

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Desarrollo de un Ensayo Basado en Aptámeros para la
Detección de Trombina en Sangre**

Proyecto de investigación

Andrea Cristina Montero Oleas

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 3 de diciembre de 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Desarrollo de un Ensayo Basado en Aptámeros para la Detección de
Trombina en Sangre**

Andrea Cristina Montero Oleas

Calificación:

Nombre del Profesor, Título Académico

Miguel Angel Méndez, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 3 de diciembre de 2015

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Andrea Cristina Montero Oleas

Código: 00105094

Cédula de Identidad: 1724354046

Lugar y fecha: Quito, 3 de diciembre de 2015

DEDICATORIA

A mi familia, por su apoyo incondicional y su paciencia, pero sobre todo por ser mi inspiración y el mejor ejemplo a seguir. Todo lo que soy es gracias a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi eterna gratitud a la Universidad San Francisco de Quito y a todos los profesores que contribuyeron con mi crecimiento humano e intelectual durante mi estadía en esta institución. De todos he aprendido algo que jamás olvidaré.

Agradezco muy especialmente a mi tutor, Miguel Ángel Méndez por ser el promotor de esta idea y confiar en mí para hacerla realidad. Gracias también porque desde mis primeros pasos en esta carrera supo fomentar en mí el amor a la ciencia.

A César Costa, Luis Alberto Pedroza "Mateo" y María de Lourdes Torres, quienes me prestaron las instalaciones y equipos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

A mis padres y hermanas, quienes me han apoyado incondicionalmente, porque cada uno de ustedes representan para mí un modelo a seguir, un ejemplo de perseverancia y dedicación. Muchas gracias por la paciencia y el amor, espero tener toda la vida para agradecerles todo lo que han hecho por mí.

Finalmente quiero agradecer a mis "Biotecs" y demás amigos, mis compañeros de viaje. Sin duda ustedes han contribuido a que estos 5 años sean los mejores de mi vida, un trayecto lleno de anécdotas que se quedarán por siempre en mi corazón. Sin ustedes nada habría sido lo mismo colegas.

RESUMEN

La cuantificación y detección de proteínas son herramientas clave para el desarrollo de biociencias, principalmente en los campos relacionados al diagnóstico de enfermedades, proteómica y el desarrollo de kits de diagnóstico. Sin embargo, los métodos actuales de cuantificación de proteínas pueden presentar grandes desventajas cuando son realizados a gran escala, en donde el precio es una limitante. Como solución a estos problemas, en este trabajo proponemos el desarrollo de un ensayo basado en aptámeros para la detección de proteínas en sangre. Este ensayo consiste en la aplicación de un algoritmo computacional para el diseño de un complejo de aptámeros específico para el reconocimiento y detección de una proteína específica en la sangre, que en el caso de este estudio, es la trombina. El complejo aquí diseñado es una molécula formada por dos secuencias de ADN; el aptámero HD1, de unión específica a trombina y la secuencia c-Myc, la cual tiene una estructura G-cuádruplex paralelo que tiene la capacidad de trabajar como un fluoróforo en presencia del pigmento NMM IX. Posterior al diseño computacional, se usó este complejo para desarrollar un Dot Blot que en lugar de usar anticuerpos usa dicho complejo como sonda de reconocimiento. La fluorescencia resultante del pigmento enlazado al complejo de reconocimiento diseñado, es cuantificada a través del cálculo de la densidad integrada de cada spot, y esto ofrece una idea de la cantidad de trombina en la muestra. Este estudio representa los experimentos iniciales para la estandarización de un protocolo que funcionará para la cuantificación de proteínas en sangre, el cual a futuro puede convertirse en una herramienta clave para el diagnóstico de enfermedades.

ABSTRACT

The detection and quantification of proteins is a key tool for the development of biosciences specially concerning to the diagnosis of diseases, research on proteomics and the development of diagnostic kits. However, current methods for quantifying proteins can exhibit great disadvantages when they are conducted on a large scale where price is a concern. To solve these problems, in this project we propose the development of a system based on aptamers for the detection of proteins in blood. This test consists in applying a computational algorithm for the design of an aptamer based complex for the specific detection and recognition of a protein in blood, which in the case of this study is for thrombin detection. The complex here designed is a molecule consisting of two DNA sequences; first an aptamer HD1, that specifically binds to thrombin, followed by the c-Myc sequence, which has a G-quadruplex parallel structure that has the ability on the presence of the dye NMM IX to work as a fluorescence reporter. After the computational design, this complex was used to develop a Dot Blot that instead of using antibodies use the complex designed as recognition probe. The resulting fluorescence of the pigment bonded to the designed recognition complex is quantified by calculating the integrated density of a digital photograph of each spot, and this gives an idea of the amount of thrombin in the sample. This study represents the initial phase to standardize a protocol that will work for the quantification of proteins in the blood, which in future can become a key tool for the diagnosis of diseases

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Detección y cuantificación de proteínas en sangre	12
1.2. Técnicas de cuantificación convencionales	13
1.3. Costo y dificultad de las técnicas convencionales.....	15
1.4. Biosensores para cuantificación de proteínas.....	16
1.5. Aptámeros: Estructura y propiedades	17
1.6. Aptasensores reportados	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo General:	21
2.2. Objetivos específicos:	21
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. ÁREA DE ESTUDIO	23
5. MATERIALES.....	24
5.1. Diseño computacional del complejo de reconocimiento de trombina.	24
5.2. Trabajo experimental: Preparación de reactivos.....	24
5.3. Verificación experimental del diseño vía espectrofotometría.	24
5.4. Desarrollo del Dot-Blot para detección de trombina en sangre.....	25
5.5. Análisis de Fotografías de membrana.....	25
6. MÉTODOS.....	26
6.1. Diseño computacional del complejo de reconocimiento de trombina.	26
6.2. Trabajo experimental: Preparación de reactivos.....	27
6.3. Verificación experimental del diseño vía espectrofotometría.	29
6.4. Desarrollo del Dot-Blot para detección de trombina en sangre.....	30

6.5. Análisis de fotografías de membrana.....	33
7. RESULTADOS.....	34
7.1. Diseño computacional del complejo de reconocimiento de trombina.	34
7.2. Verificación experimental del diseño.....	38
7.3. Optimización de Dot Blot para el complejo de aptámeros diseñado.	40
8. DISCUSIÓN.....	43
8.1. Diseño computacional del complejo de reconocimiento de trombina.	43
8.2. Verificación del diseño.	43
8.3. Dot Blot para reconocimiento de trombina en sangre.	45
8.4. Sensibilidad del ensayo.	47
8.5. Reducción de costos y dificultad.....	47
9. CONCLUSIONES.....	48
10. RECOMENDACIONES.....	49
11. BIBLIOGRAFIA.....	50
12. TABLAS.....	58
13. FIGURAS.....	63
14. ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Aptámeros de unión a trombina preseleccionados de la literatura.	58
TABLA 2. Aptámeros de unión a NMM IX preseleccionados de la literatura.	58
TABLA 3. Secuencias candidatas formadas a partir de los aptámeros de unión a trombina y NMM IX preseleccionados computacionalmente.	59
TABLA 4. Densidades integradas obtenidas del ensayo de validación experimental del complejo HD1/TT/xc-MYC.	59
TABLA 5. Densidades integradas obtenidas del ensayo comparativo entre incubación posterior de nmm ix y preincubación de NMM IX.	60
TABLA 6. Densidades integradas obtenidas del ensayo comparativo entre preincubación de ADN, NMM IX y plasma, y preincubación de ADN y NMM IX.	60
TABLA 7. Densidades integradas obtenidas del ensayo comparativo entre bloqueo de membrana y no bloqueo.	61
TABLA 8. Densidades integradas obtenidas del ensayo comparativo entre tiempos de lavado.	61
TABLA 9. Densidades integradas obtenidas del ensayo de estandarización de concentraciones de adn empleadas en el dot blot para reconocimiento de protrombina en sangre.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Algoritmo computacional empleado para el diseño del complejo de aptámeros de reconocimiento de trombina en sangre.....	63
FIGURA 2. Espectro de absorción del pigmento nmm ix solo y en presencia del complejo HD1/TT/xc-MYC, el aptámero HD1 y la secuencia c-Myc.	64
FIGURA 3. Fluorescencia de las soluciones de nmm ix solo y en presencia del complejo HD1/TT/xc-Myc y sus controles excitados por un láser de 405 ± 10 nm.....	64
FIGURA 4. Resultados obtenidos del ensayo realizado siguiendo el protocolo de Dot Blot general para proteínas con preincubación de adn con NMM IX.....	65
FIGURA 5. Resultados obtenidos del ensayo realizado siguiendo el protocolo de Dot Blot general para proteínas con incubación posterior de NMM IX y del ensayo con preincubación de ADN con NMM IX.	66
FIGURA 6. Resultados obtenidos del ensayo realizado siguiendo el protocolo de Dot Blot general para proteínas con preincubación de ADN y NMM IX y del ensayo con preincubación de ADN NMM IX y plasma.....	67
FIGURA 7. Resultados obtenidos del Dot Blot con preincubación de ADN y NMM IX con bloqueo y sin bloqueo de membrana.....	68
FIGURA 8. Resultados obtenidos del Dot Blot con preincubación de ADN y NMM IX con diferentes tiempos de lavado de membrana.....	69
FIGURA 9. Resultados obtenidos del Dot Blot realizado para estandarizar la mínima concentración del complejo HD1/TT/xc-Myc necesaria en el ensayo.	69

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Concentración normal de algunas proteínas del plasma	70
ANEXO 2. Esquema de la metodología selex, empleada para el diseño de aptámeros.....	70

1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas actuales de detección y cuantificación de proteínas constituyen herramientas clave en el ámbito clínico y de investigación. Los métodos actuales tienen limitantes que no permiten que se llegue a cuantificar todas las proteínas de la sangre con exactitud. Debido a la demanda actual, es necesario desarrollar y estandarizar nuevas técnicas que permitan; abaratar los costos, disminuir la dificultad de las técnicas actuales y alcanzar niveles de sensibilidad adecuados para el estudio de la sangre. Es por eso que en este trabajo se desarrolla un estudio preliminar para el desarrollo de una nueva técnica para la detección y cuantificación de proteínas en sangre que permita superar las limitantes de las técnicas actuales.

1.1. Detección y cuantificación de proteínas en sangre

La detección y cuantificación de proteínas constituye una herramienta fundamental en varios campos de la ciencia como lo son el diagnóstico clínico de enfermedades, las investigaciones sobre proteómica y los kits de diagnóstico caseros (Zelada-Guillén et al., 2013). Específicamente se presenta el caso del plasma sanguíneo, el cual contiene cientos de proteínas, con cuya identificación y cuantificación se puede obtener información sobre diagnóstico y estadificación de múltiples enfermedades. Sin embargo, los rangos ampliamente variables de concentración de proteínas representan el mayor desafío en el desarrollo de ensayos para detección de proteínas de muy baja concentración (Anexo 1) (Aldrich, 2005; Anderson & Anderson, 2002; Busher, 1990).

Las investigaciones en proteómica basan su enfoque en la medición de los cambios cuantitativos en niveles de expresión, debido a esto, la selección de métodos apropiados de

detección de proteínas es muy importante. La proteómica frecuentemente se basa en la comparación de diferentes perfiles de proteínas y su respuesta a estímulos externos. Con esto, se convierte en un indicador 'en tiempo real' de los procesos fisiológicos que ocurren en la sangre. La meta de la proteómica del plasma y suero es obtener la información más realista posible para diagnóstico y propósitos terapéuticos. Para esto, es necesario partir de una línea base de datos sobre proteómica, lo cual incluye mucho acerca de la abundancia y presencia de las proteínas en el suero (Chandramouli & Qian, 2009; Srinivas, Srivastava, Hanash, & Wright, 2001)

En cuanto a los kits de diagnóstico caseros, estos resultan de gran importancia cuando se requiere un diagnóstico en plazos muy cortos con respecto a las pruebas clínicas convencionales y con un alto grado de precisión. Se trata de pruebas que pueden ser realizadas en casa, las cuales se basan, en su mayoría, en la detección de proteínas en una muestra (Jansen & Lumsden, 1985).

1.2. Técnicas de cuantificación convencionales

Actualmente hay varios métodos bien establecidos para la cuantificación de proteínas individuales en solución o en fase sólida, que se basan en el uso de anticuerpos marcados. Los métodos más comúnmente utilizados son: los inmunoensayos (inmuno-microscopía electrónica, inmunoprecipitación, inmunoelectroforesis, Western Blot, ELISA), espectrofotometría y espectrometría de masas (Bruce et al., 2013)

Los inmunoensayos se caracterizan por usar anticuerpos como sondas de reconocimiento. La inmuno-microscopía electrónica consiste en enlazar anticuerpos marcados, específicos a un target, con partículas de metales pesados, y visualizar la unión target-anticuerpo con un microscopio de transmisión electrónica (Risco et al., 2012). El Western Blot es una técnica

empleada para comparar las abundancias de proteínas separadas en electroforesis. Estas proteínas son inmovilizadas en una matriz de un material polimérico y expuestas a una solución que contiene un anticuerpo marcado con radioactividad, fluorescencia o marcado enzimáticamente. También es posible la cuantificación de proteínas individuales en solución usando una fase sólida en la cual un anticuerpo específico es inmovilizado en una matriz polimérica o en disco de plástico. Se añade una gota de la solución que contiene el target y se forma un complejo antígeno-anticuerpo, el cual es detectado después de colocar una solución que contiene un segundo anticuerpo que reconoce diferentes epítopos del primer anticuerpo. La versión más popular de esta técnica es el Ensayo Inmunsorbente enlazado a Enzimas (ELISA) en el cual los anticuerpos llevan una enzima que convierte un sustrato sin color en un compuesto de color o fluorescente (Akter, Mie, & Kobatake, 2014; Stave, 2002)

Por otro lado, la espectrofotometría, consiste en la medición de la absorbancia de las moléculas en solución. La absorbancia es una función lineal de la concentración molar de acuerdo a la ley de Beer-Lambert-Bouguer:

$$A = \epsilon \times l \times c$$

Donde ϵ es el coeficiente de absorción molar, l es la longitud de la cubeta que atraviesa la luz y c la concentración de la muestra. El coeficiente de absorción molar puede ser fácilmente calculado en base a valores promedio de ϵ de tres aminoácidos cromóforos presentes en la proteína (triptófano, tirosina y cisteína) (Busher, 1990). Estos ensayos no requieren de reactivos adicionales o incubaciones previas. No se necesita preparar estándares y no se consume la muestra analizada. (Busher, 1990; Goodwin & Morton, 1946; Noble & Bailey, 2009; Simonian, 2002).

