



FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN
BIOLOGÍA O QUÍMICA

DERIVACION DE UN APTAMERO DE DNA COMO UN SISTEMA APLICADO PARA LA DETECCION DE UNA TOXINA MARINA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN CIENCIAS MENCIÓN
BIOLOGIA

KAROL ANGELICA ALFARO ARANCIBIA

DIRECTOR
DR. PABLO CONEJEROS ABRAHAM

Valparaíso, Chile
2014

Esta Tesis titulada “Derivación de un aptámero de DNA como un sistema aplicado para la detección de una toxina marina”, fue presentada por *Karol Angélica Alfaro Arancibia* ante la Universidad de Valparaíso como requerimiento parcial para la obtención del grado académico de Licenciada en Ciencias con Mención en Biología.

La comisión examinadora ha decidido aprobar esta tesis de grado con calificación:

.....

Pablo Conejeros Abraham

Director de Tesis

Departamento de Biología y Ciencias
Ambientales, Facultad de Ciencias
Universidad de Valparaíso

Juan Carlos Espinoza Ibáñez

Profesor Informante

Departamento de Biología y Ciencias
Ambientales, Facultad de Ciencias
Universidad de Valparaíso

Patricio Villalobos Biaggini

Profesor Informante

Centro de biotecnología Dr. Daniel Alkalay
Lowitt, Universidad Federico Santa María

Marcela Zahr Tajmuchi

Directora Programa Licenciatura en
Ciencias mención Biología o Química

Valparaíso, 6 de Marzo del 2014

*A mis Padres,
Hermano, Hijo
y Familia.*

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis es un esfuerzo donde participaron personas directa o indirectamente a lo largo de este proceso, por lo tanto esta sección posee una carga emotiva especial.

Como dicen el esfuerzo es necesario para valorar los objetivos que uno se propone a lo largo de la vida. En estos años que han sido una etapa de estudio, aprendizaje y esfuerzo llegue a comprender que con trabajo y dedicación se obtienen grandes frutos, el cual ha sido alimentado por todas las personas que me han acompañado, apoyado y ayudado en estos años. Y uno de ellos es mi Director de Tesis el Dr. Pablo Conejeros Abraham gracias por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Además debo destacar su paciencia y disponibilidad que lo hacen un gran Director y profesor guía. A mis compañeras de laboratorio Paulina Bustos y Diana Gaete que hicieron de este proceso del cual todos hablaban que era tedioso, algo simpático con sus cantos, noticias que los medios no publican, sus chistes, comentarios, ayuda y enseñanza, gracias por todo aquello.

Quiero agradecer también al profesor Rodrigo Segura y al profesor Juan Carlos Espinoza por facilitarme las dependencias de sus laboratorios para poder realizar ciertos protocolos que no podía desarrollar en el laboratorio de Genética.

También quisiera agradecer a mis compañeras y amigas de carrera: Yessica Cornejo por ser mi partner, amiga y casi una hermana a lo largo de este proceso, es verdad que estuve ausente el año recién pasado, en el cual extraño tus consejos y tu presencia, gracias por todos los momentos vividos, se que fueron demasiados en los cuales reímos o lloramos por las derrotas y triunfos logrados. A Camila Quezada, aunque nos abandonó a mitad de camino, también te considero alguien especial en este proceso, al igual que Yessica eres una de mis grandes amistades en estos años de universidad en los cuales nos reímos, nos enojamos y nos apoyamos.

A Claudia Contreras y a Pamela Donoso por ser unas grandes amigas y compañeras durante este largo proceso donde día a día nos dábamos ánimo y nos distraíamos en las pocas horas que podíamos pasar juntas.

Para continuar quiero agradecer a mi Familia:

A mis padres por haberme dado la vida, apoyarme en los momentos más duros y por haberme dado la oportunidad de llegar hasta donde estoy, más adelante les podré retribuir todo el esfuerzo que han hecho por mí. A Mi Hermano Fabián, por formar parte de mi vida y haberla llenado de alegrías. Sé que dentro de unos meses vas a vivir este mismo proceso y si necesitas apoyo ahí estaré siempre, como nos enseñaron nuestros padres, siempre debemos contar el uno con el otro.

A Hijo Sebastián Alonso Zamora Alfaro, quien tuvo que soportar horas sin mi compañía y días sin verme, sin entender el por qué prefería estar frente a la pantalla del computador, que estar jugando con él o de paseo en la plaza, pero esto se debía para tener un mejor futuro juntos.

Mi abuela María Isabel Tenorio, a quien por fin podré decirle terminé y espero que se sienta orgullosa de mí, ojalá la vida te entregue muchos años de vida para que más adelante puedas gozar de la vida junto a mí, sacándote a pasear y llenarte de alegrías viejita linda. Este año y el que viene serán muy especiales ya que casi todos tus nietos serán profesionales, solo faltaría el más pequeño de todos, Tomás, pero aún le quedan años por recorrer y llegar a esta etapa, que decir de tus bisnietos. También a mis tíos y tías que en más de alguna oportunidad me brindaron su ayuda y apoyo, en especial a mi tía Fresia por cobijarme varios años en su hogar, para ahorrar algo de dinero del pasaje y poder solventar otros gastos que se requieren para poder estudiar en la universidad

Son muchas las personas que formaron y forman parte de mi vida a las que me gustaría agradecerles su apoyo, ánimo y amistad en los momentos difíciles de mi vida. Algunas están conmigo, otras formaron parte de mi recuerdo y otras se encuentran en mi corazón, sin importar en donde se encuentren quiero darles las gracias por formar y haber formado parte de mí y por todo aquello que me han brindado.

Finalmente expreso los agradecimientos al proyecto FONDECYT N° 11110050 y al proyecto anillo perteneciente a CONICYT por el financiamiento otorgado para la realización de esta tesis.

GRACIAS.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCION	16
1.1 MAREA ROJA O FLORACIONES DE ALGAS NOCIVAS	17
1.1.1 VENENO AMNESICO DE MARISCOS (VAM O ASP)	19
1.1.2 VENENO DIARREICO DE LOS MARISCOS (VDM O DSP)	19
1.1.3 VENENO PARALIZANTE DE MARISCOS (VPM O PSP)	19
1.2 TECNICAS DE DETECCION PSP	22
1.2.1 BIOENSAYO EN RATON	23
1.2.2 METODOS ANALITICOS	23
1.2.3 ANALISIS ENZIMATICOS Y TECNICAS INMUNOLOGICAS	24
1.3 BIOSENSORES	26
1.3.1 FUNCIONAMIENTO DE UN BIOSENSOR	27
1.3.2 CARACTERISTICAS DE LOS BIOSENSORES	28
1.3.3 APLICACIÓN DE LOS BIOSENSORES	29
1.3.4 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES	29

1.4	APTASENORES	30
1.5	APTAMEROS	31
1.5.1	APTÁMEROS VERSUS ANTICUERPOS	31
1.5.2	SYSTEMATIC EVOLUTION OF LIGANDS BY EXPONENTIAL ENRICHMENT	33
1.6	HIGH RESOLUITON MELTING	36
1.6.1	COLORANTE DE UNION AL DNA	36
1.6.2	INSTRUMENTOS Y SOFTWARE	37
2	HIPOTESIS Y OBJETIVOS	40
2.1	HIPOTESIS	41
2.2	OBJETIVO GENERAL	41
2.3	OBJETIVOS ESPECIFICOS	41
3	MATERIALES Y METODO	43
3.1	REACTIVOS	44
3.2	INTRUMENTACION	46
3.3	PROCEDIMIENTOS PARA DETECCION DE SAXITOXINA	47

3.3.1	LIOFILIZACIÓN DE SAXITOXINA Y GONYAUTOXINA 2/3	47
3.3.2	ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA	48
3.3.3	EXTRACTO DE MARISCO	52
4	RESULTADOS	54
4.1	DERIVACION DEL APTAMERO HANDY AP COMO UN SISTEMA PARA DETECTAR SAXITOXINA	55
4.1.1	LÍMITE DE DETECCIÓN DEL APTAMERO HANDY AP APLICABLE PARA LA DETECCIÓN DE SAXITOXINA.	58
4.1.2	DIFERENCIAS ENTRE LAS CURVAS DE MELTING	63
4.2	INFLUENCIA DE DIVERSOS COMPONENTES QUE PODRIAN CAMBIAR LA RESPUESTA DEL APTAMERO HANDY AP EN LA DETECCIÓN DE SAXITOXINA	67
4.2.1	EFFECTO DE LAS MODIFICACIONES DEL APTÁMERO EN LA DETECCIÓN DE STX.	87
4.2.2	INTERACCION CRUZADA CON OTRA TOXINA MARINA	89
4.2.3	EVALUACION DE LA TEMPERATURA DE INICIO DE MELTING	118
5	DISCUSION	125

5.1	DETECCION DE STX MEDIANTE LA OBSERVACION DE CURVAS DE HIGH RESOLUTION MELTING	126
5.2	LIMITES DE DETECCIÓN	127
5.3	CONDICIONES DEL MEDIO DE REACCION QUE INFLUYEN EN LA DETECCION DE STX	127
5.4	REACTIVIDAD CRUZADA DE LA TECNICA DE DETECCION DE STX	130
5.5	ESCISION DE BASES EN LOS EXTREMOS Y SU INFLUENCIA EN LA DETECCION DE STX	130
5.6	PERFILES DE DENATURACION	132
5.7	CONSIDERACIONES FINALES	134
6	CONCLUSION	136
7	BIBLIOGRAFIA	140

RESUMEN

No se sabe bien las condiciones que influyen para que ocurran las Floraciones Algales Nocivas (FAN), fenómeno natural provocado por la proliferación de especies de microalgas, una reproducción excesiva, cuyas concentraciones de algunas especies causan daño a otro organismo acuático. Se cree que es por el incremento de temperatura, incremento de la luminosidad, agotamiento de la disponibilidad de nutrientes, poca turbulencia del agua y condiciones hidrográficas, por ejemplo cuyos suelos son áridos y aportan minerales al agua provocando una mayor turbidez del agua alterando la actividad fotosintética, para facilitar a la aparición de cianobacterias.

Las mareas rojas producidas en Chile se deben principalmente a una especie llamada *Alexandrium Catenella*, que es un dinoflagelado que produce una de las toxinas más peligrosas conocidas, pertenecientes al grupo del Veneno Paralizante de Marisco, correspondiente a análogos de Saxitoxina. Los crecimientos poblacionales de este microorganismo en agua dulce o salada causa enormes pérdidas económicas que bordean los 50 millones de dólares anuales solo en Chile.

El método tradicional para el monitoreo de concentraciones de PSP es el ensayo biológico con ratones de la línea CF-1, que presenta propiedades biológicas homogéneas y constantes en el tiempo, relacionando la toxicidad de las muestras de marisco con el tiempo de muerte después de haber inyectado intraperitonealmente, un pequeño volumen de extracto crudo de marisco. Sin embargo este método requiere de personal especializado e infraestructura costosa, la cual restringe los análisis a unos pocos laboratorios. Además, este sistema que es válido internacionalmente y normado en Chile presenta ciertas desventajas. Entre ellas se encuentra que es poco selectivo, presenta una baja sensibilidad, especificidad reducida, se necesita un gran stock de animales y presenta errores al testear concentraciones bajas de toxinas. Estas limitaciones han conducido a desarrollar otros tipos de ensayos que sean menos costosos de implementar, y puedan ser ocupados donde haya un difícil acceso geográfico, para poder realizar detecciones preventivas.

Los llamados aptámeros, moléculas de hebra simple de ADN o ARN que son altamente sensibles, específicos, con una alta afinidad y con un manejo sencillo, podrían tener la capacidad de compensar las exigencias que se requieren para poder desarrollar nuevos

sistemas analíticos de detección de VPM. En el año 2012 se desarrolló un aptámero que se une en forma específica a Saxitoxina. Sin embargo no se ha encontrado un sistema aplicable para este aptámero.

En este trabajo se propone derivar este aptámero en un sistema que detecte de forma específica a Saxitoxina, que permita un cierto grado de automatización. Aplicando un método nuevo y sencillo llamado High Resolution Melting, se puede generar con el uso de fluoróforos un ensayo el cual se podrá ejecutar en solo paso con el uso de equipos que puedan registrar fluorescencia, el cual podrá ser aplicado en diversos laboratorios a lo largo del país que poseen este tipo de instrumentos.

1 INTRODUCCION

1.1 MAREA ROJA O FLORACIONES DE ALGAS NOCIVAS

Las floraciones de algas nocivas (FAN) o mareas rojas son fenómenos naturales en donde se produce un aumento de algunas micro-algas fotosintéticas en agua dulce o salada. Las FAN se han incrementado notoriamente en frecuencia y diversidad en las últimas décadas [1-2].

Las algas del tipo planctónicas producen un poco más del 90% de las sustancias orgánicas marinas. Su alimentación es a través de fotosíntesis, cuyo proceso es complejo, donde se ocupan sustancias inorgánicas como H_2O y CO_2 en componentes orgánicos, empleando la energía solar y generando O_2 [3].

El fitoplancton se encuentra por todo el planeta, en columnas de agua que reciben luz y en zonas costeras. Cuando proliferan algunas de estas especies ricas en pigmentos se observa un cambio en la coloración del agua, provocadas por organismos inocuos o inofensivos. Hay cerca de 4000 especies de algas, de las cuales 300 pueden decolorar el agua [4] y provocar el fenómeno de “MAREA ROJA”. Los colores característicos van desde el color rojo, amarillo, verde, café o azul. Los colores que pueden adquirir van a depender de la profundidad, tipo de alga y su concentración en la que se encuentra.



Figura 1. Fenómeno de Marea Roja. Floración de algas Nocivas provocada por *Alexandrium Catenella* en la Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo imagen registrada en Marzo del 2008. Fuente: http://www.labtox.cl/?page_id=42

No están claras las condiciones por la ocurre la FAN, pero se piensa que influyen las condiciones del agua como la temperatura, luminosidad, disponibilidad de nutrientes, vientos y condiciones hidrográficas [5]. Frecuentemente ocurren cuando aparece una capa que es superficial sobre las aguas frías y ricas en nutrientes debido al calentamiento. Las algas que tienen un mayor crecimiento acaban con los nutrientes que se encuentran en esta capa y dejando solo N_2 y P en la picnoclina. Los dinoflagelados llegan a esta capa y su reproducción empieza a ser exponencial, de día viven en la superficie y en la noche llegan a la picnoclina para poder alimentarse.

De las 300 especies que decoloran el agua, solo 60 poseen ficotoxinas. Entre los principales organismos que producen las FAN se encuentran los dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias, las cuales en su metabolismo producen ciertos compuestos químicos de alta toxicidad [6]. Estas se desplazan por toda la trama alimentaria llegando a ser consumidos por nosotros, los seres humanos, generando enfermedades gastrointestinales hasta neurológicas. Las toxinas son metabolitos secundarios, probablemente utilizadas como una forma de combatir la predación o como un mecanismo de defensa contra otros organismos [7].

Los gastrópodos, mariscos bivalvos, crustáceos, equinodermos y tunicados son susceptibles a acumular toxinas marinas, debido a que las micro-algas son su alimento natural. Sin embargo, en general las concentraciones tóxicas se hallan solamente en moluscos bivalvos, los al alimentarse por filtración alcanzan concentraciones que pueden causar las enfermedades anteriormente nombradas. Para evitar el consumo humano de moluscos contaminados se realizan análisis periódicos de la carne del marisco. Los análisis son realizados en laboratorios autorizados y especializados, donde certifican la presencia o ausencia de toxinas.

Acorde a los efectos tóxicos, las ficotoxinas marinas se han clasificado en 5 grupos:

- a) Toxinas paralíticas de mariscos.
- b) Toxinas de mariscos diarreicas.
- c) Toxinas de mariscos amnésicas.
- d) Toxinas de mariscos neurotóxicas.
- e) Toxinas de mariscos azaspirácidas.

De los 5 grupos de toxinas de mariscos anteriormente nombrados solo 3 están presentes en el mar de Chile:

1.1.1 VENENO AMNESICO DE MARISCOS (VAM O ASP)

Es producida por *Pseudonitzschia Australis*. La toxina puede llegar a causar la pérdida temporal o permanente de la memoria en los seres humanos. El Acido Domoico es tóxico para el Sistema nervioso central (S.N.C) como para el Sistema Nervioso Periférico (S.N.P), provocando arcadas y vómitos, ya que actúa sobre el centro del vómito ubicada en el cerebro [8]. La intoxicación por ASP produce un síndrome de neuropatía axonal sensoriomotora, amnesia, ataques, coma y en pocas ocasiones la muerte. Entre los síntomas más comunes se encuentran la nausea, vomito, dolor de cabeza, diarrea y pérdida de memoria a corto plazo [14]. Solo pueden ser consumidos los mariscos que posean cantidades menores de 20 mg de toxina por Kg de carne de mariscos.

1.1.2 VENENO DIARREICO DE LOS MARISCOS (VDM O DSP)

La toxina es producida por una microalga llamada *Dinophysis sp* [9]. La ingesta de mariscos contaminados con este veneno provoca graves cuadros de diarreas y deshidratación en los seres humanos [10]. El mecanismo de acción se debe a que el ácido ocadáico provoca una larga contracción del músculo liso de las arterias. La diarrea se debe a la hiperfosforilación de las proteínas que controlan la secreción de sodio de las células intestinales, lo que ocasiona una pérdida pasiva de fluidos [11].

1.1.3 VENENO PARALIZANTE DE MARISCOS (VPM O PSP)

En el año 1972 se obtuvo el primer registro de la toxina PSP en la región de Magallanes [12] donde se registran 23 muertes y 315 intoxicados hasta hoy, y sigue presentándose con una magnitud, intensidad y duración no conocida hasta ahora y desde 1993 en la región de Aysén [13]. Las mayores toxicidades se han registrado en los años 1996, 1998, 2000 y 2002. Desde el año 1996 se han producido eventos tóxicos con una periodicidad

de dos años, donde las mayores toxicidades se han registrado en 1996, 1998, 2000 y 2002 [14].

Las Floraciones Algales Nocivas ocurren con frecuencia y cada vez comprometiendo extensas zonas costeras del planeta, en el cual se incluye Chile. En el país las mareas rojas son principalmente del tipo paralizante y diarreica y se ha tenido que lamentar la muerte de 32 personas tan solo por consumir mariscos contaminados con toxina paralizante: 1 persona en la X región, 8 en la XI región y 23 en la XII región [14].

La toxina PSP es producida por una microalga llamada *Alexandrium Catenella*, aunque también se le ha atribuido a *Alexandrium Ostenfeldi*. La sintomatología por consumir mariscos contaminados va desde un hormigueo en la región peribucal con una sensación de picazón en los labios, encías y lengua, transcurrido 5 minutos después de la primera ingesta de mariscos llegando inclusive hasta la parálisis total y muerte por una insuficiencia respiratoria, compromiso cardíaco y del sistema nervioso central [15], debido al mecanismo de acción de las toxinas PSP.

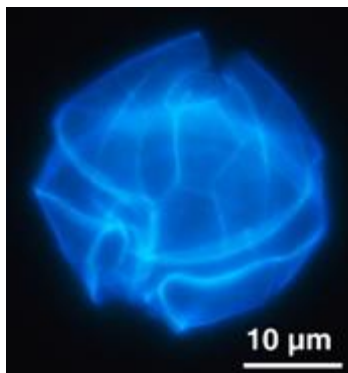


Figura 2. Alexandrium Catenella. Dinoflagelado marino principal productor de VPM en Chile. Tinción con calcofluor, el cual pone de relieve las placas celulósicas que lo recubren. Fuente: http://www.icm.csic.es/bio/outtur_s.htm.

Las toxinas paralizantes alteran específicamente el transporte de ión sodio, ya que se unen fuertemente al canal de sodio. Entre las toxinas bloqueadoras del canal se encuentran las Saxitoxinas. Este bloqueo es por afinidad nanomolar en células excitables, inhibiendo los potenciales de acción de la membrana, alterando el funcionamiento de la

actividad nerviosa superior y comunicación sináptica, causando así una disfunción en los músculos esqueléticos provocando una parálisis respiratoria en menos de una hora después de haber consumido moluscos contaminados [16 – 17]. La regulación internacional indica que no deben ser consumidos mariscos que contengan cantidades de toxinas igual o superior a los 80 µg de toxina por cada 100 g de carne de mariscos [14].

Las toxinas que pertenecen al grupo PSP, están constituidas por un núcleo tetrahidropurínico, similares a Saxitoxina (STX). Existen más de 26 derivados de STX, las cuales se pueden dividir en 3 grupos, dependiendo de la carga neta que estas presentan a un pH neutro:

- 1) Grupo de Saxitoxinas (STX), carga neta 2: STX, neo – STX, dc – STX, dcneo – STX.
- 2) Grupo de las Gonyautoxina (GTXs): GTXs 1 – 6, B1 = GTX5 y GTX6 y decarbamoil – gonyautoxinas (dcGTXS), todas ellas con carga neta 1.
- 3) Sulfocarbamoil-Saxitoxina (C1 – C4), con carga neta 0.

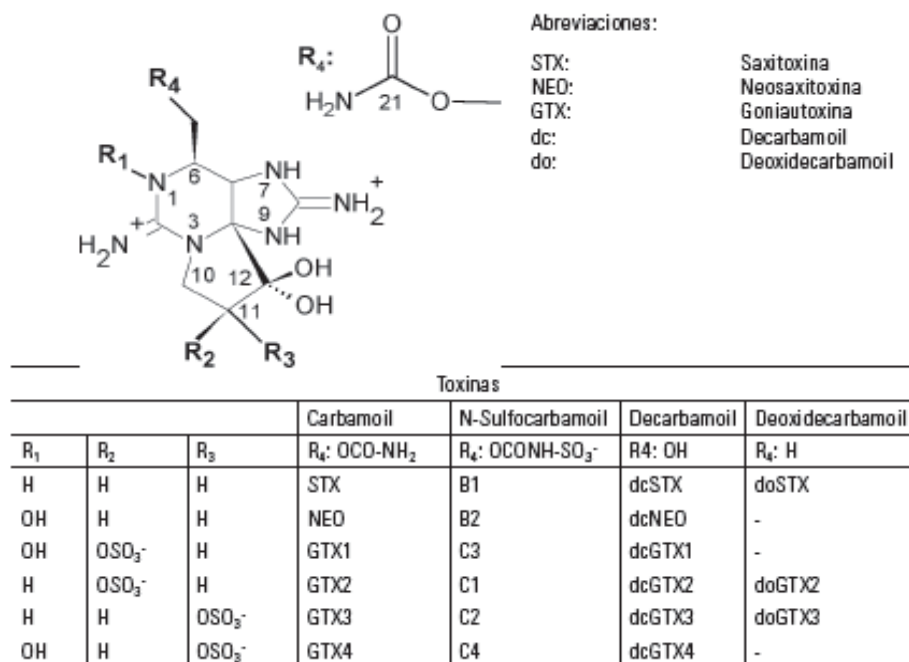


Figura 3. Toxinas paralizantes de mariscos. Estructuras químicas de las distintas toxinas PSP. **Fuente:** Hernández-Sandoval F. E., D. J. López-Cortés, C. J. Band-Schmidt, I. Gárate-Lizárraga, E. J. Núñez-Vázquez y J. Bustillos-Guzmán. 2009. Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferación de *Gymnodinium cantenatum* Graham en la Bahía de la Paz, México. *Hidrobiológica* 19 (3): 245-256.

Las PSP y las DSP has producido un mayor impacto en la salud pública y en la economía. Solo en EE.UU entre 1987 y 1992 las pérdidas bordearon los US\$ 49 millones, en la Unión Europea las pérdidas anuales entre 1989 y 1998 fueron de US\$ 81 millones y el área Asia pacífico fue de 1 US\$ millón por evento, además de US\$ 50 millones de gastos [18] por monitoreo en cada área afectada, habiendo 72 caso de marea roja entre 1934 y 1994.

En Chile se han presentado 140 sucesos de floraciones algales siendo la mayoría inocuas. En el año 2009 Chile reportó \$ 30 millones de dólares en ventas nacionales de mariscos y cerca de \$ 97 millones de dólares en exportaciones, donde las pérdidas se estiman entre \$ 10 millones y \$ 50 millones de dólares cada año [14] que hay contaminación de los mariscos por saxitoxina y otras toxinas análogas.

Por la incidencia de las mareas rojas es que se ha impulsado el desarrollo e implementación de normativas y de leyes para regular la explotación del mar y garantizar la calidad e inocuidad de los productos marinos

1.2 TECNICAS DE DETECCION PSP

Hay diferentes metodologías para testear la presencia de toxinas de Marea Roja en los tejidos de mariscos. Como las toxinas pertenecientes a este fenómeno son de un tamaño pequeño y además se encuentran en pequeñas concentraciones es que se requieren métodos de alta complejidad para detectar pequeñas cantidades de la sustancia y que a su vez sean específicos para poder diferenciarlas de otras sustancias que están presentes y son inocuas.

Entre los ensayos que se conocen a la fecha se encuentran métodos biológicos o bioensayos, ensayos bioquímicos y técnicas analíticas cuantitativas [19]. Como objetivo tienen determinar si los productos marinos pueden ser utilizados para el consumo o venta y si su contenido tóxico está de acuerdo a la legislación aplicable a los fines reguladores.

