

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Metodología de micro dispositivo de análisis en papel
para la detección y cuantificación de protrombina en
sangre
Proyecto de Investigación**

Andrea Alejandra Calahorrano Silva

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 3 de diciembre de 2015

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

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Metodología de micro dispositivo de análisis en papel para la
detección y cuantificación de protrombina en sangre**

Andrea Alejandra Calahorrano Silva

Calificación

Nombre del Profesor, Título académico

Miguel Ángel 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 de la estudiante:

Nombre y Apellidos:

Andrea Alejandra Calahorrano Silva

Código de estudiante:

00104072

Cédula de Identidad:

171421491-1

Lugar y fecha:

Quito, 3 de diciembre de 2015

RESUMEN

Los métodos actuales para el diagnóstico de analitos en matrices complejas representan un alto grado de inversión económica y principalmente de tiempo. Existen técnicas que proporcionan información de alta confiabilidad que engloban una amplia gama de conocimientos con aplicación en muchas áreas, la microfluídica es una de ellas. El objetivo de esta técnica es desarrollar sistemas en los que se utilizan volúmenes pequeños. La caracterización de los micro dispositivos de análisis en papel son parte de un proyecto global que pretende el desarrollo de nuevas tecnologías de detección con fluorescencia de blancos biológicos usando aptámeros donde la microfluídica es una alternativa. El desarrollo de esta investigación fue dividida en tres fases importantes. En la fase preliminar se usó el kit de Micro BCA Protein Assay Reagent obteniendo una reacción colorimétrica morada, mientras que en la primera fase de desarrollo se empleó el kit Liquicolor Glucose obteniendo una reacción colorimétrica naranja. Finalmente, en la segunda y última etapa un complejo de aptámero unido al pigmento, NMM IX, fue usado. La fluorescencia fue observada cuando el complejo fue excitado usando un transiluminador de luz azul con el dispositivo de microfluídica cargado con una muestra de plasma (con la ayuda de detección de protrombina, molécula diana de esta fase). En la segunda fase se aplicaron una serie de ensayos para el análisis de fluorescencia, métodos de lavado y concentraciones óptimas fueron testeados. Los resultados de estos ensayos fueron positivos. Cada una de las fases muestran resultados que en el futuro podrían ser replicados para cualquier tipo de analito con micro dispositivos de análisis en papel. En general cada kit empleado funciona con los micro dispositivos de análisis de papel. Para lograr la cuantificación de protrombina es necesario cambiar el diseño del chip para que el pigmento NMM IX, no se pegue a la fibra de celulosa y lograr como resultado una fluorescencia óptima.

ABSTRACT

Current methods for analyte detection on complex matrices represent a high level of economic investment and time. There are many techniques that provide high reliable information that encompasses a wide range of fields with applications in many areas, microfluidics is one of these techniques. The objective of this method is to develop systems in which small volumes (microliter scale) are used. The characterization of the micro-paper based analytical devices methodology is part of a global project that pretends the development of new methodologies for the detection with fluorescence of biological targets using aptamers where microfluidics is one of the alternative setups. The development of this investigation was divided in three main stages. In the preliminary stage, the Micro BCA Protein Assay Reagent kit was use to obtain a Purple colorimetric reaction, while in the first stage the Liquicolor Glucose kit was use to obtain a orange colorimetric reaction. Finally, in the second and last stage a complex with an aptamer bound to the NMM IX dye was used. Fluorescence was observed when the complex was excited using a blue light transilluminator with the microfluidics device loaded with a plasma sample (with the aim of detecting prothrombin, target molecule of this phase). In the second stage a series of assays for the fluorescence analysis, washing methods and optimal concentration were tested. The overall results of these assays were positive. Each of the stages shows results that in the future could be replicated for any analyte with micro-paper based analytical devices. In general every kit evaluated works fine with the paper-based analytical devices. To achieve the quantification of the prothrombin a change of the design of the chip will be necessary in order that the NMM IX dye does not stick to the cellulose fiber and resulting on an optimal fluorescence.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 MARCO TEORICO	9
2. OBJETIVOS.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	16
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSIÓN.....	37
7. CONCLUSIONES:	45
8. RECOMENDACIONES:	46
9. ANEXOS.....	46
10. BIBLIOGRAFÍA	53

1. INTRODUCCIÓN

Las biomoléculas son un eje fundamental para la vida, por lo que su detección y cuantificación se ha convertido en un procedimiento importante para el diagnóstico de enfermedades. Las biomoléculas son constituyentes de los seres vivos y están principalmente compuestas por cuatro elementos: hidrógeno, oxígeno, carbono y nitrógeno. Aquellas biomoléculas encargadas de la obtención de la energía inmediata para el cuerpo son los glúcidos, y aquellas que almacenan energía a largo plazo son los lípidos. Las proteínas participan en casi todo los procesos biológicos del cuerpo, mientras que los ácidos nucleicos contienen información genética del organismo y la transmiten (Battaner, 2000). Debido a que se encuentran presentes en todos los organismos y al papel fundamental en el funcionamiento de cada uno de ellos son de gran importancia.

Los métodos actuales para el diagnóstico de analitos en matrices complejas representan un alto grado de inversión económica y principalmente de tiempo. Existen técnicas que proporcionan información de alta confiabilidad que engloban una amplia gama de conocimientos con aplicación en muchas áreas, la microfluídica es una de ellas. El objetivo de esta técnica es desarrollar sistemas en los que se utilizan volúmenes pequeños. En esta nueva época el enfoque planteado con la microfluídica se centrará en sustituir, en tanto sea posible, microplacas, cajas de cultivos de células, cromatógrafos líquidos, citómetros, entre otros. por microsistemas programables (Loenzo, 2009).

Actualmente los dispositivos para microfluidos, están siendo aplicados en la medicina, biología, biotecnología y química, debido a su simplicidad y la capacidad de proporcionar resultados rápidos sin la necesidad de un entorno de investigación en un laboratorio completo con equipamiento sofisticado y costoso. Las aplicaciones

mayormente usadas son las pruebas de diagnóstico múltiple de forma simultánea y con alta sensibilidad. Los dispositivos microfluídicos analíticos diseñados en papel llamados μ PAD han surgido como una alternativa de bajo costo para mediciones químicas cuantitativas, lo cual hace un diagnóstico fácil, *in situ* de gran importancia y que incluso países en desarrollo podrían emplearlos (Poomrat Rattanarat, 2013).

Estos dispositivos de papel tienen como componente principal fibra de celulosa. Una de sus características principales es ser un soporte naturalmente hidrofílico que permite la penetración de líquidos acuosos dentro de su matriz de fibra (Xu Li, 2010). En términos de costo-beneficio, los dispositivos de papel son de bajo costo, fácilmente disponibles y manipulables. Existen algunas posibilidades de detección de analitos en plataformas basadas en papel. Entre las principales están: colorimetría, electroquímica, quimioluminiscencia, electro-quimioluminiscencia, fluorescencia y la superficie mejorada de espectroscopia Raman. El método más común es la colorimetría que utiliza reacciones químicas o enzimáticas en la zona hidrófila del papel para la producción de cambio de color (Julaluk Noiphung, 2013).

La protrombina, molécula diana de esta investigación, desempeña un papel importante en la coagulación de la sangre, la inflamación, la angiogénesis y la biología del tumor (Chen, Wang, Lian, & Chen, 2013). El nivel de generación de trombina (que se genera a partir de la protrombina) en la sangre puede reflejar la progresión de ciertas enfermedades, por lo que métodos de detección por microfluídica sensibles y específicos podrían ser de utilidad práctica. Numerosos biosensores se han desarrollado para la detección de trombina y protrombina con aptámeros pero ninguno como el presente por su sencillez y versatilidad (Witt, Walter, & Stahl, 2015). Adicionalmente el proceso utilizado para desarrollar el presente método se podría replicar pero para otros analitos presentes en sangre.

Por consiguiente, se propone el desarrollo de un método para el uso de biochips basados en microfluídica para la detección y cuantificación de proteínas en sangre usando aptámeros. Como una primera fase se realizó ensayos réplica de estudios preliminares desarrollados en la Universidad del Valle (Colombia), para la detección de glucosa como un sistema inicial para la caracterización de los protocolos de uso de μm^2 s. En base a estos resultados iniciales se proponen métodos para la detección de proteínas en general y protrombina en plasma sanguíneo basado en las técnicas de microfluídica, con la finalidad de obtener mayor número de ensayos simultáneos utilizando una menor cantidad de muestra.

1.1 MARCO TEORICO

1.1.1 Microfluídica

El desarrollo e implementación de metodologías de Micro dispositivo de análisis en papel (biochips basado en microfluídica) para la detección y cuantificación de proteínas en sangre puede contribuir de forma importante en reducir costos para análisis clínicos y en laboratorios de investigación. La microfluídica es una tecnología interdisciplinaria que se obtiene como resultado de una interconexión de investigaciones de varios campos como física, química, micro-tecnología y biotecnología que tiene como objetivo el desarrollo de sistemas en los que se utilizan volúmenes pequeños (Lorenzo, 2013).

Los chips con micro-fluidos hace posible el controlar, manipular y hacer reacciones químicas con fluidos en escala de micro-litros, los cuales tienen auge debido a su simplicidad para proporcionar resultados rápidos con costos bajos, lo cual permitirá que cualquier tipo de laboratorio pueda realizar una mayor cantidad de análisis (F R, 2008). Uno de los parámetros más importantes para que un sistema de

microfluídica funcione son los reactivos que se añaden en el sistema para la identificación del substrato y la generación de una señal analítica medible fácilmente. En este caso se utilizó la tecnología de aptámeros para lograr ambos fines.

1.1.2 Dispositivos microfluídicos analíticos diseñados en papel

(μ PADs)

Entre los dispositivos más exitosos de micro-fluidos se tienen aquellos que se basan en el movimiento lateral de los fluidos a través de tiras de papel para la distribución de reactivos. Estos sistemas son útiles, con canales de fluidos hidrófilos y paredes hidrófobas. A los dispositivos de micro-fluidos hechos de papel se los denomina como micro-dispositivos analíticos en papel (μ PADs), en particular, estos se caracterizan porque absorben, distribuyen y expulsan los fluidos en volúmenes de micro-litros desde los puntos de entrada individuales hasta las matrices de detección (Quiceno, 2014). Su fácil preparación y bajo costo han sido las principales razones para su selección y desarrollo de la presente metodología la cual pretende ser un caso de estudio que se podrá generalizar para la detección de otros analitos de importancia clínica.

1.1.3 Aptámeros

Un aptámero es un ácido nucleico de cadena sencilla ssDNA o de RNA, cuya longitud es corta y dependiendo de su secuencia adopta estructuras tridimensionales definidas, lo que les permite unirse de manera estable y específica a su dianas (Mosing & Bowser, 2007). La selectividad de los aptámeros hacen que sea más estable que el uso de anticuerpos; además, económicamente hablando son menos costosos que el empleo de anticuerpos. Por consiguiente, los aptámeros pueden ser usados como moléculas de reconocimiento con un sin número de aplicaciones con

diversas dianas incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos (Wang, Liu, Liu, Huang, Yang, & Liu, 2009).

La alta afinidad y especificidad de los aptámeros, son características que dan la posibilidad de aplicaciones en electroforesis, cromatografía estacionaria y algunos micro-ensayos que han revolucionado al análisis genómico (Mosing & Bowser, 2007). Recientemente, a los dispositivos de microfluídica se los reconoce como una tecnología poderosa que jugará un papel importante en los análisis biológicos. Aquí se plantea la utilización de aptámeros en conjunto con la tecnología de microfluídica y un sistema de detección basado en una señal luminosa (ej. Fluorescencia). que se genere cuando este presente trombina.

1.1.4 Trombina

Conocida también como fibrinogenasa, factor activado de coagulación sanguínea II, factor de coagulación de la sangre-IIa, factor IIa. Es una serina proteasa que en los seres humanos está codificada por el F2.

1.1.5 Protrombina

La protrombina es una glicoproteína localizada en el plasma sanguíneo y se caracteriza por ser un componente esencial del mecanismo de coagulación de sangre. Esta proteína es transformada en trombina por un factor de coagulación denominado Factor II; la trombina posteriormente actúa para transformar fibrinógeno, que se encuentra también presente en el plasma, en fibrina que en combinación con las plaquetas de la sangre forma un coágulo (Encyclopedia Britannica, Inc, 2015). Bajo circunstancias normales, la protrombina cambia a trombina solo cuando una lesión ocurre en los tejidos o en el sistema circulatorio. Mientras que la fibrina y la coagulación sanguínea no se forman excepto en respuesta a un sangrado (Encyclopedia Britannica, Inc, 2015).

1.1.5.1 Generación de trombina.

La trombina es producida por la escisión enzimática de dos sitios en la protrombina por el Factor X activado (Xa). La actividad de este factor es mayor por la unión al factor V activado (Va), denominado como complejo de Protrombinasa. La protrombina se produce en el hígado y es modificada en una reacción dependiente de vitamina K que convierte diez ácidos glutámicos en la protrombina en ácido gamma-carboxiglutámico (Gla). En presencia de calcio, los residuos de GLA promueven la unión de protrombina en bicapas de fosfolípidos. La deficiencia de vitamina K o administración del anticoagulante warfarina inhibe la producción de residuos de ácido gamma-carboxiglutámico retrasando la activación de la cascada de coagulación (Collados & et al, 1996).

En adultos el nivel normal de actividad de trombina en sangre es de aproximadamente de 1.1 unidades/mL . Los niveles en recién nacidos aumentan de manera constante después del nacimiento para llegar a los niveles de adultos normales, se ha visto que dichos valores van desde un nivel alrededor de 0.5 unidades/mL y después de los seis meses de vida después el nivel aumenta alrededor de 0.9 unidades/mL (Andrew, 1987).