La espectrometría de masas es una técnica analítica que ayuda a identificar la cantidad y tipo de componentes de una muestra (Zhang et al., 2010). Se basa en el uso de un espectrómetro de masas para determinar la masa de una molécula midiendo la relación masa/carga de los iones. Los iones son generados induciendo la pérdida o la ganancia de carga a partir de especies neutras. Los iones son dirigidos electrostáticamente a un analizador de masa en donde son separados de acuerdo a la relación masa/carga y a la intensidad de la señal que producen, lo cual se expresa en un espectro de masas. Para la cuantificación se asume que la señal medida tiene una dependencia lineal a la cantidad de material en la muestra (Hale, 2013; van Duijn, 2010).

Sin embargo, a pesar de que las técnicas aquí descritas se encuentran bien estandarizadas, existen varias proteínas cuya cuantificación es muy difícil o imposible de medir a través de métodos inmunológicos o espectrofotométricos. Tal es el caso de las isoformas de proteínas, las proteínas modificadas específicamente y las proteínas individuales presentes en muestras biológicas (Hale, 2013; van Duijn, 2010)

1.3. Costo y dificultad de las técnicas convencionales

Los inmunoensayos tienen gran precisión y altos niveles de sensibilidad. Sin embargo, tienen la desventaja de que se puede producir una reacción cruzada de los anticuerpos con otros targets. Otra desventaja comparada con las alternativas actuales, es el uso de anticuerpos como biomarcadores (Zhao & Cheng, 2013). Los anticuerpos han sido ampliamente estudiados, sobre todo debido a su especificidad y a su fácil acceso debido a que no posee protección de propiedad intelectual. No obstante, presentan varias limitaciones, por lo cual hoy en día se estudia varias maneras de sustituirlos. Los anticuerpos son producidos biológicamente en un proceso in vivo difícil de realizar a gran escala sin afectar las

características del producto. Su producción es laboriosa, cara y requiere de un tiempo que varía de semanas a meses. Pueden ser afectados por contaminación viral o bacteriana durante el proceso de producción, lo cual también aumenta su inmunogenicidad. Poseen grandes tamaños que limitan la biodisponibilidad o impiden el acceso a muchos compartimentos biológicos. Son susceptibles a desnaturalización irreversible, lo cual hace que tengan una vida útil limitada. Por lo tanto, debido al uso de anticuerpos, los inmunoensayos pueden resultar caros y difíciles en la técnica (Keefe, Pai, & Ellington, 2010).

En espectrofotometría, se han reportado dos grandes limitaciones. En primer lugar las proteínas varían en la concentración de aminoácidos aromáticos, los cuales son los responsables de la absorbancia en las longitudes de onda de interés, y pueden producir una variación en la absorbancia molar y por lo tanto en la concentración real de la proteína. Otra gran limitación es que este método no mide concentraciones menores a $100\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Murphy & Kies, 1960)

En cuanto a la espectrometría de masas, la gran limitación consiste en que comúnmente hay problemas de resolución de iones cuando se trata de proteínas muy grandes debido a la movilidad de los iones (Pan et al., 2009; Scalbert et al., 2009). Por lo tanto solo ciertas proteínas calibradas se encuentran disponibles para estos análisis (van Duijn, 2010). Otra limitante es el elevado costo del equipo y que se requiere capacitación para poder leer un espectro de masas (Noble & Bailey, 2009).

1.4. Biosensores para cuantificación de proteínas

Los biosensores son dispositivos que incorporan un sensor biológico conectado a un transductor, el cual está encargado de traducir la señal emitida por el sensor y dirigirla hacia un detector de señal (Strehlitz, Nikolaus, & Stoltenburg, 2008). El objetivo es producir una

señal que es proporcional a la concentración del químico a utilizar (Turner, Karube, & Wilson, 1987).

Actualmente se han desarrollado varios biosensores para detección de proteínas, estos están basados generalmente en anticuerpos específicos para una proteína. Sin embargo, también se han desarrollado biosensores basados en otros elementos biológicos de reconocimiento de acuerdo a su especificidad de detección (Leca-Bouvier & Blum, 2005). Una forma de reconocimiento molecular que ha surgido en los últimos años son los aptasensores, los cuales son biosensores basados en aptámeros que funcionan usando varios mecanismos de transducción de señal (Strehlitz et al., 2008).

1.5. Aptámeros: Estructura y propiedades

Los aptámeros son moléculas sintéticas de doble o simple cadena de ADN o ARN que tienen la capacidad de unirse a targets específicos con una alta afinidad y especificidad (Nutiu & Li, 2005a). Se pueden unir a un amplio rango de dianas moleculares como pueden ser proteínas, péptidos, aminoácidos, drogas, iones metálicos e incluso células enteras (Dobrovolsky et al., 2009)

Los aptámeros muestran diferentes arreglos estructurales que varían de acuerdo al target de interés. Los más estudiados actualmente son los de unión específica a trombina y trombospondina, los cuales poseen una arquitectura de G-cuádruple que consiste en dos arreglos planos de cuatro guaninas, cada guanina emparejada a través de dos puentes de hidrógeno no convencionales entre nucleótidos (enlaces Hoogsteen) (Gatto, Palumbo, & Sissi, 2009; Kretz et al., 2010).

1.5.1. Desarrollo de aptámeros.

Los aptámeros son generados por una selección *in vitro* y posterior amplificación con una metodología llamada SELEX (Anexo 2). El punto de partida de esta metodología es una librería de oligonucleótidos sintéticos que consiste en múltiples fragmentos de ácidos nucleicos de simple cadena con diferentes secuencias aleatorias. Para aislar oligonucleótidos de alta afinidad, la librería de ácidos nucleicos, que contienen de 10^{14} a 10^{15} secuencias diferentes, es incubada con la proteína de interés (White, Sullenger, & Rusconi, 2000). Los aptámeros que adoptan conformaciones que permiten enlazarse a una proteína específica son separados de los oligonucleótidos restantes que no se unen al target bajo las condiciones empleadas. Posteriormente se realiza la elucidación de los aptámeros de su proteína y se los amplifica por transcripción reversa y PCR. Este proceso es realizado por varias ocasiones, manteniendo condiciones más severas en cada nuevo ciclo, hasta obtener la secuencia que se une con mayor afinidad a su target (Berezovski, Musheev, Drabovich, & Krylov, 2006; Klug & Famulok, 1994).

1.5.2. Aptámeros para reconocimiento molecular

Por más de tres décadas, los anticuerpos han sido las moléculas más comúnmente utilizadas para reconocimiento molecular dadas sus aplicaciones analíticas, con fines diagnósticos y terapéuticos, objetivos que demandan un reconocimiento molecular en un corto período de tiempo. Sin embargo en los últimos años los aptámeros han sido reportados como excelentes sustitutos de anticuerpos, el uso de aptasensores ha logrado cumplir con las necesidades actuales de rápida detección molecular. Además, presentan varias ventajas que mejoran la eficiencia con respecto a los ensayos basados en anticuerpos. (Brody & Gold, 2000; Jayasena, 1999; Xu & Ellington, 1996).

Debido a las propiedades antes mencionadas, se han desarrollado importantes investigaciones para su uso como herramientas para el diagnóstico clínico, desarrollo de nuevas drogas, sistemas de administración de medicamentos, investigaciones en proteómica, entre otras aplicaciones (Gatto et al., 2009; Nutiu & Li, 2005b; Tasset, Kubik, & Steiner, 1997)

1.6. Aptasensores reportados

1.6.1. Aptasensores ópticos

Se basan en la detección óptica de aptámeros marcados con fluoróforos. Existen dos estrategias frecuentemente empleadas para convertir un aptámero en una sonda fluorescente. La primera consiste en utilizar la secuencia del aptámero como una estructura “beacon-like hairpin”. Esta estructura está marcada en los extremos 5’ y 3’ con un fluoróforo y un inhibidor de fluorescencia (quencher) respectivamente. La unión del aptámero con el target genera un cambio conformacional en la horquilla que hace que se separen el fluoróforo y el quencher, con lo cual se emite fluorescencia (Navani & Li, 2006; Strehlitz et al., 2008).

La segunda estrategia usa al aptámero en un complejo formado por una estructura en dúplex, es decir que un aptámero marcado con un fluoróforo está unido a su cadena complementaria, la cual está marcada con un quencher. La adición del target a este complejo hace que se rompan las fuerzas débiles que unían al dúplex. Esto resulta en el desprendimiento de la cadena complementaria del aptámero y por ende del quencher, con lo cual el fluoróforo queda liberado para emitir su señal (Navani & Li, 2006; Strehlitz et al., 2008).

1.6.2. Aptasensores acústicos

Estos sensores resultan de la medición de la onda acústica de una superficie piezoeléctrica para detectar el cambio de masa de una molécula. Una superficie piezoeléctrica consiste en un cristal que al ser sometido a una tensión mecánica, se polariza y se genera una diferencia de cargas eléctricas en su superficie (Lec & Lewin, 1998). Dicha tensión mecánica es generada por el enlace de un aptámero a una proteína inmovilizada en la superficie piezoeléctrica, ocasionando a su vez el cambio de la onda acústica. Ya que la energía acústica se debe estrictamente a la superficie del cristal, la onda generada es muy sensitiva a cualquier cambio en esta superficie como: cantidad de masa, cambios de viscosidad y conductividad (Ardle & Vetelino, 1994).

1.6.3. Aptasensores Electroquímicos

Un clásico ejemplo de este aptasensor consiste en un ensayo específico para la detección de proteínas con un punto isoeléctrico alto. El sensor consiste en un electrodo modificado con un aptámero de unión a lisozima, cuyo punto isoeléctrico es de 11. En el electrodo se está generando la reacción redox de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4}$ continuamente, y para evitar que esta reacción se produzca, el aptámero está cargado negativamente (Rooney, Coomber, & Bond, 2000). Cuando en la solución se encuentra el target del aptámero, el cual está cargado positivamente, se reducen las cargas negativas en el electrodo y por lo tanto baja la resistencia de transferencia de carga, y esto es medido por el electrodo (D'Amico, Natale, Mosiello, & Zappa, 2012)

1.6.4. Aptasensores basados en vigas colgadas por un extremo

Consiste en una viga micrométrica que contiene un aptámero inmovilizado por un extremo. En presencia de la proteína target, la viga se dobla en el extremo que está colocado el aptámero y se produce una señal mecánica. Este sensor puede ser regenerado y reutilizado con eficacia (Navani & Li, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General:

Desarrollar un método para la detección de proteínas en sangre mediante la estandarización de un nuevo Dot-Blot basado en la detección a través de complejos de aptámeros para el reconocimiento de proteínas.

2.2. Objetivos específicos:

- Diseñar un complejo de aptámeros específico para la detección de trombina en sangre utilizando datos de cristalografía de rayos X y herramientas computacionales.
- Detectar trombina como un ensayo preliminar para su posterior cuantificación en sangre humana y empleo en el diagnóstico clínico de enfermedades.
- Implementar una nueva técnica para el diagnóstico de enfermedades que sea precisa, económica y pueda ser realizada en un laboratorio básico.

3. JUSTIFICACIÓN

Los aptámeros, al ser sustitutos de los anticuerpos, representan una gran estrategia para mejorar la eficiencia de los métodos de diagnóstico basados en anticuerpos. En comparación con los anticuerpos monoclonales, poseen una gran estabilidad puesto que pueden volver a renaturalizarse sin problema después de enfrentarse a condiciones desnaturalizantes. Por otro lado, su producción es más efectiva, menos costosa y podría realizarse localmente puesto que únicamente se requiere su síntesis y posterior amplificación mediante PCR, lo cual se podría realizar en un laboratorio de biología molecular básico; en cambio, para la producción de anticuerpos monoclonales se requiere su identificación y producción a través de procedimientos muy laboriosos y caros que se realizan en laboratorios más sofisticados. Son de tamaño pequeño y además poseen la misma especificidad que los anticuerpos (Jayasena, 1999) (Tasset, Kubit, & Steiner, 1997).

Los métodos actuales de cuantificación de proteínas en sangre pueden resultar muy costosos debido a que las técnicas que se emplean requieren de equipos sofisticados y caros, por lo cual es necesario el diseño de técnicas que abaraten los costos y empleen procedimientos simples y rápidos. Un examen de cuantificación de proteínas en sangre en nuestro país puede llegar a costar \$15 y tardar alrededor de 20 minutos por muestra (Bovera, 2014). Debido a la gran demanda en el diagnóstico clínico de enfermedades, a gran escala, estos precios resultan caros, ineficientes y de difícil acceso para la salud pública. Además, el tiempo que toma una prueba de laboratorio para la cuantificación de proteínas representa una constante preocupación en los hospitales, a menudo se requiere resultados inmediatos para realizar algún procedimiento de emergencia al paciente (DeLoughery,

2004). Con la puesta en práctica de la técnica que proponemos, el costo puede disminuir puesto que no se emplean equipos ni reactivos de alto valor y una vez optimizados no requerirán de personal altamente capacitado.

Adicionalmente, en proyectos futuros, el aptámero puede ser cambiado para el empleo de esta técnica con otras proteínas de interés clínico.