1.2.1 BIOENSAYO EN RATON

Este es uno de los ensayos predominantes y el más aceptado para evaluar la toxicidad de los moluscos [20]. Es un método rápido, en el cual se emplean ratones albinos CF-1 (en Chile son producidos en el instituto de salud pública) cuyo peso debe fluctuar entre los 19 y 20 gramos. La característica principal de estos ratones es que sus propiedades biológicas son homogéneas y no varían en el tiempo. En el procedimiento de detección a los ratones se le inyecta intraperitonealmente una dosis de 0,1 a 1 mL de un extracto de tejido de marisco y se mantienen en observación, midiendo el tiempo en que tardan en presentar un comportamiento anormal hasta su muerte, en caso de que esta suceda [24] se debe observa hasta una hora y el tiempo de muerte es inversamente proporcional a la toxicidad del extracto de marisco. Los síntomas y signos de muerte del ratón permiten detectar la diferencia en cuanto a si la toxicidad es debido a toxinas neuro o hepatotóxica [21]. El tiempo de muerte de los ratones es comparada a ratones inyectados con una solución estándar de toxina. La toxicidad estimativa para ocasionar algún tipo de daño al ser humano bordea los 80 µg/ 100 gr. de carne de marisco [74]. El límite de detección para este ensayo es de 32 µg/ 100 gr. de carne de marisco [73].

Entre las ventajas que presenta el ensayo de ratón es que en pocas horas se logra medir la toxicidad total [22], y el resultado puede ser cualitativo o cuantitativo. Siendo una de las metodologías más efectivas presenta desventajas, entre ellas se encuentran que es poco selectiva, tiene una baja sensibilidad y una reducida especificidad [23], ya que los extractos pueden ser una mezcla de distintos tipos de toxinas que pueden producir diferentes síntomas tóxicos [10]. Además se requiere un gran stock de animales y presenta errores significantes al testear concentraciones bajas de toxinas. Estas limitaciones han conducido a desarrollar otros tipos de ensayos, utilizando invertebrados, bacterias y líneas de células cultivadas.

1.2.2 METODOS ANALITICOS

Se han desarrollado varios métodos para la detección química de toxinas que son más sensitivos que el bioensayo en ratones [25]. Estos incluyen cromatografía líquida de alta

resolución (HPLC) [26], cromatografía de capa delgada de alta resolución (TLC) [27] y cromatografía de gases [28].

Estos métodos se basan en la separación del extracto en componentes individuales y esta basado en que cada componente químico migra a través de un material y bajo condiciones específicas con disitintas velocidades.

La técnica de HLPC separa las toxinas del extracto forma individual lo cual se representa del extracto en forma de picos en el cromatograma, estos picos pueden ser identificados a través de medidas estándares [26]. Una de las ventajas es su alta sensibilidad, pero la desventaja es que requiere equipos de alto costo, sotificados y con personal autorizado, además de requerir requerir estándares para la mayor parte de toxinas para su aplicación [29].

1.2.3 ANALISIS ENZIMATICOS Y TECNICAS INMUNOLOGICAS

Tambien se han desarrollado métodos bioanalíticos, los cuales se basan principalmente en la detección con anticuerpos. Llamada inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA, es una técnica prometadora debido a su sensibilidad, precisión y facilidad de operación [30]. La desventaja es que las proteínas deben ser conjugadas con proteínas carrier, para así producir un antígeno, además las toxinas deben ser sumunistradas al animal en cantidades mínimas para evitar la muerte del mismo, pero estas concentraciones a las cuales se les administra la toxina son frecuentemente insuficientes para generar una respuesta inmune.

Uno de estos métodos que han dado resultado es el test de RIDASCREEN (R-Biopharm, Darmastadt) [77] o el ensayo de MIST alert (Jellet Biotek Ltd, Dartmouth) [31], este es uno de los métodos aceptado por la USFDA como alternativa al ensayo de ratón [32]. En el test de ELISA RIDASCREEN, la toxina anclada a una enzima es adherida a microplacas de titulación y la toxina del extracto de marisco compite con la toxina que esta inmovilizada por el anticuerpo anti-toxina conjugado a una reacción enzimática colorimétrica. La desventaja de este método es su alto costo, debido a la síntesis de anticuerpos y la implementación del test de ELISA requiere tiempo y personal especializado [33].

El segundo ensayo nombrado se basa en la interacción y competencia de Saxitoxina para poder bloquear canales de sodio en una línea celular de neuroblastoma. Al requerir una línea celular, es de alto costo.

Por último hay otro método para PSP el cual aún no ha sido comercializado en el cual se usa Saxifilina, es una proteína que no está relacionada con los canales de sodio, pero se une a los derivados de saxitoxina. Esta es inmovilizada en microplacas de titulación y se ha mostrado una correlación con el análisis de HPLC [34]. Este ensayo es de mucho menor costo que los nombrados anteriormente, pero sin embargo presenta una cierta sensibilidad frente a determinados componentes del extracto afectando su sensibilidad y la capacidad de cuantificación.

En esta última época ha estado muy en boga el uso de biosensores, debido a que son dispositivos analíticos rápidos para testear, económicos, selectivos, sensibles y portables, es por eso que se ha dirigido la atención a esta metodología, la cual podría ayudar para alertar tempranamente a los consumidores de aquellos moluscos que se encuentren contaminados por el veneno PSP. Así podría evitarse el bioensayo en ratones y además dar una alerta temprano reduciéndolo a un par de horas o incluso menos, contra las 72 horas que demora el ensayo en ratón.

Para determinar la presencia de toxinas VPM en alimentos marinos, en Chile, se realiza su medición en los servicios de salud de la X, XI y XII región, en el instituto de salud pública de Chile y en laboratorios acreditados de la Universidad Austral y Universidad de Chile. En estos se aplica el bioensayo de ratón, el cual está internacionalmente acreditado. Los cuales han tenido éxito protegiendo a la población, ya que en el año 2012 no se registraron casos de intoxicaciones [14].

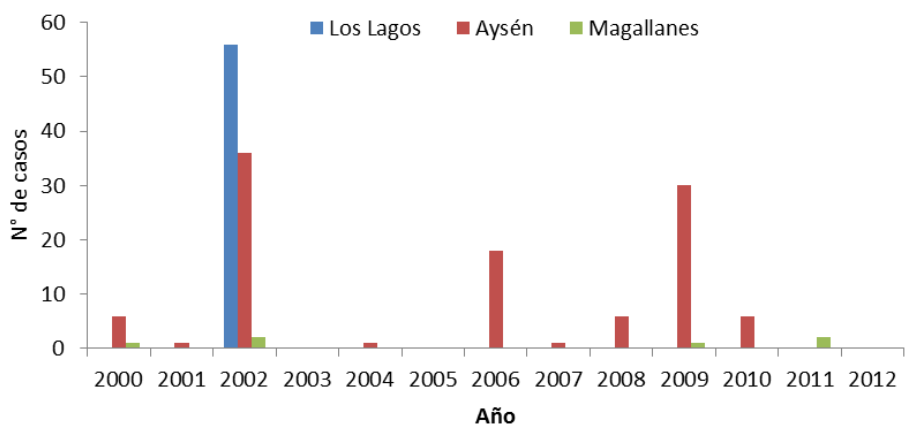


Figura 4. Número de casos de intoxicaciones por VPM. Números de casos de intoxicación de VPM por región en Chile entre los años 2000 – 2012. Fuente: Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.

Para fines industriales, la aplicación de las pruebas biológicas en zonas de extracción no es aplicable, al igual cuando se requiere cuantificar la toxicidad en terreno y aplicar oportunamente el bioensayo en terreno.

Por lo tanto es deseable contar con métodos rápidos tanto cualitativos como cuantitativos, aplicables a un número significativo de muestras, precisos y rapidez de aplicación.

En los últimos años se han desarrollado una diversidad de tecnologías, sensores, para la detección selectiva y sensible de una amplia gama de analitos, tales como adenosina, cocaína, iones de mercurio y trombina [35]. Estos responden a estímulos físicos o químicos y a su vez producen señales que son detectables. Dentro de este grupo se encuentran los llamados biosensores [36].

1.3 BIOSENSORES

Hoy en día según la IUPAC se define a un biosensor como un: *“dispositivo integrado que es capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa, compuesto por un elemento de reconocimiento biológico (ác. Nucleicos, anticuerpo, enzima, tejido, etc.) en íntimo contacto con un elemento de transducción, que permite procesar la señal generada por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito, transformándola en información específica”* [37 -39].

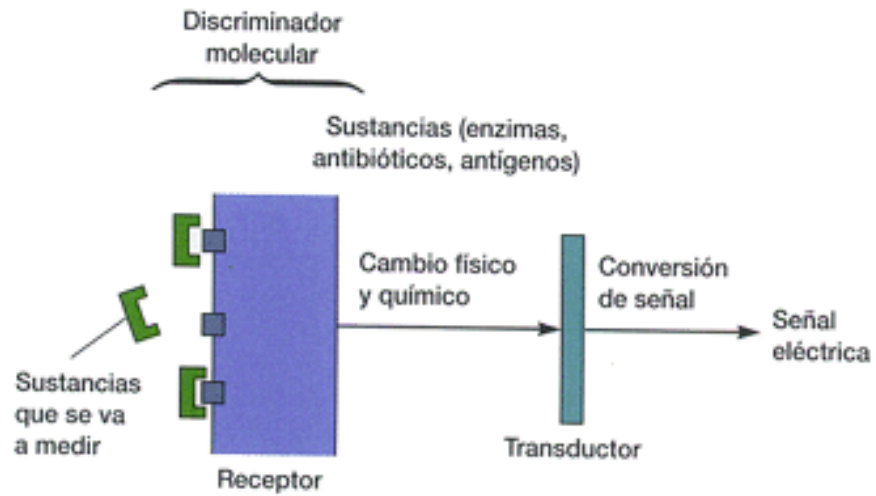


Figura 4. Esquema de un Biosensor. El analito entra en contacto con el dispositivo, este es detectado por el receptor biológico. Luego ocurre una reacción de reconocimiento generando cambios Físicos-Químicos los cuales son detectados por el transductor generando una señal que es cuantificable y es proporcional a la concentración de la muestra analizada.

1.3.1 FUNCIONAMIENTO DE UN BIOSENSOR

Un biosensor funciona de la siguiente forma:

- 1.- Ocurre una interacción específica del analito con el material biológico el cual esta inmobilizado.
- 2.- Posteriormente se detecta alguna variación en algún tipo de propiedad ya sea física o química, la cual es provocada por la reacción de bioreconocimiento.
- 3.- Por último se procesa la señal y se obtienen los resultados.

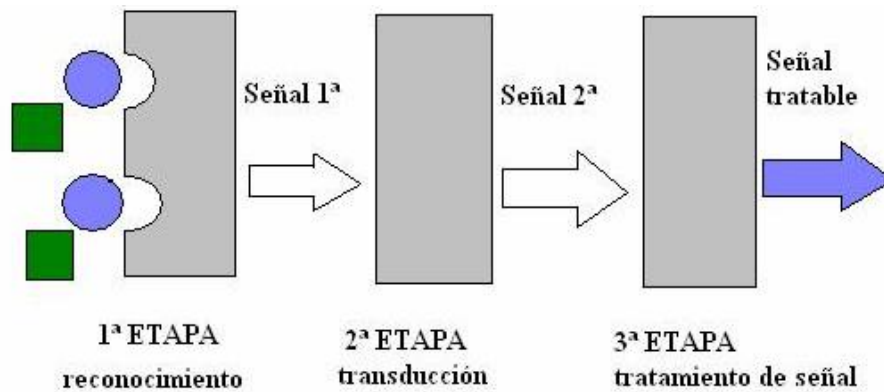


Figura 5. Funcionamiento de un Biosensor. La muestra es reconocida por el receptor, la cual genera una señal primaria. Posteriormente el transductor la convierte en una señal secundaria, que es amplificada, condicionada y procesada en forma de dato.

En el reconocimiento de moléculas, el material biológico confiere selectividad y puede ser muy variado, tal como: ADN, enzimas, bacterias, tejidos, aptámeros [38]. El transductor entrega sensibilidad, debe permitir la interacción del analito con el receptor entregando una respuesta, la cual es amplificada o procesada y tendrá una estrecha relación con la concentración del analito.

1.3.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOSENSORES

Los biosensores forman parte una amplia gama de nuevas técnicas de ensayo, debido a ciertas propiedades particulares que poseen. Un biosensor efectivo debería presentar al menos las siguientes condiciones:

- Fiable y específico para el propósito de la aplicación, su reacción debe ser independiente a factores como presión, temperatura, pH.
- Debe presentar una elevada sensibilidad y selectividad en condiciones normales de almacenamiento.
- Debe proveer tiempo de análisis cortos, precisos, reproducibles y lineales en el rango de interés.
- Debe ser económico, portable y de manejo sencillo para así requerir pocos recursos operativos y de almacenamiento.

Existe una amplia gama de biosensores, pero sin embargo, no todos poseen las características nombradas anteriormente, por lo cual se combinan varias de ellas, llegando a tener una posición ventajosa ante las técnicas convencionales, además de permitir a la monitorización en tiempo real.

1.3.3 APLICACIÓN DE LOS BIOSENSORES

La aplicabilidad de los biosensores puede extenderse a una diversidad de campos porque con el receptor biológico adecuado se permite la detección de casi cualquier sustancia ya sea química o biológica, tales como toxinas, hormonas, proteínas, fármacos, etc. [40].

Por ejemplo en el área de la química clínica, medicina, se encuentran biosensores para determinar glucosa, el cual es una monitorización de bolsillo, cómoda para el usuario y especial para los diabéticos, ya que, las personas que son insulino – dependiente tienen que determinarse dos o tres veces un control de azúcar en sangre. Existe también un biosensor para el control de aguas, para determinar si hay contaminación en aguas superficiales como en agua de bebida. Este biosensor es de amplio espectro y ya se encuentra en el mercado.

1.3.4 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES

Los criterios de clasificación que se basan en los componentes básicos tales como el elemento de reconocimiento y el de transducción. Además se han clasificado por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito, el tipo de ensayo, el método por el cual se detecta y la naturaleza propiamente tal del reconocimiento [41].

Si nos basamos en el tipo de interacción estos pueden ser biocatalíticos o de bioafinidad. El primero es donde un elemento, el cual es inmovilizado actúa como catalizador midiendo así la aparición o desaparición del analito. En los de bioafinidad, no existe transformación catalítica entre el elemento de reconocimiento y la sustancia en análisis, logrando así el complejo analito-receptor [40]. Aquí se ocupa un sistema de detección el cual es directo, ya que se observa los cambios en las propiedades ópticas o electroquímicas debido a la formación del complejo. También se puede recurrir a algún

tipo de marcaje ya sea al elemento de reconocimiento o a una molécula que compita con el analito por el sitio de unión, este tipo vendría siendo un método de detección indirecto. Debido al tipo de marcaje utilizado se clasifican en: enzimáticos, fluoroinmunoensayos y radioactivos.

Tabla 1. Criterio de Clasificación de los Biosensores. Dispositivos clasificados en función de: el tipo de interacción, detección de la interacción, elemento de reconocimiento y el sistema de transducción.

Tipo de Interacción	Detección de la interacción
Biocatalítica	Directa
Bioafinidad	Indirecta
Elemento de reconocimiento	Sistema de transducción
Enzima	Electroquímico
Orgánulo, tejido o célula completa	óptico
Receptor biológico	Piezoelectrico
Anticuerpo	Termométrico
Ácidos nucleicos	Nanomecánico
PIN, PNA, Aptámero	

Se han desarrollado una diversidad de biosensores y entre ellos se encuentran los aptasensores.

1.4 APTASENSORES

Los aptasensores proporcionan una señal analítica a partir desde la unión entre la molécula diana y el aptámero. Donde se combina un elemento de reconocimiento biológico que puede corresponder por ejemplo a una hebra sintética ADN de cadena simple o “aptámero”). El aptámero otorga la selectividad, y en un aptasensor debe ir unido a un transductor que confiere sensibilidad y genera una señal eléctrica desde el reconocimiento.

1.5 APTAMEROS

Por la década de los 80 se descubrieron pequeñas cadenas de ácidos nucleicos, los cuales derivaban de adenovirus y tenían afinidad y especificidad por proteínas. En los años 90 fueron aislados por Larry Gold y Craig Tuerk [42 – 43]. Estos eran ligandos de RNA que reconocían la ADN polimerasa del bacteriófago T4 [44], Gold y Tuerk además con la ayuda de Ellington y Szostak seleccionaron de forma in vitro ligandos basados en RNA frente a diversos colorantes orgánicos, dichos ligandos interaccionaron selectivamente con los colorantes, y por tanto les dieron nombre de aptámeros [45]. En el año 1992 patentaron esta selección in vitro, a través de la compañía farmacéutica Gilead Sciences, con una clara intención de utilizar los aptámeros para el tratamiento y el diagnóstico de patologías humanas.

Así los aptámeros son oligonucleótidos de cadena simple que son sintetizadas artificialmente, los cuales pueden ser de ADN o ARN, no más de 120 nucleótidos y el peso molecular está en el rango de 5 – 25 kDa [46], poseen una estructura tridimensional específica capaz de unirse a las moléculas diana con alta afinidad, comparable o a veces más aun superior que los anticuerpos monoclonales, con valores de Kd en el rango picomolar y una especificidad de acoplamiento por el orden de discriminación entre los 10000 y 12000 veces [46], inclusive con moléculas que poseen estructuras similares. Es por esta razón que han sido denominados “anticuerpos químicos” y sus interacciones se pueden comparar con la reacción antígeno – anticuerpo, convirtiéndolos en una herramienta clave para el diagnóstico, terapia o bioanálisis.

1.5.1 APTÁMEROS VERSUS ANTICUERPOS

Los aptámeros se caracterizan en su interacción con la proteína diana y su detección mediante diferentes técnicas como ELISA [47], PCR [48], microscopia de fluorescencia [49], SPR [50] y AFM [51]. Debido a que se pueden obtener en condiciones diferentes al ambiente fisiológico, pueden ser ocupados para reconocer una diversidad de moléculas diana [52], como toxinas, aminoácidos, antibióticos, proteínas, etc. en condiciones que no son las típicas o no convencionales. Es acá donde resalta una ventaja de los aptámeros por sobre los anticuerpos, ya que estos últimos son generados bajo condiciones

fisiológicas [53]. En las aplicaciones médicas, los anticuerpos logran una alta afinidad y especificidad [54], sin embargo hay limitaciones en su uso en ciertas pruebas clínicas, producción, variabilidad y con cualquier episodio de desnaturalización pierden la capacidad de reconocimiento [55]. En cambio los aptámeros pueden ser ocupados como elementos de bio-reconocimiento en el desarrollo una gran variedad de bio-sensores [56-57] son estables y tienen una larga vida útil. Pueden ser desnaturalizados por un aumento de la temperatura o del pH, pero con las condiciones óptimas de reconocimiento pueden volver a su estado activo.

Tabla 2. Principales ventajas y desventajas del aptámeros y anticuerpos. Algunas ventajas y desventajas que poseen los aptámeros ante los anticuerpos para su uso como elementos de reconocimiento.

	Aptámeros	Anticuerpos
VENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> - Producción sencilla y reproducible. - Pueden ser modificados para incrementar su estabilidad frente a nucleasas (ácidos nucleicos modificados) y también para aumentar su tamaño. - Pueden ser desnaturalizados y utilizados repetidamente. - Pueden ser seleccionados en condiciones fisiológicas y no fisiológicas - No son inmunogénicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Son las moléculas más ampliamente usadas en terapia y diagnóstico clínico. - Su tamaño (~150 Kda) reduce su eliminación mediante filtración renal, y generalmente su vida media es suficiente para la acción terapéutica. - Son muy estables en condiciones fisiológicas, no presentan degradación por nucleasas. - Pueden producirse sin pago de propiedad intelectual.
DESVENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> - Su aplicación clínica esta en los primeros pasos - Por su tamaño (5-20 Kda) son eliminados rápidamente por filtración renal, generalmente se requieren modificaciones para alcanzar niveles terapéuticos - Son degradados por nucleasas en ambientes fisiológicos, generalmente deben ser modificados para uso clínico 	<ul style="list-style-type: none"> - Producción dependiente de animales o células (variabilidad en cada lote) - Su modificación genera en muchos casos reducción o pérdida de su capacidad de reconocimiento - Cualquier episodio de desnaturalización generalmente reduce o anula su capacidad de reconocimiento - Solo pueden ser seleccionados en condiciones fisiológicas - La inmunogenicidad es un problema asociado al uso de anticuerpos

1.5.2 SYSTEMATIC EVOLUTION OF LIGANDS BY EXPONENTIAL ENRICHMENT

Mediante el uso de un proceso denominado SELEX (Evolución Sistemica de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial) es que se desarrollan y seleccionan aptámeros [44 , 58]. Este proceso consta de dos pasos críticos: purificación y amplificación. En primer lugar, la biblioteca de ácidos nucleicos que consta hasta 10^{14} - 10^{15} cadenas al azar de oligonucleotidos, se incuban con una molécula diana. Cada oligómero lineal perteneciente a la biblioteca posee una secuencia única. Estas poseen secuencias aleatorias en el centro y en ambos extremos poseen regiones fijas que contiene secuencias de cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o la transcriptasa reversa. Las secuencias que poseen afinidad [59] por la molécula objetivo se unirán con fuerza y los otros permanecerán en solución. Es entonces que las cadenas de oligonucleótidos se separan de los que no son afines al analito, los que están unidos a los analitos pueden ser amplificados para poder generar una nueva biblioteca y así mejorar el reconocimiento [60], es por esto que los nucleótidos que no son esenciales son eliminados.

Este proceso de selección es continuo y con condiciones cada vez más estrictas para garantizar que los oligonucleótidos que se van obteniendo tengan una mayor afinidad por la molécula diana, ya que el número de ciclos de SELEX es lo que otorga la afinidad.

Por lo tanto este método se puede dividir en 3 pasos:

- 1) Interacción entre miembros de la biblioteca y la molécula diana
- 2) Selección de miembros que poseen afinidad por la molécula diana
- 3) Enriquecimiento de la biblioteca mediante amplificaciones usando PCR.

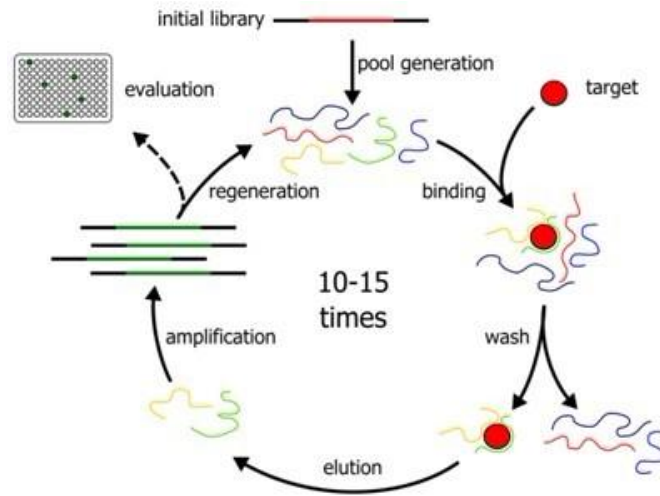


Figura 6. SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). Este proceso comienza con la generación de una biblioteca de oligonucleótidos, las cuales pueden ser secuencias de ADN o RNA generadas al azar, pero con un número de nucleótidos constante. Las secuencias se colocan ante un ligando diana. Se generan plegamientos tridimensionales, los oligonucleótidos pueden unirse o no a la diana y las secuencias no enlazadas son eliminadas. Las secuencias que quedan con eluidas y amplificadas mediante PCR, para así aumentar el rigor de las condiciones químicas buscadas (afinidad, conformación para la determinación, etc.)

Lo bueno de este proceso, es que no implica un sistema vivo, si no que netamente se basa en una selección *in vitro*, evitándose el uso de animales. Por lo que los aptámeros pueden ser dirigidos contra moléculas no-inmunogénicas y contra sustancias tóxicas.

Este método puede ser manipulado y producir aptámeros contra ciertas regiones específicas de las moléculas, tras ya saber las secuencias que son unidas a la molécula diana su producción se puede realizar a gran escala por máquinas totalmente automatizadas con poca o ninguna variación entre uno y otro producto. Además puede realizarse en condiciones que no son las fisiológicas, debido a que pueden recuperar su conformación nativa si llegan hacer denaturados, además al agregar sales caotrópicas los aptámeros pueden ser regenerados, debido a que estas sales quiebran la unión aptámero-blanco, pudiendo ser así reciclados [61].

Se han desarrollado aptámeros para distintas moléculas dianas: proteínas, drogas, iones metálicos. Inclusive se ha llegado a diseñar aptámeros para moléculas pequeñas como para el Acido Cólico con un peso molecular de 408 g/mol y con un $K_d = 6,4 - 67 \mu M$ [62] y

contra ATP (PM = 507 g/mol) [63], presentando un $K_d = 0,7 \mu\text{M}$. También se generó un aptámero para detectar la droga cocaína (PM= 303 g/mol) con una afinidad entre los 0.4 – 10 μM [64]. Esta hebra simple de ADN captura la cocaína por el centro de ella, adquiriendo esta forma solo y tan solo con la presencia de este analito, sin ella su forma es un tanto relajada. Para poder detectar la presencia de molécula, sacaron algunos nucleótidos que constituían una de las ramas y fueron reemplazados por fluoróforos en un extremo y un Quencher en el otro, por lo que al acercarse el fluoróforo y el Quencher disminuye la fluorescencia emitida, lo cual es proporcional al número de moléculas presentes en la muestra [64].