1.1.5.2 Mecanismo de acción.

En la vía de coagulación de sangre, la trombina actúa convirtiendo el factor XI en XIa, VIII en VIIIa, V en Va, fibrinógeno en fibrina y finalmente XIII en XIIIa. El factor XIIIa es una transglutaminasa que cataliza la formación de enlaces covalentes entre los residuos de lisina y la glutamina en fibrina. Los enlaces covalentes incrementan la estabilidad del coágulo de fibrina. La trombina interactúa con la trombomodulina (Bajzar, Morser, & Nesheim, 1996)

Al ser parte importante de la activación de la cascada de coagulación, la trombina también promueve la activación y agregación plaquetaria a través de la activación de receptores activados por proteasas en la membrana celular de la plaqueta (Jakubowski & Owen, 1989).

1.1.5.3 Enfermedades.

La deficiencia de protrombina, es un desorden en el sangrado que provoca una retardación del proceso de coagulación de sangre. Las personas que padecen esta condición experimentan un sangrado prolongado después de sufrir una herida, una cirugía o una extracción de una pieza dental. (National Institutes of Health , 2015). En otros casos, la deficiencia de protrombina, un fuerte sangrado ocurre después de un trauma menor provocando un sangrado espontaneo. Las mujeres con problemas de deficiencia de protrombina pueden tener su ciclo menstrual prolongado. Complicaciones serias se presentan cuando se dan sangrados en articulaciones, músculos, cerebro y otros órganos internos. Las formas más leves de deficiencia no involucra el sangrado espontaneo, y la condición posiblemente se hará evidente después de una cirugía o lesión grave. (National Institutes of Health , 2015)

Una deficiencia en protrombina, hipoprotrombinemia, se caracteriza por la tendencia de un sangrado prolongado. Es usualmente asociado con el bloqueo de la vitamina K, que es necesaria para la síntesis de protrombina en las células del hígado y en la función de las células del intestino (Encyclopedia Britannica, Inc, 2015). La deficiencia del factor II es un problema en la coagulación de la sangre que ocurre cuando existe un bloqueo de protrombina. Entre los principales síntomas de esta deficiencia se tiene: sangrado anormal después del parto con sangrado del cordón umbilical al nacer, sangrado menstrual anormal, sangrado después de una cirugía,

sangrado después de un traumatismo, moretones y hemorragias nasales (National Institutes of Health, 2015)

1.1.5.4 Causas y Detección.

La deficiencia en protrombina es una condición muy rara y se estima que alrededor de 2 millones de personas alrededor del mundo la padecen. Se ocasiona cuando se presenta una mutación en el gen F2. Este gen proporciona instrucciones para la fabricación de la proteína protrombina que también es conocida como factor II de coagulación, que juega un rol crítico en la formación de coágulos de sangre en respuesta de lesiones. Como antes se menciona la protrombina es un precursor de trombina, proteína que inicia una serie de reacciones químicas para la formación de coágulos de sangre. Dichos coágulos son importantes porque protegen al cuerpo sellando vasos sanguíneos dañados evitando pérdidas de sangre (National Institutes of Health , 2015).

Las mutaciones en el gen F2 reducen la producción de protrombina en las células, por consiguiente se evita la formación correcta de coágulos en respuesta a una lesión. Problemas con la coagulación sanguínea pueden dirigir un episodio excesivo de sangrado. Esta condición es heredada en un patrón autosómico recesivo, lo que implica que ambas copias de dicho gen en cada célula presenta la mutación (National Institutes of Health, 2015). Cuando una persona sangra, una serie de reacciones ocurren en el cuerpo denominado como cascada de coagulación. El proceso envuelve proteínas especiales conocidas como factores de coagulación. Cuando uno de estos factores falla, simplemente la cascada de coagulación es ineficiente ocasionando sangrado. Generalmente, la deficiencia del factor II es causada por la falta de vitamina K debido al uso a largo plazo de antibióticos. En otras ocasiones se presenta cuando el paciente presenta enfermedades en el hígado (National Institutes of Health, 2015)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Desarrollar un método para el uso de biochips basado en microfluídica para la detección y cuantificación de proteínas en sangre usando aptámeros.

2.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar un método de detección y cuantificación de proteínas en sangre que permita abaratar los costos actuales de este tipo de exámenes.
- Desarrollar un método de detección de proteínas en sangre utilizando micro dispositivos de análisis en papel basados en microfluídica que sea rápido a comparación de los procedimientos actuales para lograr un mayor número de ensayos simultáneos.
- Realizar ensayos de biochips basados en microfluídica para la detección de glucosa como control que serán usados para la construcción del mismo con la finalidad de detectar protrombina.

3. JUSTIFICACIÓN

La metodología de micro dispositivo de análisis en papel es una investigación que forma parte de un proyecto global que pretende desarrollar nuevas metodologías para detectar vía fluorescencia marcadores biológicos usando aptámeros específicos. Esta investigación en particular se centra en la elaboración de un método basado en microfluídica para la detección de analitos en general, las pruebas fueron realizadas en proteínas, glucosa y protrombina con la finalidad de estandarizar el método de detección para futuras cuantificaciones. Se espera que los resultados del proyecto global generen metodologías eficientes, de bajo costo y accesibles a todos los

laboratorios clínicos del país. Por lo tanto este proyecto es de gran importancia para que los laboratorios básicos logren llevar a cabo detecciones de analitos de forma sencilla y eficiente para el diagnóstico de enfermedades. El desarrollo de plataformas de papel de bajo costo, desechable y auto sostenible para realizar pruebas diagnósticas son de alta demanda en la actualidad. Las pruebas diagnósticas de este tipo apuntan a enfermedades como tuberculosis, leishmaniasis, malaria, algunas enfermedades autoinmunes entre otras (National Institutes of Health , 2015). La ventaja del empleo de chips de microfluídica es que se obtendrán diagnósticos múltiples en un periodo relativamente corto de tiempo. Adicionalmente, el empleo de este nuevo tipo de tecnología en el Ecuador podría abrir nuevas oportunidades de investigación debido a la sencillez de uso de estos micro dispositivos cualquier persona debidamente capacitada tendría la capacidad de utilizarlos.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Fabricación de la máscara y dispositivo. μ PAD.

La elaboración de los chips para los ensayos realizados en la presente investigación fue realizada por M.Sc. Rubén Albeiro Sánchez Andica de la Universidad del Valle de Santiago de Cali- Colombia. Los materiales usados para la fabricación fueron papel filtro cualitativo BOECO de grado 3hw, 65 g/m^2 , un bastidor para serigrafía N° 77 (Marco de madera de 8x4), una emulsión azul reveladora (Decorwid), bicromato de potasio y tinta trazo para serigrafía de emulsión pvc (línea: serigrafía solvente; sublínea: tinta printo screen-printo réflix serie 81)

4.1.2 Ensayo de glucosa.

El kit de glucosa usado para este ensayo fue Liquicolor Glucose de HUMAN y su estándar glucosa (100mg/dL). Esta es un prueba enzimática colorimétrica para glucosa que contiene buffer fosfato (100mmol/L) de aproximadamente pH 7.5 , 4-aminoehnazone $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$ (0.25mmol/L), fenol (0.75mmol/L), glucosa oxidasa ($>15\text{KU/L}$), peroxidasa ($>1.5\text{KU/L}$); Galactose mutarotase, GALM, ($>2.0\text{KU/L}$), estabilizadores y la muestra o estándar de este kit contiene glucosa (100mg/L ó 5.55mmol/L) (Human, 2015). La investigación preliminar en la Universidad del Valle usó el kit de glucosa oxidasa/ peroxidasa de Bio-Systems junto con yoduro de potasio y como estándar dextrosa, anhidra en polvo.

4.1.3 Ensayo de Proteínas.

El kit usado fue Micro BCA Working Reagent Protein Assay y se encuentra formado por tres tipos de reactivos (MA,MB y MC) y el estándar de albúmina debe ser constituido por 2mg/mL de BSA, albúmina de bovino, 0.9% de solución salina y 0.05% de azida de sodio. Los reactivos son mezclados entre sí en porciones de 50 partes de MA, 48 partes de MB y 2 partes de MC. El reactivo A (MA) contiene carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, tartrato de sodio en 0.2N de NaOH. El reactivo B (MB) contiene ácido bicínico BCA al 4% de agua y el reactivo C (MC) contiene 40% sulfato cúprico, pentahidrato en agua, la temperatura óptima para de reacción es a 37°C (PIERCE, 2001).

4.1.4 Ensayo de protrombina.

Para el ensayo de protrombina se extrajo sangre para la extracción de plasma, adicionalmente se usó un aptámero HD1/ TT*/ CMyc

(5' -GGTTGGTGTGGTTGGTTTAAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA- 3'), NMM IX (N-metil mesoporfirina) y una solución amortiguadora HEPES.

4.1.5 Equipos de laboratorio.

El material de laboratorio empleado para el desarrollo de este trabajo fue proporcionado por el Laboratorio de Investigación de la Escuela de Medicina de la Universidad San Francisco de Quito, campus Hospital de Los Valles. Entre los materiales se empleó Micropipetas de 0.5-10 μ L y de 10-100 μ L para las cargas de las muestras y reactivos en los chips. Un Vortex para mezclar y precipitar las muestras, así mismo se usó una centrifugadora (Thermo Scientific), un transiluminador Safe Imager 2.0 de luz azul. Además de un UV-VIS Epoch BIOTEK para medir concentraciones. Para la medición de los espectros se usó un láser pointera (405 +/- 10 nm) y un espectrofotómetro HR4000CG-UV-NIR marca Ocean Optics equipo disponible en el laboratorio de espectrofotometría del profesor César Costa, Departamento de Física de la Escuela Politécnica Nacional.

4.1.6 Materiales varios.

El resto de materiales usados para esta investigación fueron: chips de microfluídica, tubos eppendorf 1.5mL, una jeringa, torundas de algodón, tubos Vacutainer, puntas blancas y amarillas para micropipeta, caja petri, papel absorbente, guantes desechables, marcador permanente, cámara fotográfica (celular y Nikon Coolpix L810), Cooler, alcohol al 70%, agua destilada, hielo envasado, regla, cronómetro, cuaderno, lámpara modificada con luz azul (LEDs), refrigeradora 4°C y congeladora -30°C

4.1.7 Programas computacionales.

Los programas computacionales usados fueron ImageJ versión 1.47 OS X usado para correcciones fotográficas, Wolfram Mathematica 10 versión 10.2, Sublime

text 2 versión 2.0.2, Qtgrace versión 0.2, VMD versión 1.9.1 y AutoCAD 2015 Todos estos programas fueron su versión para Mac OS X. De igual forma se empleó Ocean Optic Spectro Suite para Windows.

4.2 Metodología

El trabajo experimental donde se llevo a cabo esta investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Escuela de Medicina de la Universidad San Francisco de Quito en el campus del Hospital de los Valles. Así mismo, la medición de algunos datos fueron realizados en el Laboratorio de Espectrofotometría de la Escuela Politécnica Nacional dirigido por César Costa, PhD. La base de esta investigación fue realizada por medio de datos bibliográficos y diseño de experimentos basados en la investigación realizada en la Universidad del Valle, Colombia donde se diseño, fabricó y evaluó los dispositivos de microfluidos para la determinación de glucosa dirigida por Rubén Sánchez, M.Sc.

Para el desarrollo de una nueva metodología de detección de analitos propuesta en esta investigación se empleó tres tipos de analitos, proteínas, glucosa y como molécula diana protrombina en sangre. La metodología usada fue basada en micro dispositivos de análisis en papel para la detección y posible cuantificación de la molécula diana seleccionada. El mecanismo de reporte fue fluorescencia dada por un complejo de ADN-G-cuádruplex y N-metil mesoporfirina IX. Es importante mencionar que esta investigación es parte de un proyecto que básicamente se enfoca en identificar y diseñar distintas metodologías que sean eficientes para la detección de analitos por medio de aptámeros.

En la primera parte del proyecto global de detección de analitos por medio de nuevas metodologías usando aptámeros se desarrollo un protocolo de ensamble del ADN-G-cuádruplex con el pigmento N-metil mesoporfirina IX (NMM IX) que fue

usado en esta investigación. Como parte preliminar se llevó a cabo replicas de la experimentación con glucosa. Luego se empleó un kit de identificación de proteínas para evidenciar la efectividad de los chips y comenzar con el análisis detallado de volúmenes y condiciones de reacción que serían necesarias para la detección de protrombina. Finalmente, usando plasma sanguíneo y un complejo de ADN-G-cuádruplex con N-metil mesopofirina, se ensayó el método para protrombina. Finalmente, y en base a los resultados obtenidos se realizó análisis de mejoras requeridas en el diseño y material del micro dispositivo en papel.

4.2.1 Preparación de la secuencia de ADN para el sistema de detección basado en aptámeros.

En la primera parte del proyecto global para la determinación de metodologías para la determinación de analitos como protrombina por medio de aptámeros se preparó la secuencia de ADN que será empleado para el presente proyecto. En un inicio al ADN liofilizado se lo resuspendió en su respectivo buffer, se desnaturalizó a una temperatura de 95°C por 5 minutos. Posteriormente, se enfrió lentamente a temperatura ambiente para ser ensamblado hasta que tome la forma de G-cuádruplex deseado por medio de un termociclador, y se almacenó a 4°C en el refrigerador (Kretz,2010). Como paso siguiente se midió la concentración de ADN usando el equipo UV-VIS Epoch para finalmente preparar disoluciones del complejo de aptámeros (Jinbo, Tao, Jiming, & Wang, 2010).

El aptámero usado fue HD1/TT/*CMyc con su secuencia (5' - GGTTGGTGTGGTTGGTTTAAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA- 3'). Se resuspendió el tubo que lo contenía (55.6nmol) en 27.5 μ L de buffer TE y se midió la concentración. Se tomó 5 μ L de la solución madre (2000 μ M) y se colocó en otro tubo

con $95\mu L$ de TE. Al final de este proceso se obtuvo una solución de $100\mu L$ (Montero, 2015).

