 0.038 | 1.796 | 0.191 | 1.126 | -1.122 | 0.047 | -2.094 | -3.162 | -1.491 | -0.525 | -0.446 | -0.194 | -0.359 | -0.035 | 0.002 | 0.000 |
| 0.020 | 1.908 | 0.646 | 0.913 | -1.064 | -3.554 | -0.315 | 1.726 | 0.895 | 0.705 | 0.097 | 0.029 | 0.039 | 0.031 | -0.010 | 0.000 |
| 0.010 | 1.537 | 2.423 | -3.760 | 0.724 | 0.219 | 0.015 | -0.171 | -0.238 | 0.066 | -0.044 | -0.061 | 0.025 | -0.001 | 0.001 | 0.000 |

Referencias

- [1] V. S. Vaidya y J. V. Bonventre, *Biomarkers in medicine, drug discovery, and environmental health*. Wiley, 2010.
- [2] K. Ohtsubo y J. D. Marth, "Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease," *Cell*, vol. 126, pp. 855–867, 2006.
- [3] Jeffrey D. Esko y Scott B. Selleck, "Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 71, pp. 435–471, 2002.
- [4] R. Kornfeld y S. Kornfeld, "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 54, pp. 631–664, 1985.
- [5] Y. Yamashita, Y. S. Chung, R. Horie, R. Kannagi y M. Sowa, "Alterations in gastric mucin with malignant transformation: novel pathway for mucin synthesis," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 87, pp. 441–446, 1995.
- [6] I. Brockhausen, "Pathways of o-glycan biosynthesis in cancer cells," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1473, pp. 67–95, 1999.
- [7] I. Brockhausen, "Mucin-type o-glycans in human colon and breast cancer: glycodinamics and functions," *European Molecular Biology Organization*, vol. 7, pp. 599–604, 2006.
- [8] G. F. Springer, P. R. Desai, B. D. Spencer, H. Tegtmeier, S. C. Carlstedt, E. F. Scanlon, "T/Tn antigen vaccine is effective and safe in preventing recurrence of advanced breast carcinoma," *Cancer Detection and Prevention*, vol. 19, pp. 374–380, 1995.
- [9] T. A. Gilewski, G. Ragupathi, M. Dickler, S. Powell, S. Bhuta, K. Panageas, R. R. Koganty, J. C. Eng, C. Hudis, L. Norton, A. N. Houghton y P. O. Livingston, "Immunization of high-risk breast cancer patients with clustered sTn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, pp. 2977–2985, 2007.
- [10] D. F. Hayes, R. C. Bast, C. E. Desch, H. Fritsche, N. E. Kemeny, J. M. Jessup, G. Y. Locker, J. S. Macdonald, R. G. Mennel, L. Norton, P. Ravdin, S. Taube y

- R. J. Winn, "Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 88, pp. 1456–1466, 1996.
- [11] X. Fang, B. M. Balgley, y C. S. Lee, "Recent advances in capillary electrophoresis-based proteomic techniques for biomarker discovery," *Electrophoresis*, vol. 30, pp. 3998–4007, 2009.
- [12] U. Manne, R. Srivastava y S. Srivastava, "Recent advances in biomarkers for cancer diagnosis and treatment," *Drug Discovery Today*, vol. 10, pp. 965–976, 2005.
- [13] D. W. Chan, R. A. Beveridge, H. Muss, H. A. Fritsche, G. Hortobagyi, R. Theriault, D. Kiang, B. J. Kennedy y M. Evelengh, "Use of truquant BR radioimmunoassay for early detection of breast cancer recurrence in patients with stage II an stage III disease," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 15, pp. 2322–2328, 1997.
- [14] M. Gion, R. Mione, A. E. Leon y R. Dittadi, "Comparison of the diagnostic accuracy of CA27.29 and CA15.3 in primary breast cancer," *Clinical Chemistry*, vol. 45, pp. 630–637, 1999.
- [15] M. J. Duffy, "Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful?," *Clinical Chemistry*, vol. 47, pp. 624–630, 2001.
- [16] S. Hammarström, "The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues," *Cancer Biology*, vol. 9, pp. 67–81, 1999.
- [17] W. Steinberg, "The clinical utility of the CA 19-9 tumor associated antigen," *American Journal of Gastroenterology*, vol. 85, pp. 350–355, 1990.
- [18] P. J. Johnson, "The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma," *Clinical Liver Disease*, vol. 5, pp. 145–159, 2001.
- [19] M. K. Tuxen, G. Söletormos y P. Dombernowsky, "Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 21, pp. 215–245, 1995.
- [20] N. T. Marcos, S. Pinho, C. Grandela, A. Cruz, B. S. Petit, A. H. Lepers, R. Almeida, F. Silva, V. Morais, J. Costa, J. Kihlberg, H. Clausen y C. A. Reis, "Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the