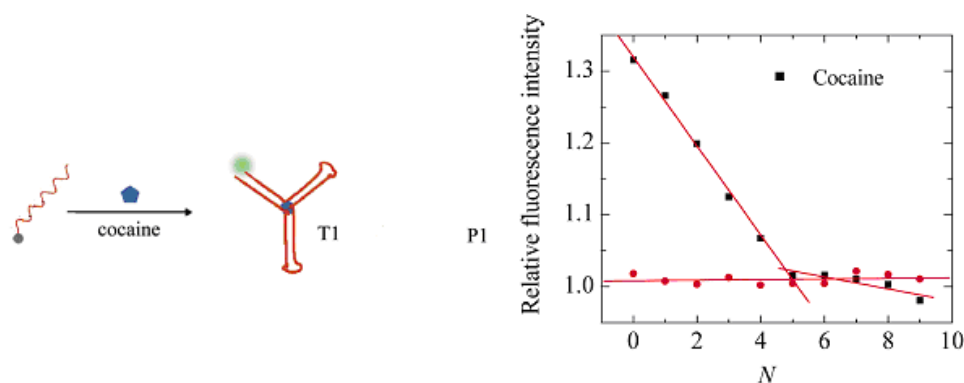


Figura 7. Esquema de detección del aptámero de cocaína. El aptámero cambia su configuración ante la presencia del analito presentando una alta afinidad. Al reemplazar ciertos nucleótidos del aptámero por un fluoróforo y un Quencher, los cuales se acercan ante la presencia de la molécula de cocaína provoca una disminución de la fluorescencia neta. **Fuente:** Cocaine Detection in Blood Serum Using Aptamer Biosensor on Gold Nanoparticles and Progressive Dilution

El desarrollar este tipo de aptámeros, para moléculas tan pequeñas, dio la posibilidad de desarrollar uno en el año 2012, donde se obtuvo un primer reporte de un aptámero de ADN contra Saxitoxina [65], anteriormente nombrada en los párrafos superiores, cuyo peso molecular es 299 g/mol. Este aptámero se une selectivamente a STX de una manera dependiente de la concentración. El uso de este aptámero como un método de detección no se ha implementado aún, ya que aún no se ha encontrado un método propicio para poder ocuparlo y así reducir el tiempo de detección y los costos. Producir un método de detección basado en este aptámero sería ideal, debido a que sería mucho más rentable que mantener un bioterio, además el personal e implementos necesarios para realizar el bioensayo en ratón, y además de reducir o eliminar el uso de animales como modelos de experimentación. La integración de este aptámero como un nuevo mecanismo de

detección, a través de un reconocimiento molecular específico y sensible es el objetivo principal de esta tesis. Este desarrollo se llevo a cabo mediante el uso de fluoróforos que aprovechen los cambios conformacionales del aptámero frente a su analito de interés provocando una alteración de la señal de fluorescencia, el cual puede ser medido por un equipo llamado termociclador en tiempo real, ocupando un método post-PCR, llamado High Resolution Melting.

1.6 HIGH RESOLUITON MELTING

En el año 2002 se introdujo un nuevo método para análisis de DNA llamado High Resolution Melting o curvas de disociación de alta resolución con la colaboración entre académicos de la universidad de UTAH e Idaho technology [66].

Este método es de gran utilidad además de simple, rápido y de bajo costo para la detección de mutaciones, polimorfismos y variaciones en las secuencias de los ácidos nucleicos en muestras de ADN de doble cadena [66]. Entre las mutaciones que se pueden detectar se encuentran los polimorfismo de nucleótido simple (SNP) las cuales dependen de los cambios de un solo nucleótido, demostrando la sensibilidad del proceso.

La base del análisis a través de este método es la caracterización del ADN por el decremento de la fluorescencia que otorga el fluorocromo debido al aumento de la temperatura, ya que este fluoroforo posee afinidad por el ADN de doble cadena, pero no de hebra simple [67]. Esta tecnología es sensible, ya que es capaz de detectar dímeros de primers y productos inespecíficos. En general la distancia entre los valores obtenidos de T_m permite la discriminación de los amplicones y productos no específicos. Este T_m es específico para cada muestra o amplicon.

1.6.1 COLORANTE DE UNION AL DNA.

Los colorantes fluorescentes de unión al DNA se ocupan para controlar la desnaturalización del ADN y cuantificación de los ácidos nucleicos, con el fin de poder

realizar análisis de HRM [67]. Estos fluoróforos tienen la capacidad de poder unirse a la cadena doble de ADN, pero todos poseen diferentes propiedades. Algunos de los colorantes comercializados disponibles incluyen:

Los colorantes saturantes: SYBR® Green I [68], es el colorante más común para saturar el ADN, este es un fluoróforo intercalante, lo cual no lo hace apropiado para aplicarlo en ensayos de curvas de fusión. En altas concentraciones estabiliza el DNA e inhibe la DNA polimerasa, por lo tanto se debe utilizar a bajas concentraciones.

Colorantes saturantes: es nuevo dentro de los colorantes intercalantes que no inhiben la DNA polimerasa o no altera el Tm del producto. Se puede añadir a concentraciones altas, asegurando la completa intercalación del amplicón. Los colorantes como SYTO9® y LCgreen® pueden ser utilizados en este método de HRM.

Colorante “Release-on-demand”, incluye EvaGreen®. Es un colorante de saturación, el cual no es fluorescente por si mismo, pero se convierte altamente fluorescente tras la unión al ADN de doble cadena específicamente en el surco menor. Es no mutagénico y no citotóxico.

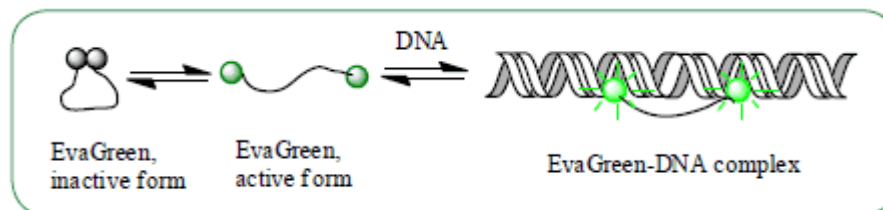


Figura 9. Unión del colorante EvaGreen®. Este Fluoróforo posee la facultad de unirse al ADN de cadena doble emitiendo fluorescencia, se pueden observar en las curvas de disociación en el HRM de tiempo real. **Fuente:** <http://biotium.com/technology/evagreen-dye-for-qpcr/>

1.6.2 INSTRUMENTOS Y SOFTWARE

Los resultados de los análisis dependen de la sensibilidad del instrumento y la naturaleza de los reactivos y/o muestras utilizadas. Se han diseñado instrumentos que son específicos para el análisis de curvas de disociación, puede utilizarse termocicladores de

comerciales de tiempo real, como por ejemplo Eco™ Real Time PCR System. Este equipo permite realizar High Resolution Melting [69].

El uso de este tipo de termociclador proporciona varias ventajas: automatización, analizando la calidad de la muestra ya que se puede obtener información de la eficiencia del PCR. También proveen un análisis de los datos mediante un gráfico de la primera derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura en donde se puede mostrar uno o más peaks representando la temperatura máxima a la cual la mitad del producto es disociado y específico para cada muestra de DNA analizada [69].

El hardware y software debe manejar las grandes cantidades de datos que se generan durante un análisis de HRM. El análisis de los datos es más fácil si se utiliza el software adecuado. El software que es específico para el análisis de curvas de disociación utiliza varios algoritmos, donde se procesa y genera los resultados en gráficos.

2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPOTESIS

El cambio conformacional que sufre el aptámero tras la unión de saxitoxina se puede medir como una alteración de la señal de fluorescencia, ya que al unirse el analito cambia su estructura, y fluoróforos de tercera generación unidos a ella pueden provocar una señal proporcional a la cantidad de toxina que se encuentra en la muestra.

2.2 OBJETIVOS GENERALES

- Convertir un aptámero con afinidad por Saxitoxina, en un aptasensor mediante el uso de fluorocromos de tercera generación.

2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Elucidar si la técnica de HRM puede ser ocupada para detectar la presencia de toxinas de marea roja, tales como Saxitoxina, cuando el aptámero específico es ensayado con la adición de fluorocromos de tercera generación.
- Determinar si en el empleo de curvas de disociación la cantidad de fluorescencia a baja temperatura es directamente proporcional con la concentración de toxina en solución.
- Determinar los intervalos de concentraciones de toxina en los cuales la relación con la fluorescencia sigue una relación lineal en el ensayo desarrollado.
- Determinar la robustez del ensayo de detección, en cuanto al funcionamiento en diferentes medios, tales como el extracto de marisco.

3 MATERIALES Y METODOS

Se presenta a continuación la descripción de la metodología experimental utilizada para llevar a cabo el presente trabajo.

3.1 REACTIVOS

Para desarrollar los distintos protocolos llevados a cabo en esta tesis, se utilizó agua libre de nucleasas (Winkler), Cloruro de Magnesio 50 mM invitrogen®, Ácido clorhídrico (Sigma - Aldrich al 37), PBS 10x (winlker), este se encontraba a un pH 7,5 cuya composición se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Composición del buffer PBS 10x

Sal	Concentración
NaCl	187 mM
KCl	2.7 mM
Na₂HPO₄	8.1 mM
KH₂PO₄	1.76 mM

El aptámero y las secuencias ocupadas fueron : Handy Ap, Handy Rand1, Handy ApTRIM y Handy Rand1TRIM, los cuales fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT).

- Handy Ap (APT^{STX1}) posee 42 secuencias específicas (ver tabla 4) que tienen afinidad por STX. Este fue usado como control positivo debido a que en el paper “First report of the use of a saxitoxin–protein conjugate to develop a DNA aptamer to a small molecule toxin.” Además de indicar como fue hecho, demostraron su afinidad por esta toxina, indicando que su relación de interacción entre aptámero y toxina era directamente proporcional.

- Handy Rand1 corresponde a secuencias aleatorias inespecíficas para STX, publicada en el paper: “First report of the use of a saxitoxin–protein conjugate to develop a DNA aptamer to a small molecule toxin.” Este fue ocupado como control negativo para evaluar la selectividad de las secuencias de Handy Ap.
- Handy Aprim1 y Handy Rand1trim, son los “aptámeros” antes mencionados pero con la salvedad que no poseen 6 nucleótidos en cada extremo 5´y 3´ de cada uno, es decir no poseen 5´-GGT ATT y TCC TCT en su extremo 3´. Estos fueron ocupados a modo de evaluar si todas sus secuencias eran necesarias para el reconocimiento de STX y además ver la posibilidad de convertir a Handy Ap en un aptámero colorimétrico.

Tabla 4. Secuencias de los aptámeros ocupados en los ensayos.

Nombre	Secuencia
APT ^{STX1}	5´-GGT ATT GAG GGT CGC ATC CCG TGG AAA CAT GTT CAT TGG GCG CAC TCC GCT TTC TGT AGA TGG CTC TAA CTC TCC TCT-3´
APT ^{RAND1}	5´-GGT ATT GAG GGT CGC ATC TAG TAG AAA AGT GCT GAG TAG TTT TAC CTG GTA GAT ATG CGA TGG CTC TAA CTC TCC TCT-3´
APT ^{RAND1TRIM}	5´-GAG GGT CGC ATC TAG TAG AAA AGT GCT GAG TAG TTT TAC CTG GTA GAT ATG CGA TGG CTC TAA CTC-3´

APT ^{APTRIM}	5'-GAG GGT CGC ATC CCG TGG AAA CAT GTT CAT TGG GCG CAC TCC GCT TTC TGT AGA TGG CTC TAA CTC-3'
-----------------------	--

El reactivo para el marcaje fluorescente fue Eva Green® 20x en agua (Biotium).

3.2 INSTRUMENTACION

Para realizar las mediciones de curvas de denaturación de alta resolución se ocupó un termociclador de tiempo real Illumina®, Eco™ Real Time PCR System, el cual posee una uniformidad térmica de +/- 0,1°C a lo largo de todo el bloque y una rampla de temperatura 5,5°C/Seg. Este equipo posee un sistema óptico de 48 LEDs con un espectro de excitación entre 35 y 700 nm, además es compatible con cualquier sistema existente en el mercado que tenga un espectro de emisión entre 500 y 700 nm, entre ellos se encuentran SYBR® Green, Eva® Green, FAM, HEX, ROX, Cy5 y Otros fluoróforos disponibles a demanda. Además está habilitado para ensayos HRM con el apoyo de un software para el análisis de datos.

El software utilizado para tomar las medidas fue: Software v5.0 Eco Real-Time PCR System, se evaluaron los datos utilizando el programa EcoStudy Software v 5.0. Para obtener el ajuste de los datos y a su vez para graficar los mismo se ocupó el programa Excel de Microsoft®.

Tabla 5. Perfil de temperatura para las curvas de Melting.

	Etapa	Temperatura	Tiempo
HRM curvas de melting	Desnaturalización	95°C	5 segundos
	Temperatura de	30°C	2 minutos

	inicio de Melting		
	Desnaturalización	95°C	5 segundos

En la tabla 5 se muestra el programa de temperatura High Resolution Melting (HRM) recomendado para la realización de los ensayos descritos en este trabajo aunque también se probó como temperatura inicial de Melting, 40°C.

3.3 PROCEDIMIENTOS PARA DETECCIÓN DE SAXITOXINA

En esta parte del trabajo se muestran diferentes procedimientos ocupados para desarrollar el protocolo de detección de Saxitoxina.

3.3.1 LIOFILIZACIÓN DE SAXITOXINA Y GONYAUTOXINA 2/3

En dos tubos eppendorfs de 2 mL cuyas tapas tenían un orificio, se depositaron 100 µL a 80 µg/mL de Saxitoxina (STX) y 100 µL a 60 µg/mL de Gonyautoxina 2/3 (GTX 2/3) las cuales estaban disueltas en HCl 0.01 M. Estos tubos fueron liofilizados en el laboratorio de Compuestos orgánicos perteneciente a la facultad de química y farmacia de la Universidad de Valparaíso o bien en el centro de biotecnología CBDAL de la Universidad Tecnica Federico Santa María. La presión ocupada fue entre 6 y 12 millitorr y su temperatura entre los -58°C y -60°C.

Al estar las toxinas ya secas se resuspendieron en 100 µL de agua pura libre de nucleasas (Winkler) y se almacenaron a -20°C. Posteriormente se prepararon diferentes concentraciones de toxinas que al final en el análisis tuvieran una concentración que abarcara desde los 0,01 µM a los 100 µM.

3.3.2 ANALISIS DE FLUORESCENCIA

Para realizar los análisis posteriores se preparó una Master Mix (MM) con diversos componentes y volúmenes requeridos para los estudios. En el siguiente párrafo se describirá el protocolo más importante que se quiere resaltar en esta tesis, donde el medio de dilución de los componentes es agua ultra pura, los otros experimentos se detallan en tabla 6.

En un tubo eppendorf de 0,2 mL se depositaron 6 μ L de agua pura (Winkler), 2 μ L del aptámero (Handy Ap, Handy Aprim, Handy Rand1trim o Handy Rand1) y 1 μ L de Eva Green® (Biotium), se realizaron triplicados por cada muestra de concentración de toxina, estos 3 componentes nombrados forman parte de la Master Mix. El párrafo que sigue es común para los demás experimentos.

Para mezclar los componentes se agitó en un vortex (Labnet) por 30 segundos aproximadamente. Luego el volumen obtenido se repartió en tubos eppendorf de 0,2 ml, una cantidad de 9 μ L cada uno. A estos tubos se les añadieron toxinas. Por ejemplo al primero se le añadió 1 μ L de Saxitoxina a una concentración determinada, al otro tubo 1 μ L de Gonyautoxina 2/3 y al último tubo 1 μ L de agua pura. Se agitaron en un vortex (labnet). Luego en una placa de ensayo del termociclador, se depositaron en tres pocillos 5 μ L del tubo que contenía Master Mix + STX en cada uno, en otros tres pocillos 5 μ L del tubo con Master Mix + toxina GTX 2/3 y en otros tres pocillos 5 μ L del tubo con Master Mix + agua pura, posteriormente se sellaron con un adhesivo especial para esta placa.

Esta placa se colocó en la centrifuga por 30 segundos aproximadamente y se colocó en el termociclador a tiempo real para poder aplicar el perfil de temperatura para el análisis de HRM detallado en la tabla 5.

Tabla 6. Detalles de experimentos realizados. Se muestran los diferentes experimentos realizados a lo largo de todo este trabajo, ya sea con diferentes concentraciones de Cloruro de Magnesio, distintas diluciones de extracto de marisco, PBS-TWEEN al 0,05% y diferentes concentraciones de toxinas

Experimento	Agua	Extracto de Marisco	MgCl ₂	PBS10x	Eva Green®	Aptámero O secuencias	Toxina
1	4 µL	0	1 µL (5 mM)	1 µL (1x)	1 µL	2 µL (Handy Atrim)	1 µL
2	4 µL	0	1 µL (5 mM)	1 µL (1x)	1 µL	2 µL (Handy and1trim)	1 µL
3	2 µL	0	1 µL (5 mM)	1 µL (1x)	1 µL	4 µL (Handy Atrim)	1 µL
4	2 µL	0	1 µL (5 mM)	1 µL (1x)	1 µL	4µL (Handy Rand1trim)	1 µL
5	4 µL	0	1 µL (*)	1 µL (1x)	1 µL	2 µL (Handy Atrim)	1 µL
6	4 µL	0	1 µL (*)	1 µL (1x)	1 µL	2 µL (Handy Rand1trim)	1 µL
7	5 µL	0	0	1 µL (1x)	1 µL	2 µL (Handy Atrim)	1 µL
8	5 µL	0	0	1 µL (1x)	1 µL	2 µL (Handy Rand1trim)	1 µL
9	5 µL	0	0	1 µL (**)	1 µL	2 µL (Handy Atrim)	1 µL
10	5 µL	0	0	1 µL (**)	1 µL	2 µL (Handy Rand1trim)	1 µL
10	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL (Handy)	1 µL

						Aptrim)		
11	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	1 µL	
						(Handy Rand1trim)		
12	3 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	4 µL	
						(Handy Aptrim)		
13	3 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	4 µL	
						(Handy Rand1trim)		
14	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (***)	
						(Handy Aptrim)		
15	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (***)	
						(Handy Rand1trim)		
16	5 µL	0	0	1 µL (1x)	1 µL	2 µL	1 µL (***)	
						(Handy Ap)		
17	5 µL	0	0	1 µL (1x)	1 µL	2 µL	1 µL (***)	
						(Handy Rand1)		
18	5 µL	0	0	1 µL (PBST al 0,5%)	1 µL	2 µL	1 µL (****)	
						(Handy Ap)		
19	5 µL	0	0	1 µL (PBST al 0,5%)	1 µL	2 µL	1 µL (****)	
						(Handy Rand1)		
20	5 µL	0	1 µL (****)	0	1 µL	2 µL	1 µL (****)	
						(Handy Ap)		
21	5 µL	0	1 µL (****)	0	1 µL	2 µL	1 µL (****)	
						(Handy Rand1)		
22	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (****)	
						(Handy Ap)		
23	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (****)	
						(Handy Rand1)		
24	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (****)	
						(Handy Ap)		

25	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (*****)
						(Handy Rand1)	
26	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (*****)
						(Handy Ap)	
27	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (*****)
						(Handy Rand1)	
28	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (***)
						(Handy Ap)	
29	6 µL	0	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (***)
						(Handy Rand1)	
30	3 µL	3 µL	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (****)
						(Handy Ap)	
31	3 µL	3 µL	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (****)
						(Handy Rand1)	
32	4 µL	1,5 µL	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (****)
						(Handy Ap)	
33	4 µL	1,5 µL	0	0	1 µL	2 µL	1 µL (****)
						(Handy Rand1)	

*Las concentraciones de Cloruro de Magnesio ocupadas: 0,05 mM, 0,1 mM, 0,15 mM, 0,2 mM, 0,25 mM, 0,3 mM, 0,35 mM, 0,4 mM y 0,45 mM.

**Las concentraciones de PBS ocupadas: 2x, 5x, 6x.

***Las concentraciones de toxinas analizadas fueron desde los 1 µM hasta los 10 µM.

****Las concentraciones de toxinas ocupadas fueron: 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM, 5 µM y 10 µM.

*****Las concentraciones de Cloruro de Magnesio ocupadas: 0,1 mM, 0,5 mM y 1 mM.

*****Las concentraciones de toxinas analizadas fueron: 10 µM hasta los 100 µM.

*****Las concentraciones de toxinas analizadas fueron: 0,01 µM, 0,025 µM, 0,05 µM, 0,075 µM, 0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 0,75 µM, 1 µM, 10 µM.

Al obtener las curvas del gráfico fluorescencia versus temperatura otorgadas por el equipo Eco Illumina, se analizaron las curvas de la derivada de las dos variables antes mencionadas y las diferencias de estas mismas para observar si ocurrió un desplegamiento adecuado durante la interacción del aptámero versus Saxitoxina o Gonyautoxina, además sirve para observar el “nivel de ruido” presente durante las mediciones.

El dato que cobra mayor relevancia en esta tesis son los valores de fluorescencia inicial que se arrojan durante la temperatura inicio de Melting (30 °C) en el gráfico mencionado al inicio del párrafo anterior. Cada análisis se hizo por triplicado para posteriormente sacar un promedio y realizar los gráficos de Concentración de toxina versus valor de fluorescencia inicial (promedio) y realizar análisis de las correlaciones lineales entregadas por los gráficos y a su vez ver si hay algún tipo de relación entre concentración y fluorescencia, ya sea de una forma directa o inversamente proporcional.

3.3.3 EXTRACTO DE MARISCO

Para la preparación de las muestras, se usaron 14 ejemplares de choritos (*Mytilus chilensis*) para poder recolectar 100 gr. de carne. Los choritos fueron lavados con agua fresca para eliminar la suciedad presente en las valvas, posteriormente estas fueron abiertas con cuidado cortando el músculo abductor.

El interior fue enjuagado con agua fresca para poder remover la arena o cualquier otro material. Se removió la carne de la concha y minimizando el daño al cuerpo de molusco. Posteriormente se drenó sobre un colador por 5 minutos y se homogenizó con la ayuda de una juguera Minipimer (Philips) a alta velocidad por 2 minutos.

Para el extracto se pesaron 100 gramos de la muestra homogenizada en un vaso precipitado y se agregó 100 mL de HCl a 0,1 M (Sigma - Aldrich al 37%) y se mezcló. Seguidamente se calentó la mezcla y se dejó hervir suavemente por 5 minutos bajo una campana de extracción. Ya hervido se enfrió a temperatura ambiente, se midió el pH para que no alcanzara un pH superior de 4,5. Se transfirió el extracto a una probeta y se ajustó el volumen a 200 mL con HCl 0,003 M (Sigma - Aldrich al 37%). Luego se devolvió el extracto al vaso precipitado y se mezcló hasta homogenizar. Como no fue posible realizar el estudio el mismo día se realizaron alícuotas de 50 mL en tubos Falcon y se almacenó el extracto a -20°C. Para la realización de pruebas con extracto de chorito se realizaron dos pruebas una al 50% y otra al 15% con 5 concentraciones distintas de Saxitoxina y Gonyautoxina 2/3, teniendo como blanco al extracto sin toxina.

4 RESULTADOS

En el transcurso de esta tesis se intentó encontrar un método para convertir el aptámero publicado Handy Ap en un nuevo sistema que detecte el analito de interés, Saxitoxina. Este sistema debería ser rápido, económico y específico.

Para dar inicio a los resultados de las secuencias y el aptámero seleccionado y descritos en la tabla 4, se realizaron una serie de protocolos, donde se llevó a cabo el estudio y optimización del sistema de detección de STX y a su vez el funcionamiento del aptámero.

4.1 DERIVACION DEL APTAMERO HANDY AP COMO UN SISTEMA PARA DETECTAR SAXITOXINA

A continuación se presentan los valores de fluorescencia inicial de las curvas de alta resolución con 30°C como temperatura de inicio.

Los datos presentados acá corresponden al diseño principal con el cual se obtuvieron resultados óptimos ocupando Handy Ap para detectar saxitoxina y Handy Rand1 como control negativo.

A partir de una serie de experimentos previos, que más adelante se darán a conocer, se llegó a un medio en el cual el aptámero Handy Ap tenía una relación lineal y directamente proporcional a la concentración de Saxitoxina. Este medio seleccionado fue agua ultra pura libre de nucleasas, por consiguiente los experimentos detallados en esta primera sección están realizados bajo esta modalidad.

Tabla 7. Resultados del diseño principal para la optimización del aptámero Handy Ap como un sistema para detectar Saxitoxina. Fluorescencias de los promedios de los triplicados obtenidos para Saxitoxina con el aptámero Handy Ap.

µM	Agua	STX
1	3,52	4,16
2	3,5	5,11
3	3,28	4,16
4	3,14	4,70

5	3,14	4,08
6	2,33	4,72
7	3,04	5,77
8	2,88	5,60
9	3,88	6,14
10	3,81	6,37

Se graficaron las fluorescencias iniciales promedio obtenidas de la interacción del aptámero con Saxitoxina versus las concentraciones de esta toxina, ver gráfico 1.

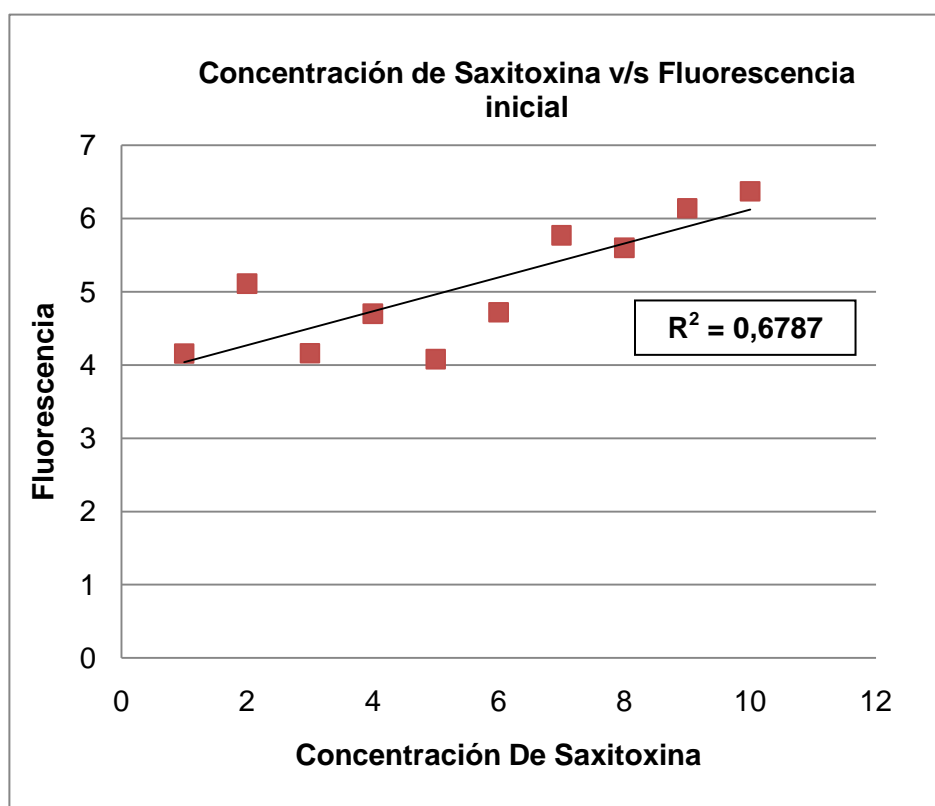


Gráfico 1. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia inicial promedio del aptámero Handy Ap con la interacción de su analito. Se muestra la tendencia de la fluorescencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del agua pura en su medio.