4.2.2 Preparación de los aptámeros.

Para llevar a cabo la preparación de los aptámeros se realizó un annealing lento que fue el más óptimo para el ensamblaje del complejo. Para ello se colocó un tubo de $50\mu L$ ($100\mu M$) del complejo HD1/TT/*CMyc en el termociclador y se continuó con el programa de $95^{\circ}C$ por 5 minutos \rightarrow ($80^{\circ}C$ 1 minuto, $60^{\circ}C$ 1 minuto, $40^{\circ}C$ 1 minuto) 2 ciclos \rightarrow $30^{\circ}C$ 5 minutos, $4^{\circ}C$ 10 minutos. Inmediatamente después de mantener la muestra a $95^{\circ}C$ en el primer paso del programa, se sacó el tubo para añadir un volumen de HEPES igual al volumen de la solución de ADN, $50\mu L$ de HEPES Buffer. La solución preparada se almacenó a $4^{\circ}C$.

4.2.3 Preparación de N-metil mesoporfirina IX, NMM IX.

De igual manera que a la preparación de la secuencia de los aptámeros, el NMM (N-metil mesoporfirina) fue preparado en la primera parte del proyecto global para la detección de analitos por medio de aptámeros. Se resuspendió 5mg (580.72) en $1mL$ de agua con una concentración de $8610\mu M$. Se midió la concentración en un espectrofotómetro y se aplicó la Ley de Beer para la cuantificación. El coeficiente de extinción a $379nm$ en agua es de $1.45 \times 10^5 M^{-1}cm^{-1}$. Se tomó $11.6\mu L$ de la solución madre ($8610\mu M$) y se colocó en otro tubo con $88.38\mu L$ y se obtuvo una solución de $10\mu M$. Posteriormente, se colocó en otro tubo con $990\mu L$ para obtener una solución de $1\mu M$ (Montero, 2015).

4.2.4 Preparación de plasma a partir de una muestra sanguínea.

La muestra que se usó para el desarrollo del proyecto fue de sangre de una persona saludable. El permiso del comité de bioética se adjunta en la sección de

anexos. La extracción de la muestra se llevó a cabo en el laboratorio de investigación de la Escuela de Medicina de la Universidad San Francisco de Quito en el campus del Hospital de Los Valles. Inmediatamente después de la extracción de la muestra, se obtuvo plasma sanguíneo a partir del protocolo de obtención de plasma citratado. Se extrajo la sangre con tubos Vacutainer con 3.2% de citrato de sodio, se almacenó a temperatura ambiente y se utilizó una vez transcurridas 4 horas de su extracción. Se centrifugó 2 veces con la finalidad de extraer PRP a 2630 rpm por 10 minutos. Las muestras de plasma fueron alicuotadas en tubos eppendorf de 100 μ L, etiquetadas adecuadamente y almacenadas a 4°C en el mismo laboratorio (MSC, 2013). (Scientific, 2011).

4.2.5 Elaboración del chip.

La fabricación del dispositivo se basó en el trabajo reportado por (Martinez, 2007), el cual consiste en el diseño de una plantilla digital o máscara con ayuda del programa corelDRAW 3; este diseño se pasó a un bastidor (malla) usando radiación ultravioleta para fijar la imagen en el bastidor; la impresión de la imagen en el papel se realizó mediante la técnica de serigrafía, que consiste en utilizar tinta hidrofóbica para fijar la imagen en una superficie. Todo el diseño y elaboración se realizó con colaboración de la Universidad del Valle en Colombia (Quiceno, 2014)

Micro dispositivo de análisis en papel (uPAD)

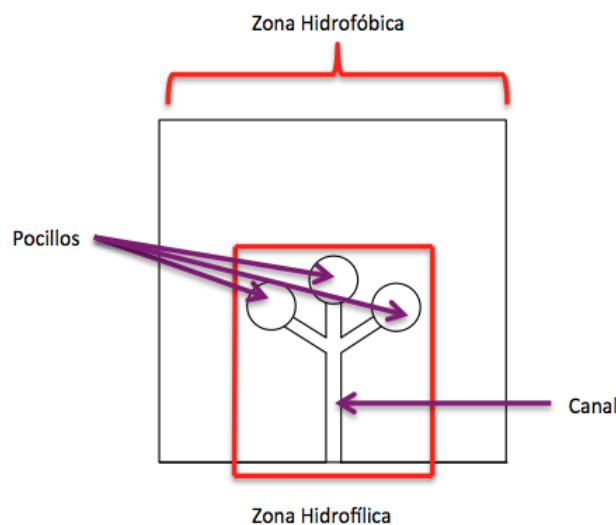


Figura1. Micro dispositivo de análisis en papel (*uPADs*). La zona hidrofóbica es aquella que no permite que atraviese el agua. La zona hidrofílica es aquella que permite que el agua penetre, en esta zona se encuentra el canal por donde se carga la muestra y los pocillos que son lugares donde se cargan los reactivos.

4.2.6 Fase preliminar: Micro dispositivo de análisis en papel para la detección de proteínas

Como parte preliminar al desarrollo de esta metodología se buscó comprobar la funcionalidad de los chips usando el kit Micro BCA Working Reagent Protein Assay junto con un estándar de BSA. Para ello se realizó una solución de $100\mu\text{L}$ de reactivo mezclando $50\mu\text{L}$ del reactivo MA, $48\mu\text{L}$ del reactivo MB y $2\mu\text{L}$ del reactivo MC junto con una solución de BCA. Se pesó BSA en polvo en un eppendorf y se añadió 1mL de agua destilada. La reacción se llevó a cabo en un tubo eppendorf donde se mezcló $1.5\mu\text{L}$ del reactivo y $1.5\mu\text{L}$ del estándar de BSA. Se dejó incubar por aproximadamente una hora a 37°C . Finalmente, se cargó $3\mu\text{L}$ de la mezcla reactivo-estándar BSA en los pocillos derecho y centro dejando al pocillo izquierdo

completamente vacío. Se escaneó la imagen para observar los resultados obtenidos.

Procedimiento para detección de Proteínas

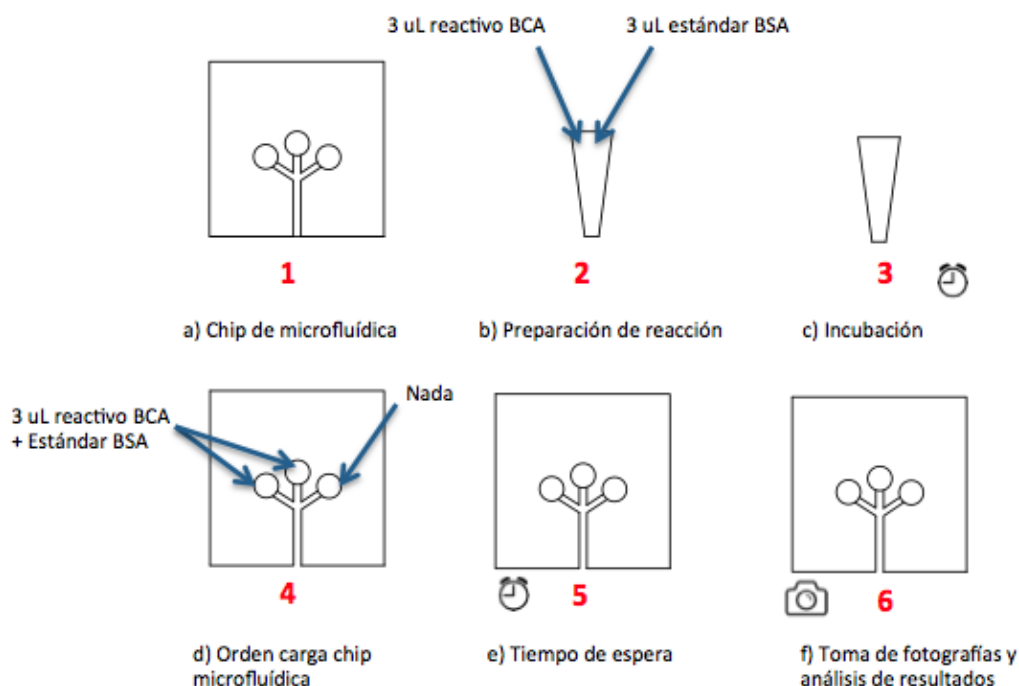


Figura2. Procedimiento llevado a cabo para la detección de proteínas **a)** Preparación del chip de microfluídica, chip limpio, **b)** Preparación de la reacción en un tubo eppendorf, 3 μ L de reactivo BCA del kit Micro BCA Working Reagent Protein Assay y 3 μ L del estándar BSA (albúmina de bovino) **c)** Tiempo de incubación para que se lleve a cabo la reacción de cambio de color (30 minutos a 37°C). **d)** Carga de 3 μ L reactivo y 3 μ L estándar en los pocillos derecho y centro, el pocillo izquierdo es el control, no tiene nada **e)** Tiempo de espera hasta que se seque el chip (30 minutos) **d)** Toma de fotografías a 15cm de distancia y análisis de resultados

4.2.7 Primera fase: Micro dispositivo de análisis en papel para la detección de glucosa

La primera parte de este proyecto se centró en el establecimiento de cantidades óptimas y tiempos de reacción adecuados para lograr activar el cambio de coloración y por lo tanto detectar glucosa. Para ello se analizó lo realizado en la Universidad del Valle, Colombia y se modificó algunos valores para aplicarlos a beneficio de esta investigación. Por lo tanto, se desarrollaron una serie de ensayos donde se buscó analizar la cantidad óptima necesaria para evitar fugas y reflujos en el chip. Se probó cargando en el canal 4L de la muestra (glucosa 100mg/dL) debido a que está fue la

cantidad óptima de la investigación Colombiana. Posteriormente, se probó con cantidades de $0.5\mu\text{L}$, $1\mu\text{L}$, $2\mu\text{L}$ y $5\mu\text{L}$ del kit glucose liquicolor.

La toma de fotografías se llevó a cabo por medio de un teléfono celular y una cámara semi-profesional (Nikon Coolpix L810). Se tomó fotografías en un lapso de tiempo para ver si existía un cambio en la coloración. Los tiempos usados fueron: 0 minutos, 3 minutos, 6 minutos, 9 minutos y 12 minutos. Finalmente, el análisis de resultados fue realizado en el programa Wolfram Mathematica versión 10.2 para MacOS X

Procedimiento para detección de Glucosa

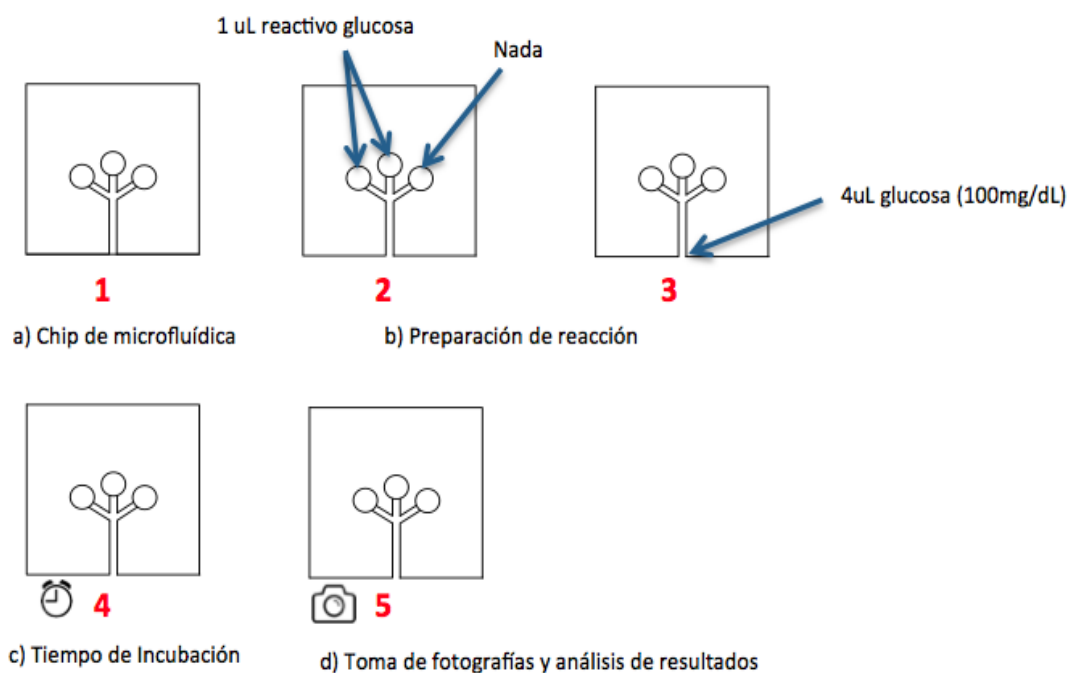


Figura3. Procedimiento llevado a cabo para la detección de glucosa **a)** Preparación del chip de microfluídica, chip limpio, **b)** Preparación de la reacción, dos pocillos con $1\mu\text{L}$ de reactivo de glucosa del kit liquicolor y un pocillo vacío (control) 2. Carga de glucosa 100mg/dL en el canal. **c)** Tiempo de incubación para que se lleve a cabo la reacción de cambio de color (12minutos tiempo óptimo). **d)** Toma de fotografías a 15cm de distancia y análisis de resultados

4.2.8 Segunda fase: Micro dispositivo de análisis en papel para la detección de protrombina.

Como paso siguiente a la replica de funcionamiento de los micro dispositivos de análisis en papel para la detección de la glucosa, y una vez encontradas las

cantidad óptimas que se deben cargar en el chip se realizó el diseño de tres experimentos para la detección de protrombina en plasma sanguíneo. En el primer experimento se tomaron en cuenta cuatro distintos escenarios para medir la eficiencia de la fluorescencia donde se llevo a cabo 4 ensayos distintos. En el primer ensayo se empleó $4\mu L$ de plasma diluido en relación 1:1 cargado únicamente en el canal, en el segundo ensayo se empleó $1\mu L$ del complejo formado en la primera parte del proyecto de ADN G-cuádruplex y N-metil mesopropirina (NMM), la concentración usada fue de $2\mu M$ de ADN y $20\mu M$ de NMM cargado directamente en los pocillos. El tercer ensayo fue de control con el complejo de ADN cuádruplex y N-metil mesopropirina (NMM) de las mismas concentraciones que en el segundo ensayo, se cargó $1\mu L$ de este complejo en los pocillos y $4\mu L$ de agua destilada en el canal. Mientras que en el cuarto ensayo se cargó las mismas cantidades del ensayo tres con la diferencia de que en este se cargó $4\mu L$ plasma diluido en relación 1:1 en lugar del agua destilada.