- cancer associated sialyl-Tn antigen,” *Cancer Research*, vol. 64, pp. 7050–7057, 2004.
- [21] S. E. Baldus y F. G. Hanisch, “Biochemistry and pathological importance of mucin associated antigens in gastrointestinal neoplasia,” *Advances in Cancer Research*, vol. 79, pp. 201–248, 2000.
- [22] S. H. Itzkowitz, E. J. Bloom, W. A. Kokal, G. Modin, S. Hakomori y Y. S. Kim, “Sialosyl-tn. a novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients,” *Cancer*, vol. 66, pp. 1960–1966, 1990.
- [23] H. Kobayashi, T. Terao y Y. Kawashima, “Serum sialyl Tn as an independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 10, pp. 95–101, 1992.
- [24] M. Leivonen, S. Nordling, J. Lundin, K. Boguslawski y C. Haglund , “STn and prognosis in breast cancer,” *Oncology*, vol. 61, pp. 299–305, 2001.
- [25] G. E. Kim, H. Bae, H. Park, S. Kuan, S. C. Crawlwy, J.L. Ho y Y. S. Kim, “Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasms of the pancreas,” *Gastroenterology*, vol. 123, pp. 1052–1060, 2002.
- [26] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Bioquímica*. Editorial Reverté, 2007.
- [27] B. A. Budnik, R. S. Lee y J. A.J. Steen, “Global methods for protein glycosylation analysis by mass spectrometry,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1764, pp. 1870–1880, 2006.
- [28] F. Scheller y F. Schubert, *Biosensors*. Elsevier, 1992.
- [29] X. Zhang, H. Ju y J. Wang, *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications*. Elsevier, 2008.
- [30] Y. Jia, M. Qin, H. Zhang, W. Niu, X. Li, L. Wang, X. Li, Y. Bai, Y. Cao, X. Feng, “Label-free biosensor: A novel phage-modified Light Addressable Potentiometric Sensor system for cancer cell monitoring,” *Biosensors and bioelectronics*, vol. 22, pp. 3261–3266, 2007.
- [31] J. Zhao, Y. Yan, L. Zhu, X. Li, G. Li, “An amperometric biosensor for the detection of hydrogen peroxide released from human breast cancer cells,” *Biosensors and bioelectronics*, vol. 41, pp. 815–819, 2013.

- [32] H. Yang, Z. Li, X. Wei, R. Huang, H. Qi, Q. Gao, C. Li, C. Zhang, "Detection and discrimination of alpha-fetoprotein with a label-free electrochemical impedance spectroscopy biosensor array based on lectin functionalized carbon nanotubes," *Talanta*, vol. 111, pp. 62–68, 2013.
- [33] T. Yang, S. Wang, H. Jin, W. Bao, S. Huang, J. Wang, "An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 178, pp. 310–315, 2013.
- [34] C. L. Nilsson, *Lectins analytical Technologies*. Elsevier, 2007.
- [35] X. Zeng, C. A. S. Andrade, M. D. L. Oliveira, X. L. Sun, "Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 402, pp. 3161–3176, 2012.
- [36] M. D. L. Oliveira, M. T. S. Correia y F. B. Diniz, "Concanavalin a and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, pp. 728–732, 2009.
- [37] J. A. Serrato, R. Lascrain, D. García, y P. Gorocica, "Determinación del perfil de glicosilación de los glicoconjugados de membrana de la línea celular A427 de adenocarcinoma pulmonar humano mediante el uso de lectinas," *Neumología y Cirugía de Torax*, vol. 70, pp. 236–242, 2011.
- [38] E. C. M. Brinkman-Van der Linden, J. L. Soonenburg y A. Varki, "Effects of sialic acid substitutions on recognition by *Sambucus nigra* agglutinin and *Maackia amurensis* hemagglutinin," *Analytical Biochemistry*, vol. 303, pp. 98–104, 2002.
- [39] J. N. Miller y J. C. Miller, *Statics and chemometrics for analytical chemistry*. Pearson, 2010.
- [40] J. E. Jackson, *A user's guide to principal components*. John Wiley, 1991.
- [41] I.T. Jolliffe, *Principal component analysis*. Springer, 2002.
- [42] G. Ramis, Ma. García, *Quimiometría*. Editorial Síntesis, 2001.
- [43] J. P. Neoptolemos, R. Urrutia, J. Abbruzzese y M. Büchler, *Pancreatic cancer*. Springer, 2010.
- [44] N. Li, A. Brahmendra, A. J. Veloso, A. Prashar, X. R. Cheng, V. W. S. Hung, C. Guyard, M. Terebiznik y K. Kerman, "Disposable immunochips for the detection of legionella pneumophila using electrochemical impedance spectroscopy," *Analytical Chemistry*, vol. 84, pp. 3485–3488, 2012.

-
- [45] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, 1996.
- [46] M. Gamella, S. Campuzano, C. Parrado, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, “Microorganisms recognition and quantification by lectin adsorptive affinity impedance,” *Talanta*, vol. 78, pp. 1303–1309, 2009.
- [47] C. Escalante, F. Zeledón y G. Ulate, “Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada,” *Acta Médica Costarricense*, vol. 49, pp. 83–89, 2007.
- [48] B. G. M. Vandeginste, D. L. Massart, L. M. C. Buydens, S. de Jong, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*. Elsevier, 1998.