

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Diseño de un sistema de reporte, específico, *in vitro* de un metabolito de interés agroindustrial, teofilina, vía ensayos con aptámeros y fluorescencia**

Proyecto de investigación

**Paola Rivera**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

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

Quito, 16 de mayo de 2016

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

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Diseño de un sistema de reporte, específico, *in vitro* de un metabolito de interés agroindustrial, teofilina, vía ensayos con aptámeros y fluorescencia

**Paola Rivera**

Calificación:

Nombre del Profesor, Título Académico

Miguel Ángel Méndez, PhD.

Firma del profesor

Quito, 16 de mayo 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: Paola Belén Rivera Ulloa

Código: 00107631

Cédula de Identidad: 1803105426

Lugar y fecha: Quito, 12 de mayo de 2016

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme llegar con éxito al final de una etapa importante en mi vida profesional. A mi padre y madre porque gracias a ellos he podido formarme en una prestigiosa universidad y han sido el apoyo incondicional, necesario para superar cada obstáculo. A mis dos hermanas, porque las admiro y en ellas veo profesionales realizadas y representan un ejemplo a seguir para mí.

## AGRADECIMIENTOS

Manifiesto mi gratitud a la Universidad San Francisco de Quito por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional, además me gustaría agradecer a todos los profesores que formaron parte de mi formación académica y aportaron con sus conocimientos pero sobretodo a aquellos que contribuyeron a mi crecimiento como persona.

Agradezco de forma muy especial a mi director de tesis, Miguel Ángel Méndez ya que sin su paciencia y sus conocimientos este trabajo no habría sido posible. Gracias por su esfuerzo, dedicación y motivación ya que de esta manera he logrado terminar mis estudios con éxito y formarme como persona e investigadora.

Quiero expresar mis agradecimiento también a Cesar Costa y Antonio León que son directores de los laboratorios donde se llevo a cabo la parte experimental de este trabajo de titulación.

Agradezco exclusivamente a mi familia, padres y hermanas porque han sido un apoyo incondicional a los largo de toda mi carrera universitaria. Gracias porque representan un ejemplo a seguir no solo como personas sino también como profesionales y sin ustedes este logro en mi vida no habría sido posible.

Finalmente les expreso mi gratitud a todos mis compañeros biotecnólogos, pero sobretodo a aquellos amigos de todas las carreras que hice gracias a la universidad. Gracias por todos los consejos y su apoyo ya que cada experiencia vivida con ustedes fue única e irrepetible.

## RESUMEN

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas. Estos compuestos no se encuentran relacionados directamente con el crecimiento y reproducción de las plantas; sin embargo son importantes en otros procesos biológicos y ambientales como el mecanismo de defensa contra patógenos y la interacción con otros organismos como los polinizadores. La detección de metabolitos secundarios es de interés agroindustrial en varios aspectos, por ejemplo se ha demostrado que la calidad de un producto como el cacao aumenta conforme aumenta la concentración de un metabolito secundario específico, en este caso la teobromina. Adicionalmente, la positiva correlación entre el sistema de defensa de las plantas y la concentración de metabolitos en los órganos hace que la detección de estos compuestos sea interesante para el cuidado de las plantaciones. Los sistemas de reporte que se han desarrollado para detectar compuestos, en su mayoría, están direccionados a detectar genes y proteínas de interés; no obstante no se han desarrollado métodos para el análisis a profundidad de compuestos no proteicos como los metabolitos de las plantas. Algunas técnicas desarrolladas para detección de metabolitos no permiten la observación intracelular y molecular de los mismos. Por esta razón se ha propuesto desarrollar, como una prueba de concepto, un sistema de reporte *in vitro* basado en ensayos con aptámeros y fluorescencia que permita detectar la teofilina, metabolito secundario que se encuentra principalmente en plantas de te y café. Mediante la experimentación se lograron cumplir los objetivos determinando la especificidad del aptámero de teofilina y la viabilidad del sistema de reporte para futuras aplicaciones *in vivo*.

**Palabras clave:** Teofilina, aptámeros, sistema de reporte *in vitro*, fluorescencia.

## ABSTRACT

Secondary metabolites are organic compounds synthesized by plants. These compounds are not related directly to the growth and reproduction of plants; however they are important in other biological and environmental processes such as defense mechanism against pathogens and interaction with other organisms such as pollinators. The detection of secondary metabolites is of agro industrial interest in various aspects; for example it has been shown that the quality of a product such as cocoa increases as the concentration of a specific secondary metabolite increases – in this case theobromine. In addition, the positive correlation between the defense system of plants and the concentration of metabolites in organs makes detection of these compounds interesting for the care of the plantations. Reporting systems have been developed to detect compounds; mostly, these are directed towards gene detection and protein detection. However, methods for analyzing in depth non-proteic compounds as plant metabolites has not been developed. Most available techniques for detection of intracellular metabolites and molecular do not allow intracellular imaging. For this reason it is proposed as a proof of concept to develop an *in vitro* reporting system based on fluorescence and aptamers to detect theophyllin, a secondary metabolite found mainly in tea and coffee plants. Through the experimentation the objectives were achieved, first determining the specificity of an aptamer for theophylline and the viability of the reporting system for future *in vivo* applications.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1.	OBJETIVO GENERAL: .....	18
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	18
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>4.</b>	<b>ÁREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>20</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIALES .....</b>	<b>21</b>
5.1.	EXTRACCIÓN DE TEOFILINA A PARTIR DE PASTILLAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA. ....	21
5.2.	ENSAMBLAJE DE COMPLEJOS PARA CONTROL POSITIVO, NEGATIVO Y PRUEBAS CON APTÁMEROS.....	21
5.3.	OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE LAS MEMBRANAS DE NITROCELULOSA .....	21
5.4.	ANÁLISIS DE FOTOGRAFÍAS DE MEMBRANA. ....	22
<b>6.</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
6.1.	BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA Y SELECCIÓN DE APTÁMEROS PARA RECONOCIMIENTO DE TEOFILINA. ....	22
6.2.	SELECCIÓN DE UN MÉTODO DE REPORTE POR FLUORESCENCIA QUE PUEDA SER COMPATIBLE CON FUTURAS APLICACIONES INTRACELULARES. ....	23
6.3.	EXTRACCIÓN DE TEOFILINA A PARTIR DE PASTILLAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA. ....	23
6.4.	ENSAMBLAJE DE COMPLEJOS PARA CONTROL POSITIVO, NEGATIVO Y PRUEBAS CON APTÁMEROS.....	24
6.4.1.	<i>Control positivo</i> .....	24
6.4.2.	<i>Control negativo</i> .....	24
6.4.3.	<i>Complejos THPYF7 y THPYF10</i> .....	25
6.5.	PRUEBAS EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA PARA OBSERVACIÓN DE FLUORESCENCIA. ....	25



	8
6.5.1. Experimento 1.....	25
6.5.2. Experimento 2.....	26
6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS IMÁGENES OBTENIDAS.....	26
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
7.1. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA Y SELECCIÓN DE APTÁMEROS PARA RECONOCIMIENTO DE TEOFILINA. ....	27
7.2. SELECCIÓN DE UN MÉTODO DE REPORTE POR FLUORESCENCIA QUE PUEDA SER COMPATIBLE CON FUTURAS APLICACIONES INTRACELULARES.....	28
7.3. EXTRACCIÓN DE TEOFILINA A PARTIR DE PASTILLAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA. ....	28
7.4. PRUEBAS EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA PARA OBSERVACIÓN DE FLUORESCENCIA. ....	29
7.4.1. Experimento 1.....	29
7.4.2. Experimento 2.....	29
7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS IMÁGENES OBTENIDAS.....	30
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
8.1. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA Y SELECCIÓN DE APTÁMEROS PARA RECONOCIMIENTO DE TEOFILINA. ....	31
8.2. SELECCIÓN DE UN MÉTODO DE REPORTE POR FLUORESCENCIA QUE PUEDA SER COMPATIBLE CON FUTURAS APLICACIONES INTRACELULARES.....	32
8.3. EXTRACCIÓN DE TEOFILINA A PARTIR DE PASTILLAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA. ....	33
8.4. PRUEBAS EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA PARA OBSERVACIÓN DE FLUORESCENCIA. ....	33
8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS IMÁGENES OBTENIDAS.....	35
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>10. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>
<b>12. TABLAS.....</b>	<b>42</b>
<b>13. FIGURAS.....</b>	<b>45</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. APTÁMEROS DE TEOFILINA SELECCIONADOS DE LA LITERATURA.....	42
TABLA 2. RESULTADOS DE ABSORBANCIA OBTENIDOS DE LA LIBERACIÓN DE TEOFILINA EN 4 SOLUCIONES DE DIFERENTES PH A TIEMPOS DISTINTOS.....	42
TABLA 3. MATRIZ DE EXPERIMENTACIÓN PARA LAS PRUEBAS EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA.....	43
TABLA 4. VALOR P OBTENIDO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA COMPARACIÓN DE LA PRUEBA 1 CON LA PRUEBA 3 Y DE LA PRUEBA 1 CON EL CONTROL NEGATIVO. EXPERIMENTO REALIZADO CON EL COMPLEJO THPYF10.....	43
TABLA 5. VALOR PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR OBTENIDO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS IMÁGENES DEL CONTROL NEGATIVO, PRUEBA 1 Y PRUEBA 3. EXPERIMENTO REALIZADO CON EL COMPLEJO THPYF10.....	43
TABLA 6. VALOR P OBTENIDO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA COMPARACIÓN DE LA PRUEBA 1 CON LA PRUEBA 3 Y DE LA PRUEBA 1 CON EL CONTROL NEGATIVO. EXPERIMENTO REALIZADO CON EL COMPLEJO THPYF7.....	44
TABLA 7. VALOR PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR OBTENIDO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS IMÁGENES DEL CONTROL NEGATIVO, PRUEBA 1 Y PRUEBA 3. EXPERIMENTO REALIZADO CON EL COMPLEJO THPYF7.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUCTURA DE LA TEOFILINA .....	45
FIGURA 2. DIAGRAMA DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN LAS MEMBRANAS DE NITROCELULOSA PARA EL COMPLEJO THPYF7 (IZQUIERDA) Y COMPLEJO THPYF10 (DERECHA).....	45
FIGURA 3. DIAGRAMA DE REPRESENTACIÓN DEL SISTEMA DE REPORTE ESCOGIDO EN BASE A APTÁMEROS Y FLUORESCENCIA.....	46
FIGURA 4. RESULTADOS OBTENIDOS DEL ENSAYO REALIZADO CON EL COMPLEJO THPYF10 Y TEOFILINA. EN ORDEN DESCENDENTE SE OBSERVA LA FILA 1: CONTROL POSITIVO. FILA 2: CONTROL NEGATIVO. FILA 3: PRUEBA 1. FILA 4: PRUEBA 2. FILA 5: PRUEBA 3.....	47