Para cada uno de los ensayos se realizó la toma de fotografías en un lapso de tiempo (0 minutos, 3 minutos, 6 minutos, 9 minutos y 12 minutos) a 15 centímetros del transiluminador de luz azul. El segundo experimento consistió en hallar el mejor método de lavado, para ello una vez tomadas las fotografías se llevó a cabo dos tipos de lavados con la finalidad de seleccionar el más óptimo. El método 1 de lavado consistió en colocar μL de agua destilada en el canal por 3 minutos y por triplicado, este lavado se realizó en los chips de los ensayos 1 y 4. Mientras que el método 2 de lavado consistió en colocar agua destilada en una caja petri y sumergir los chips por 6 minutos, los chips lavados con este método fueron los de los ensayos 2 y 3. Posterior al lavado se llevó a cabo el secado y para ello que colocó papel absorbente sobre una superficie desinfectada con alcohol al 70%. Se colocó los chips sobre el papel junto con la parte hidrofóbica de otros chips no usados para evitar que el complejo unido a

la proteína se pierda en el lavado por la sección inferior del chip. Finalmente, después de todos estos cuatro ensayos se tomó fotografías a 15 centímetros del transiluminador de luz azul.

Una vez comprobado el efecto de fluorescencia del complejo en distintos escenarios se procedió a la realización del tercer experimento, comprobar que efectivamente lo que fluoresce en el transiluminador es el complejo de ADN G-cuádruplex con NMM IX unido a la proteína, y que si estos se encuentran por separado la fluorescencia se altera. Por lo tanto, se cargo en un solo chip distintas concentraciones de ADN G-cuádruplex ($92.93\mu M$ y $18.81\mu M$) y misma concentración de NMM ($5\mu M$). Para analizar la acción de NMM IX se cambió la concentración del mismo para que llegue a ser mayor a la cantidad de ADN G- cuádruplex usado. En el pocillo de la derecha se colocó NMM IX ($100\mu M$) y ADN G- cuádruplex ($18.81\mu M$), en el pocillo del centro se cargó el complejo ($50.42\mu M$ ADN G-cuádruplex y $100\mu M$ NMM XI) y en el pocillo izquierdo no se cargó nada. Para el análisis de resultados se llevo a cabo el procedimiento antes mencionado de lavado, secado y toma de fotografías. Para tener un contraste entre lo que sucede cuando existe mayor concentración de NMM que de ADN G-cuádruplex se realizó un ensayo donde la concentración de ADN G-cuádruplex fuera mayor a la concentración de NMM, de igual forma se llevo a cabo los lavados, secados y toma de fotografías.

Finalmente, una vez puestas a experimentación los diversos escenarios se estandarizó cantidades y procedimiento de lavado óptimo para poder tener una mejor fluorescencia.

Procedimiento para detección de Protrombina

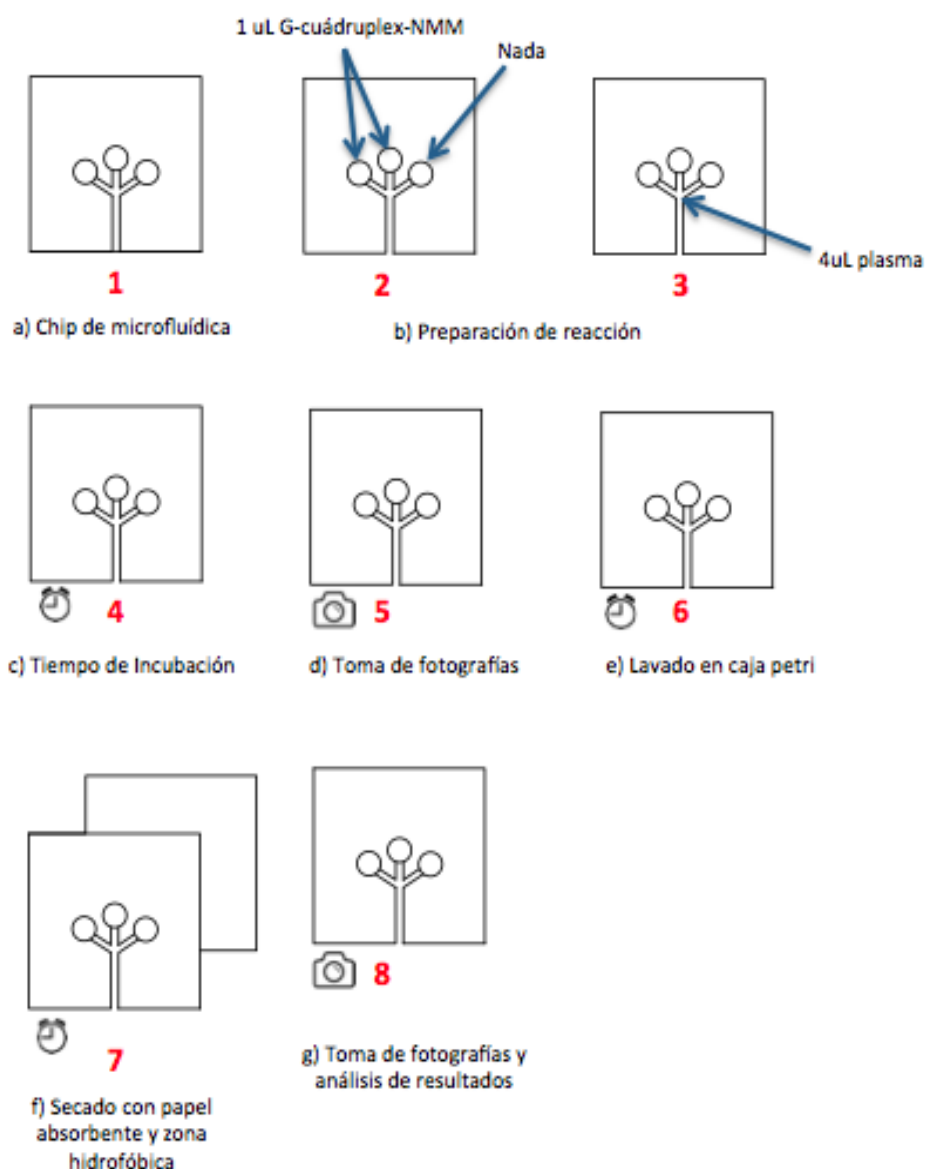


Figura4. Procedimiento llevado a cabo para la detección de protrombina usando aptámeros **a)** Preparación del chip de microfluídica, chip limpio, **b)** Preparación de la reacción, 1. dos pocillos con $1\mu\text{L}$ de complejo G-cuádruplex-NMM y un pocillo vacío (control). 2. Carga de $4\mu\text{L}$ plasma diluido 1:1. **c)** Tiempo de incubación para que se lleve a cabo la reacción (3 minutos tiempo óptimo). **d)** Toma de fotografías a 15cm de distancia del transiluminador de luz azul. **e)** Lavado de chip con agua destilada para quitar lo no reaccionado (6 minutos) **f)** Secado con papel absorbente junto con otro chip pegado a la zona hidrofóbica (3 minutos). **g)** Toma de fotografías a 15 cm del transiluminador de luz azul y análisis de resultados.

4.2.9 Medición de fluorescencia y cuantificación:

Una vez culminados todos los ensayos, se analizó los resultados por medio de algunos programas que permiten medir los niveles de pixeles de cada fotografía. Para

confirmar que el ensamble del ADN G cuádruplex con N-metil mesoporfirina (NMM) fue el correcto se midió la fluorescencia usando un espectrofotómetro de la Escuela Politécnica Nacional, los datos obtenidos fueron editados en sublime text 2 para corregir el formato y graficarlos en Qtgrace. Cuando se verificó que el complejo funciona se procesaron las fotografías en ImageJ, donde se realizó una corrección de la imagen. Esta corrección de imagen puede ser realizada en cualquier programa de edición de imágenes como por ejemplo Photoshop. La medida de fluorescencia buscó detectar protrombina localizada en el plasma sanguíneo que fue diluido para evitar problemas de penetración de luz.

Para llevar a cabo la corrección de imagen se abrió ImageJ, se cargó las fotos ingresando a File/Open. Posteriormente se corrigió la foto usando Image/Transform/Rotate, dependiendo de la posición de la fotografía se rotó la imagen para colocarla en una posición adecuada. Se cortó la foto en Image/Transform/ Crop. Para el cambio de filtro y llegar solo a la visualización de tonos rojos se usó Process/Substract background/Rolling ball radius 25 pixels, se seleccionó “light background”. Inmediatamente se seleccionó la zona hidrofílica del chip y se verificó la escala usando Image/Adjust en esta opción se modificó los valores mínimos y máximos para filtrar otros tonos y visualizar la fluorescencia de la protrombina.

5. RESULTADOS

En la fase preliminar se usó el kit de Micro BCA Protein Assay Reagent obteniendo una reacción colorimétrica morada, mientras que en la primera fase de desarrollo se empleó el kit Liquicolor Glucose obteniendo una reacción colorimétrica naranja a diferencia del kit de Glucosa oxidasa/ peroxidasa usado en la investigación

de la Universidad del Valle, Colombia, donde la reacción que se obtuvo fue marrón. Finalmente, en la segunda etapa del desarrollo de este trabajo de investigación se aplicó las bases de las fases anteriores para que por medio de un complejo de aptámeros con un pigmento, NMM IX, se observe fluorescencia con la ayuda de un transiluminador con ello detectar protrombina, molécula diana de esta investigación. En la segunda fase se aplicaron una serie de ensayos para el análisis de fluorescencia, métodos de lavado y concentraciones óptimas. Durante el desarrollo de esta metodología se puede decir que en general los resultados fueron positivos. Cada una de las fases muestran resultados que en un futuro se podrían replicar para cualquier tipo de analito con micro dispositivos de análisis en papel, y en general cada kit empleado funciona.

Una vez culminados los ensayos de cada fase, se procedió a tomar fotografías y analizar los resultados. Esta sección se enfocará en mostrar los resultados más relevantes de cada una de las fases: preliminar con el kit para detección de proteínas, fase primera con el kit de detección de glucosa y fase segunda de detección de protrombina.

5.1 Fase preliminar: Micro dispositivo de análisis en papel para la detección de proteínas

En esta parte con el empleo del kit Micro BCA Working Reagent Protein Assay se comprobó la funcionalidad de los chips para la continuación del estudio. La reacción de coloración al ser realizada en un tubo eppendorf brinda menos fuentes de error al momento de cargar en el chip debido a que la coloración ya se encuentra presente al momento de la carga. La fotografía 1, tomada mediante un escáner, indica el resultado tras la carga en el chip después del tiempo de incubación de 30 minutos. El pocillo derecho y del centro fueron cargados con $3\mu L$ del kit con el estándar de

albúmina y se produce un reflujo debido a que los canales del chip se encuentran de color morado así como los pocillos cargados, y el pocillo de la izquierda se encuentra contaminado con los reactivos del kit pero en una menor porción en comparación a los otros pocillos lo que hace suponer que el volumen cargado no es el óptimo para lograr que los reactivos reaccionen dentro del pocillo sin tener reflujo alguno.



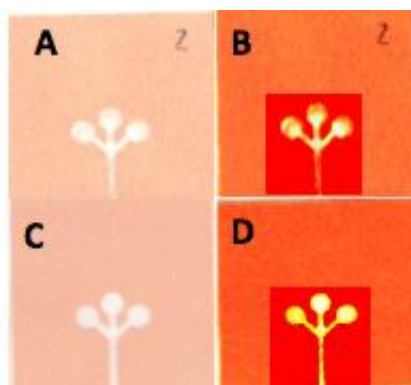
Fotografía1. Ensayo detección de proteínas: Carga realizada directamente en los pocillos derecho y centro cargados con $3\mu L$ de reactivo ($100\mu M$), pocillo izquierdo vacío (control).

5.2 Primera fase: Micro dispositivo de análisis en papel para la detección de glucosa

Esta fase se dividió en dos tipos de ensayos, el primero se realizó para identificar los volúmenes óptimos que deben ser cargados para evitar el reflujo presentado en la fase preliminar y como segundo ensayo llevar a cabo una replica de la investigación con glucosa del grupo en la Universidad del Valle. En la identificación de los valores óptimos de carga tanto para los pocillos como para el canal se utilizó un chip de microfluídica con agua destilada. Los volúmenes usados en cada uno de los pocillos fueron de $0.5\mu L$, $1\mu L$, $2\mu L$ y $5\mu L$ donde el volumen óptimo para evitar derrames o reflujos fue de $1\mu L$. De igual forma, el volumen óptimo para la carga del canal fue de $4\mu L$, mismo valor identificado en la investigación de la Universidad del Valle, Colombia.

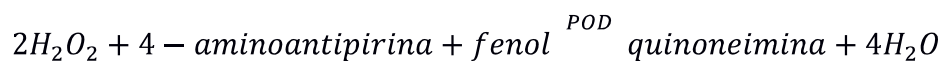
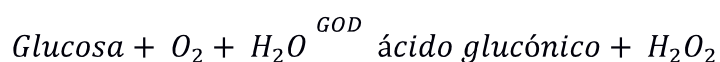
Con el empleo del kit Liquicolor Glucose se comprobó la eficiencia de los chips para detectar glucosa debido a que se evidenció la reacción colorimétrica

naranja. Se cargó $1\mu\text{L}$ de reactivo en los pocillos derecho y centro mientras que el pocillo izquierdo se dejó vacío para usarlo como control. En el canal se cargó $4\mu\text{L}$ de glucosa $100\text{mg}/\text{dL}$. La fotografía2 muestra el resultado obtenido tras la reacción lograda entre el reactivo y la muestra.