4. ÁREA DE ESTUDIO

El diseño del complejo de aptámeros fue realizado en el Laboratorio de Química Computacional y Teórica de la Universidad San Francisco de Quito (Instituto de Simulación Computacional USFQ). Los estudios ópticos del pigmento (NMM IX) se realizaron en el Laboratorio de Espectroscopía Óptica y Espectrometría de Masas de la Escuela Politécnica Nacional. Las muestras de sangre fueron tomadas de 2 pacientes saludables del personal del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad San Francisco de Quito (Campus Hospital de los Valles) con el permiso 2015-007T del Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito (Mayo-2015) y todos los experimentos relacionados al Dot Blot para reconocimiento de trombina, fueron desarrollados en el mismo laboratorio.

5. MATERIALES

5.1. Diseño computacional del complejo de reconocimiento de trombina.

- Software Visual Molecular Dynamics 1.9.2 (VMD)
- Computador portátil o de escritorio (Windows o Mac)

5.2. Trabajo experimental: Preparación de reactivos.

- Oligonucleótidos: HD1, c-Myc, HD1/TT/xc-Myc y HD1/TT/XXX
- Buffer TE 1X (5mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 7.0)
- Sangre de pacientes saludables
- Tubos vacutainer con citrato de sodio
- Trombina de plasma humano liofilizada (Marca Sigma Aldrich: NIH >1000 unidades/mg)
- Pigmento NMM IX (Marca Frontier Scientific Inc, 5mg)
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)
- T Personal Thermocycler (Biometra)
- NanoDrop 1000 (ThermoScientific)
- Buffer HEPES 1X (50mM HEPES, 40mM KCl, 400 mM NaCl, 0.1% (w/v) TritonX-100, 2% (v/v) DMSO, pH 7.0)
- Buffer de Litio (465mM LiCl, pH 7.0)
- Balanza analítica (Sartorius LA 230 S)

5.3. Verificación experimental del diseño vía espectrofotometría.

- Aptámero HD1, secuencia c-Myc y complejo HD1/TT/xc-Myc
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)

- Pigmento NMM IX (Marca Frontier Scientific Inc, 5mg)
- High Resolution Spectrometer Ocean Optics HR4000CG-UV-NR
- Lámpara DT-Mini-6S
- Cuvetas de plástico para espectrofotometría de 1cm de camino óptico.
- Láser UV de 405 nm \pm 10nm

5.4. Desarrollo del Dot-Blot para detección de trombina en sangre.

- Aptámero HD1, secuencia c-Myc y complejos HD1/TT/xc-Myc y HD1/TT/XXX
- Membranas de nitrocelulosa con poros de 0.45 μ m
- Buffer TBS sin Tween 1X (20mM Tris-Hcl, 150mM NaCl, pH 7.0)
- Buffer TBS con Tween 1X (20mM Tris-Hcl, 150mM NaCl, 0.05% Tween20, pH 7.0)
- Pigmento NMM IX (Marca Frontier Scientific Inc, 5mg)
- Safe Imager 2.0 Blue-Light Transilluminator (luz LED azul)
- Cámara fotográfica Sony Cyber shot dsc rx100

5.5. Análisis de Fotografías de membrana.

- Software Wolfram Mathematica 10
- Software ImageJ 1.50^a

6. MÉTODOS

6.1. Diseño computacional del complejo de reconocimiento de trombina.

6.1.1. Selección de aptámeros.

Inicialmente se realizó una preselección de los aptámeros de unión a NMM IX y a trombina, para esto se realizó una revisión bibliográfica de los aptámeros más estudiados y con mayor especificidad a su target. Luego se realizó una segunda selección haciendo uso del software VMD, para visualizar las estructuras de cristalografía y NMR de cada uno de los aptámeros preseleccionados.

Se utilizó la base de datos Protein Data Bank para descargar los archivos que contienen las coordenadas de las estructuras de cristalografía o NMR (.pdb) de los aptámeros preseleccionados. Estos archivos fueron visualizados en VMD y se analizaron los detalles estructurales de cada aptámero tales como: tamaño, orientación, distancias entre bases nitrogenadas, interacciones que intervienen en el plegamiento y residuos que forman parte de los sitios de unión a trombina.

6.1.2. Diseño de secuencias.

Después de seleccionar los aptámeros en VMD, se armaron las secuencias para el sistema de detección basado en aptámeros. Se unió a los aptámeros con especificidad a trombina, seleccionados, con una secuencia de unión a NMM IX y viceversa. Luego, se realizó un nuevo análisis computacional de las secuencias y se procedió a aprobar o rechazar los diseños propuestos.

Para la aprobación de un diseño se tomaron en cuenta los siguientes criterios: que haya una mínima cantidad de guaninas y adeninas en tándem, si hay la necesidad de un puente entre los dos segmentos funcionales para evitar cambios conformacionales de las dos secciones de ADN, que los iones que estabilizan al aptámero y a c-Myc sean los mismos, que el puente de unión de los dos segmentos funcionales no interfiera con los sitios de unión a la molécula diana (NMM IX o trombina respectivamente).

6.1.3. Identificación de DNAsas en sangre.

Para esto se identificó a las principales enzimas de restricción de la sangre. A partir de esta información, se descargaron los archivos de coordenadas (.pdb) de cada enzima de restricción desde el Protein Data Bank y se realizó un análisis en VMD. En este análisis, se identificó el tipo de sustrato sobre el que actúa cada enzima y se comparó con el diseño propuesto para identificar si contiene secuencias susceptibles a ser identificadas como sitio de restricción por las enzimas. Todo este análisis fue acompañado de una exhaustiva revisión bibliográfica de cada enzima.

6.2. Trabajo experimental: Preparación de reactivos.

Todas las secuencias de ADN fueron sintetizadas en Midland Oligos (Midland, Texas, Estados Unidos) y resuspendidas en buffer TE 1X. Se adquirieron cuatro secuencias; 3 secuencias control: aptámero HD1, secuencia c-Myc y complejo HD1/TT/XXX, este último complejo con una secuencia final parecida en contenido de bases a c-Myc pero con sustituciones de 4 guaninas por timinas, y también se adquirió el complejo diseñado previamente HD1/TT/xc-Myc.

El plasma fue obtenido a partir de la extracción de donantes voluntarios, bajo el permiso número 2015-007T del Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito. La sangre fue extraída en tubos vacutainer de hemólisis con citrato de sodio, inmediatamente fue sometida a centrifugación a 1500 RPM por 15 minutos. Se recogió el sobrenadante, el cual corresponde al plasma sanguíneo, y se realizaron alícuotas en tubos eppendorf.

La trombina fue adquirida liofilizada en Sigma Aldrich y fue resuspendida en agua destilada ultra pura. El pigmento NMM IX fue adquirido de Frontier Scientific y fue diluido en agua para luego ser cuantificado mediante espectrofotometría.

6.2.1. Ensamblaje de Secuencias

Las secuencias fueron ensambladas para preparar los ensayos de Dot Blot respectivos. Se realizaron dos tipos de ensamblaje, uno bajo condiciones óptimas para la formación de las estructuras G-cuádruple y otro bajo condiciones no óptimas.

Ensamblaje bajo condiciones óptimas para G-cuádruple

A este procedimiento fueron expuestas las secuencias HD1 y c-Myc, y los complejos HD1/TT/xc-Myc y HD1/TT/XXX. Cada una de estas secuencias fue sometida a un paso de calentamiento en el termociclador, desde temperatura ambiente a 95° C durante 10 minutos. Posteriormente, en cada tubo se añadió el buffer HEPES 1X, en la misma cantidad en la que se encontraba el ADN, y se corrió el segundo programa de termociclado, el cual consistió en un calentamiento inicial a 95° C por 5 minutos seguido por 2 ciclos de descenso de temperatura hasta 40°C (80°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 40°C por 1 minuto), después se bajó la temperatura a 30°C por 5 minutos y finalmente a 4°C por 10 minutos.

Ensamblaje bajo condiciones para inhibir el plegamiento G-cuádruple.

Este procedimiento fue realizado con la secuencia HD1/TT/xc-Myc. La secuencia resuspendida en buffer TE 1X, fue sometida a un primer paso de calentamiento en el termociclador, desde temperatura ambiente a 95°C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió el buffer de litio, en la misma cantidad en la que se encontraba el ADN, y se corrió el segundo programa de termociclado, el cual consistió en un enfriamiento rápido desde 95°C hasta 4°C (95°C por 10 minutos a 4°C por 10 minutos)

6.3. Verificación experimental del diseño vía espectrofotometría.

Para comprobar que el complejo de reconocimiento de trombina diseñado es el adecuado para el ensayo propuesto y se está ensamblando adecuadamente, se obtuvieron los espectros de absorbancia y emisión (fluorescencia) del complejo y de los dos elementos que lo conforman en presencia del pigmento NMM IX. El equipo utilizado para medir cada uno de los espectros fue un espectrómetro de alta resolución. Para medir los espectros de absorbancia se utilizó una lámpara con una salida espectral de 215 a 2500 nm, la cual viene incorporada en el espectrómetro. En cuanto a los espectros de emisión, como fuente de excitación se empleó un láser UV de 405 ±10 nm.

En todas las mediciones se utilizó como referencia agua destilada, y fueron realizadas en una cubeta de plástico de 1cm de camino óptico. Las primeras mediciones realizadas fueron el espectro de absorción y emisión de NMM IX. A esa misma solución se le añadió el complejo HD1/TT/xc-Myc en una concentración 10 veces en exceso a la concentración de NMM IX, y se midieron nuevamente los espectros de absorbancia y emisión. Se realizó el mismo procedimiento con las secuencias HD1 y c-Myc tratadas con condiciones óptimas de ensamblaje.

6.4. Desarrollo del Dot-Blot para detección de trombina en sangre.

6.4.1. *Dot Blot protocolo general.*

Las secuencias sometidas a ensamblaje óptimo y no óptimo fueron utilizadas para realizar los ensayos de Dot Blot siguiendo el protocolo general para proteínas.

El primer paso fue la activación de la membrana de nitrocelulosa, para esto se marcó con un lápiz las zonas donde se van a cargar las muestras. Luego se inundó la membrana en un contenedor con buffer TBS sin Tween, se sumergió brevemente hasta que esté completamente mojada y se dejó secar sobre un papel filtro durante 5 minutos.

Se continuó colocando 1 μ L de plasma total sobre cada dot marcado previamente con lápiz y se dejó secar. Se procedió a bloquear la membrana, para esto se la sumergió en buffer TBS con Tween por 30 minutos y se dejó secar por 40 minutos. Una vez seca, se colocó 2 μ L de ADN en cada dot y se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados de la membrana con buffer TBS con Tween por 5 minutos cada uno. En cada dot, se colocó 2 μ L del pigmento NMM IX en una concentración que alcance la relación 1:10 con respecto a la cantidad de ADN (Sabharwal, Savikhin, Turek, Nicoludis, Szalai, & Yatsunyk, 2014). Finalmente se realizaron 3 lavados con buffer TBS con Tween durante 5 minutos cada uno, inmediatamente se colocó la membrana sobre el transiluminador y se tomó fotos en la oscuridad.

En este ensayo se realizaron 6 tratamientos que difirieron en el complejo de reconocimiento de trombina utilizado. El primero utilizó el aptámero HD1 con ensamblaje óptimo; el segundo, la secuencia c-Myc con ensamblaje óptimo; el tercero, el complejo HD1/TTxc-Myc con ensamblaje óptimo; el cuarto, el complejo HD1/TT/c-Myc con ensamblaje no óptimo; el

quinto, el complejo HD1/TT/XXX con ensamblaje óptimo y el sexto empleo el complejo HD1/TT/c-Myc ensamblado óptimamente pero en lugar de incubarse con plasma, fue incubado con agua.

6.4.2. Optimización de Dot Blot.

A partir del protocolo general, se consideró ciertas variables para optimización como: forma de incubación del pigmento, forma de incubación del plasma, necesidad de bloqueo de la membrana, tiempos de lavado y concentración de ADN. Para optimizar cada variable, se realizó un ensayo diferente con varios tratamientos realizados por triplicado.

Ensayo con pre-incubación del pigmento con ADN.

Una vez ensambladas las secuencias, se procedió a colocar el pigmento NMM IX en el mismo volumen de ADN en una concentración con relación 10NMM:1ADN y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Se continuó con el protocolo general de Dot Blot para proteínas, con la modificación de que después del bloqueo de la membrana se colocó 2 μ L del complejo aptámeros-NMM IX en cada dot y se dejó incubar en la membrana por 1 hora. Se realizaron los lavados respectivos y se tomaron fotos.

Ensayo con pre-incubación de plasma con complejo ADN-NMM IX.

Este ensayo difirió del ensayo con pre-incubación del pigmento con ADN en que al momento de incubar el ADN con NMM IX, también se incubó el plasma. Es decir en un nuevo tubo eppendorf se colocaron 2 μ L de cada solución (ADN, NMM IX y plasma) y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y en absoluta oscuridad. Con esta solución se siguió

el protocolo general de Dot Blot para proteínas hasta el paso anterior al bloqueo y se dejó incubar en oscuridad por 1 hora y a temperatura ambiente. Se realizaron los lavados respectivos y se procedió a tomar fotos.

Ensayo sin Bloqueo.

Este ensayo se realizó siguiendo el protocolo empleado para el ensayo con pre-incubación del pigmento con ADN. La diferencia fue que no se realizó el bloqueo de la membrana, en lugar de ello se dejó secar el plasma sobre la membrana y enseguida se procedió a colocar el complejo-NMM IX. Después se continuó con el protocolo normal.

Ensayo de tiempos de lavado.

Al igual que en el anterior, este ensayo se realizó siguiendo el protocolo empleado para el ensayo con pre-incubación del pigmento con ADN. La diferencia fue que al realizar los lavados después de la incubación del complejo-NMM IX se probaron 3 tiempos de lavado. Es decir, se realizaron 3 tratamientos con 2, 5 y 10 minutos de lavado respectivamente

Ensayo de estandarización de concentración de ADN.