FIGURA 5. RESULTADOS OBTENIDOS DEL ENSAYO REALIZADO CON EL COMPLEJO THPYF10 Y TEOFILINA. EN ORDEN DESCENDENTE SE OBSERVA LA FILA 1: CONTROL POSITIVO. FILA 2: CONTROL NEGATIVO. FILA 3: PRUEBA 4. FILA 4: PRUEBA 5. FILA 5: PRUEBA 6.....	47
FIGURA 6. RESULTADOS OBTENIDOS DEL ENSAYO REALIZADO CON EL COMPLEJO THPYF7 Y TEOFILINA. EN ORDEN DESCENDENTE SE OBSERVA LA FILA 1: CONTROL POSITIVO. FILA 2: CONTROL NEGATIVO. FILA 3: PRUEBA 1. FILA 4: PRUEBA 2. FILA 5: PRUEBA 3.....	48
FIGURA 7. RESULTADOS OBTENIDOS DEL ENSAYO REALIZADO CON EL COMPLEJO THPYF7 Y TEOFILINA. EN ORDEN DESCENDENTE SE OBSERVA LA FILA 1: CONTROL POSITIVO. FILA 2: CONTROL NEGATIVO. FILA 3: PRUEBA 4. FILA 4: PRUEBA 5. FILA 5: PRUEBA 6.....	48
FIGURA 8. RESULTADOS OBTENIDOS DEL ENSAYO REALIZADO CON EL COMPLEJO THPYF7 Y CAFÉINA. EN ORDEN DESCENDENTE SE OBSERVA LA FILA 1: CONTROL POSITIVO. FILA 2: CONTROL NEGATIVO. FILA 3: PRUEBA 1. FILA 4: PRUEBA 2. FILA 5: PRUEBA 3.....	49
FIGURA 9. RESULTADOS OBTENIDOS DEL ENSAYO REALIZADO CON EL COMPLEJO THPYF7 Y CAFÉINA. EN ORDEN DESCENDENTE SE OBSERVA LA FILA 1: CONTROL POSITIVO. FILA 2: CONTROL NEGATIVO. FILA 3: PRUEBA 4. FILA 4: PRUEBA 5. FILA 5: PRUEBA 6.....	49
FIGURA 10. RESULTADOS OBTENIDOS DEL ENSAYO REALIZADO CON EL COMPLEJO THPYF10 Y CAFÉINA. EN ORDEN DESCENDENTE SE OBSERVA LA FILA 1: CONTROL POSITIVO. FILA 2: PRUEBA 3. FILA 3: PRUEBA 6. EN EL RESTO DE PRUEBAS NO SE OBSERVÓ FLUORESCENCIA. ....	50
FIGURA 11. REPRESENTACIÓN DEL EQUILIBRIO QUÍMICO DE LOS COMPLEJOS. ....	50

## 1. INTRODUCCIÓN

En las plantas existe gran cantidad de compuestos orgánicos que no están directamente relacionados con el desarrollo y el crecimiento de las plantas, además se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, y se denominan metabolitos secundarios (Arias. *et al.* 2009). Las plantas resisten, atraen e inhiben a otros organismos mediante la producción de estos compuestos químicos. Existen más de 10.000 metabolitos secundarios de plantas que varían en peso molecular desde 70 a más de 390.000 daltons, sin embargo la mayoría presenta un bajo peso molecular (Arias. *et al.* 2009). Algunos metabolitos secundarios desempeñan funciones protectoras y otros son esenciales para atraer polinizadores, mientras que otros tienen múltiples funciones. Un ejemplo de metabolito secundario son las xantinas (Arias. *et al.* 2009).

Las xantinas son sustancias metiladas que pertenecen al grupo químico de las bases purínicas, poseen baja solubilidad (Zapata, *et al.* 2013). Las xantinas son un grupo de drogas que provienen de vegetales orgánicos y poseen como precursor al ácido úrico. Estos compuestos químicos, metabolitos secundarios de las plantas, son un grupo que se clasifica según la presencia o no de nitrógeno en su composición (Zapata, *et al.* 2013). De esta forma las xantinas se clasifican en el grupo de los alcaloides, que se caracteriza por llevar un grupo nitrógeno en la estructura, además son sustancias fisiológicamente activas. Las tres xantinas de mayor importancia que se han investigado son: cafeína, teobromina, teofilina. La cafeína es más abundante en las plantas de café, té y yerba mate, mientras que la teobromina es más abundante en semillas de cacao y la teofilina en plantas de té y café (Zapata, *et al.* 2013).

La cafeína es un alcaloide que se encuentra en más de 60 especies de plantas, es una xantina trimetilada y tiene compuestos relacionados como la teobromina y la teofilina. Las plantas donde generalmente se encuentra son el café, té y cacao, la cantidad de cafeína que provee cada planta depende de varios actores como la especie de la planta, tipo de hoja de té o tipo de grano de café y cacao, ubicación geográfica, clima (Zapata, *et al.* 2013).

La teofilina es una metilxantina (figura 1) inhibidora de la fosfodiesterasa y produce bronco dilatación cuando relaja el musculo liso, este compuesto dimetilado es poco soluble y muy parecido a la cafeína. La teofilina es una dioxipurina relacionada químicamente con el ácido úrico y puede aumentar la solubilidad cuando forma complejos con sales que neutralizan el pH. La vida media de la teofilina es de 10 a 36 horas y su metabolismo tiene la cinética limitada por capacidad, es decir el aclaramiento es más rápido a bajas concentraciones que a mayores ya que el sistema enzimático se satura y se detiene (Morfín, 2010).

Las metilxantinas son producidas en hojas jóvenes y frutos inmaduros. Estos compuestos continúan acumulándose de forma gradual durante la maduración de los órganos. La degradación de las metilxantinas es lenta debido a que contiene grupos metilos (Zapata, *et al.* 2013). La cafeína es principalmente catabolizada vía teofilina; posteriormente, la xantina se degrada en  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  por la vía convencional de catabolismo oxidativo de purina. La asociación entre los efectos de la cafeína y los de la teofilina se deben a que la teofilina es un metabolito de la degradación de la cafeína, así como también es un metabolito previo a la cafeína en una de sus vías de síntesis (Portillo, 2012).

La presencia de metabolitos secundarios es importante en varios aspectos para la planta, por ejemplo en el mecanismo de defensa. Las funciones de los metabolitos secundarios son necesarios en cuanto a las interacciones que las plantas tienen con otros organismos (Taiz y Zeiger, 2006). Por ejemplo con respecto a las interacciones planta-microorganismo se destaca el uso de antibióticos del grupo de los alcaloides. Estos compuestos no tienen un modo de acción especie-específico; algunos de ellos atacan contra las membranas celulares de los patógenos, y para mayor eficiencia se requieren altas concentraciones en la zona de infección de la planta. Un ejemplo de antibiótico alcaloide es la benzofenantridina alcaloide escoulerina (Taiz y Zeiger, 2006).

En cuanto a las interacciones planta- insecto, la cafeína es una toxina efectiva contra los insectos, se encuentra en las semillas y hojas de cacao, café, cola, mate, y té. A la concentración que se encuentra presente en el café o té es capaz de matar a la mayoría de larvas de la polilla del tabaco en menos de 24 horas (Vilela, *et al.* 2011). Además existen otras interacciones como planta- vertebrados, que cumplen la función de defender a la planta ya que la cafeína ataca principalmente al sistema nervioso de los animales vertebrados. Incluso las investigaciones han destacado que existen interacciones planta-planta ya que cuando crece una planta específica, y se produce cierta cantidad de metabolitos secundarios se inhibe el crecimiento de la otra planta con el fin de disminuir la competencia intraespecífica (Vilela, *et al.* 2011).

En diferentes estudios ya se ha evidenciado la correlación positiva entre la resistencia de las plantas y el contenido de metabolitos secundarios como es el caso del mecanismo de defensa contra *Hypothenemus hampei* --la broca que destruye las plantas de café-- donde la cafeína produce efectos tóxicos para este insecto (Bustamante, 2007). Otro caso es el de un

hongo específico que ataca a la planta de mate; caso donde la cafeína inhibe el crecimiento del hongo. El crecimiento del hongo es inhibido por la cafeína y se ha propuesto que la acumulación de cafeína de té es una estrategia de defensa que deriva del ataque del escarabajo (Bustamante, 2007).

Aneja y Gianfagna (2001) encontraron datos interesantes sobre el agente causal de la enfermedad de escoba de bruja, *Crinipellis pernicioso*, ataca a plantas jóvenes de cacao en crecimiento en especial sus brotes, flores y frutos en desarrollo. El crecimiento de *C. pernicioso* es significativamente inhibido por la cafeína. Por ejemplo, el tejido del tallo infectado contiene 8.7 veces más cafeína que el tallos sanos, esto sugiere que los metabolitos secundarios son parte de la respuesta de defensa de esta especie a una infección. Sin embargo, la infección puede o no afectar a los niveles de teobromina y teofilina.