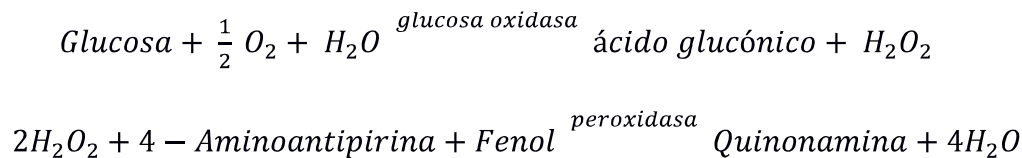
Fotografía2. Ensayo de detección de glucosa: Comparación entre un chip cargado con reactivo y muestras (glucosa $100\text{mg}/\text{dL}$) y un chip completamente vacío usado como control. **A)** pocillos derecho y centro cargados con $1\mu\text{L}$ del reactivo del kit liquicolor, pocillo izquierdo vacío, canal cargado con $4\mu\text{L}$ de glucosa $100\text{mg}/\text{dL}$. **B)** Corrección fotográfica en ImageJ para la observación de los pocillos derecho y centro cambiados de color a diferencia del pocillo izquierdo que no muestra coloración. **C)** Chip control, pocillos y canal vacíos **D)** Corrección fotográfica en ImageJ para comprobación de no reacción por ausencia de coloración.

Sin embargo, el uso del kit Liquicolor Glucose dio como resultado un color distinto en la reacción colorimétrica en comparación del kit Glucosa oxidasa/peroxidasa. Esta diferencia de coloración presentada se dio debido a los componentes de cada kit, Liquicolor Glucose muestra una coloración naranja.



La prueba se caracteriza por ser lineal hasta una concentración de glucosa de $400\text{mg}/\text{dL}$ ó $22.2\text{mmol}/\text{L}$. Los reactivos son estables, el color generado en el ensayo tiene una longitud de onda de 500nm y la temperatura óptima es de 37°C (Human, 2015). La reacción tiene un tiempo de duración en el chip de aproximadamente 12 minutos y el cambio de coloración, a pesar de que se camufla con el chip, se encuentra presente (fotografía2).

El kit Micro BCA Working Reagent Protein Assay muestra una coloración marrón y esto se debe a que añadieron yoduro de potasio para la fijación del kit y para evitar la evaporación temprana del color.



De igual manera los reactivos son estables, este ensayo genera una longitud de onda de 500 +/-20nm, la temperatura de óptima es de 37°C, la concentración del estándar de glucosa en este kit fue de 100mg/dL (BioSystems S.A , n.d), misma cantidad que el estándar del kit Liquicolor Glucose.

5.3 Segunda fase: Micro dispositivo de análisis en papel para la detección de protrombina

Finalmente, en la última fase del presente proyecto se buscó estandarizar una metodología de micro dispositivos de análisis en papel para la detección de protrombina, para ello se empleó un ensamble de ADN-G-cuádruplex con N-metil mesoporfirina IX (NMM IX) y se llevó a cabo 3 experimentos que buscaban la comprobación de este ensamble, descubrir el método más óptimo de lavado y hallar las concentraciones más óptimas para la fluorescencia y detección de protrombina.

En el primer experimento para la comprobación del ensamblaje del complejo ADN-G-cuádruplex con N-metil mesoporfirina IX (NMM IX) sea correcto se llevó a cabo 4 ensayos distintos donde en el primer ensayo se cargó 4 μ L de plasma sanguíneo diluido en el canal. En el segundo ensayo se procedió con la carga de 1 μ L de el complejo ADN-G-cuádruplex con NMM IX en los pocillos derecho y centro dejando el izquierdo vacío como control. Mientras que en el tercer ensayo se cargó 1 μ L del complejo ADN-G-cuádruplex con NMM IX en los pocillos derecho y centro,

nuevamente se dejó al pocillo izquierdo vacío; en el canal se cargó $4\mu L$ de agua destilada. Finalmente, en el ensayo cuatro se cargó $1\mu L$ del complejo ADN-G-cuádruplex con NMM IX repitiendo el orden de carga de los anteriores ensayos y $4\mu L$ de plasma sanguíneo diluido. Es importante mencionar que la observación de fluorescencia se llevó a cabo en un transiluminador de luz azul.

Los primeros ensayos de fluorescencia realizados aplican 4 variables distintas en varios chips. El plasma sanguíneo obtenido fue diluido para evitar problemas con el paso de la luz al contener partículas muy densas, por lo tanto se llevó a cabo dos tipos de diluciones (1:1 y 5:1) pero en las fotografías aparentemente no se muestra diferencia alguna por lo tanto se usó únicamente la dilución 1:1 para el análisis de resultados. La primera variable buscó evidenciar que la protrombina (plasma sanguíneo) por si sola no produce fluorescencia por lo tanto se colocó tan solo $4\mu L$ del plasma disuelto en agua destilada en el canal del chip y como se observa en la fotografía1, B1 y B2 (Anexo B), la ausencia de fluorescencia en el transiluminador se evidencia; por lo tanto se supone que el plasma sanguíneo diluido solo no produce fluorescencia en la línea del espectro del transiluminador usado debido a que el filtro del mismo inhibe los otros colores dejando los rojos visibles. En la segunda variable se buscó en cambio evidenciar que el complejo ADN-G-cuádruplex con NMM IX produce fluorescencia debido a que este complejo posee el aptámero que se encuentra constituido por HD1/ TT*/ CMyc y cuando estos se encuentran unidos formando el aptámero pueden llegar a tener fluorescencia pero si el NMM IX se encuentra solo no produce fluorescencia debido a que es un pigmento, cuando existe una gran concentración de NMM IX como se indica en la fotografía4, C (Anexo B), se evidencia un brillo mucho más penetrante. La tercera variable, chip cargado con el complejo ADN-G-cuádruplex-NMM y agua destilada, fue empleada para comparar

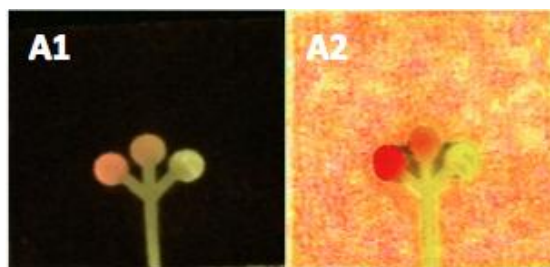
con la cuarta variable, chip cargado con el complejo ADN-G-cuádruplex-NMM y plasma diluído, las cargas fueron llevadas a cabo siguiendo el mismo orden establecido, $1\mu L$ de reactivo en pocillos izquierdo y centro y $4\mu L$ de muestra en canal. En este caso en particular se observó un error en este ensayo en específico debido a que al observar el chip correspondiente (fotografía2, E. Anexo B) se observa tan solo una cantidad mínima de coloración a comparación del chip cargado con agua destilada con el complejo (fotografía2, D. Anexo B) por lo tanto el error se atribuye al pipeteo por parte del investigador. El error de pipeteo no contribuye un resultado negativo en la investigación debido a que en los otros ensayos se evidencia el funcionamiento del ensamble del complejo por lo tanto la fluorescencia no se altera por el error de pipeteo como se observa en la fotografía 2 (Anexo B).

En el segundo experimento se considera al método de lavado como uno de los pasos importantes para el desarrollo de esta investigación debido a que con este se observaría la verdadera fluorescencia emitida, definida como la capacidad de una sustancia de absorber energía en una longitud de onda menor para convertirla posteriormente en luz visible ante nuestros ojos, para la determinación de protrombina. Los chips de los ensayos 1 y 4 fueron lavados con el primer método mientras que los chips de los ensayos 2 y 3 fueron lavados con el segundo método. Ambos métodos de lavado fueron llevados a cabo como se especifica en la sección anterior (metodología). En la fotografía3 (Anexo B) se observan los resultados obtenidos tras los lavados y adicionalmente se compara los chips antes y después de ser lavados. El nivel de fluorescencia después de los lavados se pierde lo que hace suponer que el complejo y la protrombina no unidos se está desechando. Para reducir una posible fuente de error y garantizar que solo lo que no se encuentra unido se lave, se colocó la zona hidrofóbica de un chip bajo el chip lavado y esto sobre un papel

absorbente para lograr que lo que no se encuentre unido salga del chip siguiendo el canal de carga y no un lavado en la dirección perpendicular al plano del chip. Como resultado del paso de lavado se evidencia una disminución significativa en la fluorescencia (ver fotografía 3. Anexo B).

Por otro lado, en el tercer experimento se buscó comparar lo que sucede cuando se usa una mayor concentración de NMM IX con respecto al aptámero, para ello se cargó un chip con $1\mu L$ del complejo aptámero-NMM IX ($20\mu M$ de ADN-G-cuádruplex y $100\mu M$ de NMM IX) siguiendo el mismo orden de carga de los otros ensayos y $4\mu L$ de plasma diluido en el canal. Así mismo, se usó otro chip con las mismas características al anterior con distinta concentración de complejo ($24\mu M$ de ADN-G-cuádruplex y $12.5\mu M$ de NMM IX). Al analizar los resultados se evidencia que ambos chips producen fluorescencia, el chip con mayor concentración de NMM IX presenta un color rojo más intenso que aquellos cargados con una mayor concentración de ADN-G-cuádruplex (Ver Fotografía 6, Anexo B).

Finalmente, es evidente la observación de un tono rojo más intenso cuando se carga solo NMM XI, al cargar el chip con el complejo con una mayor concentración de ADN-G-cuádruplex se observa un tono rojo menos intenso. Para la comprobación de valores de concentración es necesario llevar a cabo una cuantificación de fluorescencia cuando el complejo del aptámero-NMM IX con protrombina se encuentra unido. Después de llevar a cabo una serie de ensayos para comprobar que la fluorescencia se da debido a la acción del complejo del aptámero con el N-metil mesoporfirina y la protrombina localizada en el plasma sanguíneo, se cargó un chip para observar lo que sucede al cargar en un mismo chip distintas concentraciones de reactivos para la detección de protrombina.



Fotografía 8. Relación NMM, complejo y protrombina. A1) Chip cargado con $1\mu\text{L}$ de NMM ($100\mu\text{M}$) y ADN-G-cuádruplex-NMM óptimo ($20\mu\text{M}$) solo en el pocillo derecho, $1\mu\text{L}$ del complejo ADN-G-cuádruplex-NMM óptimo ($24\mu\text{M}$ y $12.5\mu\text{M}$ respectivamente) en el pocillo central. Pocillo izquierdo control. Canal cargado con $4\mu\text{L}$ de plasma diluido. A2) Visualización de corrección fotográfica en ImageJ, fluorescencia.

Los resultados de las distintas fases de la investigación indican que el diseño del chip se encuentra bien realizado, el volumen óptimo hallado evita reflujos o derrames de la muestra y del reactivo. De igual forma, la reacción colorimétrica se produce dentro del chip por lo tanto los kits usados son los adecuados. En el caso de la detección de protrombina se puede decir que la fluorescencia indica que el complejo se une a la proteína pero de una manera no específica debido a que se cree que el pigmento se encuentra también pegado a la fibra de celulosa del papel por lo tanto es importante realizar una optimización del chip para llevar a cabo una cuantificación ideal.

6. DISCUSIÓN

Una vez culminada la investigación se puede decir que los objetivos planteados para la misma se cumplieron debido a que se desarrolló un método de detección de proteínas en plasma utilizando chips basados en microfluídica que mostraron resultados en un lapso corto de tiempo, con detecciones positivas. Durante el desarrollo de esta metodología los resultados en general fueron positivos y cada una de las fases realizadas muestran resultados que en el futuro podrían ser replicados y aplicados para cualquier tipo de analito con micro dispositivos de análisis en papel. En general la fase preliminar y primera de esta investigación no necesitan de ningún

tipo de modificación porque los kits empleados funcionan correctamente, para lograr una mejor reacción colorimétrica en la detección de glucosa se podría usar yoduro de potasio para fijar los reactivos y permitir una mejor coloración. Pero en la segunda fase es necesario realizar una serie de modificaciones para lograr una mejor observación de resultados y con ella una cuantificación óptima.

La segunda fase, micro dispositivo de análisis en papel para la detección de protrombina, se centró en la detección de esta proteína que se encuentra localizada en el plasma sanguíneo que es un fluido translúcido y amarillento, que representa la matriz extracelular líquida en la que se encuentran suspendidos los elementos formes. Se encuentra formada principalmente por agua, 90%. Existen múltiples sustancias que se encuentran en el plasma, de ellos las proteínas son las más abundantes, por lo que constituyen el 55% del volumen sanguíneo total (20% del líquido extracelular) y se encuentra en constante movimiento gracias al sistema circulatorio. Adicionalmente, el plasma sanguíneo se encuentra constituido por proteínas plasmáticas (70%), metabolitos orgánicos, componentes inorgánicos y otros solutos (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008). Del 70% de proteínas localizadas en el plasma sanguíneo las albuminas se encuentra en abundancia (54%), las inmunoglobulinas le siguen con el 38%, el fibrinógeno con 7% y otras proteínas con el 1%, en este grupo se encuentra la protrombina (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

Con la finalidad de detectar esta proteína se llevó a cabo una serie de ensayos con la finalidad de comprobar la eficiencia de la metodología desarrollada. Se usaron los datos de volúmenes y tiempos obtenidos en la primera fase. Los posibles escenarios para esta fase fueron tres: fluorescencia óptima, fluorescencia no específica y ausencia de fluorescencia. La fluorescencia es el resultado de un proceso de tres etapas que se producen en ciertas moléculas (generalmente hidrocarburos

poliaromáticos o heterociclos) denominados fluoróforos o colorantes fluorescentes (ThermoFisher Scientific, 2015). La sonda fluorescente es un fluoróforo diseñado para responder a un estímulo específico o para localizar dentro de una región específica de una muestra biológica. Las tres etapas de fluorescencia son: excitación, estado singlete excitado y emisión. Durante la etapa de excitación, un fotón de energía es suministrado por una fuente externa tal como una lámpara incandescente o un láser, en el caso de esta investigación se empleó un transiluminador de luz azul para producir la excitación de los electrones, y es absorbida por el fluoróforo o sustancia fluorescente, debido a la unión del NMM (pigmento con el ADN), creando un estado excitado, S_1 (ThermoFisher Scientific, 2015). En la segunda etapa el estado excitado es de tiempo finito, generalmente de 1-10ns. Durante este tiempo el fluoróforo sufre cambios conformacionales y se encuentra sujeto a una multitud de posibles interacciones con su entorno molecular.