Nuevamente se empleó el protocolo del ensayo con pre-incubación del pigmento con ADN. Este difirió en la concentración de ADN empleada en cada tratamiento. Se utilizaron concentraciones de 20 μ M, 40 μ M y 90 μ M de ADN y por ende de 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M de NMM IX respectivamente.

6.5. Análisis de fotografías de membrana.

El análisis de fotografías consistió de dos fases; en la primera fase, se realizó una separación de colores de las imágenes en el software Wolfram Mathematica, y en la segunda fase se calculó la densidad integrada de cada muestra en el software ImageJ.

6.5.1. Separación de colores

Cada una de las imágenes fueron procesadas en el software Wolfram Mathematica 10. En primer lugar, se aumentó el contraste y el brillo de todas las imágenes con las opciones “*Lighter*” y “*ImageAdjust*”. Luego se transformó a las imágenes a blanco y negro con la opción “*Binarize*”. Y finalmente se realizó la separación de colores de las imágenes, es decir se utilizó la opción “*ColorSeparate*” para que la imagen muestre únicamente las zonas en donde el color de la foto original se asemeja al rojo, que corresponde a la fluorescencia del pigmento, es decir separa colores rojizos de anaranjados.

6.5.2. Cálculo de densidad Integrada

Las imágenes ya procesadas se abrieron en el software ImageJ. Aquí se realizó una corrección del fondo de la imagen con la opción “*Subtract Background*”. Posteriormente se realizó la medición de la densidad integrada, para esto se empleó la herramienta “*Measure*” y se eligió las opciones “*Integrated density*” y “*Área*”. Cada medición se observa en una tabla que genera el programa después de seleccionar con un círculo cada muestra de la membrana. Esta tabla fue exportada a Excel para realizar el análisis de los valores obtenidos.

7. RESULTADOS

7.1. Diseño computacional del complejo de reconocimiento de trombina.

El principal resultado de esta etapa fue en la elaboración de un algoritmo/proceso para el diseño asistido por computadora del complejo de aptámeros para reconocimiento de trombina en sangre (Figura 1). A continuación se muestra los resultados obtenidos en cada etapa del algoritmo.

7.1.1. Preselección de aptámeros de unión a la proteína diana.

Se encontraron seis moléculas con distinta estructura y afinidad por la diana (Tabla 1), de las cuales se eligió a los aptámeros HD-1 y HD-22. La molécula HD-1 fue preseleccionada porque es el aptámero más estudiado y tiene la estructura más simple. De acuerdo al análisis computacional, posee 15 pares de bases y se une al exosito I de trombina (residuos Lys65, His66, Arg70, Tyr71 and Arg73). Su estructura consiste en dos tétradas planas antiparalelas de guaninas (G-cuádruple) enlazadas por un loop T-G-T y dos pequeños loops T-T que se unen a dos moléculas de trombina. (Spiridonova, Glinkina, Gainutdinov, & Arutyunyan, 2014).

El aptámero HD-22 fue seleccionado porque está formado por la estructura del HD-1 pero con una sustitución de tres bases fuera del G-cuádruplex, el cual se encuentra conservado. Esta molécula se enlaza al exosito II de trombina (Mayer, Rohrbach, Potzsch, & Muller, 2011) (Dupont, Andersen, Botkjaer, & Andreasen, 2005).

Los aptámeros restantes (31TBA, Tog25 y HD1-22) no fueron preseleccionados principalmente porque no se encontraron archivos de coordenadas (.pdb) que puedan ser

analizados con la ayuda de programas de visualización de estructura tridimensional, y las investigaciones realizadas sobre estos aptámeros son escasas. Adicionalmente, el Tog25 se descartó porque es una molécula de ARN y por lo tanto es más inestable en el ambiente.

7.1.2. Preselección de secuencias de unión a NMM IX.

En la Tabla 2 se presentan las moléculas que la literatura indica que presentan una mayor intensidad de fluorescencia en presencia de NMM IX. De estas moléculas, se preseleccionó únicamente al G-cuádruple c-Myc, principalmente porque de acuerdo al análisis asistido por computadora, se trata de una molécula paralela y unimolecular. Que sea una molécula con plegamiento de cadenas paralela es conveniente, puesto que la fluorescencia del pigmento NMM IX tiene preferencia por estas estructuras (Nicoludis, Barrett, Mergny, & Yatsunyk, 2012).

7.1.3. Formación de nuevas secuencias.

En este paso del algoritmo se obtuvieron 4 secuencias como posibles candidatos para la formación del complejo de aptámeros de unión a trombina. Estas secuencias fueron el resultado de la combinación de las estructuras previamente seleccionados en una sola molécula (Tabla 3).

7.1.4. Verificación de la capacidad del ensamblaje del complejo.

Este análisis indicó que solo 3 de las 4 secuencias formadas en el paso anterior se podrán ensamblar adecuadamente sin interferir con la unión de cada uno de los aptámeros a su diana.

El ensamblaje de la combinación de HD1 con c-Myc (5'→3'), no crea interferencia con la diana; el aptámero HD1 se une a trombina cerca al extremo 5', el cual está libre ya que c-Myc se le une hacia el extremo 3'. En cuanto al ensamblaje de la combinación de c-Myc con HD1 (5'→3'), el análisis asistido por paquetes de visualización molecular indica que debe ser descartada ya que el extremo 5' de HD1, que debería interactuar con la trombina, se obstruye al unirse a c-Myc.

Las dos siguientes combinaciones corresponden a la unión de HD22 con c-Myc, la primera en sentido 5'→3' y la segunda en sentido 3'→5'. El análisis indicó que no se genera ningún tipo de interferencia al unir las dos moléculas ya que HD22 termina en un dúplex que no tiene que ver en la unión a la diana de trombina.

7.1.5. Necesidad de un puente entre aptámeros.

El análisis asistido por paquetes de visualización estructural sugirió que en el extremo 3' del aptámero HD1 no hay suficiente espacio para la entrada de otro aptámero, por lo tanto es necesario un puente de dos timinas (HD1/TT/c-Myc) de cadena simple que sirva de unión de ambas moléculas. En las combinaciones restantes no se requiere la inclusión de ningún puente puesto que hay espacio suficiente para la unión y ensamblaje de las moléculas.

7.1.6. Formación de nuevos G-cuádruple.

Se observó que la formación del complejo HD1/TT/c-Myc genera un fragmento (TTGGTTTG) con alto contenido de purinas, lo cual es propicio para el ensamblaje de moléculas de ADN tipo G-cuádruple, que impediría la formación adecuada del complejo de reconocimiento de trombina. Para evitar esto, se realizó una modificación en el segundo nucleótido del extremo 5' del complejo (HD1/TT/xc-Myc), se sustituyó una guanina por una adenina. El

análisis asistido por ordenador indica que este cambio no afecta la estabilidad de la secuencia c-Myc puesto que la guanina sustituida no forma interacciones importantes dentro de la molécula. En las combinaciones restantes no se observa que la unión de los dos aptámeros ocasione la formación de estructuras G-cuádruple puesto que no hay más de tres purinas juntas.

7.1.7. Análisis de concordancia de iones entre aptámeros.

Con este análisis se consideró que en las dos estructuras que forman el complejo de reconocimiento de trombina, los iones que estabilizan las estructuras coincidan. Con HD1, se observaron estructuras en las que la molécula se estabiliza con iones de potasio y sodio (Dobrovolsky et al., 2009; Mayer, Rohrbach, Pötzsch, & Müller, 2011; Pasternak, Hernandez, Rasmussen, Vester, & Wengel, 2011). En cuanto a HD22, se observó y se encontró en la literatura que estas moléculas son estabilizadas únicamente con sodio (Dupont, Andersen, Botkjaer, & Andreasen, 2011; Mayer et al., 2011). Y con c-Myc, se conoce que son moléculas estabilizadas con Li^+ y K^+ (Sabharwal et al., 2014). De esta manera se descartó el uso de las combinaciones formadas con el aptámero HD-22 ya que no hay evidencia de que use potasio para su estabilización. Por lo tanto, como resultado final de este análisis, el complejo de aptámeros de reconocimiento de trombina más óptimo para este ensayo es el HD1/TT/xc-Myc.

7.1.8. Identificación de DNAsas.

En la sangre hay alrededor de cinco DNAsas reportadas; DNAsa I, DNAsa II y fosfodiesterasa I (Cherepanova, Tamkovich, Vlassov, & Laktionov, 2006). De acuerdo al análisis, la DNAsa I puede afectar al complejo HD1/TT/xc-Myc, puesto que según los archivos analizados, actúa

preferiblemente sobre dsDNA y en menor cantidad sobre ssDNA y cromatina. También se observa que actúa sobre una secuencia específica de alrededor de 6 pares de bases. Se descarta que su actividad pueda afectar gravemente la estabilidad del complejo HD1/TT/xc-Myc, puesto que las dos moléculas que lo conforman, tienen una estructura G-cuádruple, con pocos pares de bases en monocadena (puente TT) lo cual no es suficiente para generar un sitio de corte de la enzima, y con ausencia de secuencias dúplex.

Por otro lado, la DNAsa II, tiene un pH óptimo ácido y no requiere activadores para manifestar su actividad endonucleasa (Cherepanova, Tamkovich, Vlassov, & Laktionov, 2006) (Krieser & Eastman, 1998). Se descarta que pueda tener actividad sobre el complejo de aptámeros en este estudio ya que los ensayos fueron realizados a un pH de 7.

La fosfodiesterasa I, actúa como una exonucleasa no específica capaz de usar DNA o RNA como sustrato preferiblemente de cadena simple o desnaturalizado. Su actividad catalítica depende de iones metálicos divalentes y exhibe un pH óptimo alcalino (Cherepanova, Tamkovich, Vlassov, & Laktionov, 2006) (Murai, y otros, 2012) (Davies, Interthal, Champoux, & Hol, 2003). Se descarta que represente un problema para el complejo de aptámeros puesto que ninguno de ellos presenta una estructura en la que quede expuesto un extremo en monohebra.

7.2. Verificación experimental del diseño.

7.2.1. Verificación vía espectrofotometría.

A partir de los ensayos realizados por espectrofotometría, se pudo observar el efecto de la presencia del complejo de aptámeros en unión al pigmento NMM IX. El espectro de absorción de NMM IX en ausencia de ADN presentó un pico de absorbancia a los 378 nm;

este pigmento no presenta emisión en ausencia de ADN. En presencia del complejo HD1/TT/xc-Myc, el pigmento NMM IX presenta un incremento en la señal del pico de fluorescencia y además se observa un corrimiento al rojo de aproximadamente 21nm en el espectro de absorbancia, el cual ahora tiene un pico máximo a los 399nm. En presencia del aptámero HD1, el pigmento presentó un pico en absorbancia a los 397nm, es decir un corrimiento al rojo de 19 nm. Sin embargo, la intensidad del pico observado en el espectro de emisión se mantiene igual. Cuando el pigmento NMM IX está en presencia de la secuencia c-Myc, el pico del espectro de absorbancia también presenta un corrimiento al rojo de 21 nm y en el espectro de emisión, la señal aumenta (Figuras 2 y 3).

7.2.2. Verificación vía Dot Blot.

Los ensayos de Dot Blot realizados con los tratamientos que usan como sonda moléculas control y el complejo HD1/TT/xc-Myc indican que este complejo funciona como se diseñó. En la Figura 4 se observa el resultado obtenido con cada tratamiento, después de la optimización del Dot Blot propuesto. Se observa abundante fluorescencia en el spot correspondiente al complejo HD1/TT/xc-Myc con una densidad integrada promedio de 98.56 ± 4.97 , la cual corresponde a la multiplicación del área en mm por el promedio de los valores en gris de cada pixel del área seleccionada. Hay fluorescencia en menor cantidad en el tratamiento correspondiente al aptámero HD1 y una densidad integrada promedio de 14.87 ± 1.53 . En los demás tratamientos no se observa fluorescencia y se obtuvo un valor de densidad integrada de 0 en la mayoría de los casos (Tabla 4).

7.3. Optimización de Dot Blot para el complejo de aptámeros diseñado.

Con los experimentos realizados, se observó que para que el ensayo basado en nuestro complejo de ADN que funcione, se debe realizar ciertas modificaciones al protocolo general de Dot Blot para proteínas.

El ensayo realizado con preincubación del pigmento NMM IX con ADN fue más exitoso que el realizado con incubación posterior de NMM IX, que sigue el protocolo de Dot Blot para proteínas. En la Figura 5, se observa que en el ensayo con incubación de NMM IX en membrana, el pigmento no se lava completamente en el tratamiento que usa la secuencia c-Myc (densidad integrada 67.99 ± 3). Cabe recalcar que este tratamiento funciona como control puesto que no debería quedarse pegado a la membrana ya que no presente afinidad con protrombina. En contraste, en el ensayo con preincubación del pigmento en solución, después de varios lavados, se logró que todos los tratamientos control se laven casi completamente (densidad integrada 0.05 ± 0.08) y se observó fluorescencia en el tratamiento que utilizó como sonda el complejo HD1/TT/xc-Myc y en menor cantidad en el tratamiento con el aptámero HD1, lo cual era lo esperado (Tabla 5). Adicionalmente, con este experimento, se logró comprobar que el complejo HD1/TT/xc-Myc, que resultó del diseño computacional, funciona adecuadamente para el ensayo basado en Dot Blot aquí propuesto.

En cuanto a los ensayos realizados con preincubación de plasma, se observa que la intensidad de los spots es demasiado baja comparado con el ensayo que utiliza únicamente el pigmento NMM IX preincubado con ADN (Figura 6). En el tratamiento que utiliza HD1/TT/xc-Myc, se observa una densidad integrada de 15,24 para el ensayo realizado con preincubación de ADN, NMM IX y plasma, y una densidad integrada de 29,18 para el ensayo

realizado con preincubación de ADN y NMM IX. Esto indica que el ensayo en el que se preincuba ADN, NMM IX fluoresce alrededor de 1.9 veces más que el ensayo en el que se preincuba ADN, NMM IX y plasma (Tabla 6). Por lo tanto, se descarta este ensayo ya que la señal de fluorescencia es demasiado baja para los propósitos de este estudio, y se conserva el paso de preincubación de NMM IX con ADN sin plasma.