Así como se parecía en el gráfico 1, los resultados indican que su R^2 es igual a 0,6787 lo cual muestra una tendencia lineal y además una relación directamente proporcional entre las dos variables, Fluorescencia versus Concentración de toxina.

Para poder comprobar si esta relación es cierta y si solo se da con este aptámero bajo distintas concentraciones de Saxitoxina, se probó con Handy Rand1, el cual posee secuencias que son aleatorias y no específicas para STX.

En la siguiente tabla se pueden apreciar los valores de los promedios para las fluorescencias iniciales obtenidas, bajo el mismo protocolo utilizado para Handy Ap.

Tabla 8. Resultados del diseño principal para la optimización de Handy Rand1 como un sistema control.
Fluorescencias de los promedios de triplicados de Saxitoxina ocupando Handy Rand1.

μM	Agua	STX
1	4,57	5,03
2	3,96	3,87
3	3,41	4,1
4	3,64	4,1
5	3,58	4,51
6	3,67	4,42
7	3,39	4,95
8	4,1	5,29
9	4,12	4,95
10	4,29	4,52

Se graficaron las fluorescencias obtenidas para Saxitoxina bajo diferentes concentraciones de esta ocupando Handy Rand1. Estas fluorescencias corresponden a los promedios de las fluorescencias iniciales.

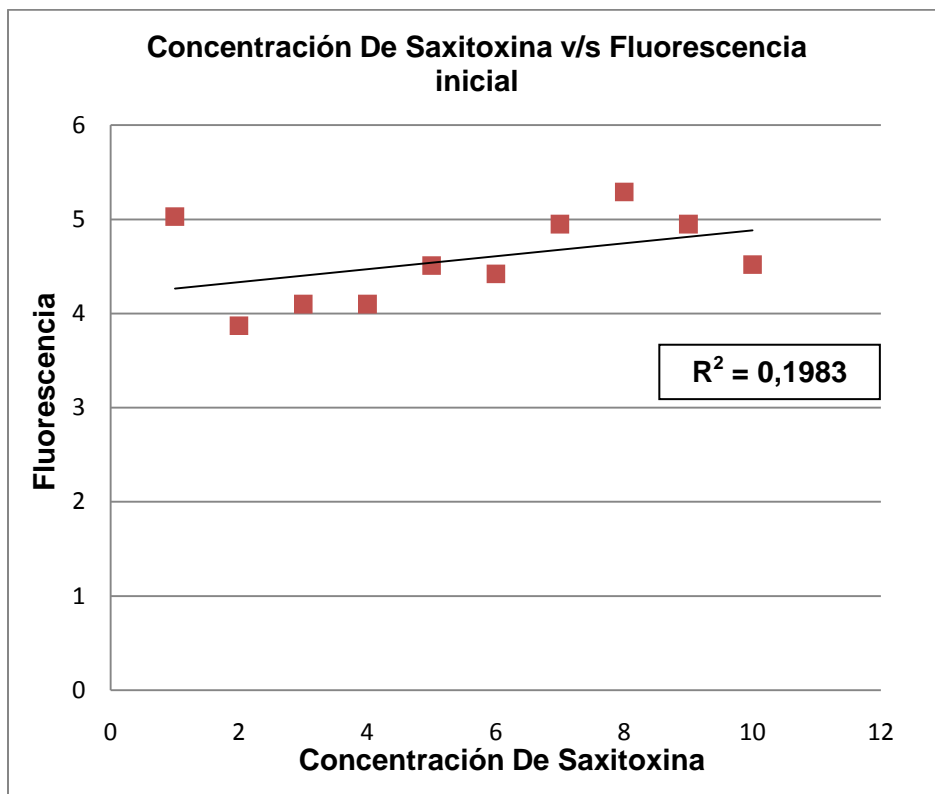


Gráfico 2. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia Handy Rand1 con la interacción de Saxitoxina. Se muestra la tendencia de la fluorescencia que tiene Handy Rand1 bajo la influencia del agua pura en su medio.

La correlación obtenida para Saxitoxina bajo la influencia del aptámero Rand1 fue de 0,1983. Este resultado no muestra selectividad ni especificidad ya que no otorgaría una relación directamente proporcional entre la concentración y fluorescencia que emite el aptámero ante la presencia de Saxitoxina.

4.1.1 LIMITE DE DETECCIÓN DEL APTAMERO HANDY AP APLICABLE PARA LA DETECCIÓN DE SAXITOXINA.

Como bien se dijo en la introducción, el método de detección en ratones presenta inconvenientes y uno de ellos es que en las concentraciones bajas presentan incertidumbre.

Para poder establecer los límites se estudiaron tanto las concentraciones superiores e inferiores que podrían establecer los valores críticos a los cuales se establecen relaciones lineales entre la fluorescencia inicial del aptámero Handy Ap versus su concentración del analito STX.

a) CONCENTRACIONES SUPERIORES

Los límites superiores testeados corresponden desde los 10 μM hasta los 100 μM en un intervalo de 10 μM entre cada uno. Los valores de los promedios de las fluorescencias iniciales se muestran en la tabla 10.

Tabla 9. Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Saxitoxina ocupando el aptámero Handy Ap. Resultados de las fluorescencias iniciales promedio obtenidas ocupando el aptámero Handy Ap a modo de testear las concentraciones por sobre los 10 μM hasta los 100 μM .

μM	Agua	STX
10	4,1	4,64
20	3,74	5,39
30	3,88	5,35
40	3,75	5,66
50	3,67	5,15
60	3,69	5,84
70	3,54	5,35
80	4,46	4,59
90	5,32	3,67
100	4,35	3,4

Al igual que en los análisis anteriores se procedió a graficar las fluorescencias iniciales promedio de la tabla 10, ver gráfico 3.

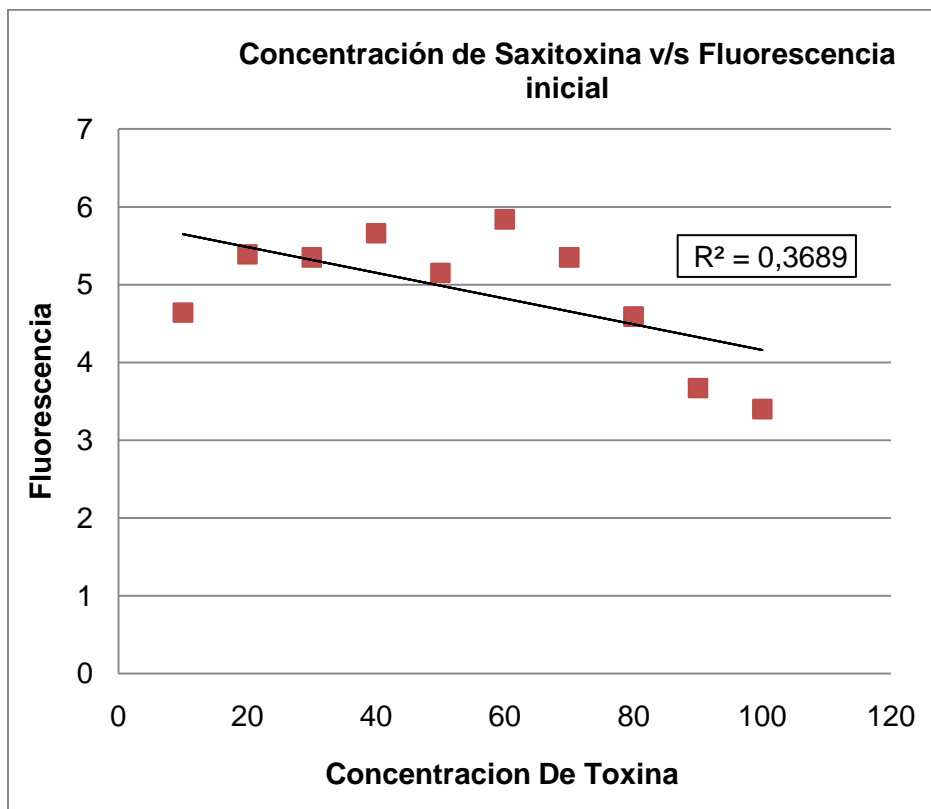


Gráfico 3. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia de la fluorescencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del agua pura en su medio en los parámetros de concentración desde los 10 µM hasta los 100 µM.

La correlación obtenida para el aptámero Handy Ap con concentraciones desde 10 µM a 100 µM es de 0,3689, por lo que se deduce que la especificidad es baja a estas concentraciones.

b) CONCENTRACIONES INFERIORES

Los límites inferiores estudiados son desde 1 µM hasta los 0,01 µM con un intervalo de 0,25 µM entre cada concentración. En la tabla 11 solo se muestran las concentraciones desde 1 µM hasta los 0,025 µM debido a que el punto 0,01 µM resultó fuera de rango, en el sentido de que su consideración distorsiona la relación lineal. Así, estimamos que el límite de detección de la técnica no alcanza 0.01 µM.

Tabla 10. Fluorescencias iniciales de los promedios de los triplicados de Saxitoxina ocupando el aptámero Handy Ap. Resultados de las fluorescencias iniciales promedio obtenidas ocupando el aptámero Handy Ap a modo de testear las concentraciones desde 1 μM hasta los 0,025 μM .

μM	Agua	STX
1	3,52	4,157
0,75	3,97	4,05
0,5	3,9	3,88
0,25	3,41	3,95
0,1	3,47	3,7
0,075	3,63	3,57
0,05	3,41	3,67
0,025	4,4	3,5

Siguiendo la misma dinámica se graficaron las fluorescencias iniciales promedio para Saxitoxina bajo concentraciones de 1 μM , las cuales se observan en el gráfico 4.

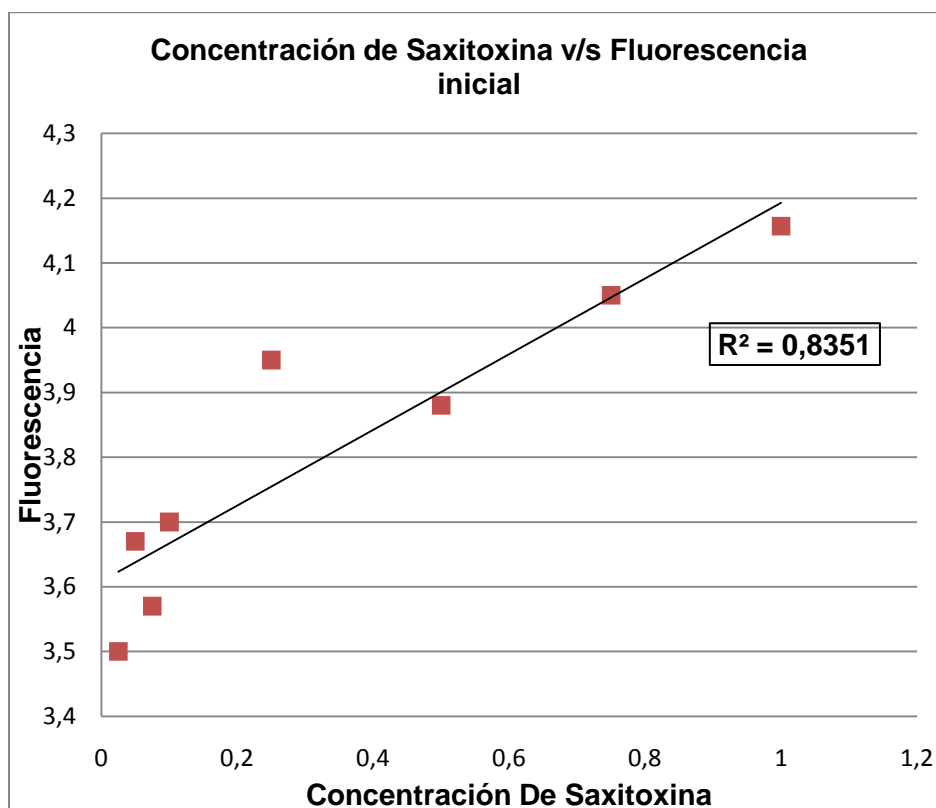


Gráfico 4. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia de la fluorescencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del agua pura en su medio en los parámetros de concentración desde los 1 μM hasta los 0,025 μM .

La correlación obtenida para el límite inferior para Saxitoxina fue de 0,8351, lo cual nos da una relación lineal entre fluorescencia y concentración. Cuando el punto 0,01 fue considerado, la relación tuvo un R^2 de 0,7211. Para comprobar si esta relación solo se da ocupando el aptámero Handy Ap, se realizó el análisis con Rand1 como control negativo.

En la tabla 12 se destacan los valores iniciales promedio de las fluorescencias obtenidas bajo las mismas concentraciones que se ocuparon para Handy Ap en las concentraciones inferiores.

Tabla 11. Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Saxitoxina ocupando Handy Rand1. Resultados de las fluorescencias iniciales promedio obtenidas ocupando Handy Rand1 a modo de testear las concentraciones desde 1 μM hasta los 0,025 μM .

μM	Agua	STX
1	4,57	5,03
0,75	4,48	5,19
0,5	4,86	4,89
0,25	4,61	5,15
0,1	4,58	5,01
0,075	5	4,78
0,05	4,61	5,08
0,025	4,75	5,09

Se graficaron las fluorescencias iniciales promedio para STX, se observa en el gráfico 5.

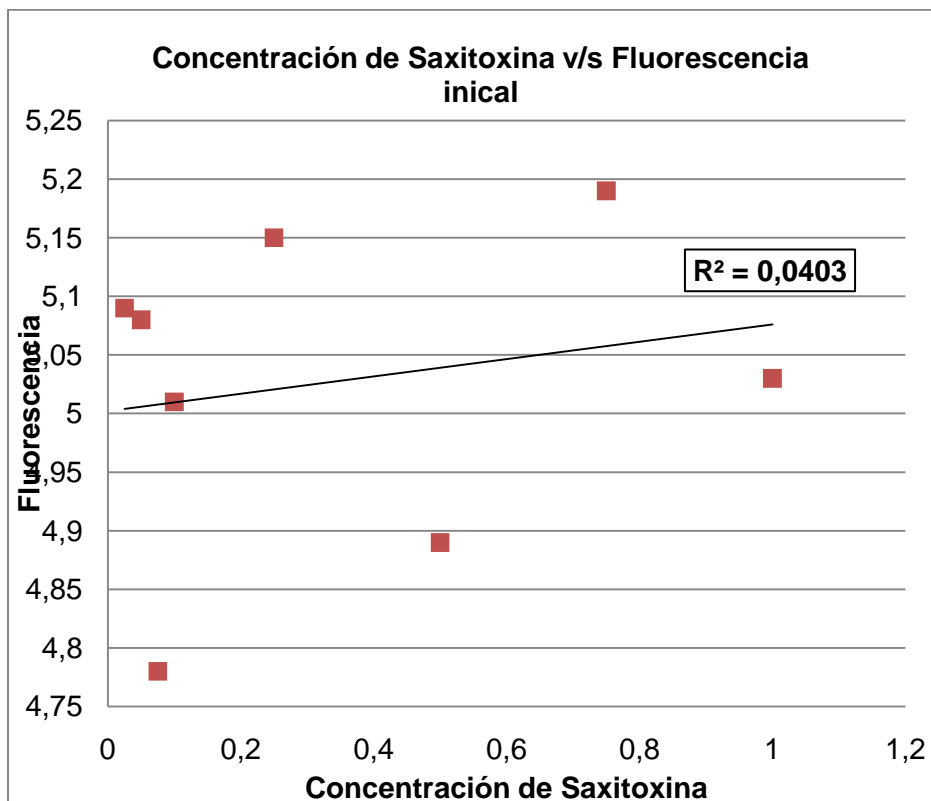


Gráfico 5. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia Handy Rand1. Se muestra la tendencia de la fluorescencia que tiene Handy Rand1 bajo la influencia del agua pura en su medio en los parámetros de concentración desde los 1 µM hasta los 0,025 µM.

La correlación entregada a bajas concentraciones para STX con el aptámero Rand1 es igual a 0,0403. Por lo tanto solo esta relación se da con Handy Ap.

4.1.2 DIFERENCIAS ENTRE LAS CURVAS DE MELTING

Para saber si STX influye sobre el desplegamiento del aptámero con la temperatura se revisaron las curvas de melting de alta resolución.

Para esto se normalizaron las curvas de melting derivadas, de fluorescencia versus temperatura, mediante la resta de las curvas del ensayo con toxina menos la curva de

referencia (blanco) para distintas concentraciones de Saxitoxina. Esto se detalla en los siguientes gráficos.

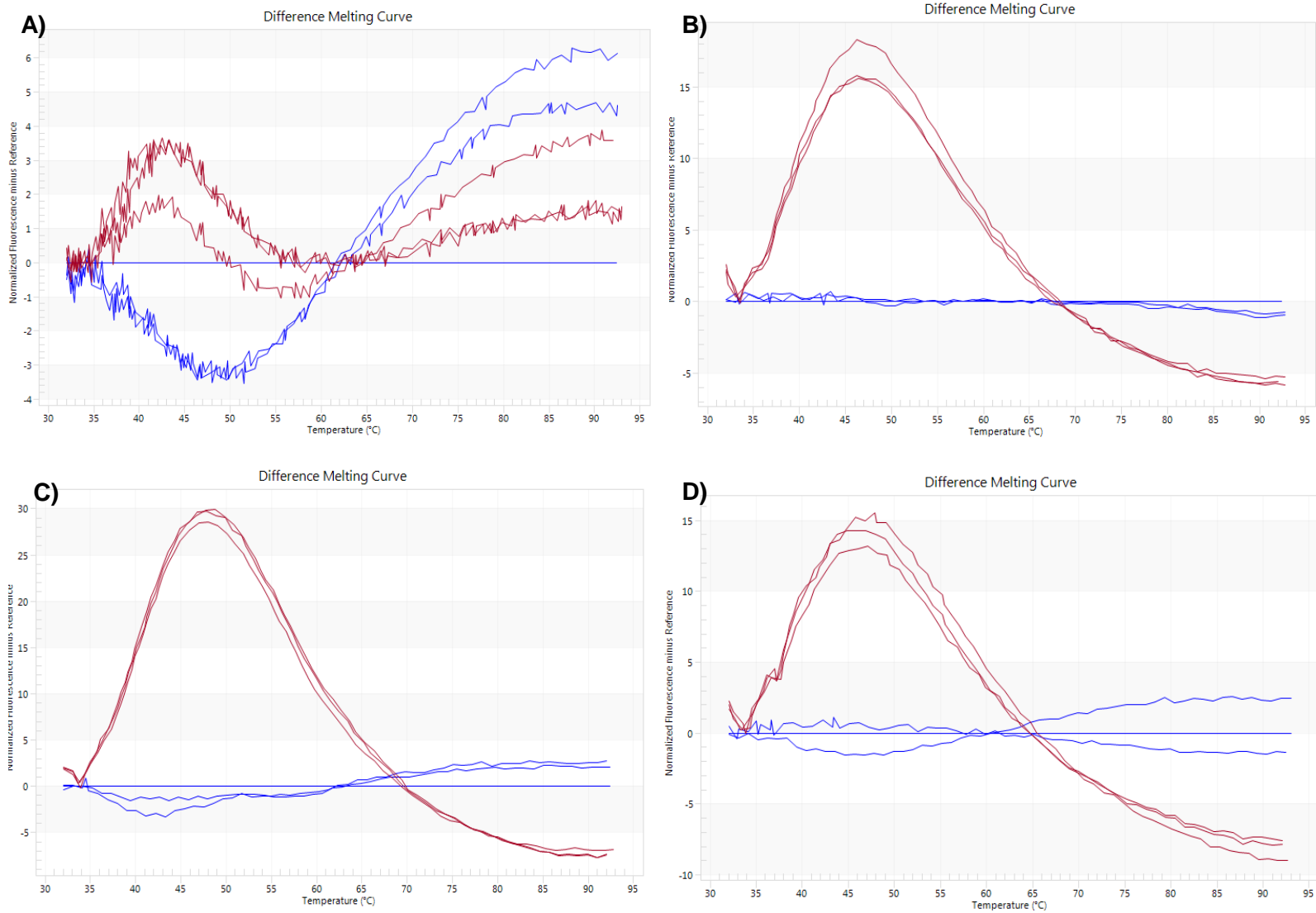


Figura 10. Diferencia entre las curvas de melting ocupando el aptámero Handy Ap. Se muestran las tendencias de las diferencias entre las curvas de melting con Saxitoxina bajo distintas concentraciones y agua. (A) 1 μ M (B) 3 μ M, (C) 5 μ M, (D) 10 μ M. Rojo: Saxitoxina, Azul: Agua

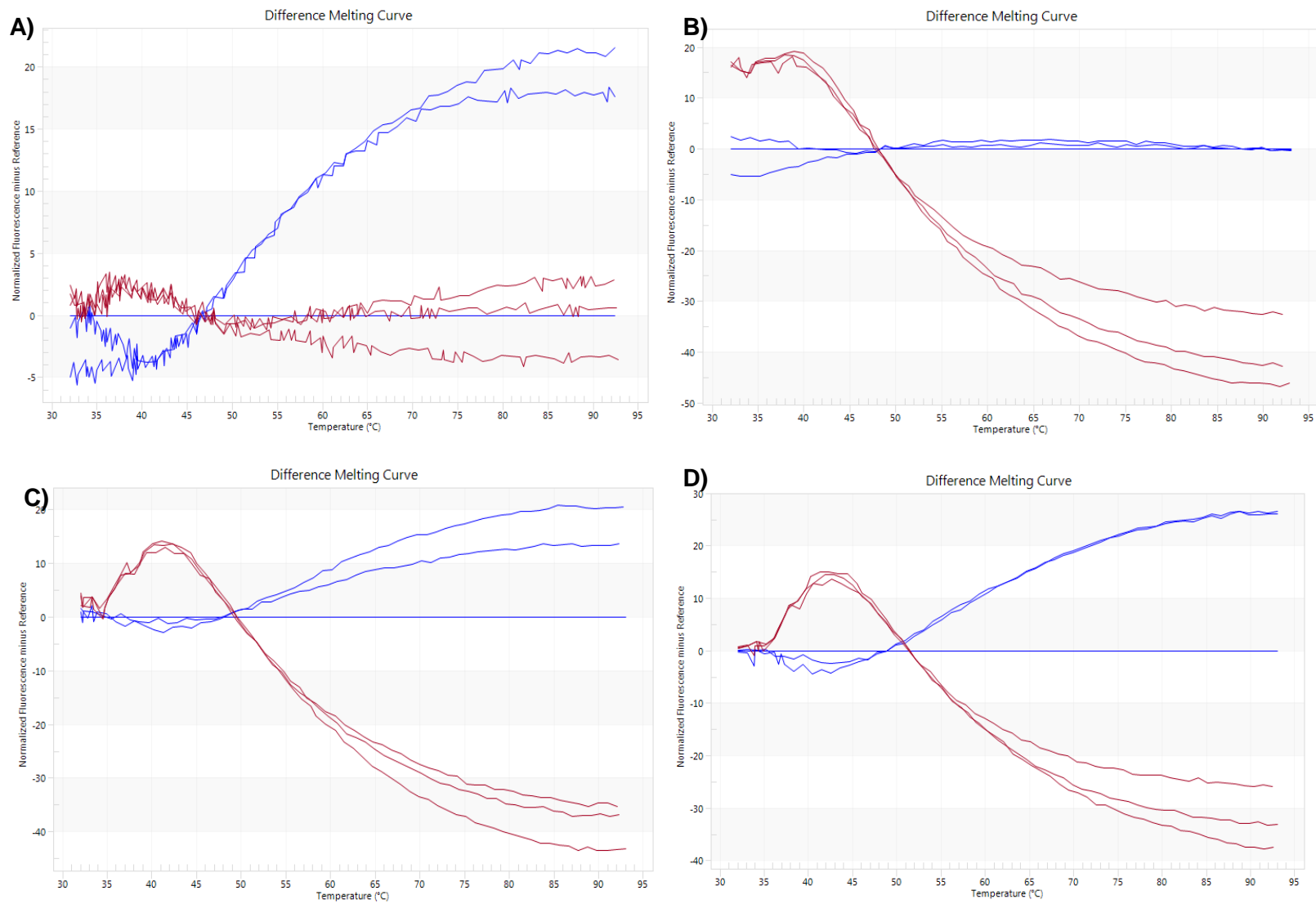


Figura 11. Diferencia entre las curvas de melting ocupando Handy Rand1. Se muestran las tendencias de las diferencias entre las curvas de melting con Saxitoxina bajo distintas concentraciones y agua. (A) 1 μM (B) 3 μM , (C) 5 μM , (D) 10 μM . Rojo: Saxitoxina, Azul: Agua.

4.2 INFLUENCIA DE COMPONENTES DEL MEDIO QUE PODRIAN CAMBIAR LA RESPUESTA DEL APTAMERO HANDY AP EN LA DETECCION DE SAXITOXINA.