Estos procesos tienen dos consecuencias importantes. En primer lugar, la energía de S_1 es parcialmente disipada produciendo un estado excitado singlete relajado de la que la emisión de fluorescencia se origina, color naranja-rojos en nuestro caso (ThermoFisher Scientific, 2015). No todas las moléculas inicialmente excitadas por absorción de la etapa 1 regresan al estado fundamental S_0 por emisión de fluorescencia. Finalmente en la tercera etapa, emisión de fluorescencia, un fotón de energía es emitida, retorna el fluoróforo a su estado fundamental S_0 por la disipación de energía durante el tiempo de vida del estado excitado, la energía de este fotón es menor, por lo tanto la longitud de onda es mayor (anaranjados a rojos en nuestro diseño, Ver fotografía10, AnexoC experimento en la Escuela Politécnica Nacional) (ThermoFisher Scientific, 2015). El retorno a un nivel de energía menor es acompañado por la emisión de luz que es conocida como fluorescencia.

Para llevar a cabo el desarrollo de esta etapa fue necesario el ensamblaje del complejo ADN-G-cuádruplex y NMM IX. El ADN usado fue HD1/TT/*CMyc con su secuencia (5'-GGTTGGTGTGGTTGGTTTAAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA-3') y NMM IX. Los aptámeros son ácidos nucleicos de cadena sencilla, ADN o ARN, que tienen la capacidad de reconocer una gran variedad de moléculas. Cada aptámero posee una estructura tridimensional particular que le permite unirse con afinidad y especificidad altas a la molécula diana, que en el caso de esta investigación el aptámero (HD1) se va a unir al CMyc y N-metil mesoporfirina IX para posteriormente detectar protrombina en plasma sanguíneo. El CMyc es un fluoróforo pobre pero se ha visto que cuando se une al NMM IX la fluorescencia aumenta 10 veces (Nicoludis, Barrett, Mergny, & Yatsunyk, 2012). Los aptámeros tienen propiedades de reconocimiento equiparables a las de los anticuerpos; sin embargo, por la naturaleza de su composición tienen ventajas significativas en cuanto a su tamaño, producción y modificación. Estas características los hacen excelentes candidatos para el desarrollo de nuevas plataformas biotecnológicas (Hernández & Botero, 2012). Todos estos avances ocurridos durante las dos últimas décadas permiten anticipar el protagonismo que tendrán los aptámeros como agentes diagnósticos y terapéuticos en un futuro cercano (APTAMERS, n.d). Debido a todas estas características se empleó el complejo de aptámeros con NMM para lograr estandarizar una metodología que en ámbito general proporcione la capacidad de detectar analitos por medio de fluorescencia. De igual forma, la selectividad que posee N-metil mesoporfirina IX para ADN-G-cuádruplex fue de gran interés para la realización de este estudio. La capacidad de estabilizar y la unión con ADN-G-cuádruplex no se ha investigado en detalle. La absorbancia del NMM XI es de 380nm y 400nm (Nicoludis, Barrett, Mergny, & Yatsunyk, 2012). Mientras que el complejo ensamblado fue medido en

por medio de un espectrofotómetro de la Escuela Politécnica Nacional obteniendo una absorbancia de 400nm y una emisión de 610nm (Anexos A, figuras 1 y 2).

La fluorescencia se observó en el laboratorio de investigación de la Escuela de Medicina de la Universidad San Francisco de Quito en el campus del Hospital de Los Valles. Safe Imager 2.0 de luz azul es un transiluminador que es comúnmente usado en los laboratorios debido a la eficiencia de los resultados. Se utiliza para varias pruebas moleculares y para lograr tomar fotografías de geles debido a que el SYBR Safe funciona muy bien con este aparato. La longitud de onda de su emisión es de 470nm localizándose en el espectro de luz visible color azul (Life Technologies, 2012). Adicionalmente, este transiluminador tiene un filtro ambar lo cual hizo factible la detección de protrombina por fluorescencia debido a que se inhibió toda la luz dejando los espectros de rojo visible. Y como la emisión del complejo es de 610nm (Anexo A) los espectros de luz visible roja son de gran ayuda.

El primer escenario, fluorescencia óptima, que se considera es que la reacción entre el complejo de ADN-G-cuádruplex-NMM IX se une a la protrombina presente en el plasma sanguíneo diluido generando fluorescencia observada en el transiluminador de luz azul pero adicionalmente a este también se considera que el NMM IX al actuar como una tinta puede permanecer pegada al papel lo cuál hace evidente el brillo rojo observada en todas las fotografías pero que al momento del lavado la intensidad de fluorescencia disminuye debido a que los reactivos que no se encuentra unidos tanto al papel como a la protrombina se pierden. El segundo panorama que se tiene es parecido al primero con la diferencia de que al momento de realizar los lavados respectivos el NMM XI permanezca pegado al papel lo cuál hace complicado el reconocimiento de protrombina unida al complejo por la fluorescencia excesiva. Y, como tercer panorama se puede decir que la fluorescencia no se da

debido a que al momento de los lavados todo se pierde y el papel no presenta ningún cambio al observar en el transiluminador. Esta última hipótesis se descarta inmediatamente porque como se muestra en resultados la fluorescencia reflejada en el transiluminador indica que posiblemente se está trabajando sobre los dos panoramas anteriores.

Uno de los procedimientos esenciales en esta metodología es el lavado y el secado debido a que por medio de estos se confirma la detección de protrombina y en vista de que se trabaja bajo 2 panoramas distintos este procedimiento se convierte en un punto crítico. El nivel de fluorescencia después de los lavados se pierde lo que hace suponer que el complejo y la protrombina no unidos se está desechando. Para lograr desechar solo lo que no se encuentra unido se colocó la zona hidrofóbica de un chip bajo el chip lavado y esto sobre un papel absorbente para lograr que lo que no se encuentre unido salga del chip y es por ello que se evidencia una disminución significativa en la fluorescencia. Por otro lado, se buscó comparar lo que sucede cuando se usa una mayor concentración de NMM con respecto al aptámero, para ello se realizó varios ensayos en donde se cambiaban las concentraciones tanto de ADN-G-cuádruplex como de NMM IX para observar el grado de fluorescencia.

La concentración ideal para el desarrollo de la metodología se observó que era tener una mayor concentración de ADN-G-cuádruplex que de NMM IX. Se usó aptámeros debido a que tienen la particularidad de reconocer a cualquier blanco molecular, y además porque sus potenciales usos terapéuticos permitieron llevar a cabo estos ensayos que posteriormente se espera sean replicados pero con otro tipo de molécula diana. La combinación de las estructuras secundarias, brazos helicoidales, cortos, bucles de cadena sencilla resultan en la formación de estructuras terciarias que dan la posibilidad de unirse al blanco por fuerzas de Van der Waals, puentes de

hidrógeno e interacciones electrostáticas (APTAMERS, n.d). Tal como se da la unión entre antígeno y anticuerpo, la protrombina se unió al complejo.

De igual forma, en la fase preliminar realizado con Micro BCA Protein Assay Reagent Kit, el chip fue cargado con $3\mu L$ en el pocillo derecho y del centro con estándar y reactivo previamente incubados en un tubo eppendorf, se produjo un reflujó debido a que los canales del chip se encuentran de color morado así como los pocillos cargados, y el pocillo de la izquierda se encuentra contaminado. Por lo tanto, el volumen de carga en cada pocillo es importante para evitar contaminación del pocillo control y principalmente debe ser el indicado para evitar reflujos del volumen cargado. La coloración morada de esta reacción se da por la quelación de dos moléculas de BCA con una de Cu^{+1} .

En el agua presenta una fuerte absorbancia a 526nm que es lineal con el aumento de las concentraciones de proteína (PIERCE, 2001). La estructura macromolecular de una proteína, el número de enlaces péptidos y la presencia de cuatro aminoácidos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) son los responsables de la formación del color cuando se unen al BCA (Wiechelman, Braun, & Fitzpatrick, 1988) donde el ácido bicincóninico es compatible con detergentes para la formación de la coloración o la detección colorimétrica y cuantificación de proteínas totales, la ventaja de este tipo de kits es que han sido optimizados para el uso con muestras de 5j proteínas diluidas ($0.5- 20\mu g/mL$) (PIERCE, 2001). Adicionalmente cabe recalcar que este método es el único que usa ácido bicincóninico (BCA) como un reactivo de detección de cobre (Cu^{+1}) que es formado cuando Cu^{+2} es reducido por proteínas en un ambiente alcalino (Smith & et al, 1985).

La primera fase buscó analizar los volúmenes óptimos para cargar el chip y replicar el trabajo realizado en la Universidad del Valle, Colombia. En dicha replica

se obtuvo los mismo resultados con cambios en la reacción de colorimetría debido al no uso de yoduro de potasio, lo que ocasionó una evaporación del reactivo después de 12 minutos de reaccionar en el chip. Pero generalmente, los resultados de esta fase son positivos lo cuál confirma la eficiencia de los chips para la detección de glucosa

En cuanto al diseño de los chip se puede decir que al cumplir la misma función que la membrana celular por sus zonas hidrofílica e hidrofóbica permite que la reacción se lleve a cabo de manera más eficiente debido a que los reflujos o derrames no se presentan a comparación de otro tipo de técnicas de laboratorio para detección de proteínas, como Dot Blot. Al comparar estas dos técnicas se puede decir que la metodología basada en micro dispositivos de análisis son mucho más sencillos de llevar a cabo. Después de realizar los experimentos se comprueba que el chip funciona para la fase preliminar y primera pero es necesario hacer modificaciones para la segunda fase debido a que al estar formado principalmente por fibra de celulosa el NMM que es un pigmento tiene la posibilidad a pegarse haciendo complicado el análisis de cuantificación, por lo tanto a pesar de usar el método óptimo de lavado descubierto se cree que existe aún la posibilidad de que el NMM además de reaccionar en el complejo con la protrombina permanece adherido al papel por lo tanto se aconseja realizar otro tipo de chip con una membrana de nylon para Dot Blot porque se ha visto que esta no permite que los pigmentos se adhieran y se de una mejor reacción. Otra posibilidad es la de tratar al chip con un buffer antes de hacer las cargas de reactivos respectivas para evitar que se de una interacción directa con la celulosa del papel.

Una vez terminada la investigación se concluye que la metodología de micro dispositivo de análisis en papel es óptima y que para optimizar la detección se

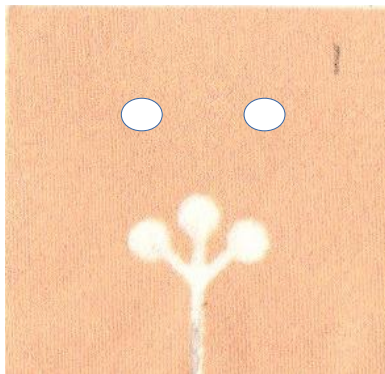
necesitan los cambios mencionados para que finalmente se pueda llevar a cabo la cuantificación debido a que la posibilidad de error se disminuye.

7. CONCLUSIONES:

- Los micro dispositivos de análisis en papel para la detección de protrombina o cualquier tipo de analito funcionan adecuadamente, por lo tanto se puede decir que por costo beneficio estos sistemas podrían ser de utilidad para la ciencia médica en el Ecuador.
- La metodología preliminar propuesta para la detección de protrombina en sangre funciona, debido a que en todos los ensayos se evidencia que después del lavado la fluorescencia continua.
- La optimización del método de lavado y secado de los chips antes del análisis de resultados es un procedimiento importante para no perder tanto complejo de aptámero con NMM y protrombina.
- Los aptámeros pueden ser de gran utilidad en la rama de las ciencias medicas porque dan la posibilidad de un sin número de aplicaciones como el caso presentado, podrían ser usados para la detección no solo de protrombina sino que de varios analitos usando diversas técnicas.
- El transiluminador de luz azul es óptimo para este tipo de análisis (que usen NMM XI), la siguiente fase deberá ser la cuantificación (TXT Borrado) de la proteína.
- Programas computacionales como ImageJ, Wolfram Mathematica2 son de utilidad para el análisis de las imágenes que permiten la determinación de la fluorescencia de la protrombina o cualquier analito detectado con aptámeros.