Los ensayos realizados para verificar si el bloqueo de la membrana es necesario, indicaron que el tratamiento de bloqueo es indispensable para obtener mejores resultados. A simple vista se puede ver que la intensidad y definición de todos los tratamientos es mucho mejor cuando se bloquea a la membrana (Figura 7). El análisis de densidad integrada, para el tratamiento que usa el complejo HD1/TT/xc-Myc, indicó un valor de 67,56 en el ensayo sin bloqueo y de 114,43 en el ensayo con bloqueo. Es decir, el ensayo con bloqueo presenta alrededor de 1.7 veces más fluorescencia comparado con el ensayo sin bloqueo. Por otro lado, en el tratamiento que usa el aptámero HD1, se observa una densidad integrada de 31,53 en el ensayo sin bloqueo y de 47,39 en el ensayo con bloqueo. Lo que corresponde a 1.5 veces más fluorescencia en el ensayo con bloqueo (Tabla 7).

Con respecto a los tiempos de lavado, se observó que el tiempo óptimo es de 5 minutos por 3 lavados de membrana. En este ensayo desaparece por completo la fluorescencia del tratamiento control que contiene agua en lugar de plasma (densidad integrada de cero), y se mantiene la fluorescencia de los tratamientos que usan como sonda el aptámero HD1 y el complejo HD1/TT/xc-Myc (densidad integrada de $57,79 \pm 1.07$ y $62,90 \pm 2.21$ respectivamente). Con 10 minutos de lavado, el brillo del tratamiento control desaparece pero el brillo del tratamiento que usa el aptámero HD1 se reduce demasiado, resultando en una densidad integrada de 8 ± 1.77 . Del mismo modo, la fluorescencia de los tratamientos

que usan el complejo HD1/TT/xc-Myc también se ve reducida considerablemente $30,1 \pm 0,71$. Se reduce la fluorescencia en un factor de 2 comparado con el tratamiento que pasó por los 5 minutos de lavado. En cuanto al ensayo realizado con 2 minutos de lavado, se observa que incluso el tratamiento control fluoresce con una densidad integrada de $21,33 \pm 1,86$, lo cual indica que es un tiempo de lavado muy corto para eliminar todo el pigmento que se pega inespecíficamente a la membrana (Figura 8) (Tabla 8).

Finalmente, en el ensayo de estandarización de concentraciones del complejo HD1/TT/xc-Myc, se observó que se obtuvo una señal más brillante cuando se trabajó con una concentración de $20 \mu\text{M}$ de NMM IX independientemente de la concentración de ADN utilizada (Figura 9). Se obtuvo la mayor fluorescencia con una concentración de $40\mu\text{M}/20\mu\text{M}$ (densidad integrada de $508,23 \pm 8,59$), seguida por la concentración $20\mu\text{M}/20\mu\text{M}$ (densidad integrada de $437,30 \pm 8,77$) y finalmente con una concentración $90\mu\text{M}/20\mu\text{M}$ (densidad integrada de $416,70 \pm 4,29$). El análisis de ANOVA de una vía, realizado con las densidades integradas de estas tres concentraciones, indicó que no hay diferencias significativas entre las fluorescencias de estos tres tratamientos ($p=0,95$). Por lo tanto, se considera que la concentración óptima del complejo de HD1/TT/xc-Myc y NMM IX corresponde a una relación $20/20 \mu\text{M}$ respectivamente, la cual además corresponde a la mínima concentración de ADN empleada y por ende se logra economizar este reactivo (Tabla 9).

8. DISCUSIÓN

8.1. Diseño computacional del complejo de reconocimiento de trombina.

Actualmente, los avances tecnológicos permiten el uso de herramientas más sofisticadas que pueden acelerar el avance de las investigaciones. Una de estas herramientas clave, sin duda, son los softwares que permiten visualizar y simular moléculas como ADN o proteínas para luego desarrollar algoritmos que faciliten el diseño de moléculas más complejas (DeGrado, 2003; Penchovsky, 2013). De esta forma, el algoritmo computacional que se presenta en este trabajo, ofrece varias ventajas y beneficios al momento de desarrollar el ensayo basado en aptámeros para la detección de trombina en sangre. En primer lugar, haciendo uso de este algoritmo, se logró obtener una visualización virtual de las moléculas y por ende predecir la estructura del complejo diseñado. Con esto se evitó realizar experimentos innecesarios de prueba y error, con cada diseño inicialmente propuesto y se consiguió reducir la inversión económica y el tiempo del estudio.

Con este algoritmo, se espera poder diseñar moléculas que permitan reconocer en sangre distintos tipos de dianas como fármacos, células u otro tipo de proteínas para poder usarlos en el ensayo de Dot Blot ya optimizado.

8.2. Verificación del diseño.

Los datos obtenidos a partir de espectrofotometría indican que el complejo de aptámeros diseñado, se está ensamblando correctamente y funciona bien para los fines del ensayo aquí propuesto. Se ha reportado que la fluorescencia del pigmento NMM IX incrementa significativamente en presencia de ADN G-cuádruple paralelo y además que ocurre un fenómeno denominado corrimiento al rojo en el espectro de absorbancia (Nicoludis,

Barrett, Mergny, & Yatsunyk, 2012; Sabharwal et al., 2014). El complejo de aptámeros diseñado para el reconocimiento de trombina consta de dos secciones. El aptámero HD1, el cual tiene una estructura G-cuádruple antiparalela y por ende presenta una fluorescencia baja al interactuar con NMM IX (Nicoludis et al., 2012). La secuencia c-Myc, tiene una estructura G-cuádruple paralela, y ha sido reportado como una de las estructuras de ADN que produce mayor fluorescencia en presencia de NMM IX (Sabharwal et al., 2014). Por lo tanto, el incremento en la señal del pico del espectro de emisión, el cual se demuestra con el cambio de color de la muestra cuando es excitada con luz azul, y el corrimiento al rojo del pico en el espectro de absorción indican que el complejo diseñado se está ensamblando correctamente, puesto que de lo contrario los espectros del complejo ADN-NMM IX se mantendrían iguales a los espectros del pigmento NMM IX solo.

Por otro lado, los ensayos de Dot blot realizados, también corroboran a que el complejo de ADN está bien diseñado. El hecho de que no se observe fluorescencia en los tratamientos que usan como sonda el complejo que se sometió a condiciones no óptimas de ensamblaje, indica que la fluorescencia observada en los demás spots, se debe a que el complejo de ADN se está ensamblando de la forma esperada. Tampoco se observa fluorescencia en el tratamiento que usa el complejo HD1/TT/XXX, esto indica que probablemente la secuencia XXX está impidiendo que el aptámero HD1 se ensamble correctamente y por ende que el complejo no se una a trombina y no se quede pegado a la membrana. Esto muestra, que es necesario realizar el análisis computacional de las secuencias para asegurarse de que la unión de las secuencias no ocasione que se modifique la estructura tridimensional de cada segmento. Por otro lado, la fluorescencia observada con el aptámero HD1, fue la esperada debido a que se ha reportado que el pigmento NMM IX si fluoresce en presencia de este

aptámero. Sin embargo, al ser una molécula antiparalela, la señal de fluorescencia es baja, lo cual se demuestra también con el espectro de emisión. Para que la fluorescencia aumente hasta niveles que puedan ser detectados con facilidad en este ensayo, es necesario emplear el complejo HD1/TT/xc-Myc puesto que solo así la fluorescencia aumenta de manera considerable y la detección de trombina en sangre se puede realizar fácilmente.

8.3. Dot Blot para reconocimiento de trombina en sangre.

A partir del protocolo general de Dot Blot para proteínas, se pudo estandarizar del protocolo definitivo para que con el uso del complejo de reconocimiento de trombina, se reconozca exitosamente a esta proteína en sangre. El primer paso estandarizado, fue la preincubación del pigmento NMM IX con el complejo diseñado. Se observó que haciendo esta preincubación en solución, hay resultados mucho más definidos y consistentes. En cuanto al ensayo con incubación posterior del complejo con NMM IX, directamente en la membrana, se observó fluorescencia en el tratamiento control con la secuencia c-Myc, que no debería emitir ninguna señal. Se asume que esta fluorescencia inespecífica se debe a que el pigmento tiene afinidad con la membrana de nitrocelulosa en ausencia de ADN G-cuádruple y por lo tanto los lavados que se realizan no son suficientes para eliminar el pigmento que se pega inespecíficamente.

El siguiente paso estandarizado fue la incubación en membrana del plasma con el complejo ADN-NMM IX. En este ensayo, se observó fluorescencia con la intensidad adecuada y en los tratamientos esperados. En cuanto al ensayo con incubación de plasma con el complejo ADN-NMM IX en solución, si bien hay fluorescencia en los tratamientos esperados, la señal es demasiado baja. Al incubar las tres soluciones juntas, es probable que los componentes del plasma, debido a su gran densidad, bloqueen de alguna forma la unión del pigmento

NMM IX con el ADN, evitando que el pigmento entre en contacto con el complejo de ADN directamente.

Otro paso importante dentro del protocolo del ensayo propuesto, es el bloqueo de la membrana. Se ha reportado que el bloqueo es un paso clave en los inmunoensayos puesto que aumenta en gran cantidad la sensibilidad de detección de la diana (Hoffman, Jump, Kelly, & Ruggles, 1991; Saravis, 1984). Las membranas de nitrocelulosa, mantienen una carga negativa puesto que están formadas por un polímero de celulosa esterificada con tres grupos nitrato. Las proteínas se inmovilizan en estas membranas a través de interacciones hidrofóbicas que ocurren en un medio altamente salino (Gao et al., 2014; Shan, 2011). Por lo tanto, el bloqueo de la membrana con un buffer apropiado, es necesario para crear un medio hipersalino para que la trombina del plasma se inmovilice con mayor afinidad. También es importante para neutralizar la carga de la membrana y evitar que repela al complejo de ADN que va a reconocer a la trombina presente en el plasma.

En cuanto a los ensayos realizados para estandarizar la cantidad de ADN necesaria se observa que una relación 1:1 de ADN y pigmento es suficiente para obtener una buena señal. Sabharwal, et al (2014), reportaron que es necesario una relación 10:1 cuando se trata de ensayos de espectrofotometría. En espectrofotometría se requiere que la cantidad de ADN exceda la de NMM IX, puesto que es necesario que no haya moléculas de pigmento libres ya que de lo contrario en el espectro de absorción se verían dos picos, uno perteneciente solo al pigmento NMM IX (378nm) y otro perteneciente al complejo NMM IX-ADN (399nm). Si se cumple con la relación 20:1, todas las moléculas de NMM IX se saturan de ADN y en el espectro se observa un solo pico a 399 nm aproximadamente. Para los fines del ensayo que se realiza en este trabajo, no es necesario saturar al pigmento puesto que la

lámpara que se utiliza para excitarlo emite luz a 470nm, longitud de onda que solo alcanza a absorber el complejo ADN-NMM IX debido al fenómeno del corrimiento al rojo que se observa en el NMM IX cuando está en presencia de ADN G-cuádruple paralelo (Nicoludis et al., 2012; Sabharwal et al., 2014; Yatsunyk et al., 2013).

8.4. Sensibilidad del ensayo.

El instrumento empleado para observar la fluorescencia de las membranas resultantes del ensayo fue un transiluminador que es comúnmente usado para la visualización de geles de agarosa en laboratorios de biología molecular. Se trata de un equipo que tiene una fuente de luz LED azul y produce luz entre los 430 a 510 nm (ThermoFisher, 2005). Como ya se mencionó, al unir el NMM IX con el complejo HD1/TT/xc-Myc, se genera un corrimiento al rojo de la absorbancia del pigmento, en donde el pico de absorción alcanza hasta los 450 nm. Es decir, la luz del transiluminador excita al complejo ADN-NMM IX solo en la parte final del espectro de absorción, en donde la intensidad es más baja y por ende absorbe menor cantidad de energía, lo cual se refleja en una menor intensidad de fluorescencia (Harris, 2001). Por lo tanto, se podría mejorar con gran eficiencia el ensayo propuesto utilizando un instrumento que emita luz en un pico máximo de 399 nm.

8.5. Reducción de costos y dificultad.

Los métodos actuales de detección de proteínas, presentan varias desventajas relacionadas al alto costo que implican y la dificultad de la técnica. El Dot Blot que proponemos en este trabajo, ofrece una alternativa prometedora que solucionaría estas desventajas. En primer lugar, no se requieren de equipos sofisticados, una vez estandarizada la técnica, se puede trabajar en un laboratorio local básico de biología molecular. No se trata de una técnica complicada y a futuro se podría evolucionar al desarrollo de un kit de diagnóstico que podría

ser utilizado sin mayor dificultad directamente por el paciente. Finalmente, también se pueden reducir los tiempos de procesamiento de muestra puesto que se pueden trabajar varias muestras en una misma membrana al mismo tiempo.

9. CONCLUSIONES

- El ensayo basado en Dot Blot que emplea un complejo de ADN para reconocimiento de trombina funciona correctamente y permite detectar con éxito esta proteína a partir de muestras de plasma.
- El algoritmo computacional propuesto en este trabajo permite diseñar complejos de reconocimiento de proteínas adecuados para su uso en el ensayo propuesto en este trabajo. Con esto se logró obtener un complejo de reconocimiento de trombina de forma rápida, reduciendo el número de experimentos requeridos y la inversión económica.
- El ensayo estandarizado en este trabajo, es un estudio preliminar que busca posteriormente llegar a cuantificar trombina en sangre basándose en la fluorescencia emitida de la muestra, la cual debe ser proporcional a la concentración de la misma.
- El nuevo Dot Blot optimizado ofrece una alternativa prometedora para reemplazar a las técnicas actuales de detección de proteínas y con esto implementar una nueva técnica para el diagnóstico clínico de enfermedades.