Determinar los niveles de metilxantinas, principalmente en el cacao y café, ha sido de gran importancia porque la concentración de cafeína y teobromina en estas plantas puede definir la calidad del producto. Por ejemplo, los cacaos más finos tienen mayor concentración de metilxantinas. Los procesos de estrés a los que se somete el cacao como la fermentación disminuyen la concentración de metilxantinas. Otra razón de la reducción del contenido de teobromina y cafeína se debe sobre todo a la difusión de estos alcaloides con los líquidos celulares y al genotipo evaluado. Además, los niveles de metilxantinas también se ven afectadas por la época del cultivo ya que se ha encontrado mayor concentración de teobromina y cafeína en la época seca, las diferencias encontradas con relación a la época lluviosa fueron significativas (Harris, 2007).

Los aptámeros son ácidos nucleicos de cadena sencilla que pueden ser de ADN o

ARN, su estructura tridimensional específica les permite unirse con afinidad a su molécula diana (Hernández y Botero, 2012). Se obtienen mediante técnicas de selección molecular *in vitro* a través de un proceso de selección combinatoria conocido como SELEX, donde se selecciona miembros de una biblioteca que se unen a una molécula diana. El método consta de tres etapas: primero la interacción entre los miembros de la biblioteca y la molécula diana; segundo la selección de los miembros que poseen afinidad por la molécula diana y tercero el enriquecimiento de la biblioteca mediante amplificación por PCR (Hernández y Botero, 2012).

Junto con el diseño de aptámeros también es necesario un sistema de fluorescencia con el objetivo de reportar los resultados cuando el aptámero haya reconocido a la molécula de interés. Uno de los sistemas más utilizados es el método FRET que son sensores basados en la amortiguación de la luminiscencia. El mecanismo de acción se basa en el *quenching* que ocurre cuando el estado excitado del fluoróforo es desactivado por el contacto con otra molécula en la solución, el fluoróforo regresa al estado fundamental tras una colisión con el *quencher*, por lo tanto la intensidad de la fluorescencia de la sustancia disminuye (Ranking, et al. 2006). Cuando una molécula absorbe luz, pasa a un estado excitado, la velocidad a la que se forma este estado es proporcional a la concentración de la molécula, la constante de velocidad depende de la intensidad de iluminación y de la absorptividad de la molécula (Ranking, et al. 2006). Mientras más intensa sea la luz y se absorba con mayor eficacia, más rápido se forma el estado de excitación. Posteriormente a la absorción, la molécula en estado excitado pierde un fotón y retorna al estado fundamental. La velocidad a la que desaparece el estado excitado de la molécula es de igual forma proporcional a la concentración de la molécula excitada, y esta última también puede



perder energía en forma de calor. Otra opción se presenta cuando la molécula excitada transfiere energía a otra molécula denominada amortiguador (*quencher*) que pasa a un estado excitado (Ranking, et al. 2006).

Otra variación de métodos basados en fluorescencia utilizan un aptámero que se une covalentemente a la superficie de una placa de vidrio que se sumerge en una corriente de analito, en el extremo libre del aptámero se une un marcador fluorescente, una vez que se expone a la luz láser el marcador se encarga de absorber la luz y posteriormente emite radiación fluorescente. La luz láser está polarizada en el plano y cuando el marcador no gira antes de emitir radiación fluorescente, la fluorescencia está polarizada preferentemente en el plano de la luz incidente (Harris, 2007). Las moléculas como los aptámeros giran a mayor velocidad que la emisión de fluorescencia que provoca una orientación aleatoria y su emisión no polarizada. Por lo contrario, cuando está presente una proteína objetivo y se une con el aptámero, se restringe el movimiento de rotación debido al tamaño del marcador unido al aptámero, de esta forma el marcador no se mueve tanto entre la absorción y emisión de luz, por lo tanto la fluorescencia está sustancialmente polarizada (Harris, 2007).

Las aplicaciones de los aptámeros se encuentran en varios ámbitos. Por ejemplo en el aspecto médico se desarrolló un biosensor que mediante la unión con un aptámero de ADN determina la concentración de trombina en el plasma humano, este sistema se basa en la competencia de la trombina natural y trombina marcada con fluoresceína (F-trombina). Esta competencia produce la disminución de la fluorescencia al final de la fibra óptica y esta fue la señal utilizada para determinar la concentración de trombina en plasma.

Algunas ventajas de los aptámeros son: mayor estabilidad en comparación con los elementos biológicos, inmovilización sencilla sobre las superficies, producción a gran escala

con coste bajo (Hernández y Botero, 2012). Las principales características que se deben tomar en cuenta al momento de elegir un biosensor son varias, por ejemplo la alta sensibilidad, ya que existen analitos que se encuentran a concentraciones sumamente bajas en las células; alta selectividad para que el aptámero reaccione solo con la molécula diana y no con otras de propiedades similares; alta fiabilidad, es decir que los sistemas de transducción se diseñen sin ser alterados por la muestra; tiempo de vida largo, la duración de un biosensor está dada por la estabilidad química, física y mecánica a pesar de que los componentes biológicos por naturaleza tienen vida media limitada, las nuevas tecnologías han permitido que las moléculas biomiméticas no presenten este inconveniente; bajo coste de producción, generalmente los aptámeros se puede fabricar a escala industrial sin embargo existen algunos reactivos dependiendo del sistema que limitan la fabricación de estos biosensores en masa; y tiempo de análisis corto para que se permita tomar una decisión rápida en cuanto a resultados obtenidos, por ejemplo retirar materias primas o productos contaminados, intervención para corregir algún parámetro en proceso industrial, entre otros (Hernández y Botero, 2012).

Actualmente existen varias aplicaciones basadas en los bioensayos con fluorescencia y aptámeros. Una de las más conocidas es la detección de la presencia de algunos compuestos en los alimentos, como es el caso del gluten. Se desarrolló un método en el que se demostró la capacidad de los aptámeros para unirse a una fracción peptídica de la gliadina para la detección de esta proteína como solución a la necesidad de manifestar la presencia de gluten en muestras de productos alimentarios o de algún tipo que puedan provocar en individuos celíacos la intolerancia (Amaya, *et al.* 2013). En el área de la agroindustria también ha sido importante el desarrollo de biosensores principalmente para

el diagnóstico, se desarrolló un biosensor fluorescente que detecta concentraciones relevantes de teofilina mediante un aptámero de ARN del mismo metabolito, siendo capaz de diferenciar entre moléculas similares como la cafeína (Ranking, 2006). La agricultura también se ha beneficiado de bioensayos basados en fluorescencia y aptámeros, la detección específica de proteínas de virus que infectan plantas es limitada por la disponibilidad de ligandos capaces de diferenciar entre proteínas homologas cercanas de la cápside de los virus, sin embargo en 2010 se desarrolló un método capaz de detectar selectivamente en el tallo de manzana infección por virus mediante aptámeros de ADN de las proteínas de la cápside e imágenes de resonancia de plasmones superficiales para determinar los resultados observados (Lautner, et al. 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General:**

Diseñar un sistema de reporte vía fluorescencia, específico, *in vitro* para la detección de un metabolito de interés agroindustrial, teofilina, vía ensayos con aptámeros y fluoróforo.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- Identificar aptámeros para teofilina y seleccionar el mejor para la aplicación propuesta.
- Seleccionar un método de reporte por fluorescencia que pueda ser compatible con futuras aplicaciones intracelulares.
- Probar que el aptámero de teofilina solo fluoresce en unión a la molécula diana.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La cuantificación y detección de metabolitos secundarios en células vegetales tiene diversas aplicaciones, el principal es el agromejoramiento de plantas. Experimentos en plantas donde se ha modificado la expresión de metabolitos secundarios han confirmado la función defensiva de los mismos. Los metabolitos secundarios tienen importancia ecológica debido a que participan en procesos de adaptación de las plantas a su ambiente (Amaya. et al. 2013). Durante el progreso de la tecnología se han desarrollado varios métodos para detectar genes y proteínas de interés, no solo en el ámbito de la agronomía sino también médico, industrial entre otros (Aparici, 2006). Sin embargo la importancia de combinar técnicas moleculares como los aptámeros y la fluorescencia radica principalmente en la obtención de imágenes como resultados. Uno de los hechos más relevantes de la tecnología que posibilita la visualización mediante imágenes es su carácter de no ser invasiva, anteriormente se podía observar los procesos solamente en preparados celulares, sin embargo con la combinación de las tecnologías como la proteína fluorescente verde y la imagen molecular fue posible la caracterización *in vivo* de procesos biológicos a nivel celular y molecular en su medio natural. Este último aspecto ha tenido un impacto significativo en nuestra capacidad de traducir pruebas *in vitro* a *in vivo* (Aparici, 2006). Sin embargo, se han realizado escasos estudios sobre este tema para componentes celulares no proteicos; por ello es conveniente desarrollar una técnica de visualización que permita detectar metabolitos de células vegetales y obtener imágenes en tiempo real para análisis. Detectar los niveles de metabolitos secundarios como la teofilina es importante debido a que según los resultados que se obtengan permitiría entender de mejor manera su ruta en escenarios dinámicos. Adicionalmente el desarrollo de mejores métodos ayudaría a entender la

correlación entre los niveles de xantinas y la infección de una planta especialmente por hongos, ya que los metabolitos secundarios son mecanismos de defensa que las plantas utilizan para atacar a los agentes de infección.

#### **4. ÁREA DE ESTUDIO**

La extracción de teofilina de las pastillas para el control positivo y el ensamblaje de los diferentes complejos que se utilizaron se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y Alimentaria de la Universidad San Francisco de Quito. Los estudios de fluorescencia y espectrofotometría se realizaron en Laboratorio de Espectroscopia Óptica y Espectrometría de Masas de la Escuela Politécnica Nacional.