8. RECOMENDACIONES:

- Para realizar la replica exacta de la detección de glucosa se debe adquirir yoduro de potasio para lograr una coloración mucho más sobresaliente.
- Hacer las cuantificaciones de este trabajo realizado para conocer la cantidad exacta de protrombina detectada.
- Elaboración de un chip con más pocillos para tener un mayor número de pocillos para más ensayos simultáneos y un mayor número de controles

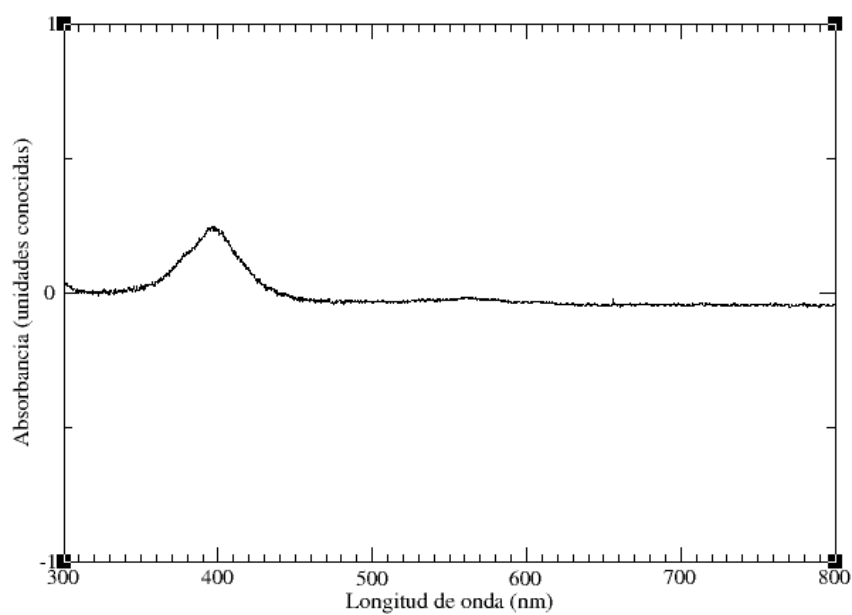


Fotografía12: Nuevo diseño de chip para optimización de respuesta y mejor comparación por control localizados fue del canal de detección

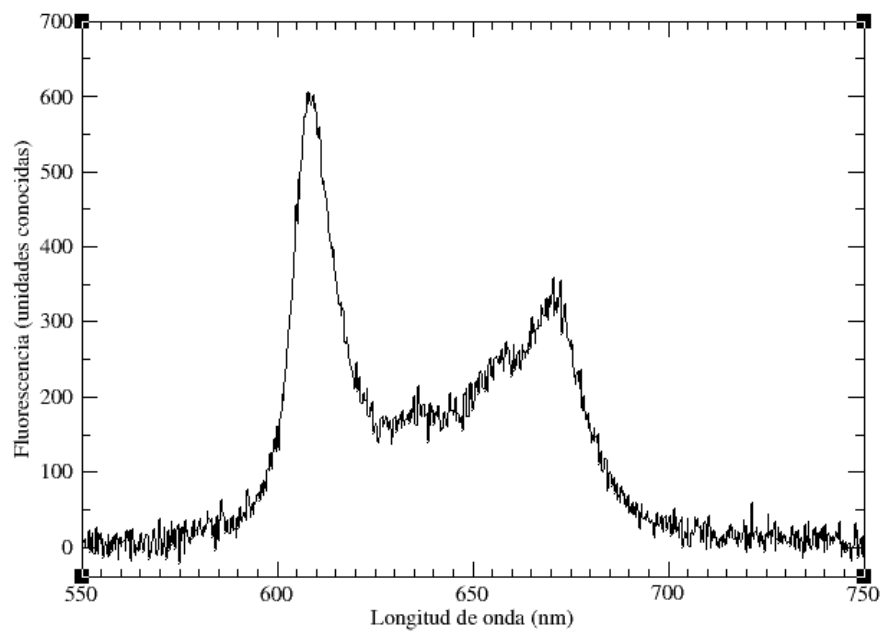
9. ANEXOS

9.1 Anexos A: Figuras y visualizaciones

Absorbancia Complejo ADN-G-cuádruplex-NMM

**Figura5.** Absorbancia Complejo ADN-G-cuádruplex-NMM.

Fluorescencia Complejo ADN-G-cuádruplex-NMM

**Figura6.** Fluorescencia Complejo ADN-G-cuádruplex-NMM.

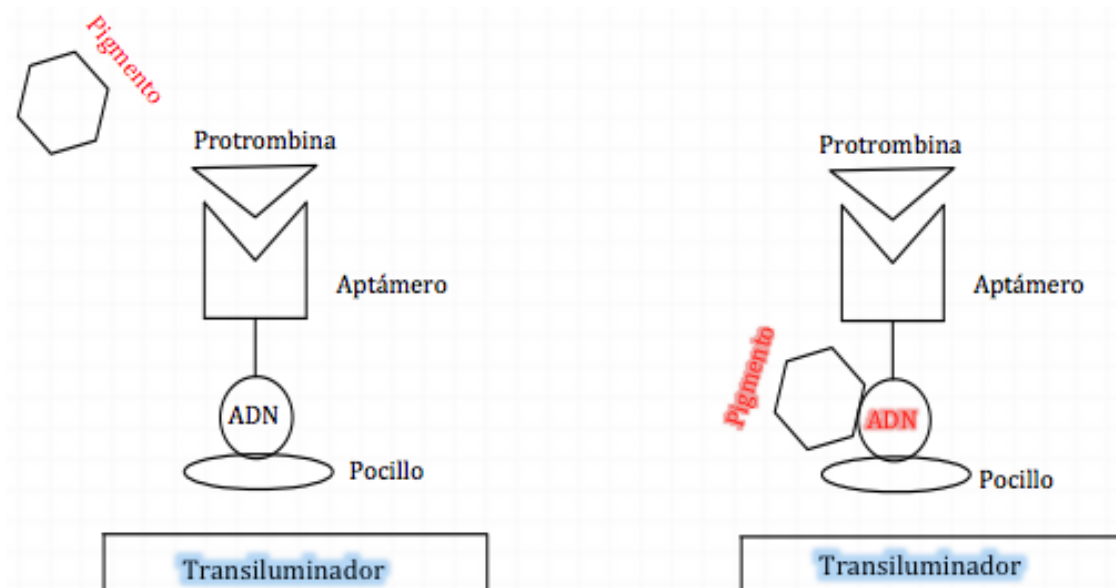
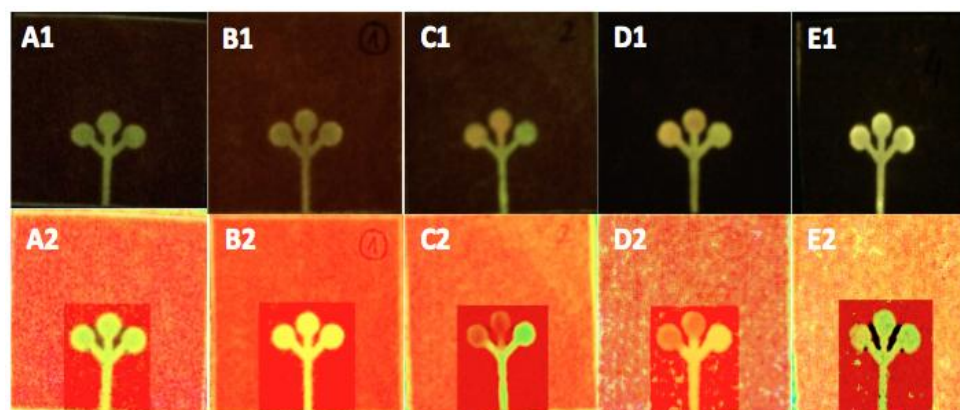
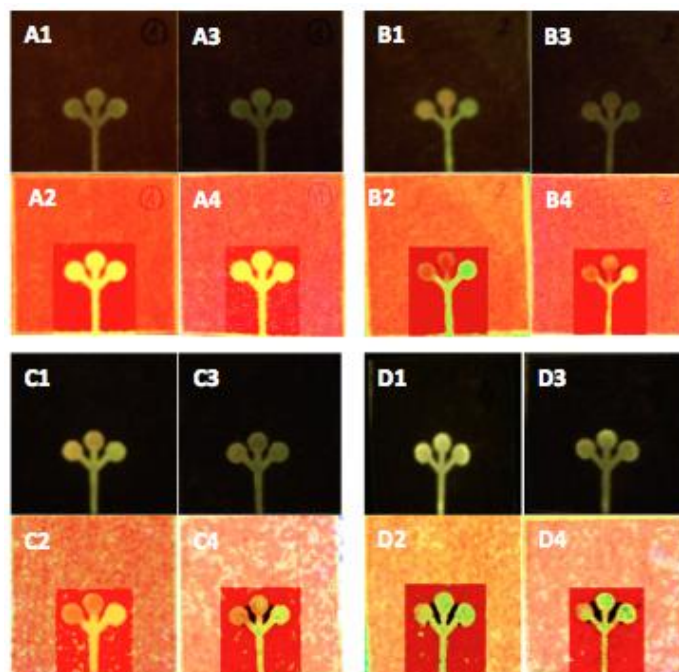


Figura7. Ensamble complejo de ADN-G-cuádruplex-NMM. Acción de fluorescencia cuando el complejo se encuentra unido; Aptámero con ADN y pigmento unido a protrombina observado en el transiluminador de luz azul.

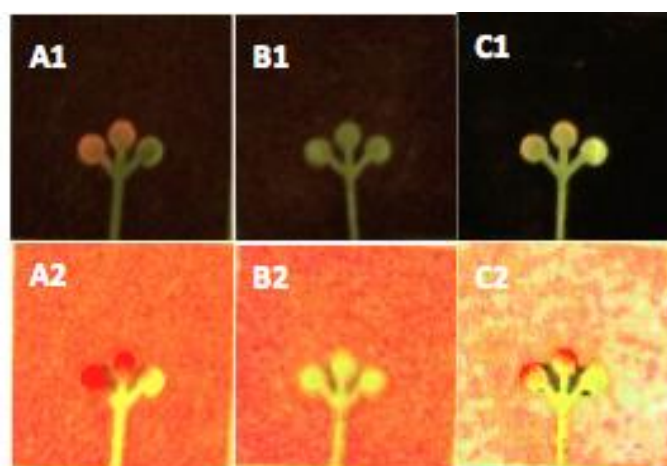
9.2 Anexos B: Fotografías chips



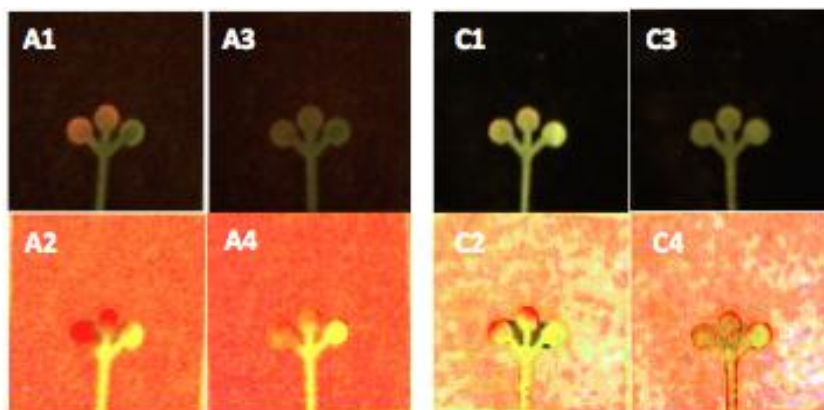
Fotografía3. Ensayos de fluorescencia: Comprobación de ensamblaje correcto de ADN-G-cuádruplex con NMM y comparación de fluorescencia con distintas variables. **A1)** Chip control, no cargado con ninguna sustancia. **A2)** Visualización de corrección fotográfica en ImageJ, no fluorescencia. **B1)** Chip cargado con 4 de plasma diluido en canal. **B2)** Visualización de corrección fotográfica en ImageJ. **C1)** Chip cargado con $1\mu L$ del complejo ADN-G-cuádruplex en los pocillos derecho y centro **C2)** Visualización de corrección fotográfica en ImageJ, observación de fluorescencia. **D1)** Chip cargado con $1\mu L$ del complejo ADN-G-cuádruplex en los pocillos derecho y centro, canal cargado con $4\mu L$ de agua destilada. **D2)** Visualización de corrección fotográfica en ImageJ, observación de fluorescencia. **E1)** Chip cargado con $1\mu L$ del complejo ADN-G-cuádruplex en los pocillos derecho y centro, canal cargado con $4\mu L$ de plasma diluido. **E2)** Visualización de corrección fotográfica en ImageJ, observación de fluorescencia.



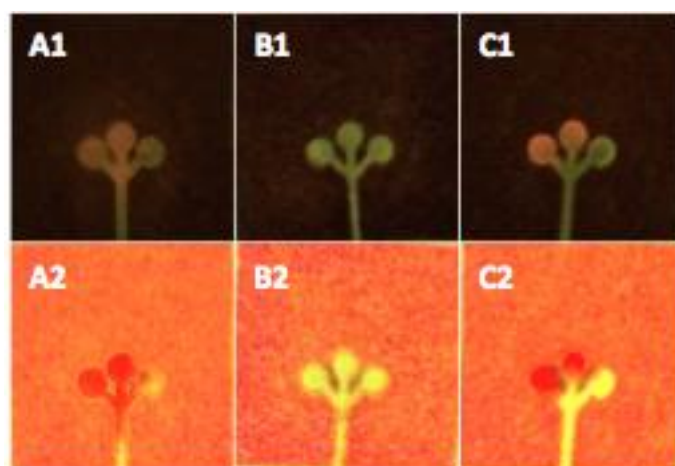
Fotografía 4. Comparación chips de microfluídica o biochips antes y después del lavado
 Comparación de métodos de lavado. Los chips rotulados con las letras A y D representan a los lavados con el primer método (A1,A3,D1,D3). Los chips rotulados con las letras B y C representan a los lavados con el segundo método (B1,B3,C1,C3). De igual forma se observan las visualizaciones de correcciones fotográficas en ImageJ para la observación de fluorescencia (A2,A4,B2,B4,C2,C4,D2,D4). Los chips con el número 1 son antes del lavado mientras que aquellos con el número 3 son después del lavado. Los chips con el número 2 muestran la visualización en ImageJ y aquellos con el número 3 muestran la visualización en ImageJ después del lavado.