10.RECOMENDACIONES

- Los resultados obtenidos en este trabajo son preliminares, puesto que el objetivo final es poder cuantificar trombina en sangre. Por lo tanto se recomienda continuar con el estudio con la técnica del *spiking* para así generar una curva de calibración de trombina y poder identificar la cantidad de proteína en una muestra de plasma.
- Se recomienda utilizar un transiluminador que emita luz en una longitud de onda que tenga su pico de absorbancia máximo a los 399 nm en el caso de detección de trombina con el complejo HD1/TT/xc-Myc. Con esto se puede obtener una mayor sensibilidad en el ensayo e incluso disminuir la concentración de los reactivos utilizados.
- Se recomienda probar el algoritmo computacional generado en este trabajo con otro tipo de proteínas para confirmar que puede ser generalizado para todo tipo de diana.

11. BIBLIOGRAFIA

- Akter, F., Mie, M., & Kobatake, E. (2014). DNA-based immunoassays for sensitive detection of protein. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 1248–1256. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.135>
- Aldrich, S. (2005). Protein Depletion for Plasma and Serum Proteomic Analysis. Retrieved from http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/AlbuminRemoval/SIGMA_ProteinDepletGuide.pdf
- Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 1(11), 845–867.
- Andle, J. C., & Vetelino, J. F. (1994). Acoustic wave biosensors. *Sensors and Actuators A: Physical*, 44(3), 167–176. [http://doi.org/10.1016/0924-4247\(94\)00801-9](http://doi.org/10.1016/0924-4247(94)00801-9)
- Berezovski, M., Musheev, M., Drabovich, A., & Krylov, S. N. (2006). Non-SELEX Selection of Aptamers. *Journal of the American Chemical Society*, 128(5), 1410–1411. <http://doi.org/10.1021/ja056943j>
- Brody, E. N., & Gold, L. (2000). Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(1), 5–13. [http://doi.org/10.1016/S1389-0352\(99\)00004-5](http://doi.org/10.1016/S1389-0352(99)00004-5)
- Bruce, A., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Water, P. (2013). *Essential Cell Biology* (4th ed.).
- Busher, J. T. (1990). Serum Albumin and Globulin. In H. K. Walker, W. D. Hall, & J. W. Hurst (Eds.), *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* (3rd

ed.). Boston: Butterworths. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK204/>

Chandramouli, K., & Qian, P.-Y. (2009). Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity. *Human Genomics and Proteomics : HGP, 2009*. <http://doi.org/10.4061/2009/239204>

D'Amico, A., Natale, C. D., Mosiello, L., & Zappa, G. (2012). *Sensors and Microsystems: AISEM 2011 Proceedings*. Springer Science & Business Media.

DeGrado, W. F. (2003). Computational biology: Biosensor design. *Nature, 423*(6936), 132–133. <http://doi.org/10.1038/423132a>

Dobrovolsky, A. B., Titaeva, E. V., Khaspekova, S. G., Spiridonova, V. A., Kopylov, A. M., & Mazurov, A. V. (2009). Inhibition of Thrombin Activity with DNA-Aptamers. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 148*(1), 33–36.

Dupont, D. M., Andersen, L. M., Botkjaer, K. A., & Andreasen, P. A. (2011). Nucleic acid aptamers against proteases. *Current Medicinal Chemistry, 18*(27), 4139–4151.

Gao, X., Xu, L.-P., Xue, Z., Feng, L., Peng, J., Wen, Y., ... Zhang, X. (2014). Dual-Scaled Porous Nitrocellulose Membranes with Underwater Superoleophobicity for Highly Efficient Oil/Water Separation. *Advanced Materials, 26*(11), 1771–1775. <http://doi.org/10.1002/adma.201304487>

Gatto, B., Palumbo, M., & Sissi, C. (2009). Nucleic Acid Aptamers Based on the G-Quadruplex Structure: Therapeutic and Diagnostic Potential. *Current Medicinal Chemistry, 16*(10), 1248–1265. <http://doi.org/10.2174/092986709787846640>

- Goodwin, T. W., & Morton, R. A. (1946). The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Biochemical Journal*, *40*(5-6), 628–632.
- Hale, J. E. (2013). Advantageous Uses of Mass Spectrometry for the Quantification of Proteins. *International Journal of Proteomics*, *2013*, e219452. <http://doi.org/10.1155/2013/219452>
- Harris, D. C. (2001). *Análisis químico cuantitativo*. Reverte.
- Hoffman, W. L., Jump, A. A., Kelly, P. J., & Ruggles, A. O. (1991). Binding of antibodies and other proteins to nitrocellulose in acidic, basic, and chaotropic buffers. *Analytical Biochemistry*, *198*(1), 112–118.
- Jansen, B. S., & Lumsden, J. H. (1985). Sensitivity of Routine Tests for Urine Protein to Hemoglobin. *The Canadian Veterinary Journal*, *26*(7), 221–223.
- Jayasena, S. D. (1999). Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clinical Chemistry*, *45*(9), 1628–1650.
- Keefe, A. D., Pai, S., & Ellington, A. (2010). Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, *9*(7), 537–550. <http://doi.org/10.1038/nrd3141>
- Klug, S. J., & Famulok, M. (1994). All you wanted to know about SELEX. *Molecular Biology Reports*, *20*(2), 97–107. <http://doi.org/10.1007/BF00996358>
- Kretz, C. A., Cuddy, K. K., Stafford, A. R., Fredenburgh, J. C., Roberts, R., & Weitz, J. I. (2010). HD1, a thrombin- and prothrombin-binding DNA aptamer, inhibits thrombin generation by attenuating prothrombin activation and thrombin feedback reactions. *Thrombosis and Haemostasis*, *103*(1), 83–93. <http://doi.org/10.1160/TH09-04-0237>

- Leca-Bouvier, B., & Blum, L. J. (2005). Biosensors for Protein Detection: A Review. *Analytical Letters*, 38(10), 1491–1517. <http://doi.org/10.1081/AL-200065780>
- Lec, R. M., & Lewin, P. A. (1998). Acoustic wave biosensors. In *Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 1998 (Vol. 6, pp. 2779–2784 vol.6). <http://doi.org/10.1109/IEMBS.1998.746061>
- Mayer, G., Rohrbach, F., Pötzsch, B., & Müller, J. (2011). Aptamer-based modulation of blood coagulation. *Hämostaseologie*, 31(4), 258–263. <http://doi.org/10.5482/ha-1156>
- Murphy, J. B., & Kies, M. W. (1960). Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 45, 382–384. [http://doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)91464-5](http://doi.org/10.1016/0006-3002(60)91464-5)
- Navani, N., & Li, Y. (2006). Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(3), 272–281. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.04.003>
- Nicoludis, J. M., Barrett, S. P., Mergny, J.-L., & Yatsunyk, L. A. (2012). Interaction of human telomeric DNA with N-methyl mesoporphyrin IX. *Nucleic Acids Research*, 40(12), 5432–5447. <http://doi.org/10.1093/nar/gks152>
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. (2009). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 463, 73–95. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)
- Nutiu, R., & Li, Y. (2005a). Aptamers with fluorescence-signaling properties. *Methods*, 37(1), 16–25. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.07.001>

- Nutiu, R., & Li, Y. (2005b). In Vitro Selection of Structure-Switching Signaling Aptamers. *Angewandte Chemie*, *117*(7), 1085–1089. <http://doi.org/10.1002/ange.200461848>
- Pan, S., Aebersold, R., Chen, R., Rush, J., Goodlett, D. R., McIntosh, M. W., ... Brentnall, T. A. (2009). Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications. *Journal of Proteome Research*, *8*(2), 787–797. <http://doi.org/10.1021/pr800538n>
- Pasternak, A., Hernandez, F. J., Rasmussen, L. M., Vester, B., & Wengel, J. (2011). Improved thrombin binding aptamer by incorporation of a single unlocked nucleic acid monomer. *Nucleic Acids Research*, *39*(3), 1155–1164. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq823>
- Penchovsky, R. (2013). Computational design and biosensor applications of small molecule-sensing allosteric ribozymes. *Biomacromolecules*, *14*(4), 1240–1249. <http://doi.org/10.1021/bm400299a>
- Ray, P., & White, R. R. (2010). Aptamers for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceuticals*, *3*(6), 1761–1778. <http://doi.org/10.3390/ph3061761>
- Risco, C., Sanmartín-Conesa, E., Tzeng, W.-P., Frey, T. K., Seybold, V., & de Groot, R. J. (2012). Specific, Sensitive, High-Resolution Detection of Protein Molecules in Eukaryotic Cells Using Metal-Tagging Transmission Electron Microscopy. *Structure*, *20*(5), 759–766. <http://doi.org/10.1016/j.str.2012.04.001>
- Rooney, M. B., Coomber, D. C., & Bond, A. M. (2000). Achievement of Near-Reversible Behavior for the [Fe(CN)₆]^{3-/4-} Redox Couple Using Cyclic Voltammetry at Glassy Carbon, Gold, and Platinum Macrodisk Electrodes in the Absence of Added

Supporting Electrolyte. *Analytical Chemistry*, 72(15), 3486–3491.

<http://doi.org/10.1021/ac991464m>

Sabharwal, N. C., Savikhin, V., Turek-Herman, J. R., Nicoludis, J. M., Szalai, V. A., & Yatsunyk, L. A. (2014). N-methylmesoporphyrin IX fluorescence as a reporter of strand orientation in guanine quadruplexes. *FEBS Journal*, 281(7), 1726–1737.
<http://doi.org/10.1111/febs.12734>

Saravis, C. A. (1984). Improved blocking of nonspecific antibody binding sites on nitrocellulose membranes. *ELECTROPHORESIS*, 5(1), 54–55.
<http://doi.org/10.1002/elps.1150050110>

Scalbert, A., Brennan, L., Fiehn, O., Hankemeier, T., Kristal, B. S., van Ommen, B., ... Wopereis, S. (2009). Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics*, 5(4), 435–458. <http://doi.org/10.1007/s11306-009-0168-0>

Shan, G. (2011). *Immunoassays in Agricultural Biotechnology*. John Wiley & Sons.

Simonian, M. H. (2002). Spectrophotometric determination of protein concentration. *Current Protocols in Cell Biology / Editorial Board, Juan S. Bonifacino ... [et Al.]*, Appendix 3, Appendix 3B. <http://doi.org/10.1002/0471143030.cba03bs15>

Srinivas, P. R., Srivastava, S., Hanash, S., & Wright, G. L. (2001). Proteomics in Early Detection of Cancer. *Clinical Chemistry*, 47(10), 1901–1911.

Stave, J. W. (2002). Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: applications, limitations, and practical considerations. *Journal of AOAC International*, 85(3), 780–786.

- Strehlitz, B., Nikolaus, N., & Stoltenburg, R. (2008). Protein Detection with Aptamer Biosensors. *Sensors*, 8(7), 4296–4307. <http://doi.org/10.3390/s8074296>
- Tasset, D. M., Kubik, M. F., & Steiner, W. (1997). Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *Journal of Molecular Biology*, 272(5), 688–698. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1275>
- ThermoFisher. (2005). Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator. Retrieved November 19, 2015, from <http://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/gel-documentation/blue-light-transilluminator.html>
- Turner, A., Karube, I., & Wilson, G. S. (1987). *Biosensors : Fundamentals and Applications*. Oxford University Press. Retrieved from <http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A619968&dswid=-9176>
- Van Duijn, E. (2010). Current Limitations in Native Mass Spectrometry Based Structural Biology. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(6), 971–978. <http://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.12.010>
- What is Proteomics? (n.d.). Retrieved March 24, 2015, from <http://proteomics.cancer.gov/whatisproteomics>
- White, R. R., Sullenger, B. A., & Rusconi, C. P. (2000). Developing aptamers into therapeutics. *Journal of Clinical Investigation*, 106(8), 929–934.
- Xu, W., & Ellington, A. D. (1996). Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 7475–7480.

- Yatsunyk, L. A., Piétrement, O., Albrecht, D., Tran, P. L. T., Renčiuk, D., Sugiyama, H., ... Mergny, J.-L. (2013). Guided Assembly of Tetramolecular G-Quadruplexes. *ACS Nano*, 7(7), 5701–5710. <http://doi.org/10.1021/nn402321g>
- Zelada-Guillén, G. A., Tweed-Kent, A., Niemann, M., Göringer, H. U., Riu, J., & Rius, F. X. (2013). Ultrasensitive and real-time detection of proteins in blood using a potentiometric carbon-nanotube aptasensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 366–371. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.055>
- Zhang, G., Ueberheide, B. M., Waldemarson, S., Myung, S., Molloy, K., Eriksson, J., ... Fenyö, D. (2010). Protein Quantitation Using Mass Spectrometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 673, 211–222. http://doi.org/10.1007/978-1-60761-842-3_13
- Zhao, Q., & Cheng, L. (2013). Detection of thrombin using an excimer aptamer switch labeled with dual pyrene molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(25), 8233–8239. <http://doi.org/10.1007/s00216-013-7240-3>

12. TABLAS

Tabla 1. Aptámeros de unión a trombina preseleccionados de la literatura.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	#Nucleótidos	Orientación
HD-1	GGTTGGTGTGGTTGG	15	Antiparalelo
HD-22	AGTCCGTGGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT	32	Antiparalelo
*Tog25	GGGAACAAAGCUGAAGUACUUACCC	25	Antiparalelo
31TBA	CACTGGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCCAGTG	31	Antiparalelo
HD1-22	GGTAGGTGTGGTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAG TCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT	59	Antiparalelo

*El aptámero Tog 25 es una estructura de ARN, todos los demás aptámeros de la lista corresponden a moléculas de ADN.

Tabla 2. Aptámeros de unión a NMM IX preseleccionados de la literatura.

Nombre	Secuencia 5' --> 3'	# Nucleótidos
G4	TTTTGGGGTTTT	12
G5	TTTTGGGGTTTT	12
G8	TTTTGGGGGGGGTTTT	16
c-Myc	TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA	22

Tabla 3. Secuencias candidatas formadas a partir de los aptámeros de unión a trombina y NMM IX preseleccionados computacionalmente.