## 5. MATERIALES

### 5.1. Extracción de teofilina a partir de pastillas de liberación prolongada.

- Medio para liberación y disolución de teofilina (NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH, agua destilada).
- Pastillas de teofilina GENFAR
- Shakin incubator JISICO

### 5.2. Ensamblaje de complejos para control positivo, negativo y pruebas con aptámeros

- Oligonucleótidos: Myc1245, THPYDNAF7, THPYDNAF10
- Buffer TE 1X (5mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, pH 7)
- Buffer de litio (465mM LiCl, pH 7.0)
- Buffer HEPES 1X (50mM HEPES, 40mM KCl, 400 mM NaCl, 0.1% (w/v) TritonX-100, 2% (v/v) DMSO, pH 7.0)
- Pigmento NMM IX (Marca Frontier Scientific Inc, 5mg)
- T Personal Thermocycler (Biometra)
- Balanza analítica (Sartorius LA 230 S)
- Micropipetas BioPette

### 5.3. Obtención de imágenes de las membranas de nitrocelulosa

- Membranas de nitrocelulosa con poros de 0.45  $\mu\text{m}$
- Foto Diodo Lámpara de luz UV Thorlabs
- Moticam 5 5.0 MP
- Software Motic Live Imaging Module

#### 5.4. Análisis de Fotografías de membrana.

- Software Wolfram Mathematica 10
- Software ImageJ 1.50<sup>a</sup>

## 6. MÉTODOS

### 6.1. Búsqueda bibliográfica y selección de aptámeros para reconocimiento de teofilina.

A partir de la bibliografía se seleccionó un aptámero de teofilina de acuerdo a los diferentes criterios que se establecen. La afinidad del aptámero escogido se encontraba en un rango bajo de nanomolaridad, otro criterio importante para elegir el aptámero fue alta especificidad, debía tener capacidad para reconocer pequeños cambios estructurales entre la molécula diana y otras moléculas parecidas con el objetivo de que sea capaz de distinguir específicamente la teofilina de la cafeína que solo tienen un grupo metilo de diferencia entre las dos.

El costo de la secuencia del aptámero fue otro criterio que determinó la selección del mismo. Las secuencias de ARN son considerablemente más costosas en comparación con las moléculas de ADN, por lo cual se procedió a descartar los aptámeros cuyo número de pares de bases superaban los 36 nucleótidos. Adicionalmente, es importante mencionar que, a pesar de que los aptámeros de ARN son más específicos que los de ADN, también son más susceptibles a cualquier tipo de degradación, especialmente por enzimas como las ARNasas.

## **6.2. Selección de un método de reporte por fluorescencia que pueda ser compatible con futuras aplicaciones intracelulares.**

El sistema se escogió bajo diferentes criterios, por ejemplo debía estar basado en ácidos nucleicos y tener un tamaño relativamente pequeño (menos de 100 bases, límite con el que se puede sintetizar con alta fidelidad artificialmente un ácido nucleico). Se investigaron sistemas capaces de ser introducidos intracelularmente vía técnicas de transformación de células vegetales. El sistema debe estar contenido totalmente en una o máximo dos secuencias sean de ADN o ARN con el objetivo de que el sistema funcione *in vivo* e intracelularmente. Además, es importante que el sistema sea específico y dar una señal fuerte solamente al unirse a la molécula de teofilina.

## **6.3. Extracción de teofilina a partir de pastillas de liberación prolongada.**

Para la extracción de teofilina de las pastillas se preparó un medio de liberación compuesto de fosfato de potasio monobásico, cloruro de sodio y agua destilada. Se realizaron 4 pruebas diferentes con distinto pH cada una (6.5, 7.0, 7.5, 8.0), cada solución contenía 50 ml de medio más 5 pastillas de teofilina de 125 mg cada una. Las soluciones fueron colocadas en el Shakin incubator a 100rpm y temperatura de 37°C y se procedió a tomar 1.5 ml de cada muestra durante 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Finalmente se midió la evolución de la liberación de teofilina en función del tiempo espectrofotométricamente a una longitud de 270nm. Para determinar la concentración obtenida se realizaron los cálculos con la formula de absorbancia que relaciona el coeficiente de extinción molar y la longitud de la celda que se utiliza en el espectrofotómetro .



#### **6.4. Ensamblaje de complejos para control positivo, negativo y pruebas con aptámeros.**

Las secuencias fueron ensambladas en dos medios y bajo condiciones diferentes de acuerdo al tipo de ensamblaje que se requería para obtener los controles positivos, negativos y los complejos para las pruebas

##### ***6.4.1. Control positivo.***

Para el control positivo se ensambló la secuencia Myc1245 en buffer HEPES 1X para estimular el plegamiento G-cuádruple y se sometió a cambios de temperatura en el termociclador con el siguiente procedimiento: se calentó la muestra desde temperatura ambiente a 95°C durante 10 minutos y posteriormente se añadió buffer HEPES 1X, a continuación se corrió el segundo ciclo en el termociclador que es calentamiento inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido por un descenso de temperatura a 80°C por un minuto y luego a 40°C por 10 minutos.

##### ***6.4.2. Control negativo***

Para el control negativo se realizó un tratamiento de la secuencia Myc1245 en buffer de litio para inhibir el plegamiento G-cuadruple. Primero la secuencia fue sometida a calentamiento de 95°C durante 10 minutos, a continuación se añadió el buffer de litio y se corrió el segundo programa en el termociclador que fue 95°C por 10 minutos seguido por 10 minutos de temperatura a 4°C. Como control negativo también se utilizó la secuencia de aptámero de ADN de teofilina THPYDNA.

### **6.4.3. Complejos THPYF7 y THPYF10.**

Para realizar las pruebas por triplicado se utilizaron dos secuencias Cmyc, la primera secuencia con 7 bases complementarias al aptámero y otra secuencia con 10 bases complementarias al aptámero (Myc1245TF7 y Myc1245TF10) respectivamente. Cada una de estas secuencias fue ensamblada con el aptámero THPYDNA disuelto en agua de PCR para formar el complejo THPY-TF7 y THPY-TF10 mediante un programa de termociclador que consistió en el calentamiento del aptámero a 95°C durante 10 minutos, se añadió la secuencia Myc1245TF7 y Myc1245TF10 en tubos diferentes cada una. Posteriormente se sometió al segundo ciclo de termociclador: calentamiento inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido por un descenso de temperatura a 80°C por un minuto y luego a 40°C por 10 minutos.

### **6.5. Pruebas en membrana de nitrocelulosa para observación de fluorescencia.**

Para observar la fluorescencia en las membranas de nitrocelulosa se prepararon 6 soluciones diferentes con cada complejo, para un total de 12 soluciones. Las pruebas en membranas se realizaron por triplicado con cada uno de los complejos.

#### **6.5.1. Experimento 1.**

En una membrana se fijaron 10 puntos: en 6 tubos eppendorf se colocó 5µl del complejo THPYF10, en los tres primeros tubos (1',2',3') se colocó primero 5µl de la teofilina y pasados 10, 20 y 30 minutos se añadió 5µl de NMM a los tubos respectivamente; para los 3 tubos sobrantes (4',5',6') se colocó primero el pigmento NMM y pasados 10, 20 y 30 minutos se añadió teofilina a los tubos respectivamente. En la tabla 3 se observa la matriz de experimentación para llevar a cabo la preparación de las soluciones para la membrana de

nitrocelulosa. Adicionalmente, se pusieron dos controles positivos y dos controles negativos. En el tubo eppendorf del control positivo se añadió el complejo Myc1245 ensamblado en HEPES, más NMM después de 10 minutos y teofilina después de 20 minutos y en el segundo control positivo no se adicionó teofilina. Para los dos controles negativos, en un tubo eppendorf se colocó la secuencia Myc1245 ensamblado en buffer de litio, más NMM después de 10 minutos y teofilina después de 20 minutos y en otro tubo eppendorf no se añadió la teofilina. Adicionalmente se realizaron otros dos controles negativos con el complejo THPYF7 y THPYF10, se colocaron 5 $\mu$ L de cada complejo en tubos eppendorf diferentes, pasados los 10 minutos se adicionó 5 $\mu$ L de NMM y se dejó por 10 minutos. Finalmente se tomó 1 $\mu$ L de cada uno de los 10 tubos y se agregó a la membrana de nitrocelulosa previamente marcada para tomar fotos con el microscopio.

### **6.5.2. Experimento 2.**

Para el experimento 2 se realizó el mismo procedimiento desarrollado en el experimento 1 para los controles positivos y negativos, para los tubos de prueba (1'',2'',3'',4'',5'' y 6'') se utilizó el complejo THPYF7 y se realizó el mismo protocolo mencionado anteriormente. Se procedió a tomar 1 $\mu$ L de cada tubo y se colocó en una membrana de nitrocelulosa para tomar fotos con el microscopio. El diagrama de la experimentación en las membranas se pueden observar en la figura 2.

### **6.6. Análisis estadístico de las imágenes obtenidas**

El análisis de las imágenes consistió de dos fases; en la primera fase, se procedió a ordenar las imágenes de acuerdo a cada prueba realizada y a cada complejo estudiado, junto con los controles positivos y negativos, esto se llevó a cabo en el software Wolfram

Mathematica. En la segunda fase se calculó la densidad integrada de cada muestra en el software ImageJ.

Las imágenes abiertas en el software ImageJ fueron cambiadas a la escala de grises con la opción “*RGBstack*” para obtener datos más homogéneos. Posteriormente se realizó la medición de la densidad integrada y se utilizó la herramienta “*Measure*”, se eligió las opciones “*Integrated density*” y “*Área*”. En una misma fotografía se realizaron 4 mediciones de la referencia; es decir de la parte de la membrana donde no se observaba muestra, 4 del contorno de la fluorescencia y 4 mediciones del centro de la fluorescencia, para obtener un total de 12 mediciones por cada fotografía. Cada medición se observa en una tabla que genera el programa después de seleccionar con un círculo la muestra de la membrana. Después, la tabla fue exportada a Excel para realizar el análisis estadístico de los valores obtenidos.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Búsqueda bibliográfica y selección de aptámeros para reconocimiento de teofilina.**

En la búsqueda bibliográfica se encontraron 5 secuencias de aptámeros que podían ser posibles opciones para las pruebas; sin embargo, se procedió a escoger solamente un aptámero (secuencia #3 de la Tabla 1) en base a los criterios mencionados anteriormente. Este aptámero es un híbrido ARN/ADN cuyo número de bases es 33, la secuencia consenso de ARN contiene un motivo de 15 nucleótidos, los mismos que son requeridos para la alta afinidad de unión con el ligando, dentro de la secuencia consenso 14 nucleótidos son altamente conservados y 1 nucleótido semi-conservado que puede ser una adenina o citosina. Este aptámero fue capaz de diferenciar a la teofilina de la cafeína, además en

comparación con aptámeros de ARN, este resultaba más económico. Los principales aptámeros obtenidos, posibles candidatos para las pruebas se presentan en la tabla 1.