Se estudió la influencia de distintos reactivos tales como $MgCl_2$, PBS-TWEEN al 0,05%, también se trató con el medio en el cual se deben realizar las pruebas a futuro el cual es el extracto crudo de marisco, además se analizó la influencia de la eliminación de los nucleótidos en cada extremo 5' y 3' correspondiendo al aptámero Aptrim por último la interacción cruzada con otra toxina marina de similares características que Saxitoxina. También se estudio el efecto de la medición de fluorescencia a mayor temperatura.

Para iniciar la comparación de las correlaciones lineales se procedió a evaluar el aptámero Handy Ap en cinco concentraciones distintas de Saxitoxina (tabla 13) con un medio de agua pura libre de nucleasas. Se evaluaron estas concentraciones, ya que se encuentran dentro de los márgenes detectables para STX ocupando Handy Ap.

Tabla 12. Resultados de las fluorescencias obtenidas con Agua pura, ocupando el aptámero Handy Ap. Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Saxitoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	STX
0,25	3,54	3,62
0,5	3,642	3,85
1	4,16	4,17
5	3,89	4,59
10	3,87	4,88

Las condiciones estándar de medición de STX en agua, en el gráfico 6 dieron un R^2 de 0,8573

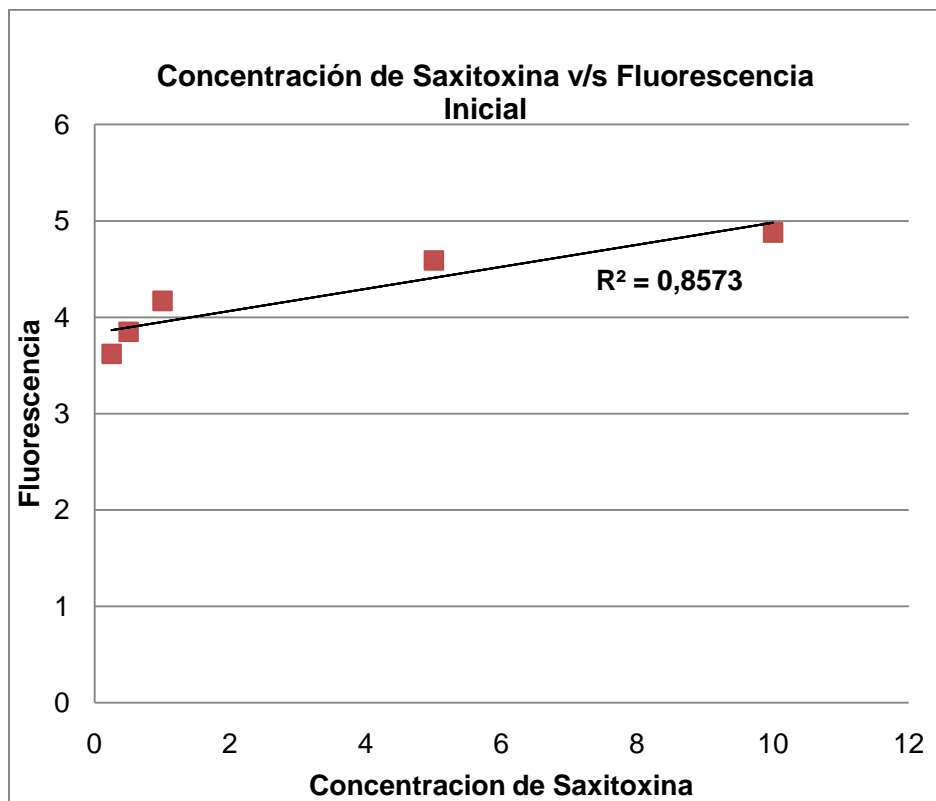


Gráfico 6. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia de agua pura como componente del medio.

Estos análisis de influencia de diversos componentes empiezan midiendo la fluorescencia a tres distintas concentraciones de Cloruro de Magnesio. La primera corresponde a 0,1 mM de $MgCl_2$, donde se analizaron las mismas cinco concentraciones de toxina (0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM y 10 μM) que con agua. Esos Resultados previos habían dado relaciones lineales entre fluorescencia y concentración realizando el ensayo con el aptámero Handy Ap solo con agua.

Se observaron altos “niveles de ruido” (figura 12) que posiblemente influyen en la lectura congruente de las diferencias entre las curvas de melting.

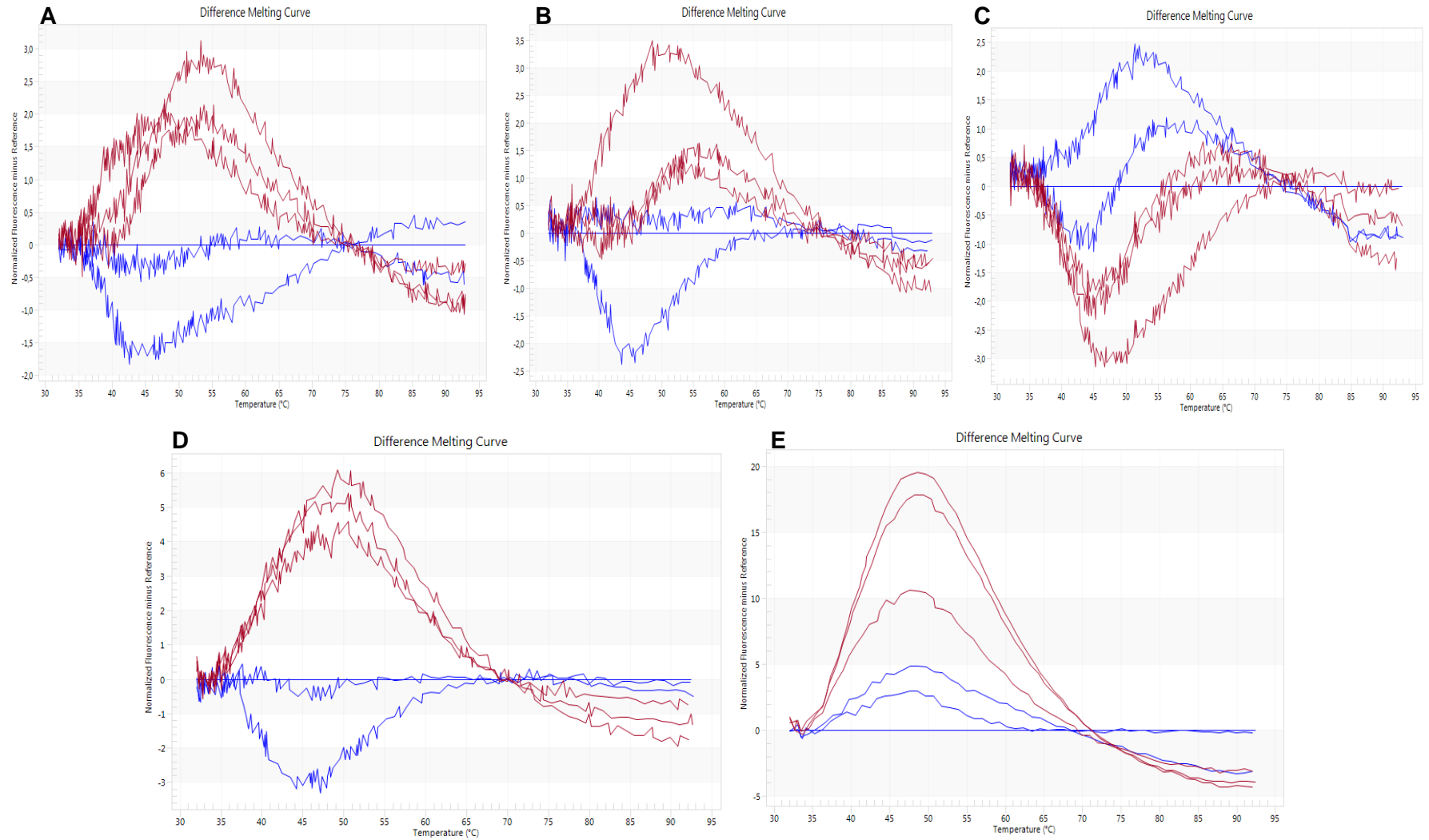


Figura 12. Comparación de las diferencias de las curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap bajo una concentración de 0,1 mM de MgCl₂. Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos presentes en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina bajo diferentes concentraciones de toxina y agua. (A) 0,25 μM (B) 0,5 μM, (C) 1 μM, (D) 5 μM, (E) 10 μM. Rojo: Saxitoxina, Azul: Agua.

Los niveles de ruido se dieron entre las concentraciones de 0,25 μM , hasta los 1 μM . Sin embargo a partir desde los 5 μM y 10 μM se puede realizar una buena lectura de las diferencias entre las curvas de melting.

En la tabla 13 se detallan los promedios de las fluorescencias iniciales correspondiente al aptámero Handy Ap con una concentración de 0,1 mM de MgCl_2 .

Tabla 13. Resultados de las fluorescencias obtenidas con MgCl_2 0,1 mM ocupando el aptámero Handy Ap.
Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Saxitoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	STX
0,25	6,03	5,72
0,5	5,6	6,56
1	5,75	5,15
5	5,76	5,79
10	5,23	6,75

Estas 5 concentraciones de graficaron con sus respectivos promedios de fluorescencias, reflejándose en el gráfico 7.

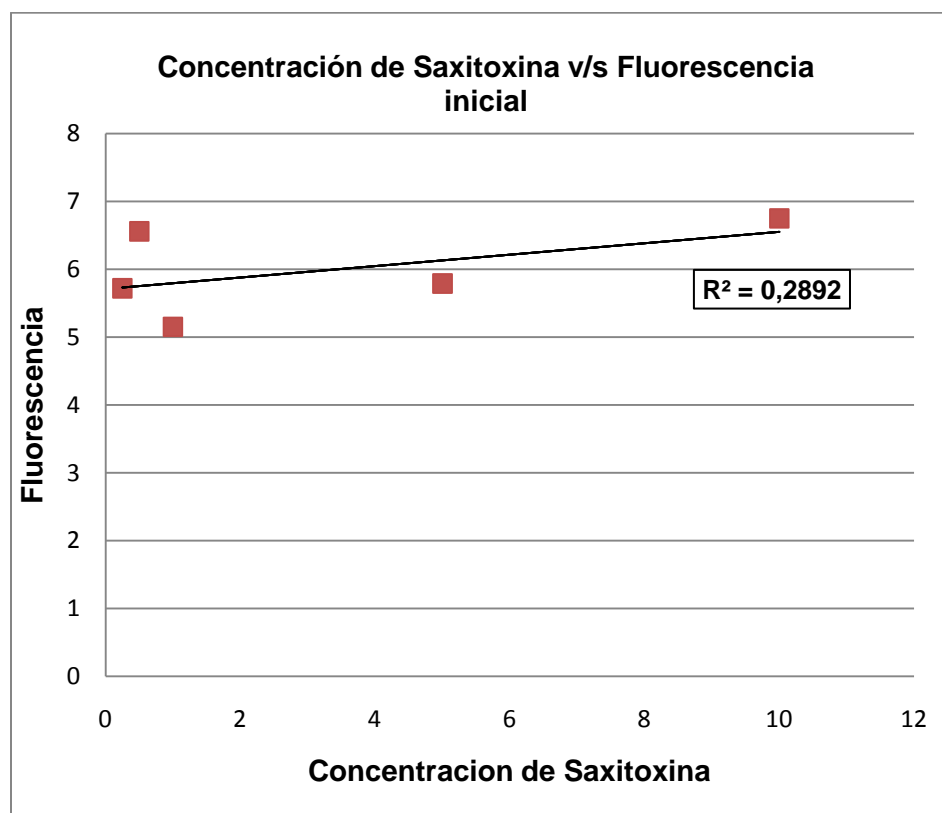


Gráfico 7. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del $MgCl_2$ a una concentración de 0,1 mM.

La correlación observada en el gráfico 7 no otorgó ningún tipo de relación entre el aptámero y Saxitoxina, concentración versus fluorescencia, donde su R^2 es del orden de los 0,2892 para STX.

Los mismos análisis se hicieron para $MgCl_2$ pero a 0,5 mM y 1 mM donde se observan los resultados de sus fluorescencias promedio en las tablas 14 y 15, las cuales posteriormente fueron graficadas.

En la figura 13 se observa resultados que representan altos “niveles de ruidos”, mayores que con 0,1 Mm de $MgCl_2$.

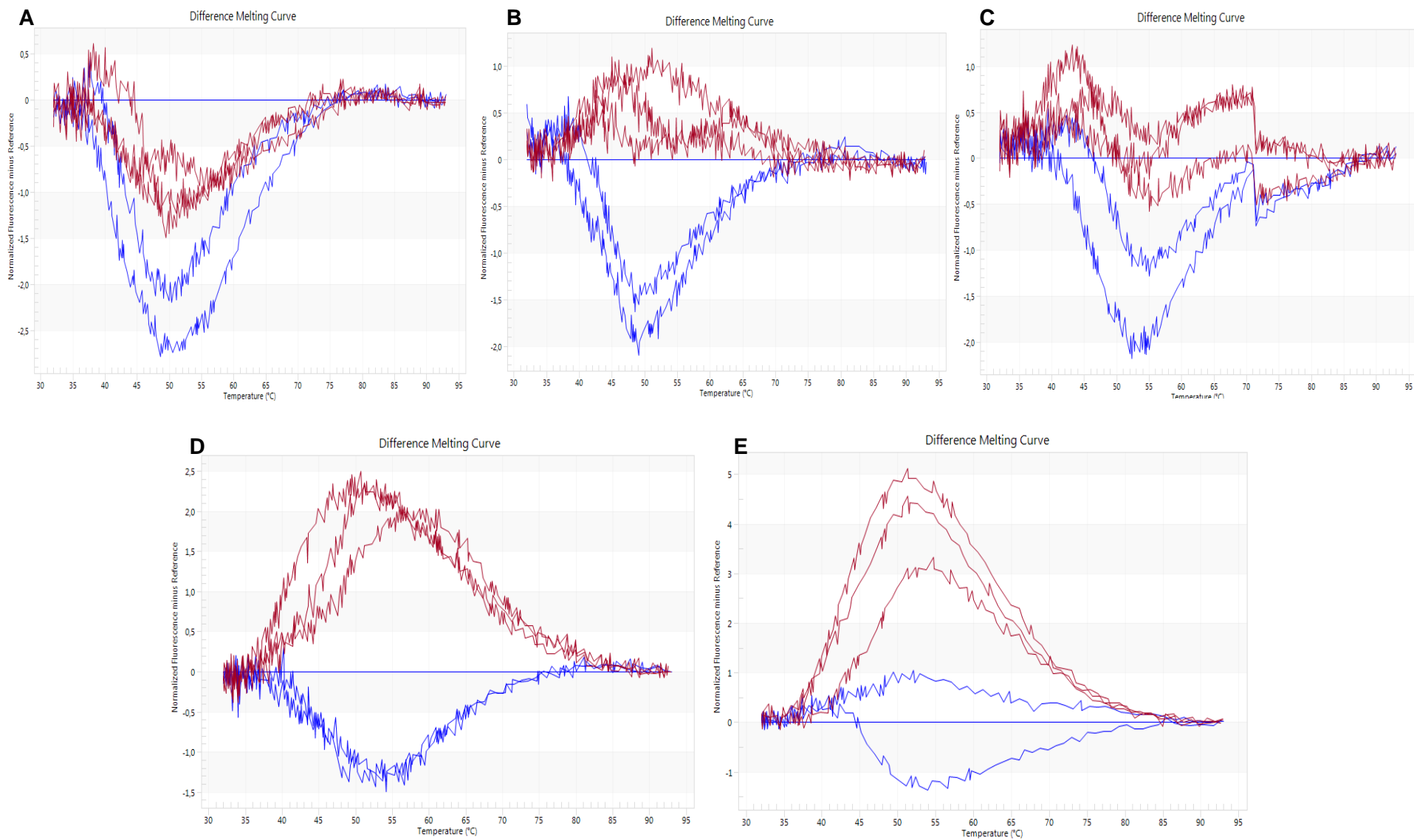


Figura 13. Comparación de las diferencias de las curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap bajo una concentración de 0,5 mM de MgCl₂. Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina bajo diferentes concentraciones y agua. (A) 0,25 μ M (B) 0,5 μ M, (C) 1 μ M, (D) 5 μ M, (E) 10 μ M. Rojo: Saxitoxina, Azul: Agua.

Tabla 14. Resultados de las fluorescencias obtenidas con $MgCl_2$ 0,5 mM ocupando el aptámero Handy Ap. Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Saxitoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	STX
0,25	5,77	5,55
0,5	5,31	5,58
1	5,57	5,31
5	5,17	4,9
10	4,97	4,9

Se realizó lo mismo que con 0,1 Mm de $MgCl_2$: se midieron las cinco concentraciones con sus respectivos promedios de fluorescencias, las cuales se muestran en el gráfico 8.

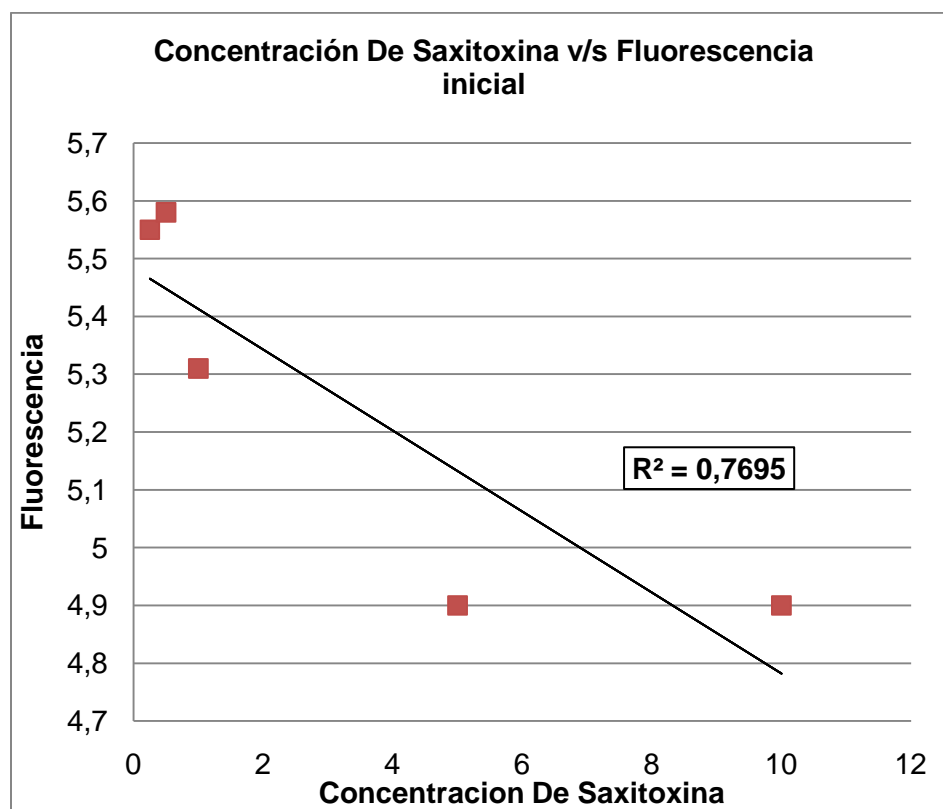


Gráfico 8. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del MgCl_2 a una concentración de 0,5 mM.

Las correlaciones señaladas en el gráfico 8 indican cierta selectividad y especificidad por STX, ya que su R^2 es del orden de los 0,7695 para Saxitoxina.

La última concentración analizada fue un 1 mM de Cloruro de Magnesio cuyas diferencias de las curvas de melting se observan en la figura 14 donde se observa nivel de ruido en las 5 concentraciones estudiadas.

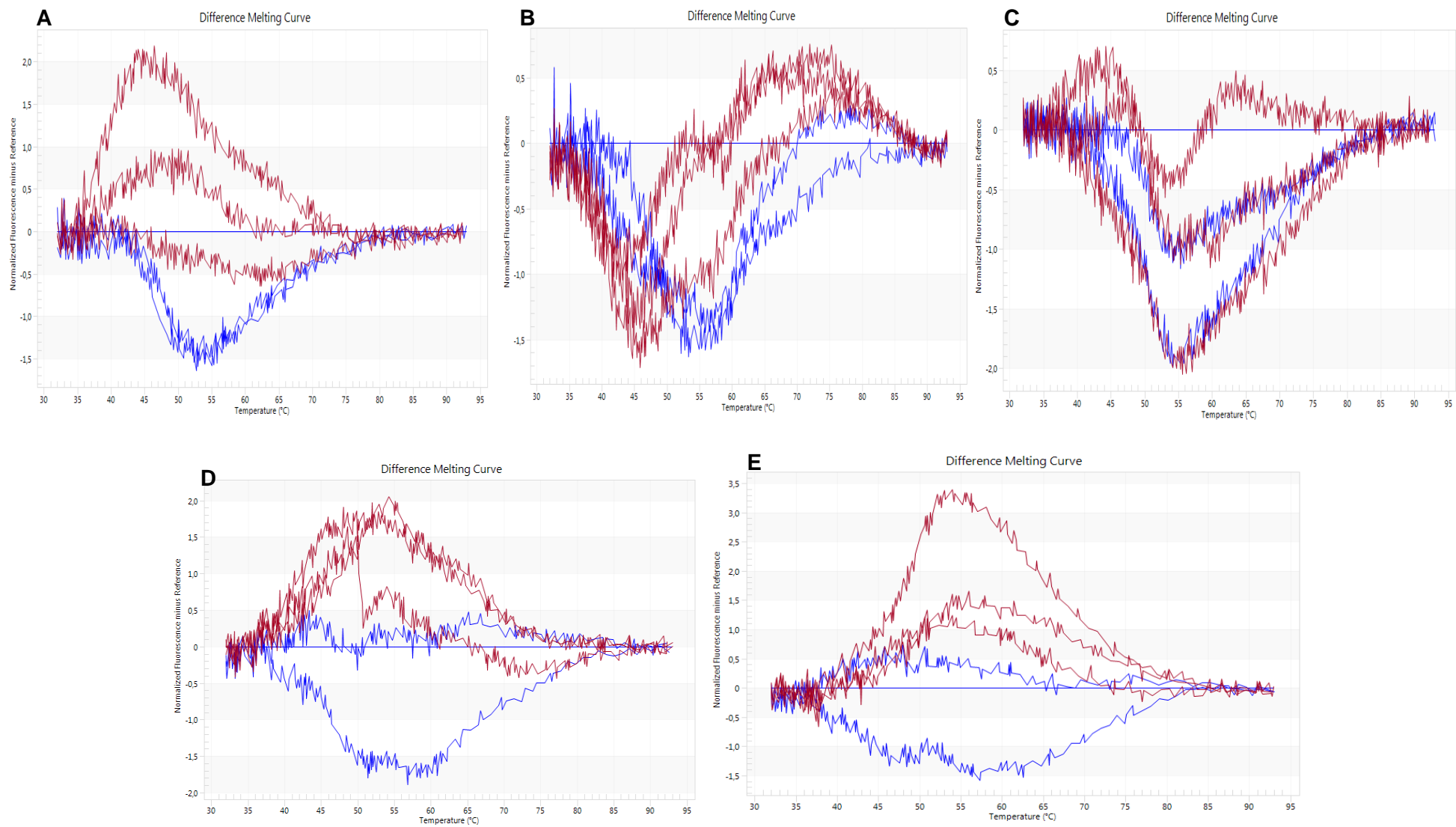


Figura 14. Comparación de las diferencias de las curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap bajo una concentración de 1 mM de $MgCl_2$. Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina bajo distintas concentraciones y agua, (A) 0,25 μM (B) 0,5 μM , (C) 1 μM , (D) 5 μM , (E) 10 μM . Rojo: Saxitoxina, Azul: Agua.

En la siguiente tabla se indican las fluorescencias iniciales promedio para cada una de las cinco concentraciones estudiadas para 1 mM de cloruro de magnesio.

Tabla 15. Resultados de las fluorescencias obtenidas con MgCl₂ 1 mM ocupando el aptámero Handy Ap.
Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Saxitoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	STX
0,25	4,3	4,2
0,5	4,42	3,92
1	3,67	3,05
5	4,74	4,71
10	4,08	4,76

Por último fueron graficadas las fluorescencias iniciales promedio para STX en 1 mM de MgCl₂, ver gráfico 9.

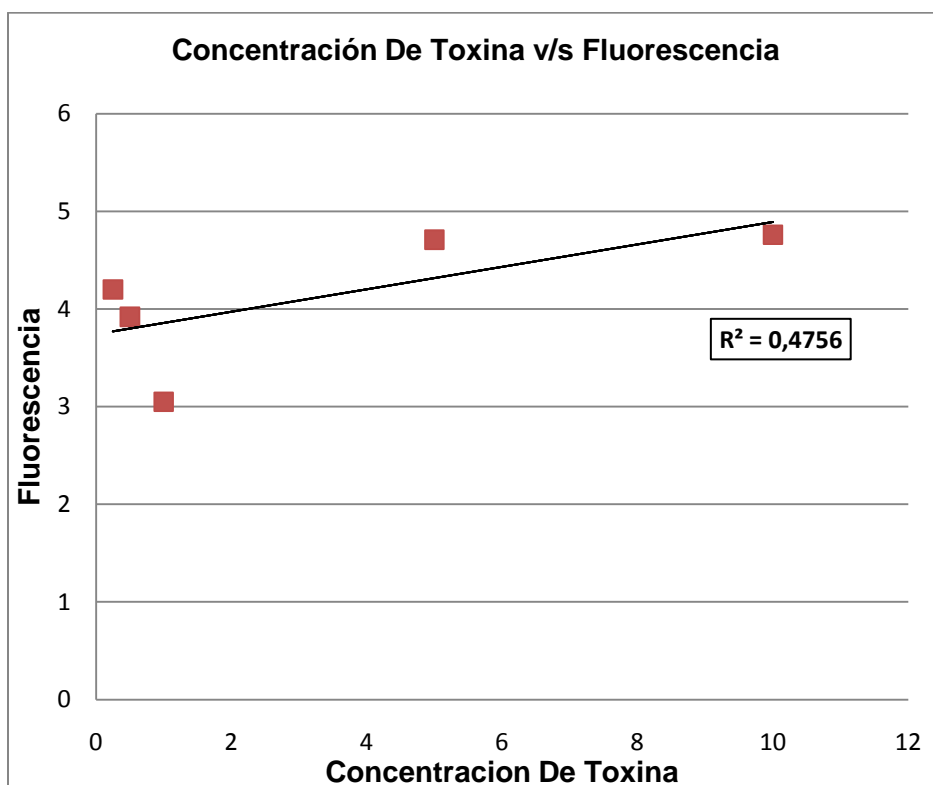


Gráfico 9. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del MgCl₂ a una concentración de 1 mM.