Nombre	Secuencia 5' --> 3'	# Nucleótidos
HD1/c-Myc	GGTTGGTGTGGTTGG/ TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA	37
c-Myc/HD1	TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA/ GGTTGGTGTGGTTGG	37
HD22/c-Myc	AGTCCGTGGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT/ TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA	54
c-Myc/HD22	TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA/ AGTCCGTGGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT	54

Tabla 4. Densidades integradas obtenidas del ensayo de validación experimental del complejo HD1/TT/xc-Myc.

Spot	Tratamiento	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación estándar
1	HD1	14,50	13,56	16,56	14,87	1,53
2	c-Myc	0,00	0,00	0,15	0,05	0,08
3	HD1/TT/xc-Myc	93,36	99,08	103,25	98,56	4,97
*4	HD1/TT/xc-Myc No óptimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	HD1/TT/XXX	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	Control con agua	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*El cuarto spot corresponde a un tratamiento realizado con el complejo HD1/TT/xc-Myc ensamblado bajo condiciones no óptimas, por lo tanto se espera que no haya adoptado la estructura G-cuádruplex correspondiente.

Tabla 5. Densidades integradas obtenidas del ensayo comparativo entre incubación posterior de NMM IX y preincubación de NMM IX.

Ensayo	Spot	Tratamiento	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación estándar
Incubación posterior con NMM IX	1	HD1	71,82	71,81	71,47	71,70	0,20
	2	c-Myc	69,26	64,57	70,13	67,99	3,00
	3	HD1/TT/xc-Myc No óptimo	99,52	98,42	99,69	99,21	0,69
	4	HD1/TT/c-Myc óptimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	HD1/TT/XXX	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	6	Control con agua	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Preincubación de NMM IX	1	HD1	14,50	13,56	16,56	14,87	1,53
	2	c-Myc	0,00	0,00	0,15	0,05	0,08
	3	HD1/TT/xc-Myc	93,36	99,08	103,25	98,56	4,97
	4	HD1/TT/xc-Myc No óptimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	HD1/TT/XXX	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	6	Control con agua	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 6. Densidades integradas obtenidas del ensayo comparativo entre preincubación de ADN, NMM IX y plasma, y preincubación de ADN y NMM IX.

Ensayo	Spot	Tratamiento	1	2	3	Promedio	Desviación estándar
Preincubación de ADN con NMM y Plasma	1	HD1	11,32	9,43	8,31	9,69	1,52
	2	HD1/TT/xc-Myc	16,86	15,32	13,54	15,24	1,66
	3	Control sin plasma	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Preincubación de ADN con NMM	1	HD1	13,56	11,64	14,56	13,25	1,48
	2	HD1/TT/xc-Myc	28,97	27,64	30,92	29,18	1,65
	3	Control sin plasma	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 7. Densidades integradas obtenidas del ensayo comparativo entre bloqueo de membrana y no bloqueo.

Ensayo	Spot	Tratamiento	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación estándar
Ensayo sin Bloqueo	*1 y 3	HD1/TT/xc-Mmyc	62,50	71,45	68,74	67,56	4,59
	2	HD1	30,70	32,65	31,23	31,53	1,01
	4	Control sin plasma	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ensayo con Bloqueo	*1 y 3	HD1/TT/xc-Myc	115,17	112,98	115,14	114,43	1,26
	2	HD1	45,97	44,92	51,28	47,39	3,41
	4	Control sin plasma	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*Los valores mostrados en esta celda son el resultado del promedio de los spots 1 y 3 que corresponde a tratamientos que usan el complejo HD1/TT/xc-Myc, realizados por duplicado en cada membrana.

Tabla 8. Densidades integradas obtenidas del ensayo comparativo entre tiempos de lavado.

Tiempos de lavado	Spot	Tratamiento	1	2	3	Promedio	Desviación estándar
2 minutos	*1 y 2	HD1/TT/c-Myc	85,18	85,68	85,13	85,33	0,30
	3	HD1	31,74	33,46	29,89	31,70	1,78
	4	Control sin plasma	21,96	22,79	19,24	21,33	1,86
5 minutos	*1 y 2	HD1/TT/xc-Myc	63,49	64,77	60,46	62,90	2,21
	3	HD1	57,46	58,99	56,92	57,79	1,07
	4	Control sin plasma	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10 minutos	*1 y 2	HD1/TT/xc-Myc	30,20	30,76	29,35	30,10	0,71
	3	HD1	6,13	9,65	8,24	8,00	1,77
	4	Control sin plasma	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*Los valores mostrados en esta celda son el resultado del promedio de los spots 1 y 2 que corresponde a tratamientos que usan el complejo HD1/TT/xc-Myc, realizados por duplicado en cada membrana.

Tabla 9. Densidades integradas obtenidas del ensayo de estandarización de concentraciones de ADN empleadas en el Dot Blot para reconocimiento de protrombina en sangre

Spot	Tratamiento	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación estándar
1	20µM HD1/TT/xc-Myc-5µM NMM	84,63	82,35	86,43	84,47	2,04
2	20µM HD1/TT/xc-Myc-10µM NMM	74,90	72,75	75,98	74,54	1,64
3	20µM HD1/TT/xc-Myc-20µM NMM	435,68	429,45	446,76	437,30	8,77
4	40µM HD1/TT/xc-Myc-5µM NMM	127,62	134,85	135,76	132,74	4,46
5	40µM HD1/TT/xc-Myc-10µM NMM	146,94	152,98	151,23	150,38	3,11
6	40µM HD1/TT/xc-Myc-20µM NMM	512,36	498,35	513,98	508,23	8,59
7	90µM HD1/TT/xc-Myc-5µM NMM	0,00	19,82	9,32	9,71	9,92
8	90µM HD1/TT/xc-Myc-10µM NMM	11,63	12,45	17,89	13,99	3,40
9	90µM HD1/TT/xc-Myc-20µM NMM	412,96	421,38	415,76	416,70	4,29
10	Control sin plasma	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

13. FIGURAS



Figura 1. Algoritmo computacional empleado para el diseño del complejo de aptámeros de reconocimiento de trombina en sangre.

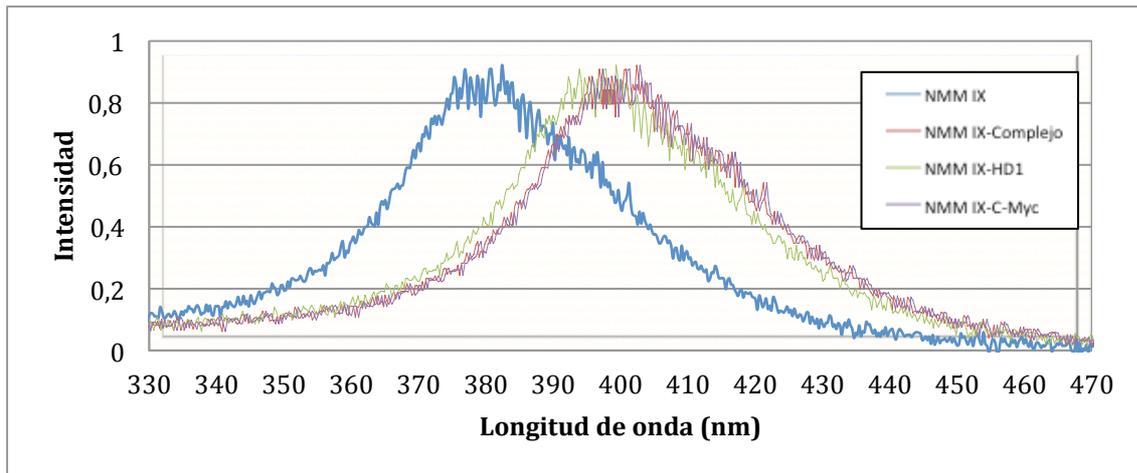


Figura 2. Espectro de absorción del pigmento NMM IX solo y en presencia del complejo HD1/TT/xc-Myc, el aptámero HD1 y la secuencia c-Myc.

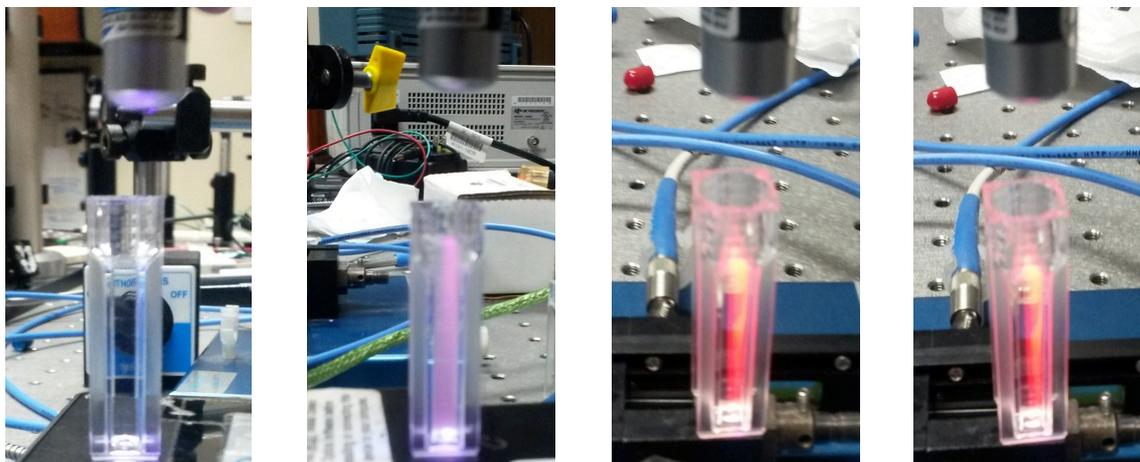


Figura 3. Fluorescencia de las soluciones de NMM IX solo y en presencia del complejo HD1/TT/xc-Myc y sus controles excitados por un láser de 405 ± 10 nm. De izquierda a derecha: NMM IX, NMM IX con aptámero HD1, NMM IX con secuencia c-Myc y NMM IX con complejo HD1/TT/xc-Myc.

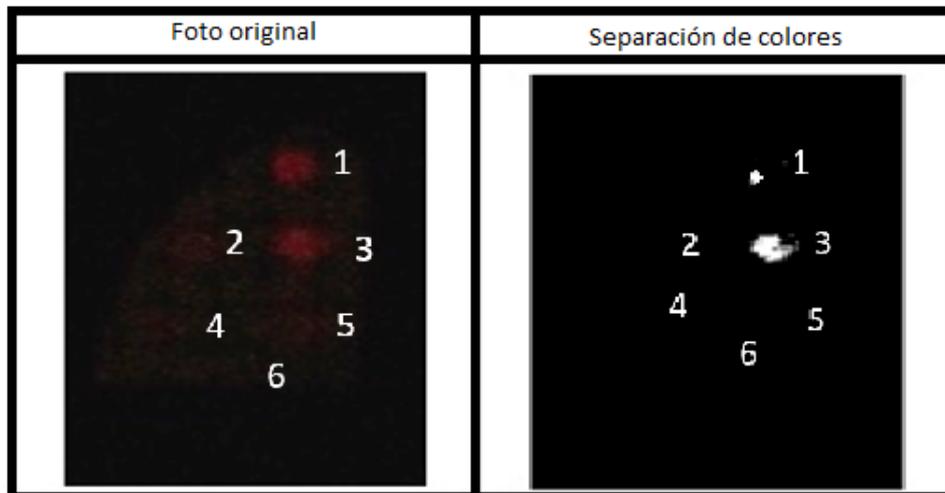


Figura 4. Resultados obtenidos del ensayo realizado siguiendo el protocolo de Dot Blot general para proteínas con preincubación de ADN con NMM IX. Se muestran 6 distintos tratamientos para ambos ensayos, que varían de acuerdo a la sonda de ADN empleada: 1. Aptámero HD1, 2. secuencia c-Myc, 3. Complejo HD1/TT/xc-Myc con ensamblaje óptimo, 4. Complejo HD1/TT/xc-Myc sin ensamblaje óptimo, 5. Complejo HD1/TT/XXX y 6. Control sin plasma.

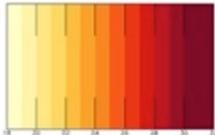
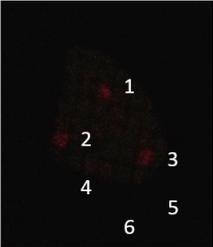
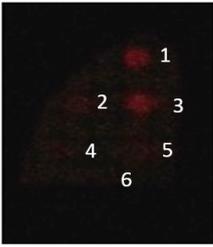
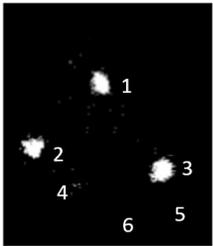
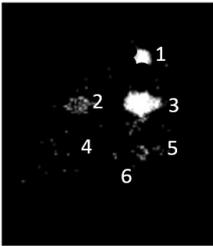
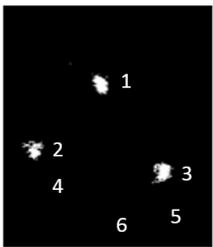
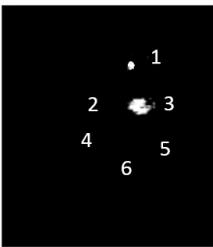
	Control	Incubación posterior de NMM	Preincubación con NMM
Foto original			
Cambio a blanco y negro			
Separación de colores			

Figura 5. Resultados obtenidos del ensayo realizado siguiendo el protocolo de Dot Blot general para proteínas con incubación posterior de NMM IX y del ensayo con preincubación de ADN con NMM IX. Se muestran 6 distintos tratamientos para ambos ensayos, que varían de acuerdo a la sonda de ADN empleada: 1. Aptámero HD1, 2. secuencia c-Myc, 3. Complejo HD1/TT/xc-Myc con ensamblaje óptimo, 4. Complejo HD1/TT/xc-Myc sin ensamblaje óptimo, 5. Complejo HD1/TT/XXX y 6. Control sin plasma.