### **7.2. Selección de un método de reporte por fluorescencia que pueda ser compatible con futuras aplicaciones intracelulares.**

El método escogido de reporte consiste en un sistema en el cual se puede determinar la ausencia o presencia de teofilina una vez que se observe o no fluorescencia. La secuencia de aptámero escogida se ensambló con la secuencia reportera Cmyc, una vez que la teofilina entra en contacto con el aptámero, la alta afinidad del mismo permite que este se una con la teofilina, de esta manera se libera la secuencia Cmyc que al ser reconocida por el pigmento NMM, bajo luz UV emite fluorescencia. La figura 3 representa el diagrama del sistema de fluorescencia escogido.

### **7.3. Extracción de teofilina a partir de pastillas de liberación prolongada.**

Los resultados de la extracción de teofilina se obtuvieron en términos de absorptividad, se pudo observar la mayor absorptividad en la solución de pH 8 y a los 120 minutos obteniendo un valor de 0.150. Sin embargo, debido a que el coeficiente de extinción molar reportado en algunas publicaciones se expresa a 277nm, se procedió a tomar la absorbancia de la solución a pH 8 y a los 120 minutos, obteniendo un resultado de 0.235, con este valor fue posible calcular la concentración de teofilina en la solución mediante la fórmula de absorptividad. El resultado de concentración de teofilina para la realización de las pruebas fue 23  $\mu\text{M}$ . Los resultados de los datos de absorbancia obtenidos de las diferentes soluciones se muestran en la tabla 2.

## **7.4. Pruebas en membrana de nitrocelulosa para observación de fluorescencia.**

### ***7.4.1. Experimento 1***

Debido a que los ensayos se realizaron por triplicado fue posible obtener tres imágenes para cada prueba; es decir tres imágenes para el control positivo, tres para el control negativo y tres imágenes para las 6 pruebas de variación de tiempo, para un total de 24 imágenes por cada complejo. En las imágenes obtenidas de la membrana de nitrocelulosa del experimento 1, los tres controles positivos (secuencia Myc1245 ensamblada en buffer HEPES), fluorescieron después de entrar en contacto con el NMM. En cuanto a los controles negativos (secuencia Myc1245 ensamblada en buffer de litio y complejo THPYF10, sin teofilina), se obtuvo varios resultados. Como se observa en la figura 4 solamente se visualiza fluorescencia en dos de las tres imágenes. En cuanto a las otras 6 pruebas se pudo observar que todas fluorescieron con la misma intensidad. Adicionalmente al comparar visualmente la fluorescencia de las 6 pruebas es posible observar que las pruebas 3 y 6 fluorescen con mayor intensidad que el resto de pruebas (ver figuras 4 y 5).

### ***7.4.2. Experimento 2***

En los ensayos realizados con el complejo THPYF7 se pudieron observar resultados similares a los obtenidos en el experimento 1. En cuanto a los controles positivos se observó fluorescencia en las tres imágenes. Sin embargo, a diferencia de los resultados del experimento 1, en el experimento 2 las tres imágenes de los controles negativos fluorescieron (ver figura 6). Se determinó la presencia de fluorescencia en las fotografías obtenidas de las 6 pruebas. Adicionalmente, fue posible distinguir que las pruebas 3 y 6 fluorescen más que el resto de pruebas (ver figuras 6 y 7).

### **7.5. Análisis estadístico de las imágenes obtenidas**

Los resultados del análisis estadístico de las imágenes corroboraron los resultados determinados visualmente. En este análisis se comparó las pruebas de mayor interés. De esta manera se analizó el valor P mediante el test T student de dos colas para las pruebas 1 y 3, así como también el valor P entre la prueba 1 y el control negativo, para determinar cuan significativa es la diferencia de fluorescencia entre los dos resultados. Adicionalmente, también se calculó el promedio de los valores de fluorescencia de las pruebas del control negativo, pruebas 1 y 3 donde se pudo observar que los valores aumentaron respectivamente para cada prueba. Este análisis se realizó tanto para el complejo THPYF7 así como para el complejo THPYF10. Los resultados del análisis estadísticos se observan en las tablas 4 y 5.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Búsqueda bibliográfica y selección de aptámeros para reconocimiento de teofilina.

En la búsqueda bibliográfica se lograron determinar 5 secuencias de aptámeros de teofilina, la especificidad de cada una de estas secuencias había sido determinada previamente y se había definido que los aptámeros de ARN presentan mayor especificidad para la molécula de teofilina en comparación con aptámeros de ADN que pueden presentar falsos positivos. Sin embargo es importante mencionar que los aptámeros de ARN son más sensibles debido a que el ADN es más resistente a posibles degradaciones. Debido a que se necesitaba un aptámero con alta capacidad de distinción entre cafeína y teofilina se procedió a descartar los aptámeros de ADN. Adicionalmente la selectividad de un aptámero está ligada al número de ciclos de SELEX que se ha llevado a cabo así como también a la efectividad del proceso de separación de moléculas que se unen con alta o baja afinidad a la molécula diana. De esta manera el aptámero escogido había pasado por un proceso de selección in vitro con el fin de seleccionar y amplificar secuencias de ADN que tengan selectividad para teofilina sobre cafeína. Las concentraciones de teofilina y cafeína con las que se trabajó fue 20  $\mu\text{M}$ ; no obstante esto no representó ninguna limitación para los ensayos ya que el aptámero escogido tienen alta afinidad por la molécula diana, es decir es capaz de reconocer concentraciones hasta de nanomolaridad.

Dentro de los aptámeros de ARN consultados en la bibliografía se encontraron secuencias con diferentes números de pares de bases; sin embargo, debido a que se requería desarrollar un sistema viable y económico para detección de teofilina se procedió a escoger aptámeros que tengan un número de bases promedio entre todos los seleccionados, cuyo sitio activo tenga el menor número de pares de bases con el fin de no



alterar la secuencia de unión a la molécula de teofilina, de esta manera se determinó que la mejor secuencia de aptámero de teofilina para realizar las pruebas es 5'-GGC GAU ACC AGC CGA AAG GCC CUU GGC AGC G(dU) C-3' con un sitio activo de 15 nucleótidos que deben ser conservados ante cualquier modificación que se requiera realizar. Mediante los ensayos realizados fue posible determinar que las modificaciones que se aplicaron a la secuencia de aptámero obtenida en la bibliografía fueron pertinentes. A pesar de que el cambio de ADN a ARN representaba una posible disminución de la selectividad del aptámero por la molécula diana, se determinó que el híbrido ADN/ARN utilizado aún mantiene la capacidad de reconocer pequeños cambios estructurales entre moléculas similares como la cafeína y teofilina.

## **8.2. Selección de un método de reporte por fluorescencia que pueda ser compatible con futuras aplicaciones intracelulares.**

La selección del método de reporte se basó en el sistema desarrollado por Ranking y sus colaboradores (2006). A diferencia del sistema de Ranking, el método de reporte de este trabajo se basa en observar el incremento de la fluorescencia una vez que la teofilina sea reconocida por su aptámero. La tecnología ha permitido que se desarrollen sistemas de reporte direccionados a la detección de genes y proteínas de interés. Una ventaja importante de estos métodos es que permite la visualización de imágenes como resultados por lo tanto se puede clasificar como una técnica no invasiva. Esto da lugar a que se desarrolle caracterización *in vivo* de los procesos biológicos a nivel celular y molecular en su medio natural. No obstante, no se han desarrollado sistemas de reporte para la detección de compuestos no proteicos como es el caso de los metabolitos secundarios de las plantas.

### **8.3. Extracción de teofilina a partir de pastillas de liberación prolongada.**

La evolución de liberación de teofilina en función del tiempo se siguió espectrofotométricamente a una longitud de 270 nm. El mayor resultado de absorbancia en cuanto a liberación de teofilina se obtuvo con la solución de pH 8, temperatura 37°C y 120 minutos. Se midió la absorbancia a diferentes valores de pH y se determinó que a medida que aumenta el pH también aumenta la liberación de la teofilina de la pastilla. A pH superiores 6.5 la liberación es más rápida debido a que la película de los gránulos que se encuentran dentro de la pastilla se hidratan más rápido y a pH inferiores la película no se hidrata, pero los gránulos sufren un proceso de disolución gradual. El porcentaje máximo de liberación crece con el pH del medio, en un valor de pH 8.0 se obtiene una liberación de 100% por lo cual no es necesario seguir aumentando el pH del medio, además a medida que pasa el tiempo también se obtiene mayor liberación como se puede observar en la tabla 2 , obteniendo una absorbancia de 0.150. Sin embargo, a partir de este tiempo la liberación de teofilina se mantiene ya que a los 120 minutos se libera el 100% de teofilina de los micro gránulos de las pastillas.