Para Saxitoxina con 1 mM de cloruro de magnesio su correlación lineal fue de 0,4756. Otra vez no se observa un tipo de relación entre concentración y fluorescencia.

Posteriormente se procedió a ocupar PBS-TWEEN al 0,05% pensando en la posibilidad de que fuera un compuesto necesario para la unión de Saxitoxina, debido a que fue el medio donde se seleccionó el aptámero Handy Ap. De igual manera que con las 3 concentraciones de $MgCl_2$ se analizaron las diferencias de las curvas de melting para ver el nivel de ruido que presentaba con este buffer y la eventual perturbación de la relación lineal entre fluorescencia y concentración de STX.

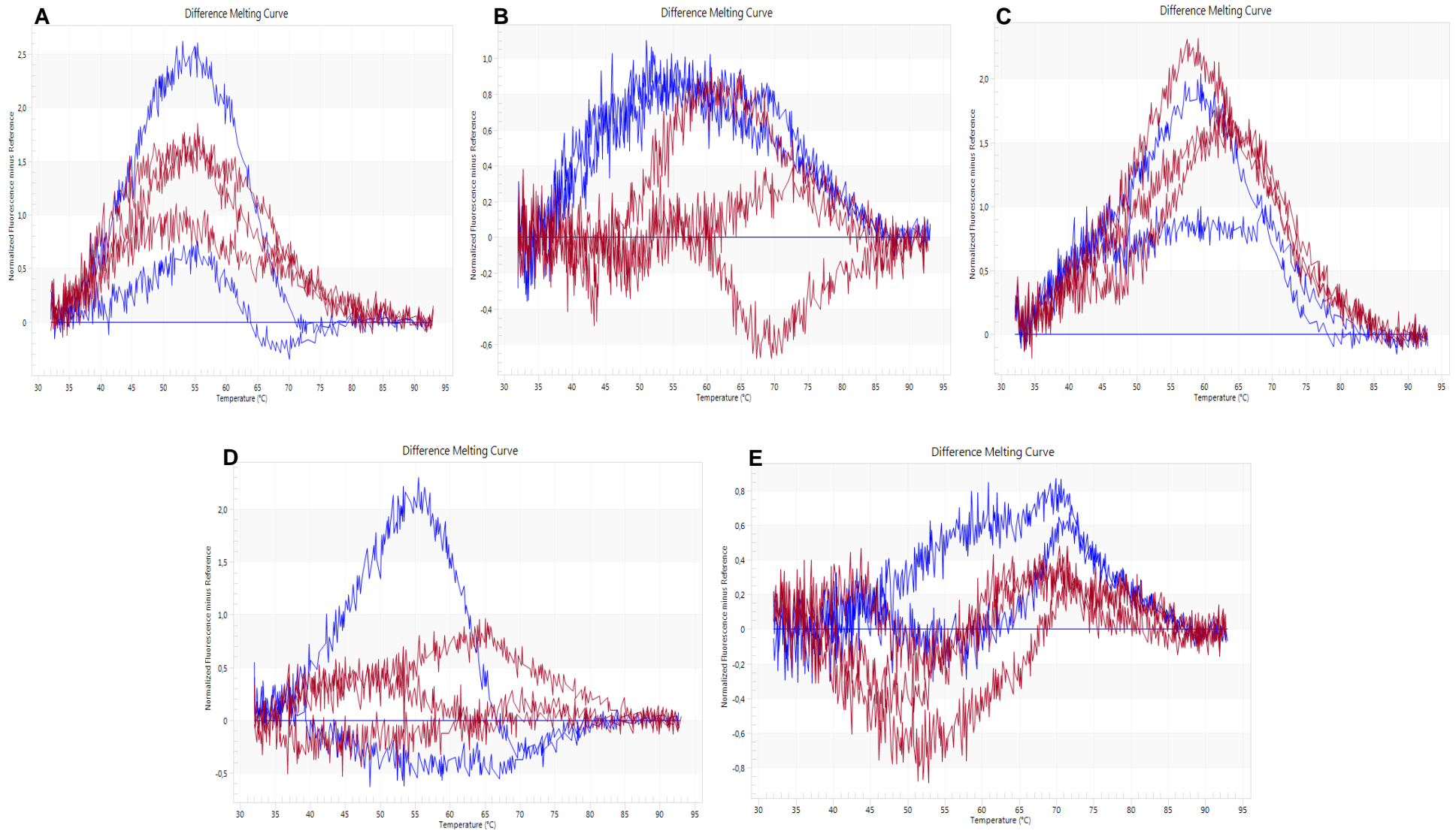


Figura 15. Comparación de las diferencia de curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap con PBS-TWEEN AL 0,05%. Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina bajo diferentes concentraciones y agua. (A) 0,25 μM (B) 0,5 μM , (C) 1 μM , (D) 5 μM , (E) 10 μM . Rojo: Saxitoxina, Azul: Agua.

La figura 15 muestra los niveles de ruido en las 5 concentraciones de toxinas tratadas con PBS-TWEEN al 0,05%, siendo relativamente mayores que en los ensayos con Cloruro de Magnesio, incluso en las concentraciones mayores.

Luego en la tabla 16 se indican las fluorescencias iniciales promedio que se obtuvieron para las cinco concentraciones de toxinas.

Tabla 16. Resultados de las fluorescencias obtenidas con PBS-TWEEN al 0,05% ocupando el aptámero Handy Ap.
Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Saxitoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	STX
0,25	6,1	5,54
0,5	5,63	5,3
1	5,89	6,02
5	6,09	5,73
10	5,62	5,97

Para saber si hay alguna tendencia lineal, se graficaron las cinco fluorescencias obtenidas por cada una de las concentraciones.

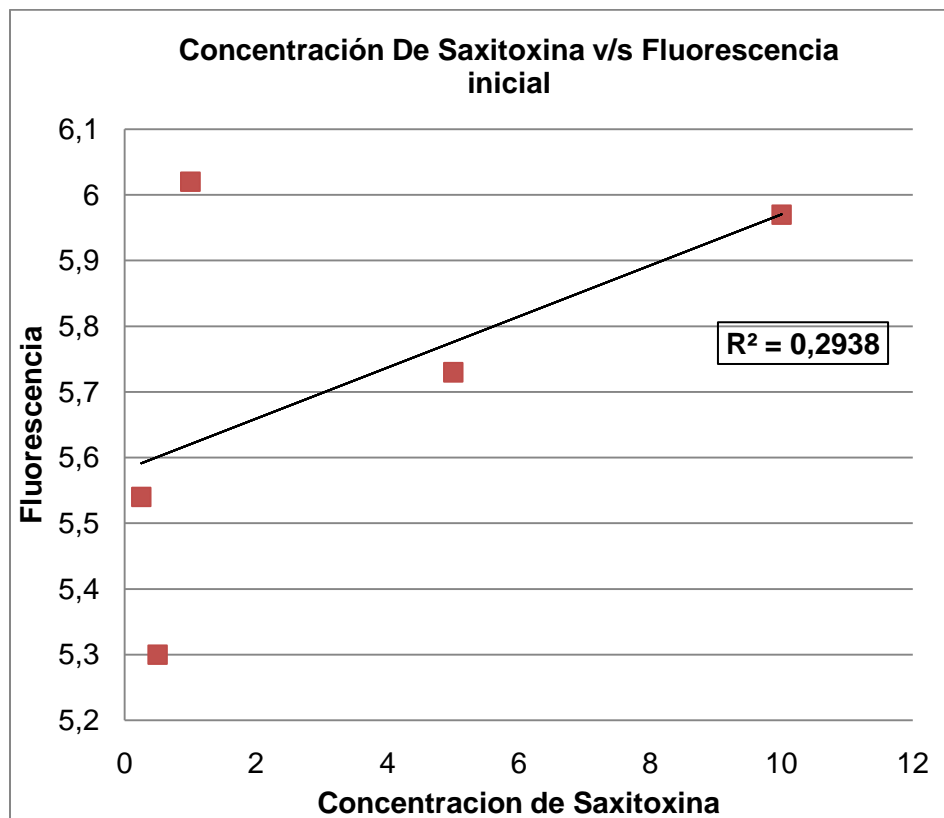


Gráfico 10. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del PBS-TWEEN al 0,05% en su medio.

Los datos observados en el gráfico 10 bajo el análisis con PBS-TWEEN al 0,05%, con las fluorescencias iniciales promedio arrojan una correlación para STX de 0,2938, lo que probablemente indica ausencia de correlación entre fluorescencia y concentración de Saxitoxina en estas condiciones.

Como bien se dijo en la introducción de este trabajo, el método predominante para estimar la concentración de VPM es la inyección de extracto crudo de marisco a ratones de una cierta línea celular, donde se estima la concentración de STX de acorde al tiempo de muerte del animal.

La Agencia Chilena para la Inocuidad Alimentaria considera que este método no es el adecuado y se busca un reemplazo mediante algún método desarrollado para la

detección de esta toxina o sus análogos. Este método debe ser específico y preciso además de establecer muestreos frecuentes y con resoluciones geográficas para poder así establecer medidas preventivas.

Dado el hecho que el aptámero Handy Ap presenta un comportamiento de detección adecuado cuando el ensayo se realiza solamente en agua, considerándose este medio como el ideal, se quiso probar en un medio cercano al utilizado actualmente en la detección de toxinas, es decir, el extracto de mariscos.

Se hicieron dos análisis, teniendo en consideración que las concentraciones de sales afectan la detección de la toxina con el aptámero, por lo que se diluyó el extracto crudo de marisco al 50% y al 15%, en forma similar a lo que es llevado a cabo en el ensayo ratón, previo a la inyección del animal.

Nuevamente se estudiaron las diferencias de las curvas de melting para las dos concentraciones de extractos de marisco. La figura 16 muestra el resultado que corresponde al extracto de marisco crudo al 15% y sus fluorescencias iniciales promedio se detallan en la tabla 17.

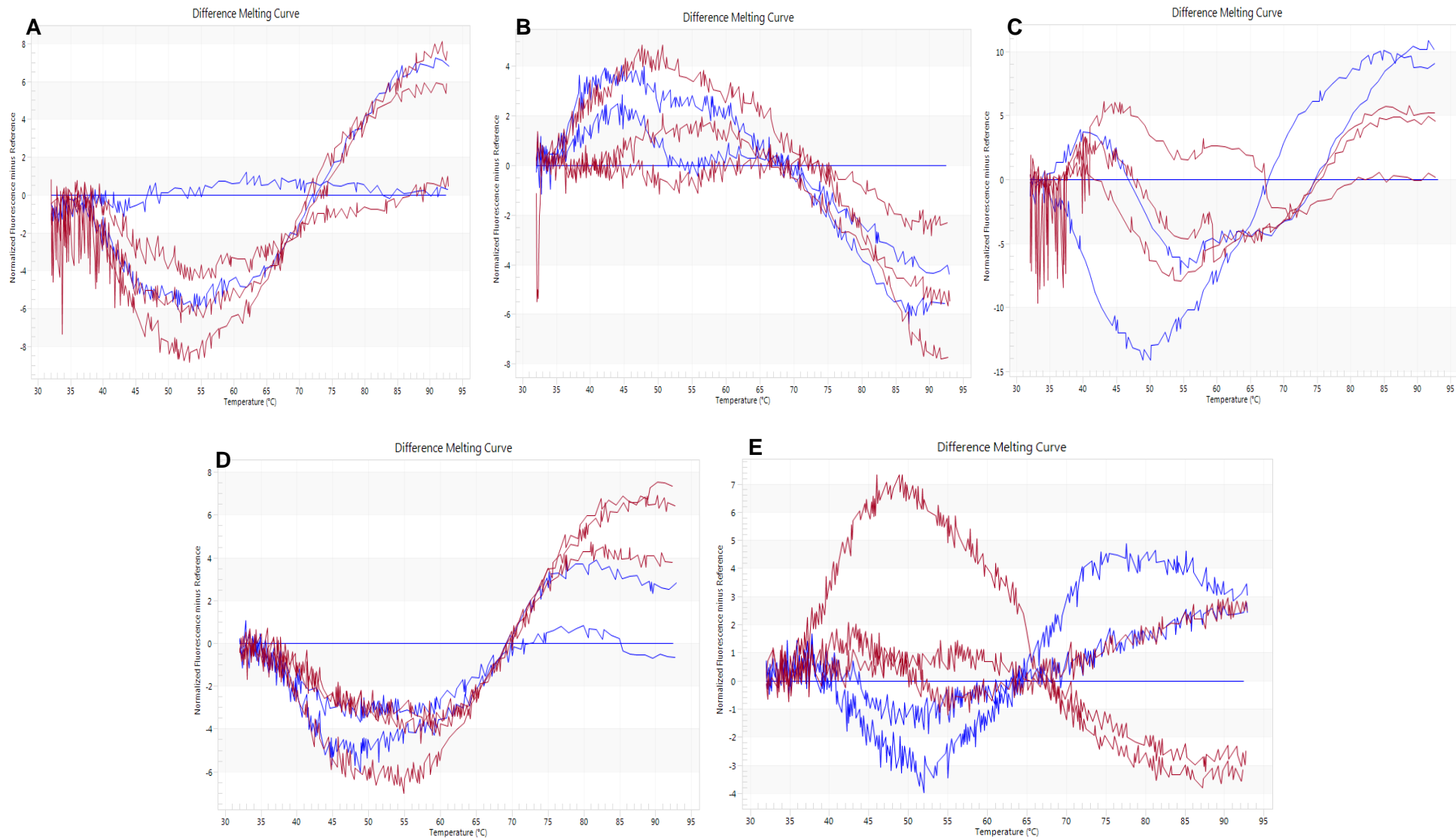


Figura 16. Comparación de las diferencias de las curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap con extracto de marisco al 15%. Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina bajo diferentes concentraciones y agua. (A) 0,25 μ M (B) 0,5 μ M, (C) 1 μ M, (D) 5 μ M, (E) 10 μ M. Rojo: Saxitoxina, Azul: Agua.

Los cinco gráficos correspondientes para las cinco concentraciones mostraron niveles de ruido en todas las curvas y para cada concentración.

Tabla 17. Resultados de las fluorescencias obtenidas con extracto de marisco al 15% ocupando el aptámero Handy Ap. Fluorescencias de los promedios de los triplicados de cada muestra ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	STX
0,25	7,8	10,7
0,5	10,3	10,4
1	6	8,4
5	7,51	7,49
10	7,19	7,45

Siguiendo los mismos procedimientos anteriores, se graficaron los cinco promedios de las fluorescencias iniciales obtenidas (gráfico 11).

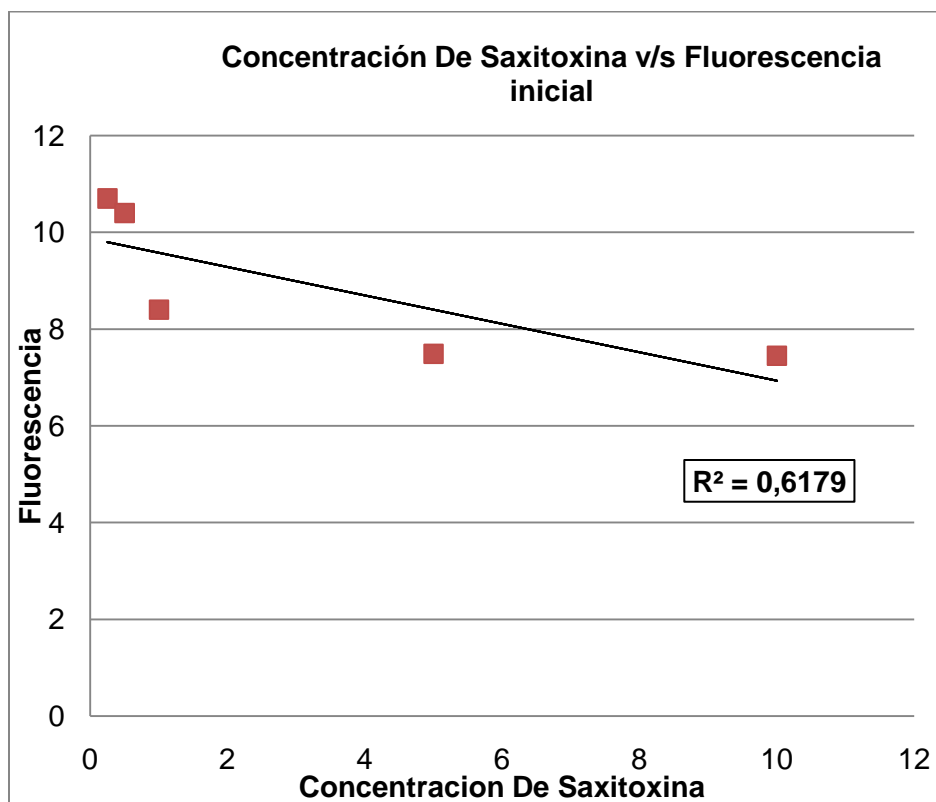


Gráfico 11. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia de extracto de marisco al 15%.

En los datos observados en el gráfico 11 bajo el análisis con extracto crudo de marisco al 15% se obtuvo una correlación de 0,6179 para STX.

Por último se hizo un análisis al 50% de extracto de marisco. Las diferencias de las curvas de melting presentaron un nivel de ruido mayor que con extracto crudo de marisco al 15%. Ver figura 17.

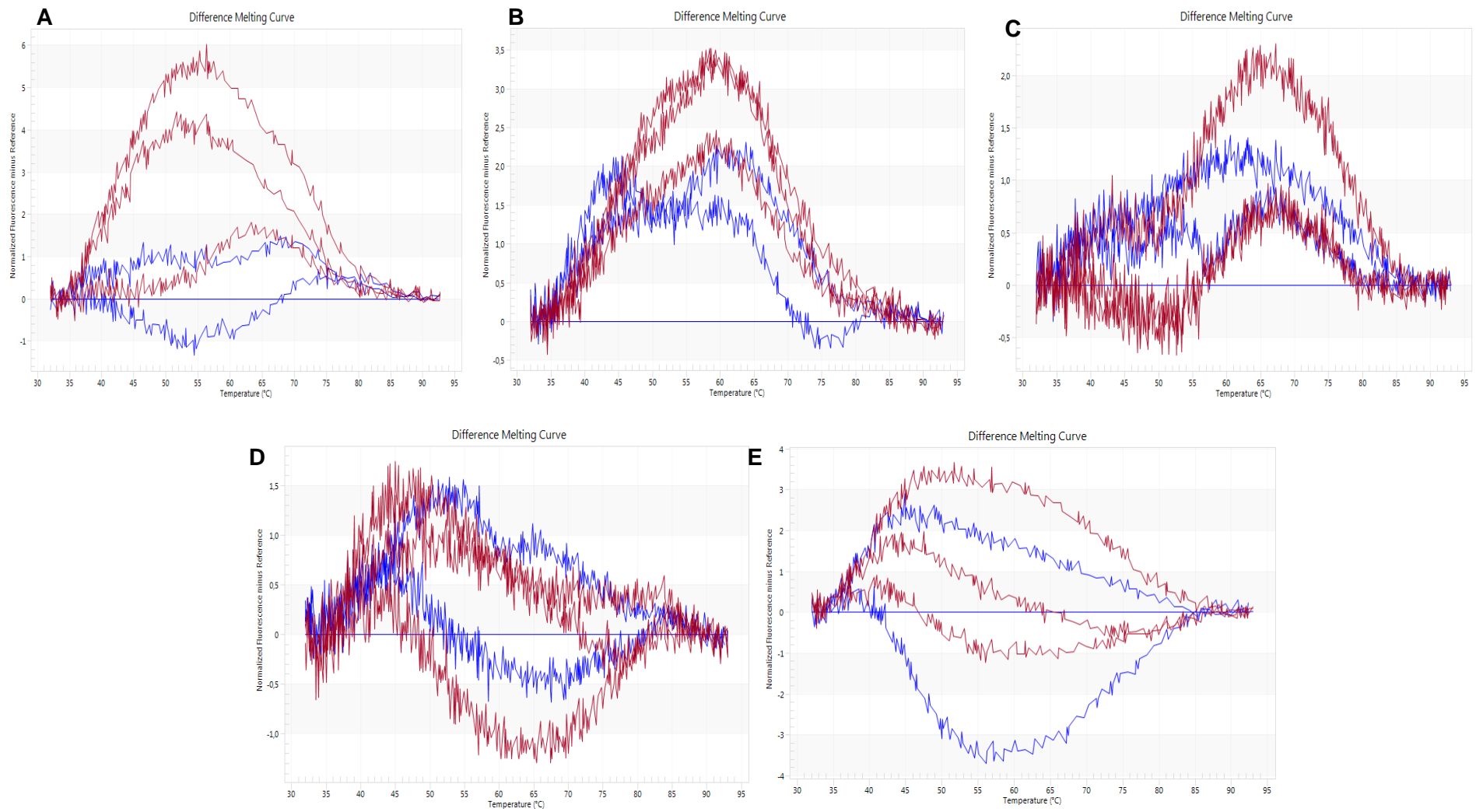


Figura 17. Comparación de las diferencia de las curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap con extracto de marisco al 50%. Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina bajo diferentes concentraciones y agua. (A) 0,25 μ M (B) 0,5 μ M, (C) 1 μ M, (D) 5 μ M, (E) 10 μ M. Rojo: Saxitoxina, Azul: Agua

La tabla 18 detalla cada promedio de las fluorescencias iniciales para las cinco concentraciones estudiadas.

Tabla 18. Resultados de las fluorescencias obtenidas con extracto de marisco al 50% ocupando el aptámero Handy Ap. Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Saxitoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	STX
0,25	7,38	7,47
0,5	7,43	7,57
1	7,46	6,99
5	7,34	7,34
10	7,19	7,33

Para saber si obtenemos alguna tendencia, se graficaron las cinco fluorescencias estudiadas.

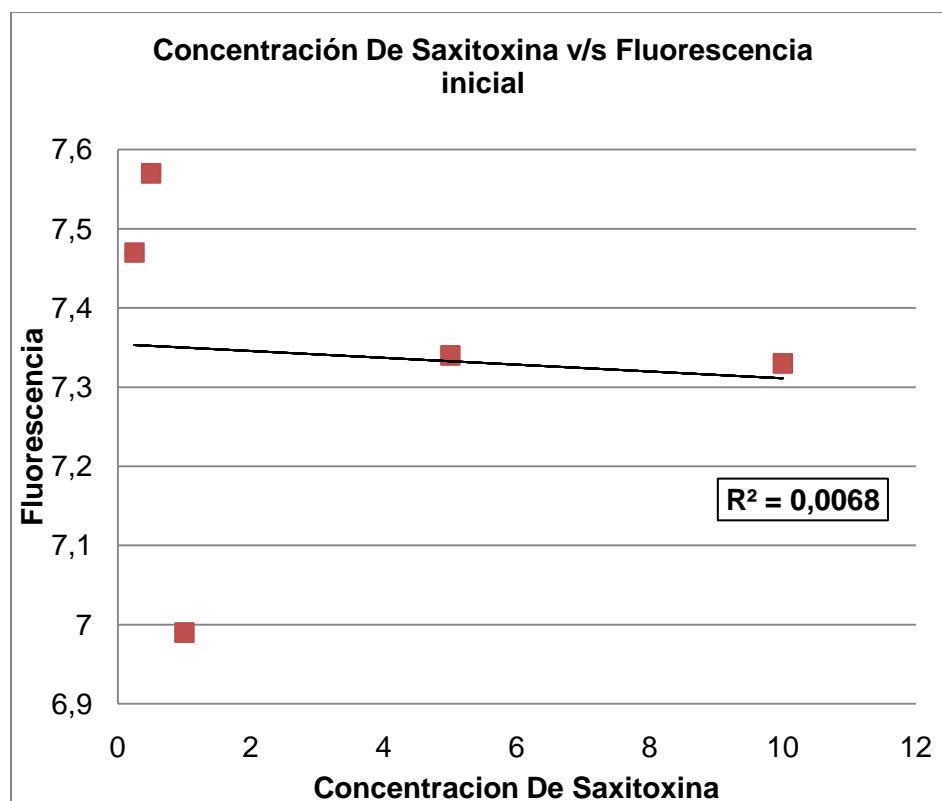


Gráfico 12. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del extracto de marisco al 50% en su medio.

Así como se aprecia en el gráfico 12, los resultados indican que con extracto crudo de marisco al 50% se obtuvo para STX una correlación igual a 0,0068.

Después de haber realizado los estudios posteriores sabemos en qué tipo de medio el aptámero es funcional y serviría como un método de detección de toxina debido a que nos arrojó una mejor correlación en ambos gráficos.

4.2.1 EFECTO DE LAS MODIFICACIONES DEL APTÁMERO EN LA DETECCIÓN DE STX.

También se realizó un análisis el cual consistía en el análisis del aptámero aprtrim, el cual es igual a los aptámeros originales pero escindiendo 6 nucleótidos de cada extremo, 5' y 3'.

Se analizaron concentraciones donde se sabe que da una relación lineal entre ambas variables (Fluorescencia y Concentración).

En la tabla 19 se muestran los promedios de las fluorescencias iniciales del aptámero con la toxina.