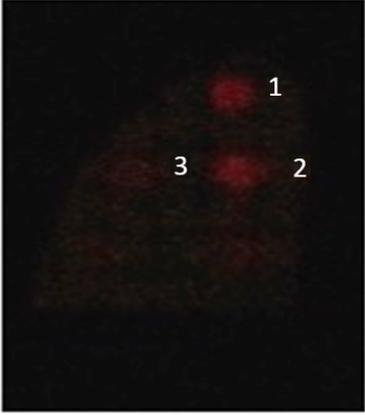
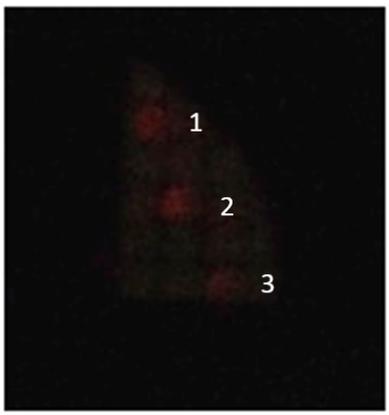
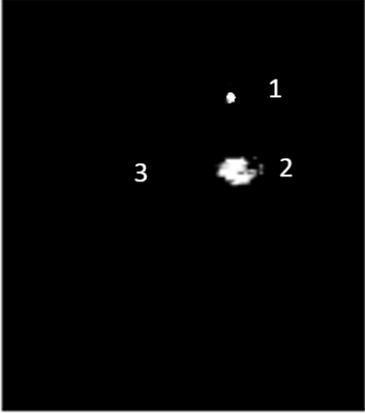
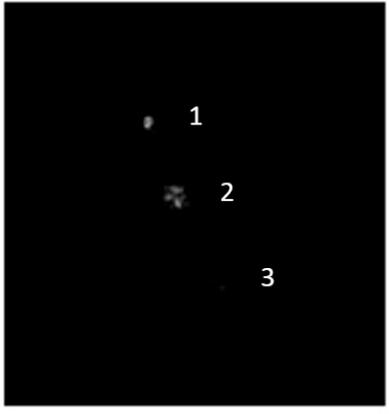
	Preincubación de ADN con NMM	Preincubación de ADN con NMM y Plasma
Foto original		
Separación de colores		

Figura 6. Resultados obtenidos del ensayo realizado siguiendo el protocolo de Dot Blot general para proteínas con preincubación de ADN y NMM IX y del ensayo con preincubación de ADN, NMM IX y plasma. Se muestran 3 distintos tratamientos para ambos ensayos, que varían de acuerdo a la sonda de ADN empleada: 1. Aptámero HD1, 2. Complejo HD1/TT/xc-Myc y 3. Control sin plasma.

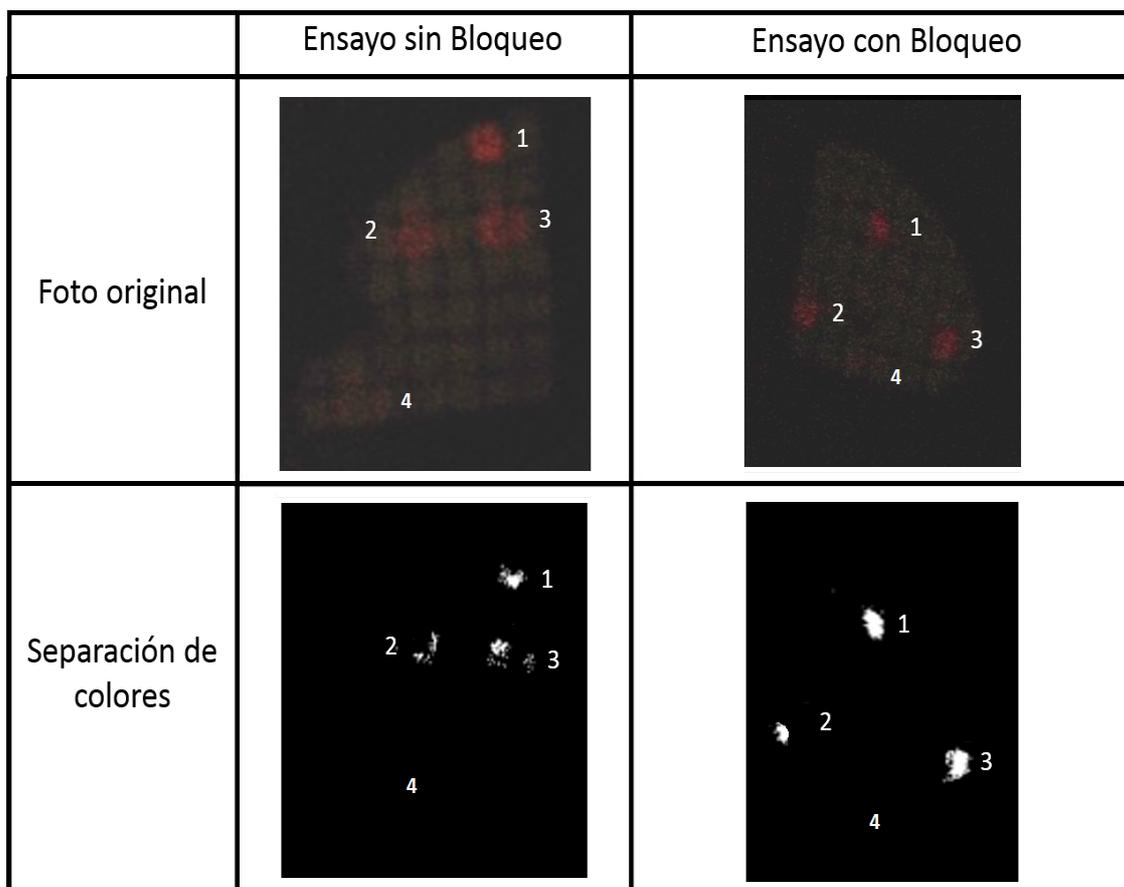


Figura 7. Resultados obtenidos del Dot Blot con preincubación de ADN y NMM IX con bloqueo y sin bloqueo de membrana. Se muestran 4 distintos tratamientos para ambos ensayos, que varían de acuerdo a la sonda de ADN empleada: 1 y 3. Complejo HD1/TT/xc-Myc, 2. Aptámero HD1 y 4. Control sin plasma.

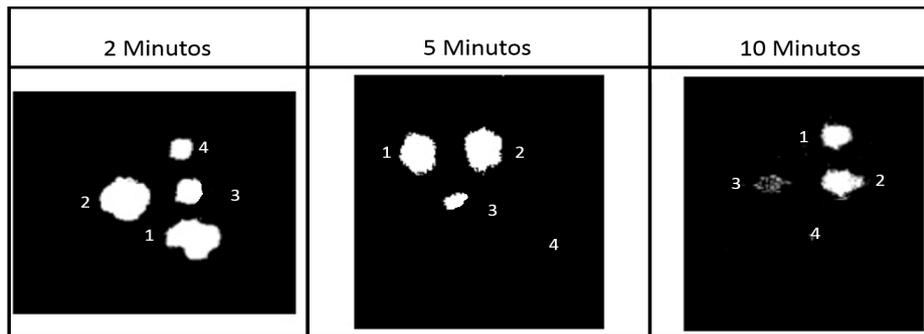


Figura 8. Resultados obtenidos del Dot Blot con preincubación de ADN y NMM IX con diferentes tiempos de lavado de membrana. Se muestran 4 distintos tratamientos para cada ensayo, que varían de acuerdo a la sonda de ADN empleada: 1 y 2. Complejo HD1/TT/xc-Myc, 3. Aptámero HD1 y 4. Control sin plasma.

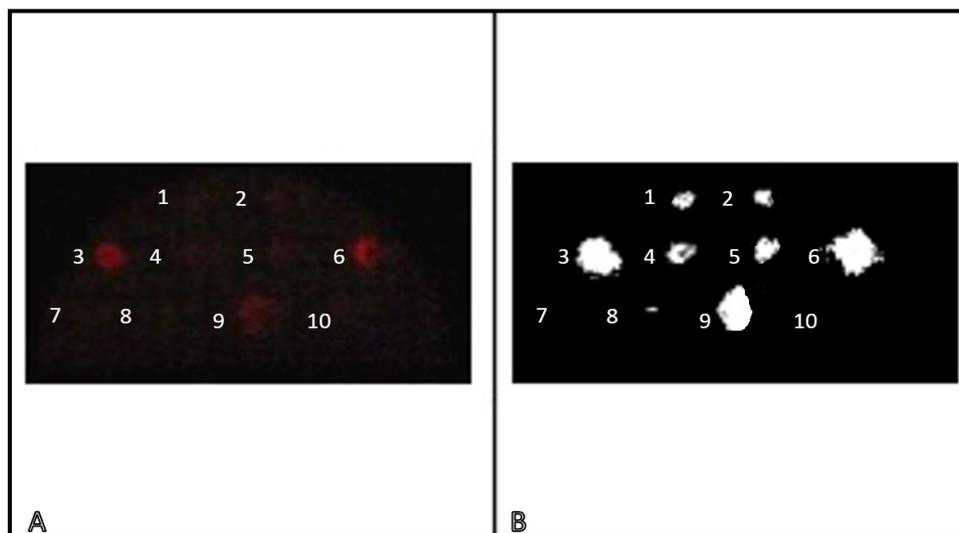


Figura 9. Resultados obtenidos del Dot Blot realizado para estandarizar la mínima concentración del complejo HD1/TT/xc-Myc necesaria en el ensayo. A: Foto antes del procesamiento en los softwares respectivos y B: foto procesada para la separación de colores. Se muestran 10 distintos tratamientos que varían de acuerdo a la concentración de ADN y NMM IX empleadas: 1. 20 μ M/5 μ M, 2. 20 μ M/10 μ M, 3. 20 μ M/20 μ M, 4. 40 μ M/5 μ M, 5. 40 μ M/10 μ M, 6. 40 μ M/20 μ M, 7. 90 μ M/5 μ M, 8. 90 μ M/10 μ M, 9. 90 μ M/20 μ M, 10. Control sin plasma.

14.ANEXOS

Anexo 1. Concentración normal de algunas proteínas del plasma

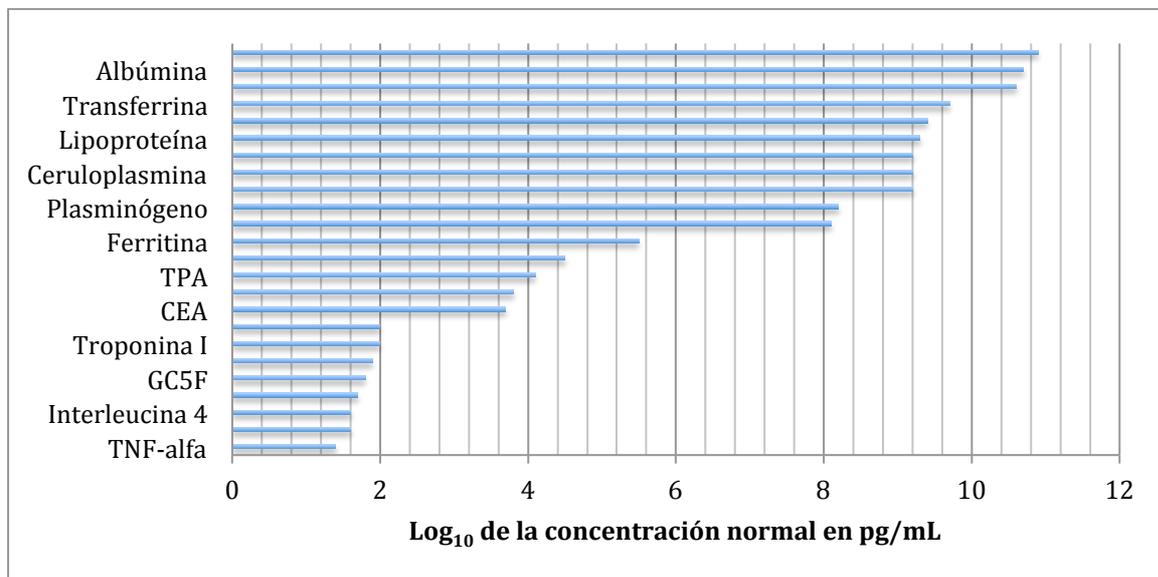


Gráfico modificado de Anderson et al. (2002). La abundancia de cada proteína se encuentra en escala logarítmica

Anexo 2. Esquema de la metodología SELEX, empleada para el diseño de aptámeros

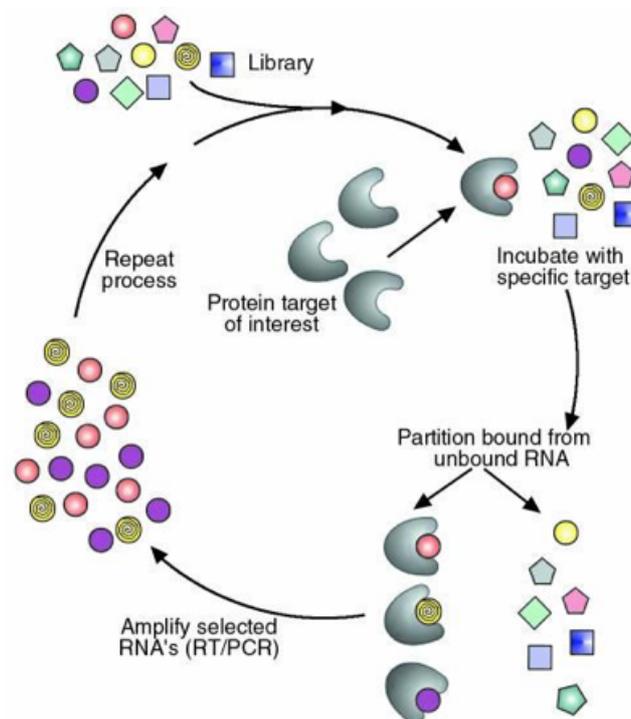


Gráfico extraído de Ray & White (2010)