### **8.4. Pruebas en membrana de nitrocelulosa para observación de fluorescencia.**

En base a los resultados obtenidos de las imágenes de las membranas de nitrocelulosa se puede determinar varias conclusiones. Primero, los resultados obtenidos fueron los esperados de acuerdo a la bibliografía estudiada, al aptámero y al sistema escogido. Como conclusiones generales se puede determinar que existe mayor intensidad de fluorescencia en las pruebas realizadas con el complejo THPYF10 en comparación con el complejo THPYF7. Adicionalmente es posible observar que existe mayor fluorescencia en las imágenes de las pruebas 3 y 6 de los ensayos con ambos complejos. Estos resultados permiten determinar

que mientras más tiempo de contacto exista entre el complejo, el pigmento NMM y la teofilina, la fluorescencia aumenta. Los complejos THPYF10 y THPYF7 de las soluciones realizadas en tubos Eppendorf para las pruebas 3 y 6 permanecieron en contacto con el NMM y la teofilina durante 30 minutos. A diferencia de las pruebas 1 y 2 que tuvieron contacto con el NMM y la teofilina durante 10 y 20 minutos respectivamente, lo cual arroja como conclusión que si existe un factor tiempo que influye en los ensayos. A pesar de que la fluorescencia observada en las imágenes de la prueba 1 son las más que menos fluorescen en comparación con el resto de imágenes de las pruebas con teofilina, también es posible determinar que estas imágenes manifiestan mayor fluorescencia que cualquiera de las pruebas realizadas con cafeína, lo cual permite concluir que el aptámero es capaz de reconocer los cambios estructurales entre moléculas similares a la teofilina y por lo tanto su especificidad se ve expresada en el aumento de fluorescencia cuando reconoce a la molécula diana. En la figura 10 es posible observar que solo se obtuvo fluorescencia en las pruebas 3 y 6 de los ensayos con cafeína y complejo THPYF10, esto significa que a medida que pasa el tiempo el aptámero es capaz de reconocer a la cafeína, aunque con menor especificidad de la que reconoce a la teofilina. En cuanto a las pruebas realizadas con el complejo THPYF7 y cafeína se obtuvo imágenes para todos los ensayos (ver figuras 8 y 9), es decir este complejo es menos específico que el complejo THPYF10 ya que sin importar la variación del tiempo se pudo observar mínima fluorescencia.

Es importante mencionar que dos de los tres controles negativos realizados con teofilina y el complejo THPYF10 fluorescieron, por otro lado los tres controles negativos de los ensayos con el complejo THPYF7 también fluorescieron. Todos los resultados obtenidos de las imágenes de la membrana de nitrocelulosa puede ser explicado mediante lo que se

denomina el equilibrio químico de los complejos (figura 11). Cuando el aptámero esta unido a la secuencia reportera Cmyc y se añade teofilina entonces el equilibrio se desplaza hacia la izquierda y el aptámero se une a la teofilina dejando libre a Cmyc que es reconocida por el NMM y esto provee la alta fluorescencia. Sin embargo, cuando se añade cafeína al aptámero unido a la secuencia reportera, entonces el equilibrio se desplaza hacia la derecha y a pesar de que el aptámero no libera por completo a la secuencia reportera Cmyc, una parte de ella se libera y es reconocida por el pigmento NMM lo cual expresa baja fluorescencia al momento de ser excitado con luz UV. Por esta razón es posible observar cierta intensidad de fluorescencia tanto en los controles negativos así como también en los ensayos realizados con cafeína.

#### **8.5. Análisis estadístico de las imágenes obtenidas.**

El análisis estadístico de las imágenes obtenidas realizado mediante el software ImageJ corroboró los resultados observados en las fotografías de las membranas de nitrocelulosa. Se procedió a realizar el análisis estadístico de las pruebas mas relevantes, de esta forma se comparó la prueba 1 con la prueba 3 y también con el control negativo, tanto para los ensayos con el complejo THPYF10 y THPYF7. El valor P obtenido determina la probabilidad de que estas dos pruebas arrojen resultados similares. El valor P obtenido comparando la prueba 1 con la 3 (complejo THPYF10) fue bajo (tabla 4); sin embargo el valor P de la comparación de la prueba 1 con el control negativo fue aún más bajo, lo cual permite determinar que la probabilidad de que la fluorescencia entre estos ensayos sea similar, es sumamente baja. Adicionalmente se obtuvo el valor promedio para las pruebas 1, 3 y el control negativo y se logro determinar que este valor aumenta considerablemente desde el valor negativo, seguido por la prueba 1 y finalmente la prueba 3 es la que tiene el valor más

alto. Se calculó la desviación estándar para las tres pruebas y se estableció que son valores bajos en comparación con los valores promedio.

En cuanto al análisis estadístico para las pruebas con el complejo THPYF7 se obtuvo resultados similares. Los valores P al comparar las pruebas 1 y 3 y al comparar 1 con el control negativo fueron bajas (tabla 6), lo cual indica la baja probabilidad de que estos resultados se parezcan. Adicionalmente se pudo determinar que el valor promedio de estas pruebas aumenta en el siguiente orden: control negativo, prueba 1 y prueba 3, lo cual es proporcional a la intensidad de fluorescencia observada en las imágenes. De igual forma la desviación estándar es baja en comparación con el valor de los promedios por lo tanto se puede determinar que el análisis de datos es confiable.

## 9. CONCLUSIONES

- El sistema de reporte de fluorescencia *in vitro* es una técnica viable que funciona correctamente para la detección de compuestos no proteicos, como los metabolitos secundarios de interés agroindustrial, en este caso la teofilina .
- El aptámero seleccionado es adecuado para reconocer la molécula diana de interés. Este aptámero tiene alta afinidad, es decir es capaz de reconocer concentraciones bajas de teofilina. Adicionalmente posee alta especificidad para este compuesto ya que es capaz de distinguir entre moléculas similares a la teofilina que tienen pequeños cambios estructurales en la conformación como la cafeína.
- Mientras más tiempo de contacto existe entre el complejo (THPYF7 o THPYF10), el pigmento NMM y la teofilina se puede observar que la intensidad de la fluorescencia aumenta, por lo tanto es posible determinar que existe un factor tiempo que influye en los resultados de los ensayos.
- El equilibrio químico de los complejos permite explicar lo que ocurre durante los ensayos, de esta manera fue posible determinar la presencia de fluorescencia en las pruebas realizadas con cafeína y también la leve intensidad de fluorescencia de las imágenes de los controles negativos.

## 10.RECOMENDACIONES

- Los resultados obtenidos en este trabajo son preliminares, debido a que el objetivo a futuro es desarrollar un sistema que permita la identificación de compuestos no proteicos *in vitro* a nivel intracelular y molecular dentro del medio natural, por lo tanto se recomienda continuar con la investigación para lograr la optimización del sistema de reporte.
- Se recomienda realizar ensayos con aptámeros de ARN, puesto que la bibliografía señala que estas secuencias tienen mayor especificidad para reconocer a la molécula diana, de esta manera se podrían evitar falsos positivos al momento de obtener las imágenes.
- Se recomienda probar con mayor número de bases complementarias entre la secuencia de reporte y el aptámero con el objetivo de evitar que este complejo formado se separe antes de entrar en contacto con la molécula diana.
- Es recomendable trabajar con soporte de vidrio para colocar las diferentes pruebas ya que en las imágenes se pudo observar que en el contorno de la muestra colocada en las membranas de nitrocelulosa existe mayor fluorescencia que en el centro de la muestra. Esto se debe a la propiedad de difusión . No obstante si se trabajaría con soporte de vidrio la fluorescencia, por ende la concentración sería homogénea en toda la muestra

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Amaya, S., Ordieres, A. y Castañón, M. (2013). Aptámeros específicos contra el gluten y método de detección del gluten asociado. Universidad de Oviedo.
- Aneja, M. y Gianfagna, T. (2001). Induction and accumulation of caffeine in young, actively growing leaves of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by wounding or infection with *Crinipellis pernicioso*. ELSEVIER. Vol 59 (1): 13-16
- Aparici, C. (2006). Introducción a la Imagen Molecular. Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular. Vol. 25 (6): 394-409
- Arias, M. et al. (2009). Engineering Aspects Of The In Vitro Plant Cell Culture For The Production Of Secondary Metabolites. *Dyna*, Nro. 157, pp. 109 -121
- Bustamante, A. (2007). Evaluación De 42 Extractos Vegetales Para El Control De La Broca Del Café (*Hypothenemus Hampei*, Ferrari). Universidad Tecnológica De Pereria. Facultad De Tecnología. Escuela De Tecnología Química
- García, A. y Pérez, A. (2009). Metabolismo Secundario de Plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. Vol. 2 (3): 119-145
- Harris, D. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo*. Ed. Reverte. 3ra edición. España
- Heck, C. y Mejía, E. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *Journal Of Food Science*. Vol. 72(9): 138-151
- Hernández, F. y Botero, J. (2012). Aptameros: agentes diagnósticos y terapéuticos. *Iatreia* Vol, 25 (2): 159 - 168



- Martínez, C. et al. (2012). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Vol 17(4): 320-329
- Pérez, N., Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*. Vol. 11 (4): 195 - 211
- Portillo, E. y Portillo, A. (2012). Chemical Characteristics Of Creole Cocoa (*Theobroma cacao* L). Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía. Venezuela.
- Ranking, C. et al. (2006). A Simple Fluorescent Biosensor For Theophylline Based On Its RNA Aptamer. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* Vol 25:1407–1424
- Sepúlveda, G. (2004). Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Departamento de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Soukup, G., Emilsson, G. y Breaker, R. (2000). Altering Molecular Recognition of RNA Aptamers by Allosteric Selection. *Journal Molecular Biology*. Vol. 298: 623-632
- Spotti, I. (2012). Identificación y valoración de metilxantinas en especies de *Ilex* autóctonas de America del sur. Universidad de Belgrano, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Argentina.
- Suess, B., Berens. C., Stentz, R. y Hillen, W. (2004). A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo. *Nucleic Acids Research*. Vol, 32 (4). 1610-1614.
- Taiz, L. y Zeiger, E (2006). *Fisiología Vegetal*. Ed: Index. 3ra edición.

- Vilela, A., González, S. y Ravetta, D. (2011). Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología Austral* 21:317-327
- Waller, G., Ashihara, H. y Suzuki, T. (2009). Department of Biochemistry, Oklahoma Agricultural Experiment Station, Oklahoma State University, Stillwater, U.S.A
- Zapata, S., Tamayo, A. y Rojano, B. (2013). Effect of fermentation on the antioxidant activity of different Colombian cocoa clones. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Vol,18(3):391-404
- Zimmerman, G., Jenison, R., Wick, C., Simorre J-P. y Pardi, A. (1997). Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA. *Nature*. Vol, 4(8): 644-649.