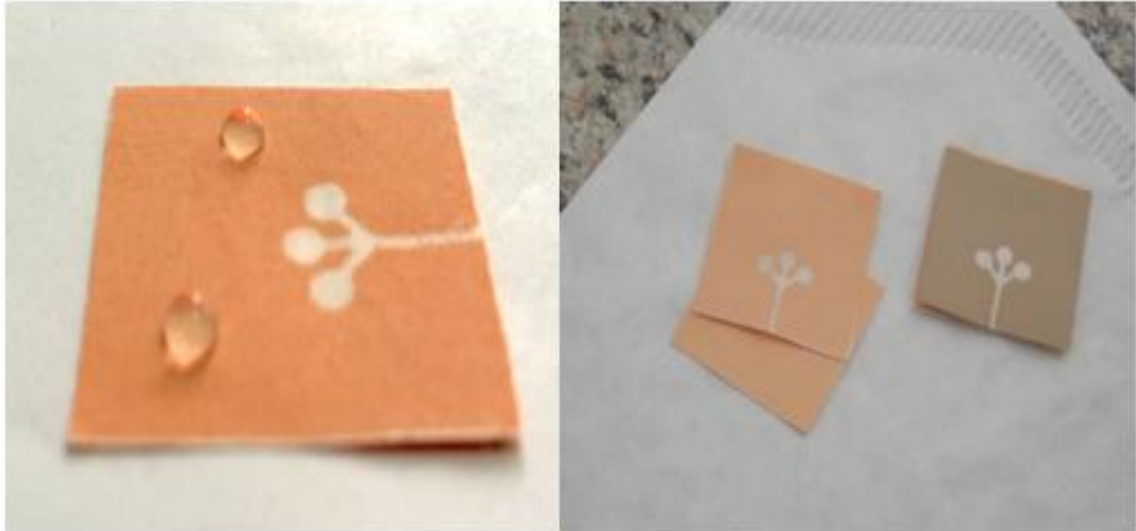
Fotografía 5. Fluorescencia emitida por la unión del complejo aptámero y NMM. Comparación de efectos de fluorescencia **A1)** Chip cargado con $1\mu L$ de complejo ADN-G-cuádruplex y NMM ($20\mu M$ y $100\mu M$ respectivamente) en pocillos derecho y centro, y $4\mu L$ de plasma diluido cargado en canal. **A2)** Visualización de corrección fotográfica en ImageJ, fluorescencia. **B1)** Chip control, sin carga alguna de sustancias en los pocillos y cargado con $4\mu L$ de plasma diluido. **B2)** Visualización de corrección fotográfica en ImageJ, fluorescencia. **C1)** Chip cargado con $1\mu L$ de ADN-G-cuádruplex $2\mu M$ en pocillos derecho y centro, y $4\mu L$ de plasma diluido cargado en canal. **C2)** Visualización de corrección fotográfica en ImageJ, fluorescencia.



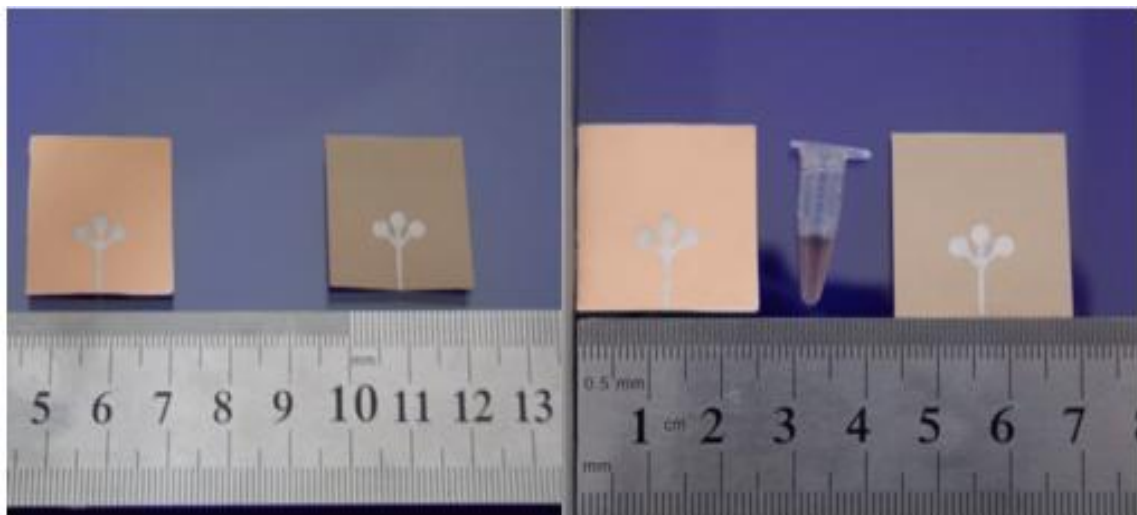
Fotografía 6. Comparación chips de microfluídica o biochips antes y después del lavado Los chips rotulados con las letras A y C son aquellos usados en el ensayo anterior (fotografía 4). El número 3 y 4 indica los chips después del lavado con el segundo método reconocido como el más óptimo. Mientras que el número 1 y 2 indica los chips antes del proceso de lavado. De igual forma se observan las visualizaciones de correcciones fotográficas en ImageJ para la observación de fluorescencia (A2, A4, C2, C4)



Fotografía 7. Diferencia de fluorescencia. Comparación entre fluorescencia **A1)** Chip cargado con $1\mu\text{L}$ de complejo ADN-G-cuádruplex y NMM ($24\mu\text{M}$ y $12\mu\text{M}$ respectivamente) en pocillos derecho y centro, y $4\mu\text{L}$ de plasma diluido cargado en canal. **A2)** Visualización de corrección fotográfica en ImageJ, fluorescencia. **B1)** Chip control, sin carga alguna de sustancias en los pocillos y cargado con $4\mu\text{L}$ de plasma diluido. **B2)** Visualización de corrección fotográfica en ImageJ, fluorescencia. **C1)** Chip cargado con $1\mu\text{L}$ de complejo ADN-G-cuádruplex y NMM ($20\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$ respectivamente) en pocillos derecho y centro, y $4\mu\text{L}$ de plasma diluido cargado en canal. **C2)** Visualización de corrección fotográfica en ImageJ, fluorescencia.

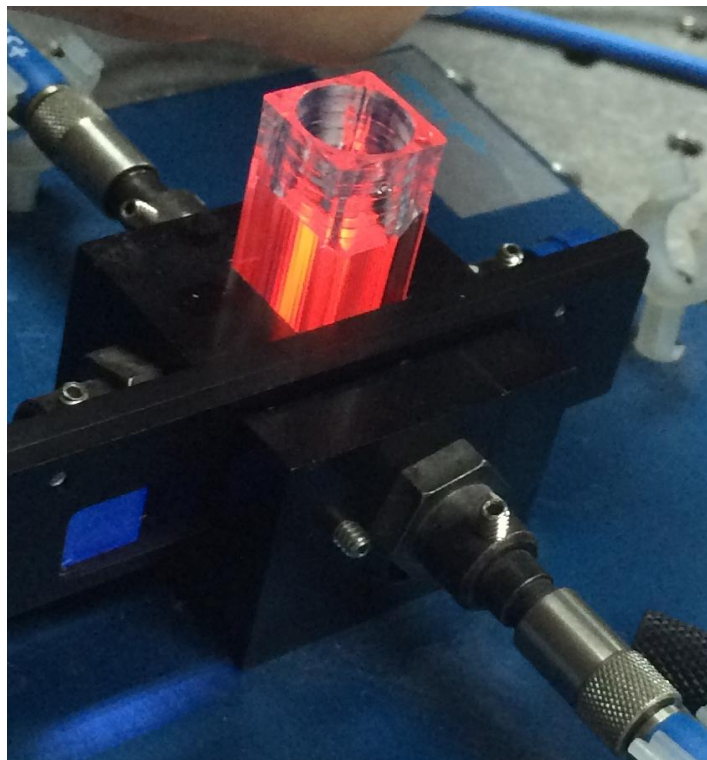


Fotografía8. Prueba de hidrofobicidad e ilustración de lavado de chips de microfluídica



Fotografía9. Dimensiones de chips de microfluídica, 2.50cm por cada lado,

9.2 Anexos C: Fotografías equipos



Fotografía10. Espectrofotómetro HR4000CG-UV-NIR marca Ocean Optics



Fotografía11. Transiluminador de luz azul (LEDs) marca Invitrogen, transiluminador Safe Imager 2.0 de luz azul

10. BIBLIOGRAFÍA

- Andrew, M. e. (1987). Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* , 70, 165-172.
- APTAMERS. (n.d). *How do aptamers work?* Retrieved 27 de 11 de 2015 from Aptamers: <http://aptamerstbc2013.wix.com/aptamers#!overview-and-history/cjg9>
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. (2008). *Biología: La vida en la tierra* (Vol. 8). México: Pearson Prentice Hall.
- Bajzar, L., Morser , J., & Nesheim, M. (1996). TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J. Biol. Chem* , 271, 16603-8.
- Battaner, E. (2000). *Biomoléculas*. Salamanca, España: Ediciones Universidad Salamanca .
- BioSystems S.A . (n.d). Glucosa oxidasa/ peroxidasa. *BioSystems: Reagents and Instruments* .
- Chen, F., Wang, Z., Lian, H.-Z., & Chen, H.-Y. (22 de September de 2013). Aptamer-based thrombin assay on microfluidics platform. *Electrophoresis* , 3260–3266
- Church , W., Ouelette, L., & Messier, T. (1991). Modulation of human prothrombin activation on phospholipid vesicles and platelets with monoclonal antibodies to prothrombin fragment. *Biol Chem* , 266, 8384- 8391.
- Collados, M., & et al. (18 de 06 de 1996). Protrombina: Estructura y Activación.
- Encyclopedia Britannica, Inc. (2015). *Proothrombin: Biochemistry* . Retrieved 20 de 09 de 2015 from Encyclopedia Britannica: <http://www.britannica.com/science/prothrombin>
- F R, D. (2008). Microfluidos: Cuánto hay de nuevo? *Revista Cub. de Física* .
- Hernández, F., & Botero, J. (2012). Aptamers: diagnostic and therapeutic agents. *SciELO* .
- Human. (2015). *Human Diagnostics World Wide* . (H. G. mbH, Producer) Retrieved 22 de 11 de 2015 from <http://www.human.de/en/index.php>
- Jakubowski , H., & Owen, W. (1989). Macromolecular specificity determinants on thrombin for fibrinogen and thrombomodulin. *J.Biol Chem* , 264, 11117-21.
- Jinbo, Z., Tao, L., Jiming, H., & Wang, E. (2010). A novel dot-blot DNAzyme-linked aptamer assay for protein detection. *Anal Chemistry* , 2923–2927 .

- Julaluk Noiphung, T. (2013). Electrochemical detection of glucose from whole blood using paper-based microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta* , 788, 39-45.
- Life Technologies. (2012). Safe Imager 2.0 Blue-light Transilluminator. *Invitrogen by Life Technologies* .
- Loenzo, C. (09 de Octubre de 2009). La microfluídica en el laboratorio. *Evolución y crecimiento en autoinmunidad y alergia* , pp. 20-21.
- Lorenzo, C. (2013). La microfluídica en el laboratorio Los análisis electroforéticos de ADN, ARN y proteínas en la palma de su mano . *Revista Bioanálisis* .
- Martinez, A. (2007). Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew Chemint* , 1318-1320.
- Montero, A. (2015). Desarrollo de un ensayo basado en aptámeros para la detección de protrombina en sangre.
- Mosing, R., & Bowser, M. (2007). Microfluidic selection and application of aptamers. *WILEY InterScience* , 1420-1426.
- MSC. (2013). *Estándares Para la Obtención de Componentes Sanguíneos y Gestión de Inventario o Stock*. Santiago de Chile: Ministerio de Salud Pública de Chile.
- National Institutes of Health . (14 de 09 de 2015). (L. H. Communications, Producer, & Department of Health & Humans Services) Retrieved 20 de 09 de 2015 from U.S National Library of Medicine : <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/prothrombin-deficiency>
- National Institutes of Health. (09 de 09 de 2015). *U.S National Library of Medicine* . (N. I. Health, Producer, & U.S Deeparment of Health and Human Services) Retrieved 20 de 09 de 2015 from <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000549.htm>
- Nemerson, Y., & Williams, W. (1990). *Biochemistry of plasma coagulation factors*. New York, New York, United States: McGraw-Hill Publishing Company.
- Nicoludis, J., Barrett, S., Mergny , J., & Yatsunyk , L. (2012). Interaction of human telomeric DNA with N-methyl mesoporphyrin IX. *Nucleic Acids Research* .
- PIERCE. (2001). *Patent No. 4839295*. United States.
- Poomrat Rattanarat, W. (2013). A microfluidic paper-based analytical device for rapid quantification of particulate chromium. *Analytica Chimia Acta* , 800, 50-55.
- Quiceno, S. (2014). Diseño, fabricación y evaluación de un dispositivo con microfluidos para la determinación de glucosa en orina . *Universidad del Valle: Facultad de ciencias Naturales y Exactas* .
- Scientific, T. (11 de 30 de 2011). *Application Note*. From Matrix Spiking – Why Spike and How to Do It .

- Smith, P., & et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid . *Anal. Biochem* , 150, 76-85.
- ThermoFisher Scientific. (2015). *ThermoFisher Scientific*. From Fluorescence Fundamentals:
<https://www.thermofisher.com/ec/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/introduction-to-fluorescence-techniques.html>
- Wang, H., Liu, Y., Liu, C., Huang, J., Yang, P., & Liu, B. (2009). Microfluidic chip-based aptasensor for amplified electrochemical detection of human thrombin. *Electrochemistry communications* .
- Wiechelmann, K., Braun, K., & Fitzpatrick, J. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* , 175, 231-237.
- Witt, M., Walter, J., & Stahl, F. (24 de March de 2015). Aptamer Microarrays—Current Status and Future Prospects . *Microarrays* .
- Xu Li, J. (2010). Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing. *Colloids and Surfaces* , 564-570