Tabla 19. Resultados del diseño principal para la optimización del aptámero Handy Aprtrim como un sistema para cuantificar saxitoxina. Fluorescencias de los promedios de los triplicados de cada Saxitoxina ocupando el aptámero Handy Aprtrim.

μM	Agua	STX
0,25	5,796	5,879
0,5	6,332	5,986
1	6,744	6,534
2	7,165	6,315
3	6,327	5,664
4	6,151	5,616
5	5,936	5,884
6	5,892	6,055
7	6,01	5,876
8	6,005	5,971
9	6,077	5,19
10	9,085	4,488

Se graficó las fluorescencias que se muestran en la tabla 20, estas son las fluorescencias iniciales del aptámero Handy Aprtrim con STX.

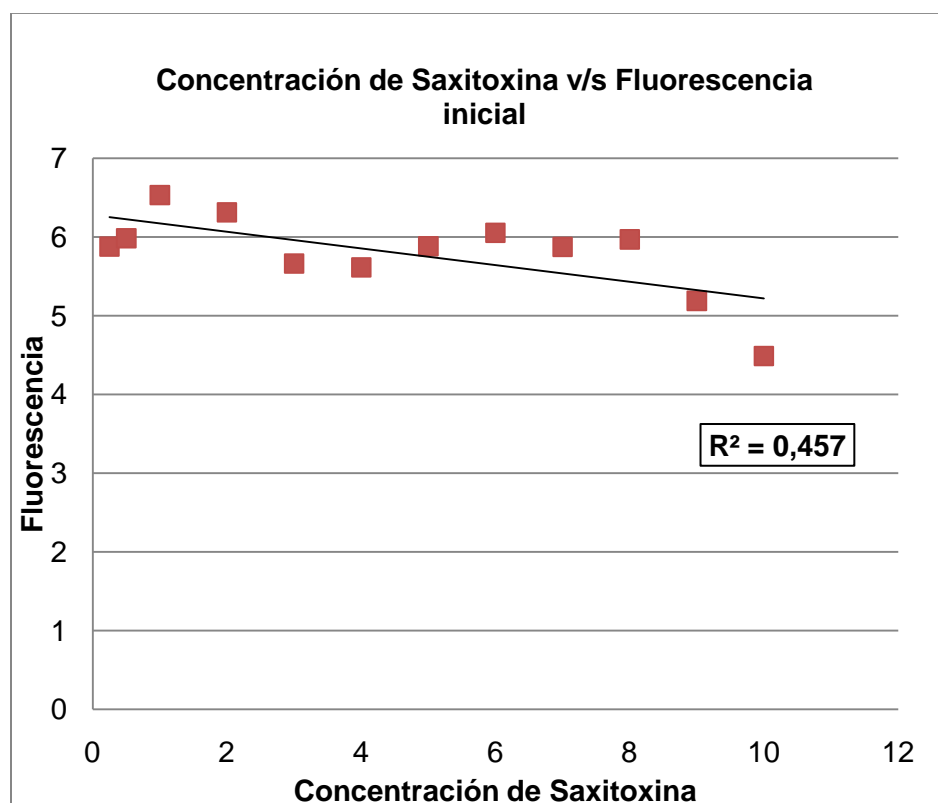


Gráfico 13. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Aprtrim. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Aprtrim bajo la influencia del agua ultra pura libre de nucleasas en su medio.

Los resultados indican que la correlación es 0,457, lo cual puede ser visualizado en el gráfico 13, lo que indicaría que no existe relación entre las variables analizadas. Por lo tanto al comparar los R^2 entre el aptámero Handy Ap y Handy Aprtrim, se concluye que el aptámero completo entrega lecturas más consistentes y de mayor correlación.

4.2.2 INTERACCION CRUZADA CON OTRA TOXINA MARINA

Se analizó en sistema de detección desarrollado con una toxina llamada Gonyautoxina 2/3, la cual posee una estructura similar a STX, con la salvedad que forma parte de sus grupos funcionales un grupo OSO_3^- . Se consideraron los mismos estudios realizados para Saxitoxina, cuyos resultados se detallarán a continuación. En una primera parte se mostrarán los resultados para concentraciones que abarcan desde 1 μM hasta los 10 μM , ocupando el aptámero Handy Ap y Handy Rand1.

Tabla 20. Resultados del diseño principal para la optimización del aptámero Handy Ap como un sistema para detectar Saxitoxina. Fluorescencias iniciales de los promedios de los triplicados de Gonyautoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	GTX
1	3,52	4,43
2	3,5	5,46
3	3,28	4,63
4	3,14	5,24
5	3,14	4,39
6	2,33	4,55
7	3,04	4,74
8	2,88	4,74
9	3,88	4,96
10	3,81	5,61

En la tabla 20 se detallan los promedios de las fluorescencias iniciales entregadas por la interacción de Gonyautoxina con el aptámero Handy Ap, posteriormente se graficaron para poder analizar si existía algún tipo de relación lineal entre fluorescencia y concentración de GTX, como se vio se existía con STX (Gráfico 14).

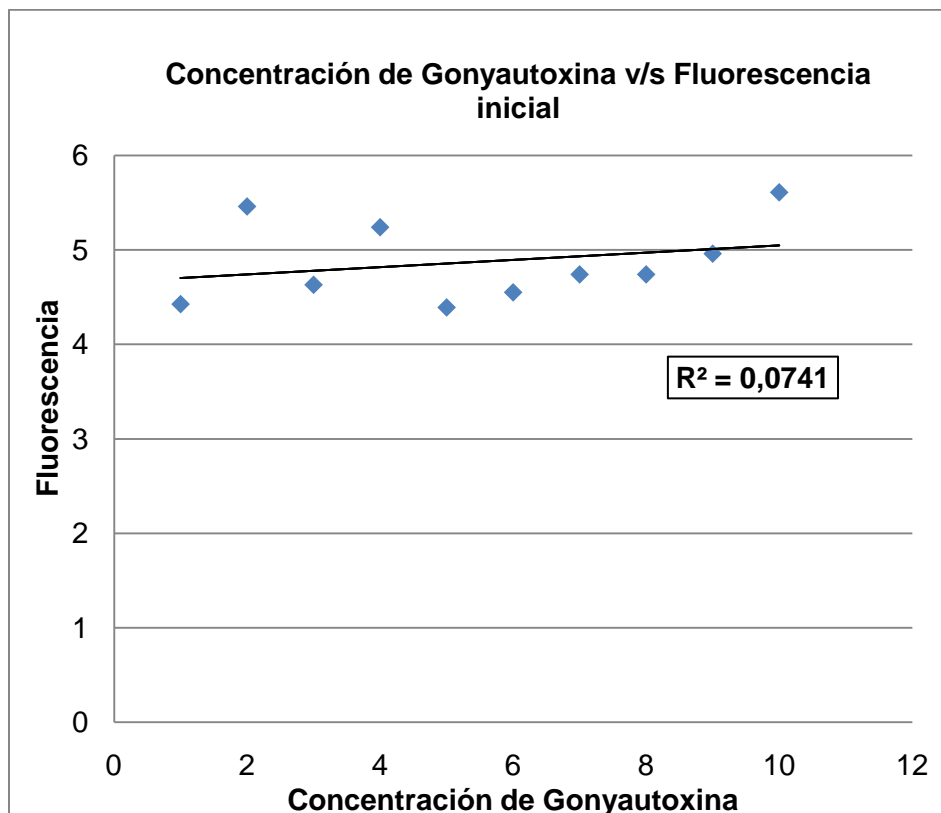


Gráfico 14. Concentración de Saxitoxina versus Fluorescencia del aptámero Handy Ap con interacción de Gonyautoxina. Se muestra la tendencia de la fluorescencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del agua pura en su medio.

La correlación obtenida para Gonyautoxina con el aptámero Handy Ap es igual a 0,0741, no mostrándose relación entre las dos variables (gráfico 14).

Como no hubo relación entre fluorescencia y concentración de Gonyautoxina no era necesario comprobar con el Handy Rand1, ya que este se usa como control negativo si existiera algún tipo de relación entre las dos variables mencionadas.

Por lo tanto este tipo de relación lineal solo se da con Saxitoxina entre las concentraciones entre 1 y 10 μM y no así con una molécula de muy similares características, Gonyautoxina 2/3.

Se analizaron también, los límites detectables estudiados en el punto 4.1.1.

En la tabla 21 se observan concentraciones y Fluorescencias iniciales promedio para Gonyautoxina.

Tabla 21. Resultados de las fluorescencias iniciales obtenidas ocupando el aptámero Handy Ap a modo de testear las concentraciones por sobre los 10 μM hasta los 100 μM . Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Gonyautoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	GTX
10	4,1	4,81
20	3,74	3,97
30	3,88	3,13
40	3,75	2,08
50	3,67	1,79
60	3,69	1,24
70	3,54	1,76
80	4,46	1,56
90	5,32	2,31
100	4,35	1,81

Los promedios obtenidos se graficaron con su correspondiente concentración (gráfico 15). Se obtiene una correlación igual a 0,5777, este dato fue mejor que la correlación indicada para STX cuyo R^2 fue de 0,3689, pero no se acerca al valor esperado que un valor cercano a 1. Además la relación que se puede visualizar en el gráfico 15, demuestra una relación inversamente proporcional.

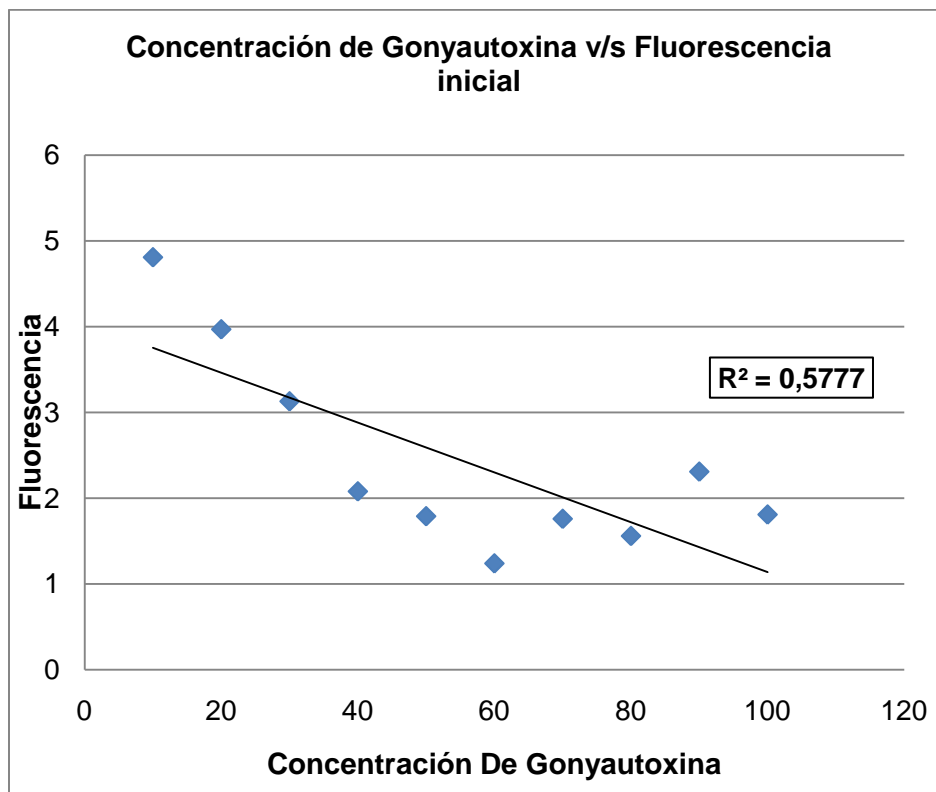


Gráfico 15. Concentración de Gonyautoxina versus Fluorescencia del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia de fluorescencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del agua pura en su medio en los parámetros de concentración desde los 10 µM hasta los 100 µM.

Posteriormente se analizó las concentraciones mínimas que corresponden de 1 µM a 0,025 µM con sus fluorescencias iniciales promedio, que se pueden observar en la tabla 22.

Tabla 22. Resultados de las fluorescencias iniciales obtenidas ocupando el aptámero Handy Ap a modo de testear las concentraciones desde 1 µM hasta los 0,025 µM. Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Gonyautoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

µM	Agua	STX
1	3,52	4,157
0,75	3,97	4,05
0,5	3,9	3,88
0,25	3,41	3,95
0,1	3,47	3,7
0,075	3,63	3,57

0,05	3,41	3,67
0,025	4,4	3,5

Siguiendo la misma dinámica que las secciones anteriores se graficaron las fluorescencias iniciales promedio para Gonyautoxina bajo las concentraciones de 1 μM , las cuales se observan en el gráfico 16.

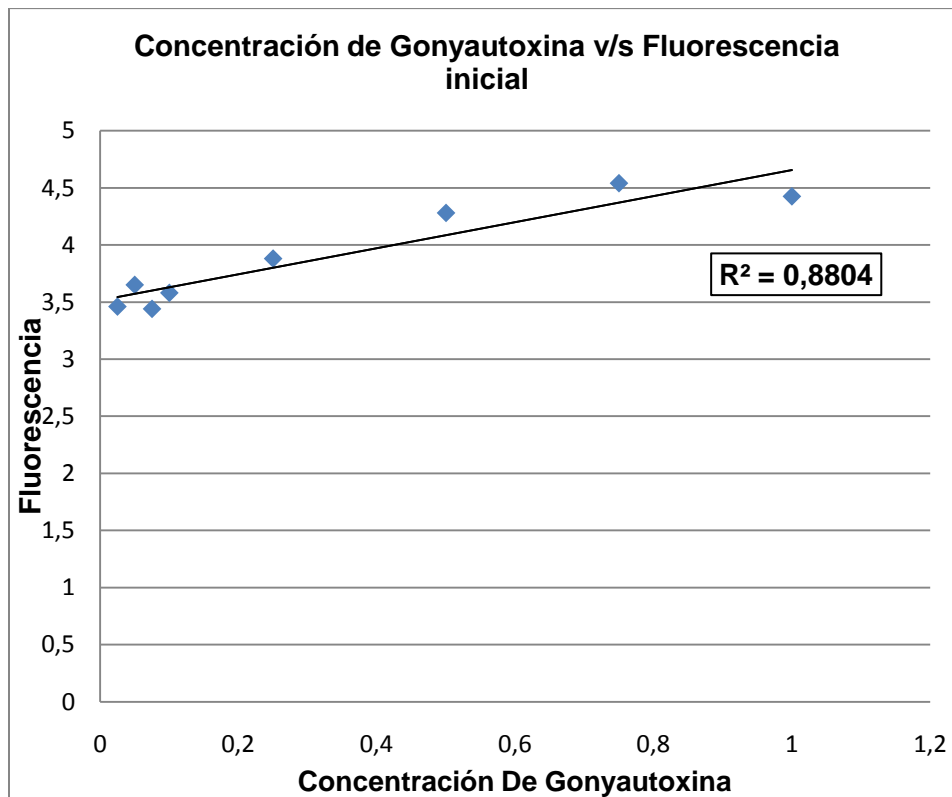


Gráfico 16. Concentración de Gonyautoxina versus Fluorescencia del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia de la fluorescencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del agua pura en su medio en los parámetros de concentración desde los 1 μM hasta los 0,025 μM .

La correlación obtenida para el límite inferior con Gonyautoxina fue de 0,8804, este dato es muy similar al entregado por Saxitoxina cuyo valor fue de 0,8351. Para comprobar si este valor entregado por Gonyautoxina a bajas concentraciones solo se da con Handy Ap se ocupó el control negativo Handy Rand1, ver tabla 23.

Tabla 23. Resultados de las fluorescencias iniciales obtenidas ocupando Handy Rand1 a modo de testear las concentraciones desde 1 μM hasta los 0,025 μM . Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Gonyautoxina ocupando Handy Rand1.

μM	Agua	GTX
1	4,57	5,66
0,75	4,48	5,32
0,5	4,86	5,18
0,25	4,61	5,19
0,1	4,58	4,69
0,075	5	4,86
0,05	4,61	5,04
0,025	4,75	4,45

Se graficaron las fluorescencias iniciales promedio que pertenecen a la tabla 23.

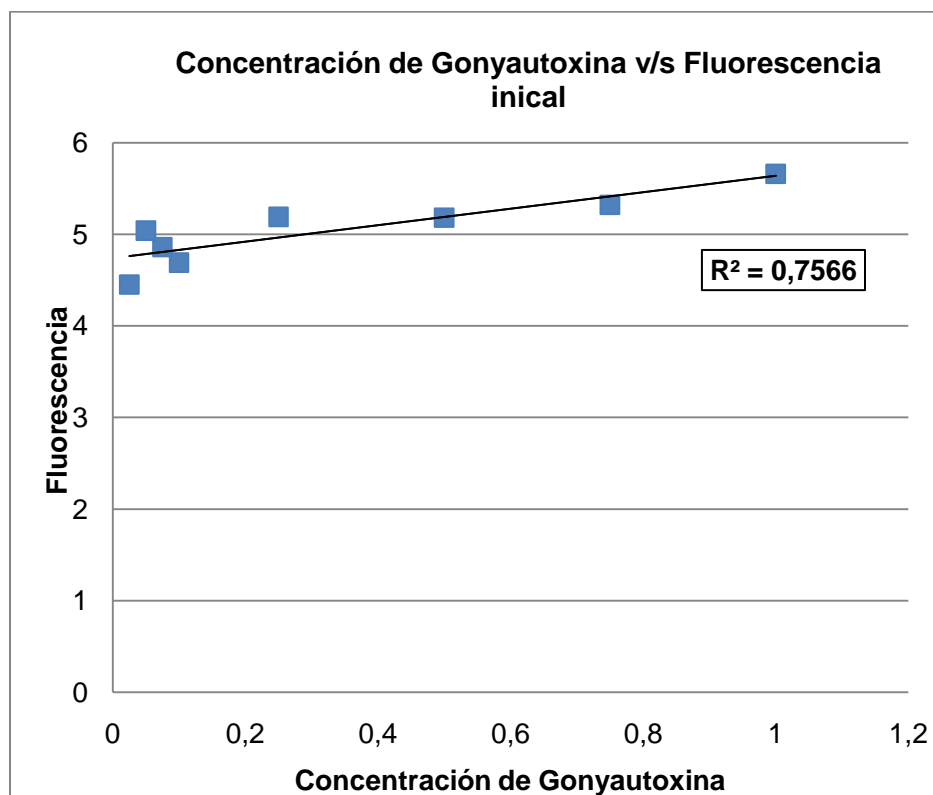


Gráfico 17. Concentración de Gonyautoxina versus Fluorescencia Handy Rand1. Se muestra la tendencia de la fluorescencia que tiene Handy Rand1 bajo la influencia del agua pura en su medio en los parámetros de concentración desde los 1 μM hasta los 0,025 μM .

Como se puede apreciar en el gráfico 17, la correlación obtenida para Gonyautoxina ocupando Rand1 es de 0,7566, por lo tanto GTX también influye con este aptámero a concentraciones bajas. Es posible que a estas bajas concentraciones, GTX influya en el plegamiento en esta hebra de ADN en forma inespecífica.

Al igual que en el punto 4.1.2 donde se analizó si STX influía en el desplegamiento del aptámero y si ocurre algún cambio cuando está ante su analito para el cual fue hecho, esto mismo se quiso analizar con GTX y se hizo el mismo procedimiento detallado en la sección antes nombrada. En la figura 18 se muestran las diferencias entre las curvas de melting de STX, GTX y el blanco de referencia (agua), ocupando el aptámero Handy Ap y en la figura 19 se observan las diferencias para Handy Rand1.

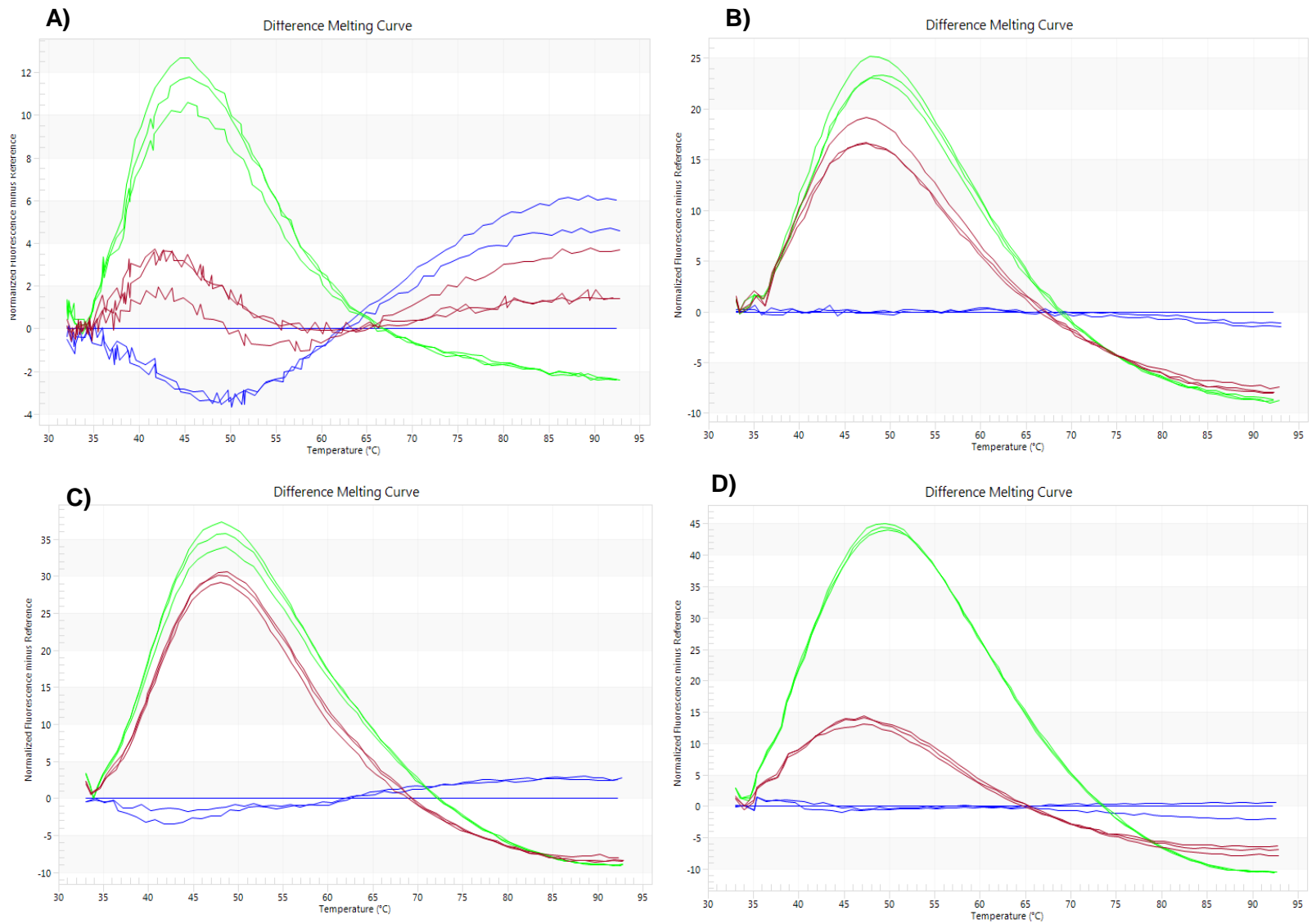


Figura 18. Diferencia de las curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap. Se muestran las tendencias de las diferencias entre las curvas de melting con Saxitoxina, agua y Gonyautoxina bajo diferentes concentraciones de toxinas. (A) 1 μ M (B) 3 μ M, (C) 5 μ M, (D) 10 μ M. Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua

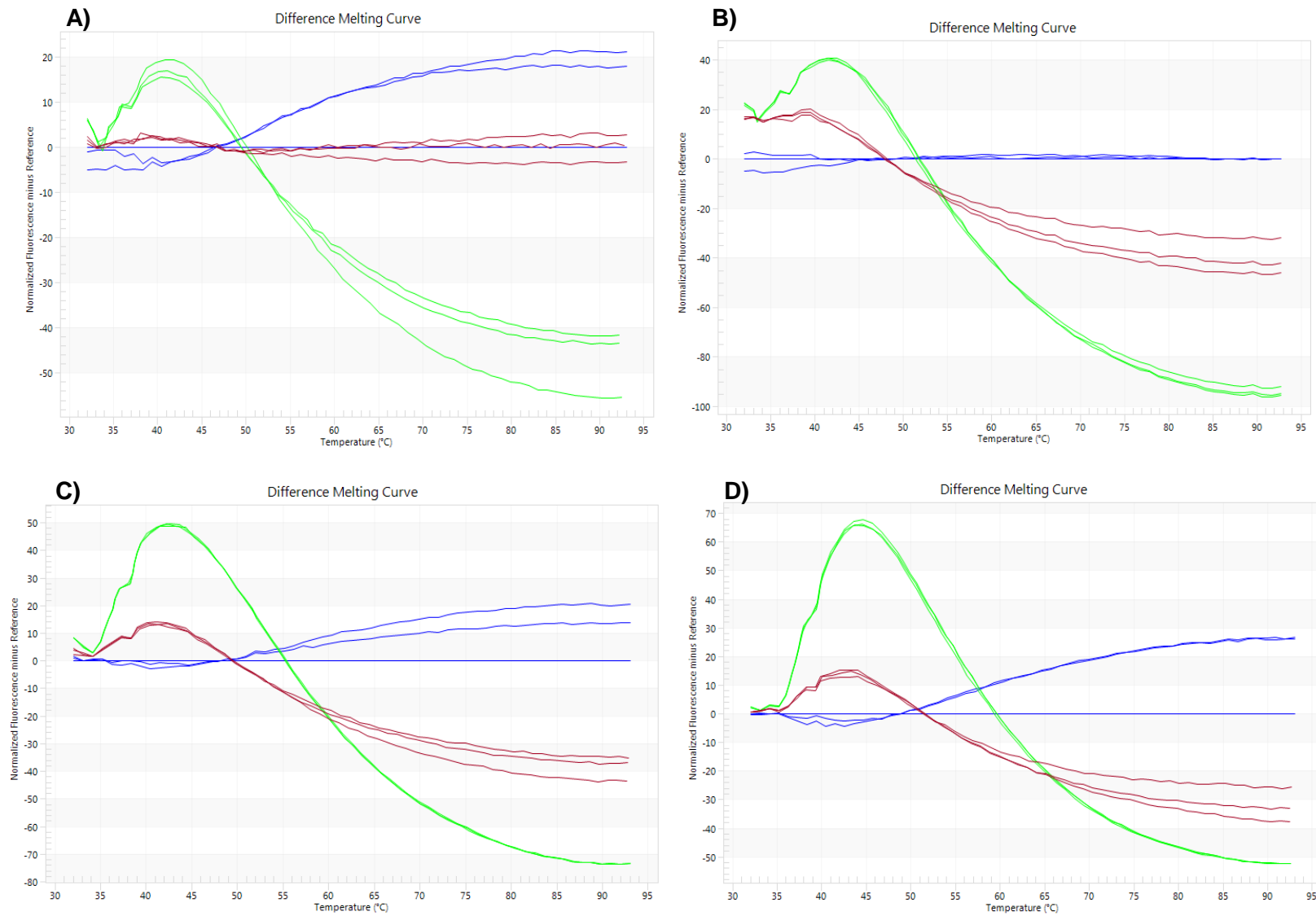


Figura 19. Diferencia de las curvas de melting ocupando Handy Rand1. Se muestran las tendencias de las diferencias entre las curvas de melting con Saxitoxina, agua y Gonyautoxina bajo diferentes concentraciones de toxinas. (A) 1 μ M (B) 3 μ M, (C) 5 μ M, (D) 10 μ M. Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua.