## 12. TABLAS

**Tabla 1.** Aptámeros de teofilina seleccionados de la literatura.

#	Secuencia	# de nucleótidos	Sitio activo
1	5' -CTC ATC TGT GAT CTA AGG CGA UAC CAG CCG AAA GGC CCU UGG CAG CGU C-3'	49	NA
2	5' GGU GAU ACC AGC AUA GUG ACU AUG CCC UUG GCA GCA CC 3'	38	6
3	5' - GGC CAU ACC AGC CGA AAG GCC CUU GGC AGC GUC-3'	33	13
4	5' GGCG AUA CCA CCG AAA GGC CCU UGG CAG CGUC 3'	31	15
5	5' - AUAC CAG CCG AAA GGC CCU UGG CAG-3'	25	NA

\*NA: No se encontró reporte del sitio activo

**Tabla 2.** Resultados de absorbancia obtenidos de la liberación de teofilina en 4 soluciones de diferentes pH a tiempos distintos.

pH \ Tiempo/min	6.5	7.0	7.5	8.0
15	0.033	0.057	0.046	0.058
30	0.023	0.069	0.057	0.055
45	0.017	0.064	0.050	0.082
60	0.025	0.076	0.071	0.100
90	0.026	0.092	0.107	0.146
120	0.0331	0.099	0.131	0.150

**Tabla 3.** Matriz de experimentación para las pruebas en membrana de nitrocelulosa.

<b>Prueba</b> <b>Tiempo/min</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>0</b>	THPYF7	THPYF7	THPYF7	THPYF7	THPYF7	THPYF7
	Teofilina	Teofilina	Teofilina	NMM	NMM	NMM
<b>10</b>	NMM			Teofilina		
<b>20</b>	Membrana	NMM		Membrana	Teofilina	
<b>30</b>		Membrana	NMM		Membrana	Teofilina
<b>40</b>			Membrana			Membrana

**Tabla 4.** Valor P obtenido del análisis estadístico T student de dos colas, de la comparación de la prueba 1 con la prueba 3 y de la prueba 1 con el control negativo. Experimento realizado con el complejo THPYF10.

<b>Complejo</b>	<b>Prueba</b>	<b>Valor P</b>
THPYF10	1 vs. 3 (10 vs. 30 min)	0,000359494
THPYF10	1 vs. control negativo	1,27636E-12

**Tabla 5.** Valor promedio y desviación estándar obtenido del análisis estadístico de las imágenes del control negativo, prueba 1 y prueba 3. Experimento realizado con el complejo THPYF10.

<b>Prueba</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<i>Control negativo</i>	9838,6	1123,6
<i>1 (10 min)</i>	50206,1	17229,0
<i>3 (30 min)</i>	73671,5	24355,7

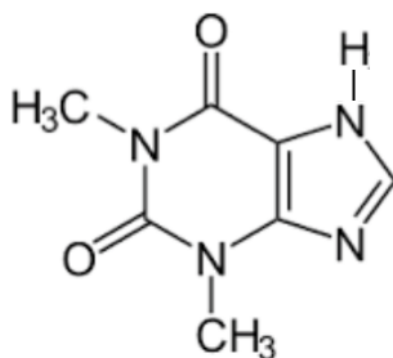
**Tabla 6.** Valor P obtenido del análisis estadístico T student de dos colas, de la comparación de la prueba 1 con la prueba 3 y de la prueba 1 con el control negativo. Experimento realizado con el complejo THPYF7.

<b>Complejo</b>	<b>Prueba</b>	<b>Valor P</b>
THPYF7	1 vs. 3 (10 vs. 30 min)	1,03356E-08
THPYF7	1 vs. control negativo	1,10988E-06

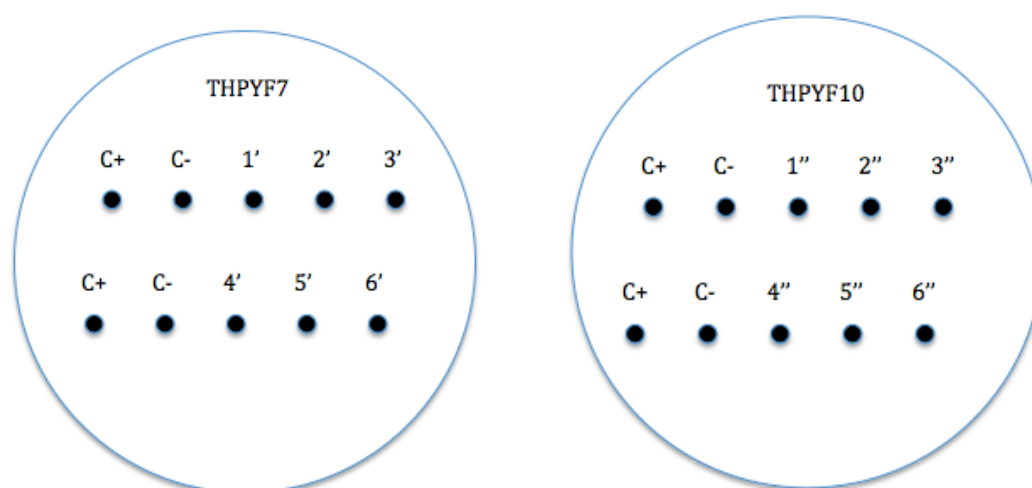
**Tabla 7.** Valor promedio y desviación estándar obtenido del análisis estadístico de las imágenes del control negativo, prueba 1 y prueba 3. Experimento realizado con el complejo THPYF7.

<b>Prueba</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<i>Control negativo</i>	26,920	15937,5
<i>1 (10 min)</i>	48,994	10846,7
<i>3 (30 min)</i>	90,302	26960,4

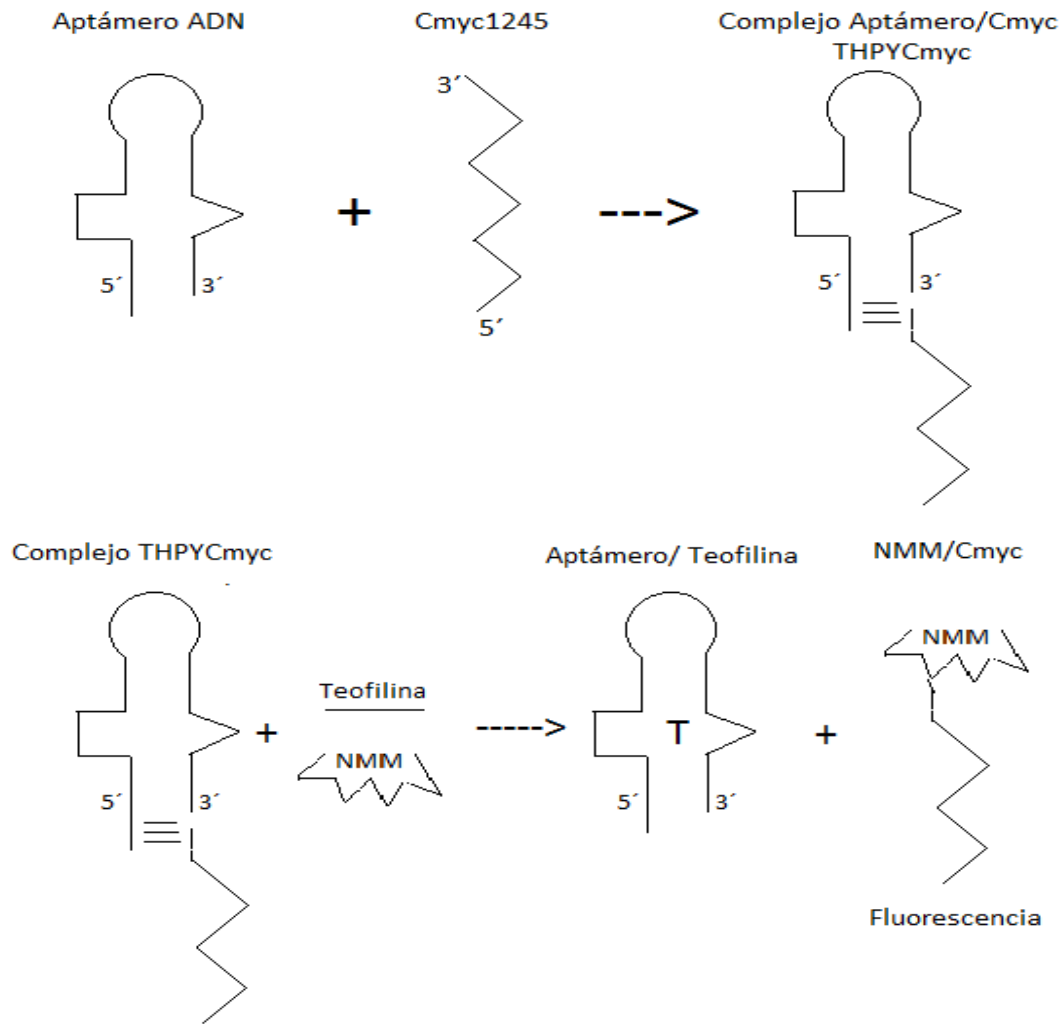
## 13.FIGURAS



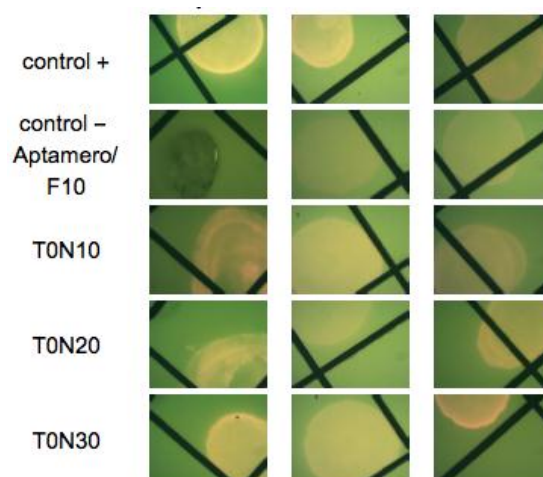
**Figura 1:** Estructura de la teofilina (Realizado por Paola Rivera)



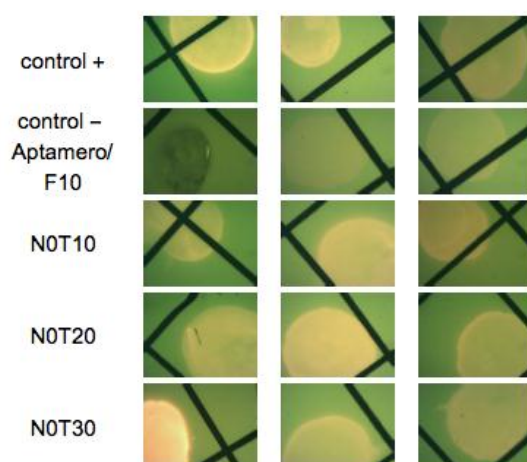
**Figura 2.** Diagrama de los ensayos realizados en las membranas de nitrocelulosa para el complejo THPYF7 (izquierda) y complejo THPYF10 (derecha). (Realizado por Paola Rivera)



**Figura 3.** Diagrama de representación del sistema de reporte escogido en base a aptámeros y fluorescencia. (Realizado por Paola Rivera).

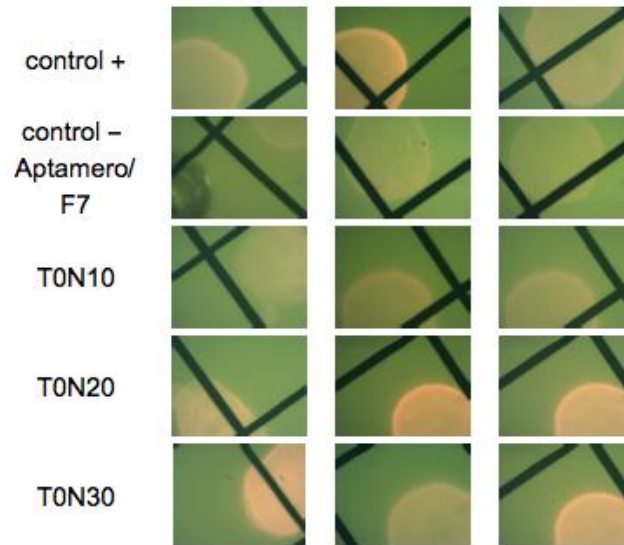


**Figura 4.** Resultados obtenidos del ensayo realizado con el complejo THPYF10 y teofilina. En orden descendente se observa la fila 1: control positivo. Fila 2: control negativo. Fila 3: prueba 1. Fila 4: prueba 2. Fila 5: prueba 3.

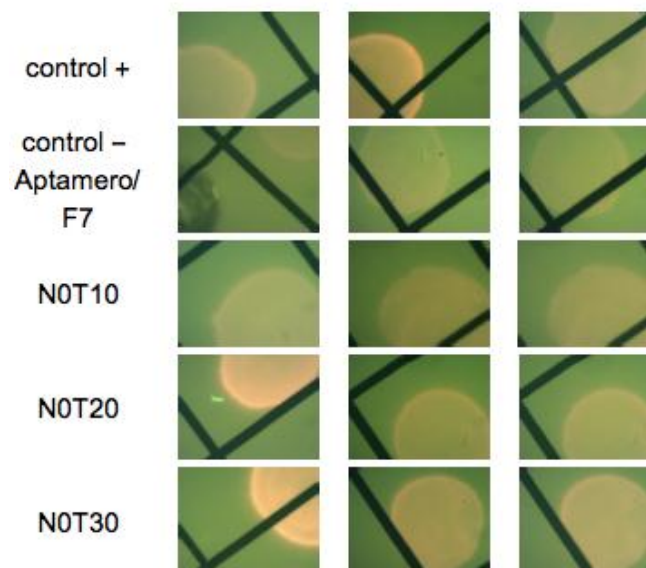


**Figura 5.** Resultados obtenidos del ensayo realizado con el complejo THPYF10 y teofilina. En orden descendente se observa la fila 1: control positivo. Fila 2: control negativo. Fila 3: prueba 4. Fila 4: prueba 5. Fila 5: prueba 6.

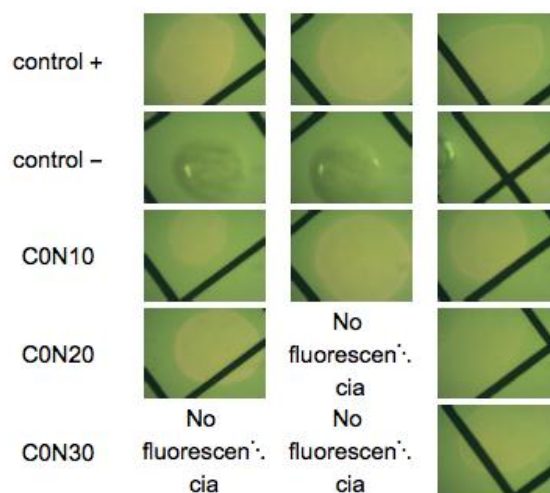




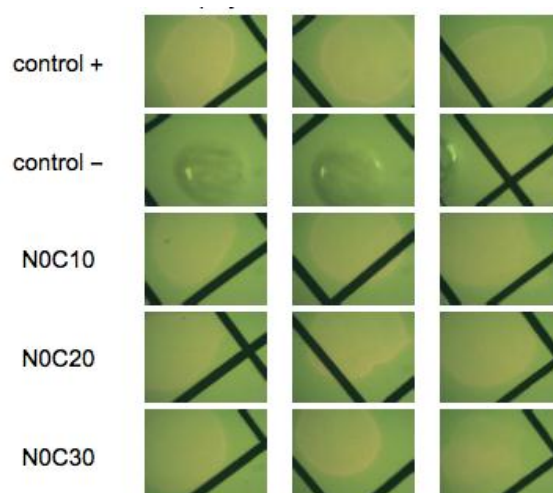
**Figura 6.** Resultados obtenidos del ensayo realizado con el complejo THPYF7 y teofilina. En orden descendente se observa la fila 1: control positivo. Fila 2: control negativo. Fila 3: prueba 1. Fila 4: prueba 2. Fila 5: prueba 3.



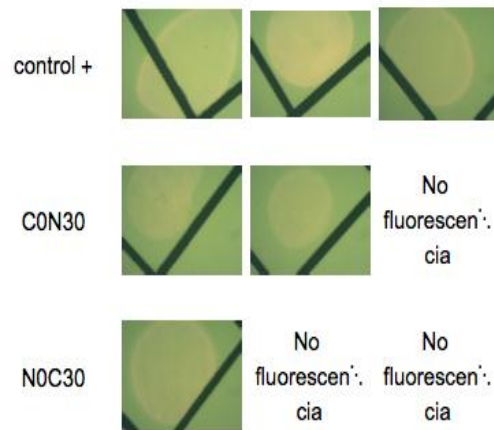
**Figura 7.** Resultados obtenidos del ensayo realizado con el complejo THPYF7 y teofilina. En orden descendente se observa la fila 1: control positivo. Fila 2: control negativo. Fila 3: prueba 4. Fila 4: prueba 5. Fila 5: prueba 6.



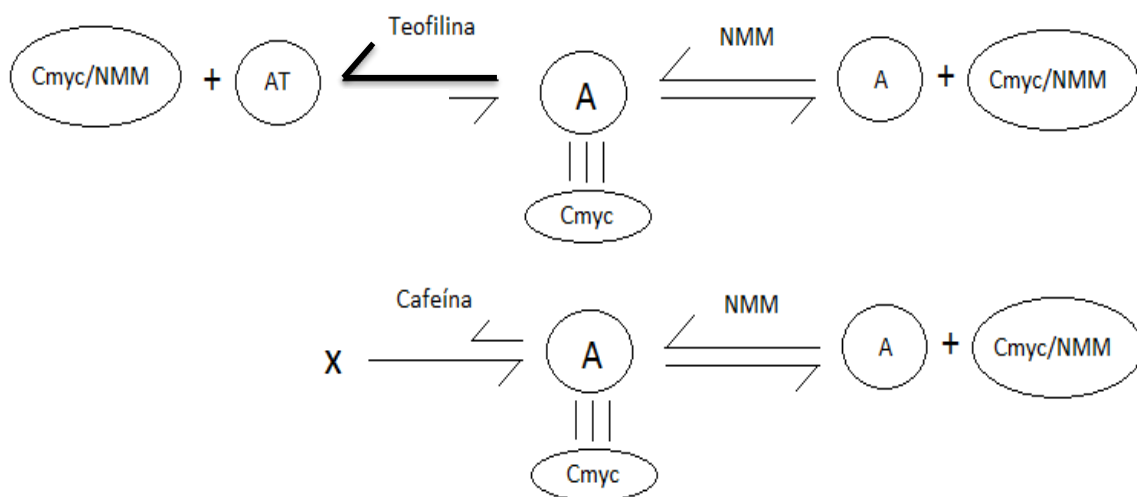
**Figura 8.** Resultados obtenidos del ensayo realizado con el complejo THPYF7 y cafeína. En orden descendente se observa la fila 1: control positivo. Fila 2: control negativo. Fila 3: prueba 1. Fila 4: prueba 2. Fila 5: prueba 3.



**Figura 9.** Resultados obtenidos del ensayo realizado con el complejo THPYF7 y cafeína. En orden descendente se observa la fila 1: control positivo. Fila 2: control negativo. Fila 3: prueba 4. Fila 4: prueba 5. Fila 5: prueba 6.



**Figura 10.** Resultados obtenidos del ensayo realizado con el complejo THPYF10 y cafeína. En orden descendente se observa la fila 1: control positivo. Fila 2: prueba 3. Fila 3: prueba 6. En el resto de pruebas no se observó fluorescencia.



**Figura 11.** Representación del equilibrio químico de los complejos. (Realizado por Paola Rivera).