En la figura 18 se observa que también podría estar ocurriendo un plegamiento diferencial del aptámero frente a GTX.

Después de haber analizado el aptámero Handy Ap bajo el protocolo destacable en esta tesis donde además se analizó diferentes concentraciones con Gonyautoxina se procedió a realizar los análisis con Cloruro de magnesio, PBS-TWEEN al 0,05% y extracto de marisco crudo.

El primer procedimiento que se detalla es el mismo que con STX corresponde a 0,1 mM de $MgCl_2$, donde se analizaron también solo cinco concentraciones de toxina (0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM y 10 μM). Se observaron “niveles de ruido”, ver figura 20, que podrían influir en la lectura congruente de las diferencias entre las curvas de melting.

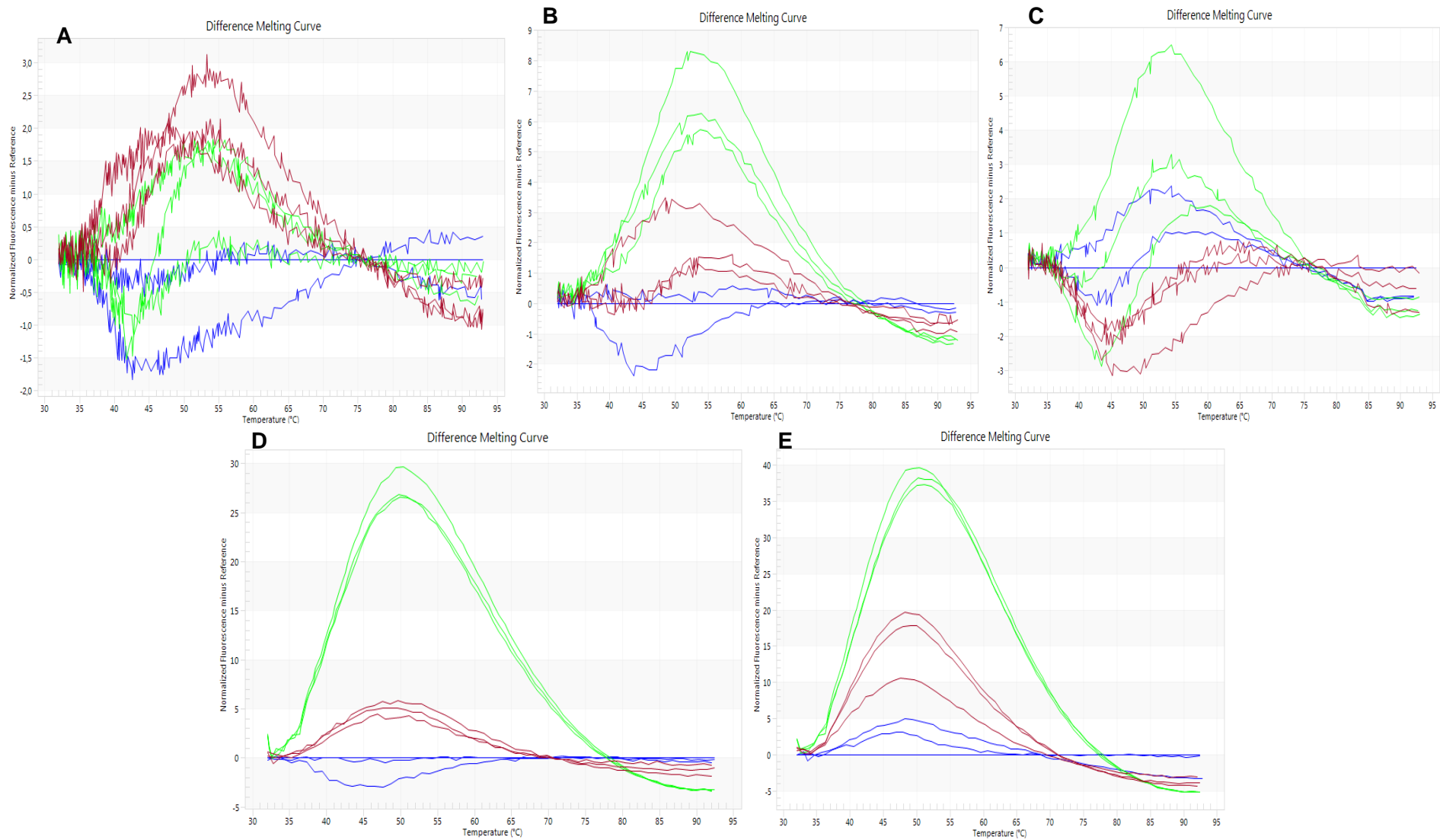


Figura 20. Comparación de las diferencias de las curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap bajo una concentración de 0,1 mM de $MgCl_2$. Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina y Gonyautoxina bajo diferentes concentraciones de toxinas., además de agua. (A) 0,25 μM (B) 0,5 μM , (C) 1 μM , (D) 5 μM , (E) 10 μM . Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua.

En la tabla 24 se detallan los promedios de las fluorescencias iniciales correspondiente al aptámero Handy Ap con una concentración de 0,1 mM de MgCl₂.

Tabla 24. Resultados de las fluorescencias obtenidas con MgCl₂ 0,1 mM ocupando el aptámero Handy Ap.
Fluorescencias de los promedios de los triplicados de cada muestra ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	GTX
0,25	6,03	6,01
0,5	5,6	6,51
1	5,75	5,65
5	5,76	7,35
10	5,23	6,95

Estas cinco concentraciones se graficaron con sus respectivos promedios de fluorescencias, reflejándose en el gráfico 18.

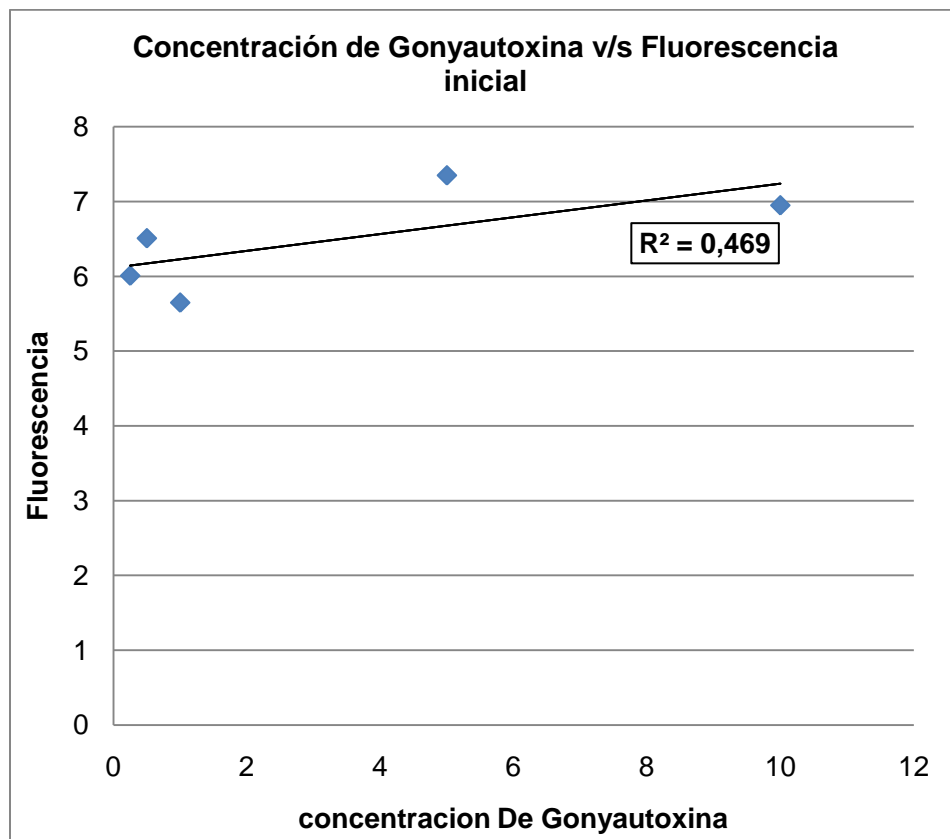


Gráfico 18. Concentración de Gonyautoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del $MgCl_2$ a una concentración de 0,1 mM.

La correlación indicada en este gráfico no indicó ningún tipo de relación entre el aptámero y Gonyautoxina, concentración versus fluorescencia, donde su R^2 es del orden de los 0,469. Los mismos análisis se hicieron para $MgCl_2$ a 0,5 mM y 1 mM donde se observan los resultados de sus fluorescencias en las tablas 25 y 26, posteriormente graficadas.

En la figura 21 se observan “niveles de ruidos” mayores que en 0,1 Mm de $MgCl_2$, incluso se presentan en las concentraciones de 5 μM y 10 μM que en la anterior figura no se muestran.

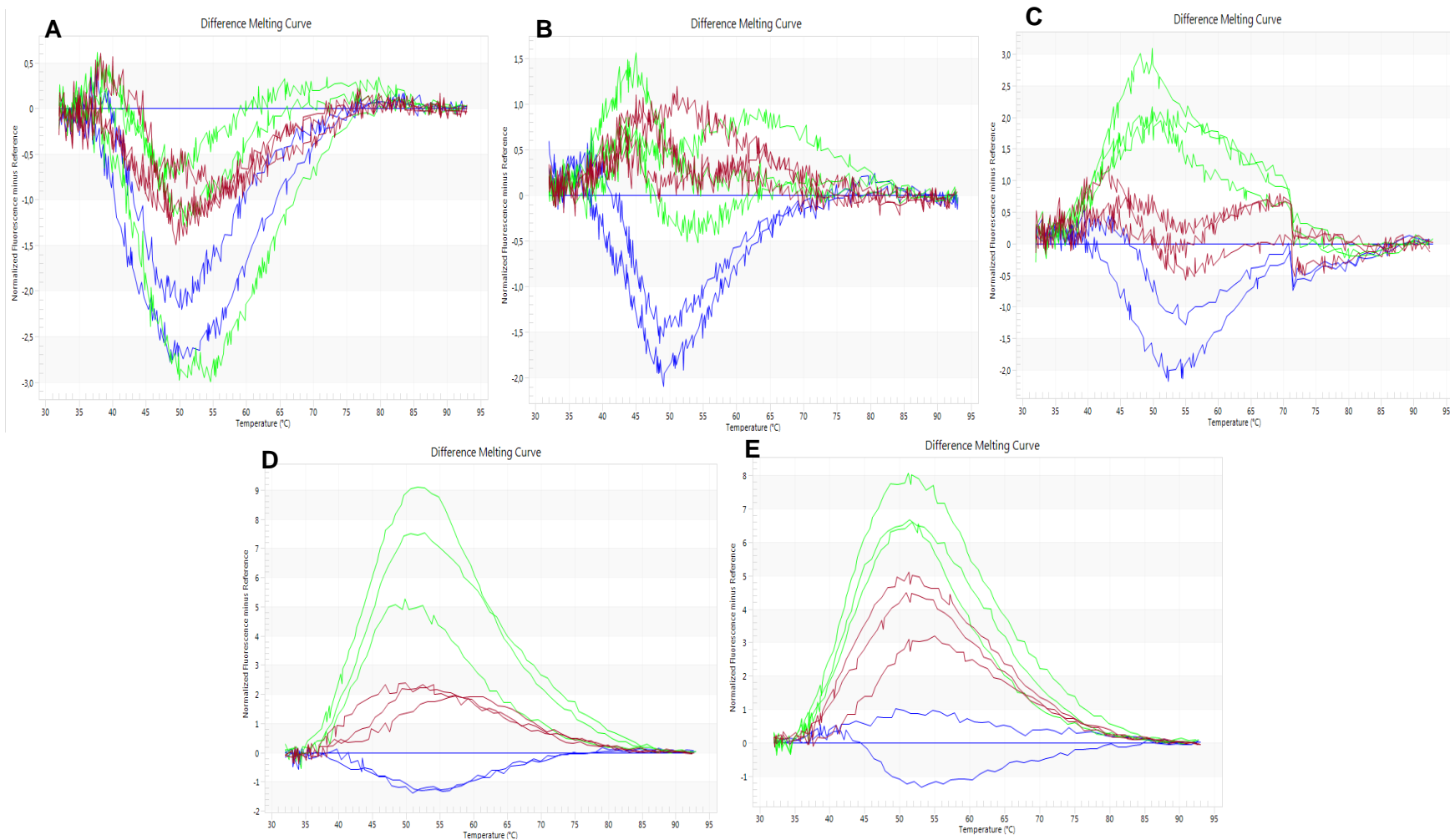


Figura 21. Comparación de las diferencias de las curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap bajo una concentración de 0,5 mM de MgCl₂. Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina, agua y Gonyautoxina bajo diferentes concentraciones de toxinas. (A) 0,25 μM (B) 0,5 μM, (C) 1 μM, (D) 5 μM, (E) 10 μM . Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua.

Tabla 25. Resultados de las fluorescencias obtenidas con MgCl₂ 0,5 mM ocupando el aptámero Handy Ap.
 Fluorescencias de los promedios de los triplicados para Gonyautoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	GTX
0,25	5,77	5,69
0,5	5,31	5,66
1	5,57	5,2
5	5,17	3,84
10	4,97	4,05

Se realizó lo mismo que con 0,1 Mm de MgCl₂, se graficaron las cinco concentraciones con sus respectivos promedios de fluorescencias, las cuales se muestran en el gráfico 19.

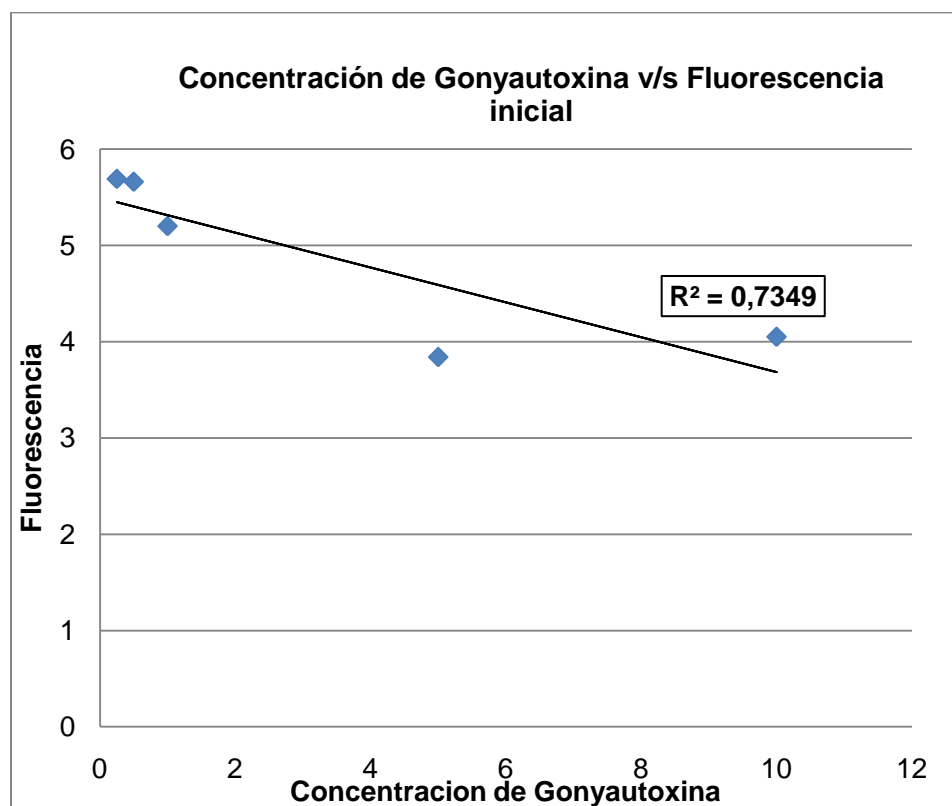


Gráfico 19. Concentración de Gonyautoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del MgCl₂ a una concentración de 0,5 mM.

Así como se aprecia en el gráfico 19, los resultados indican una cierta selectividad y especificidad por STX y GTX, ya que los R^2 son del orden de los 0,7695 para Saxitoxina y para Gonyautoxina 0,7349. Reconoció a ambas toxinas por igual. No se realizó un análisis con Rand1 debido al nivel de ruido presente en las diferencias de las curvas de melting.

La última concentración analizada fue un 1 mM de Cloruro de Magnesio cuyas diferencias de las curvas de melting se observan en la figura 22 donde se observa nivel de ruido en las 5 concentraciones estudiadas.

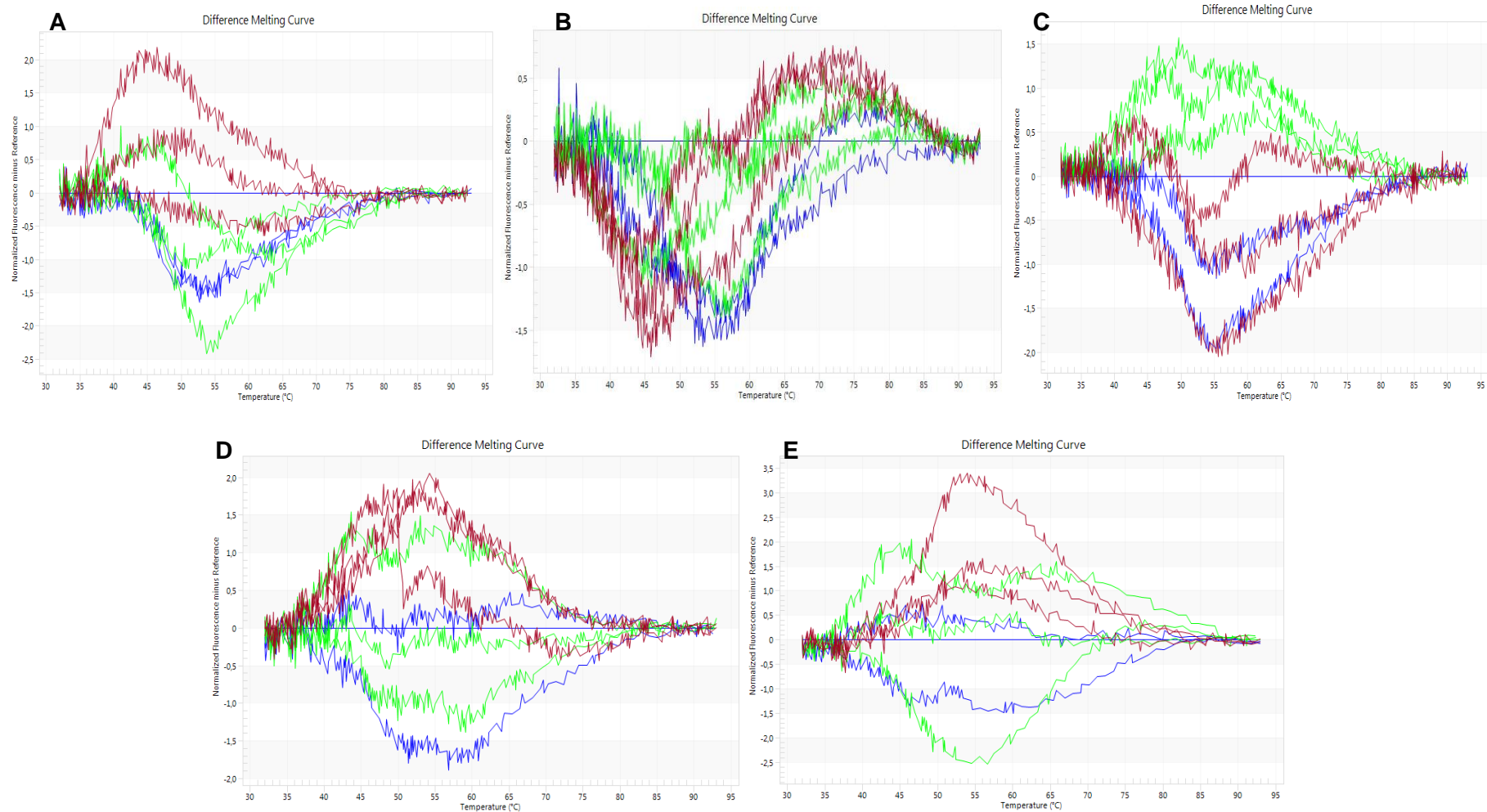


Figura 22. Comparación de las diferencias en las curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap bajo una concentración de 1 mM de $MgCl_2$. Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina, agua y Gonyautoxina bajo diferentes concentraciones de toxinas. (A) 0,25 μM (B) 0,5 μM , (C) 1 μM , (D) 5 μM , (E) 10 μM . Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua.

En la tabla 26 se muestran las fluorescencias iniciales promedio para cada una de las cinco concentraciones estudiadas para 1 mM de MgCl₂.

Tabla 26. Resultados de las fluorescencias obtenidas con MgCl₂ 1 mM ocupando el aptámero Handy Ap.
Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Gonyautoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	GTX
0,25	4,3	4,07
0,5	4,42	3,92
1	3,67	3,55
5	4,74	5,42
10	4,08	3,87

Por último fueron graficadas las fluorescencias iniciales promedio para GTX en 1 mM de MgCl₂, ver gráfico 20.

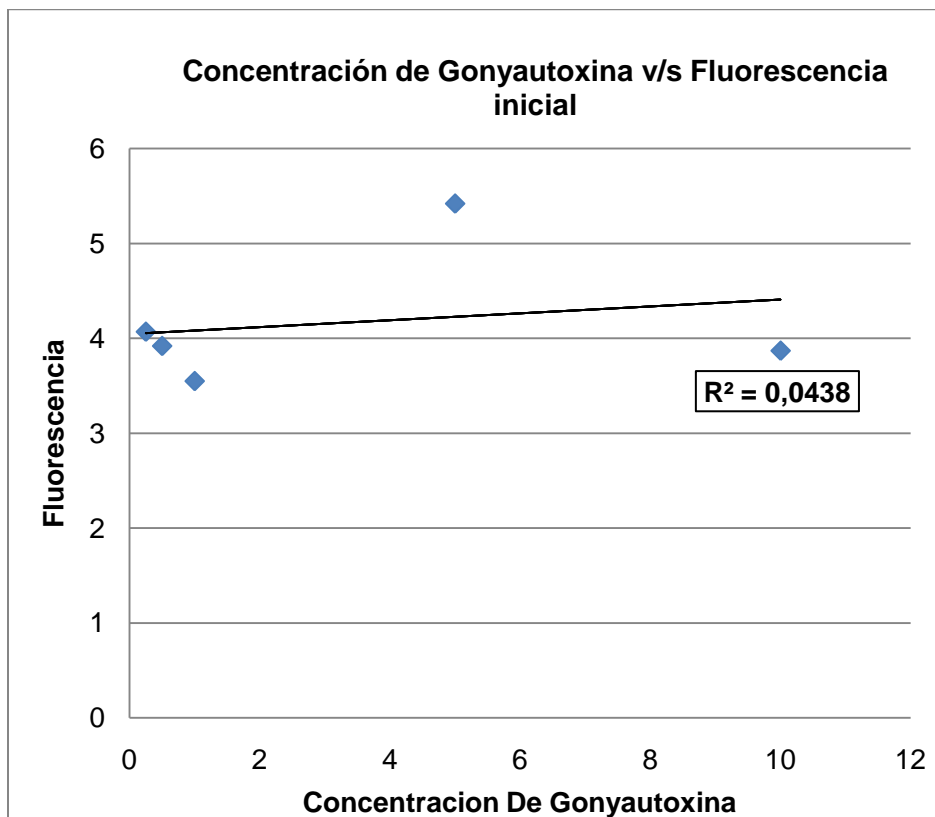


Gráfico 20. Concentración de Gonyautoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del MgCl₂ a una concentración de 1 mM.

Ocupando una concentración de 1 mM de $MgCl_2$ se obtuvo una correlación de 0,0438 para Gonyautoxina, de igual forma que con STX no se observa relación entre concentración y fluorescencia.

Después de haber realizado los 3 análisis con Cloruro de Magnesio, se procedió a ocupar PBS-TWEEN al 0,05%.

La figura 23 muestra los niveles de ruido para las 5 concentraciones de toxinas, siendo mayores que con Cloruro de Magnesio. Luego en la tabla 27 se indican las fluorescencias iniciales promedio que se obtuvieron para las 5 concentraciones de toxinas.

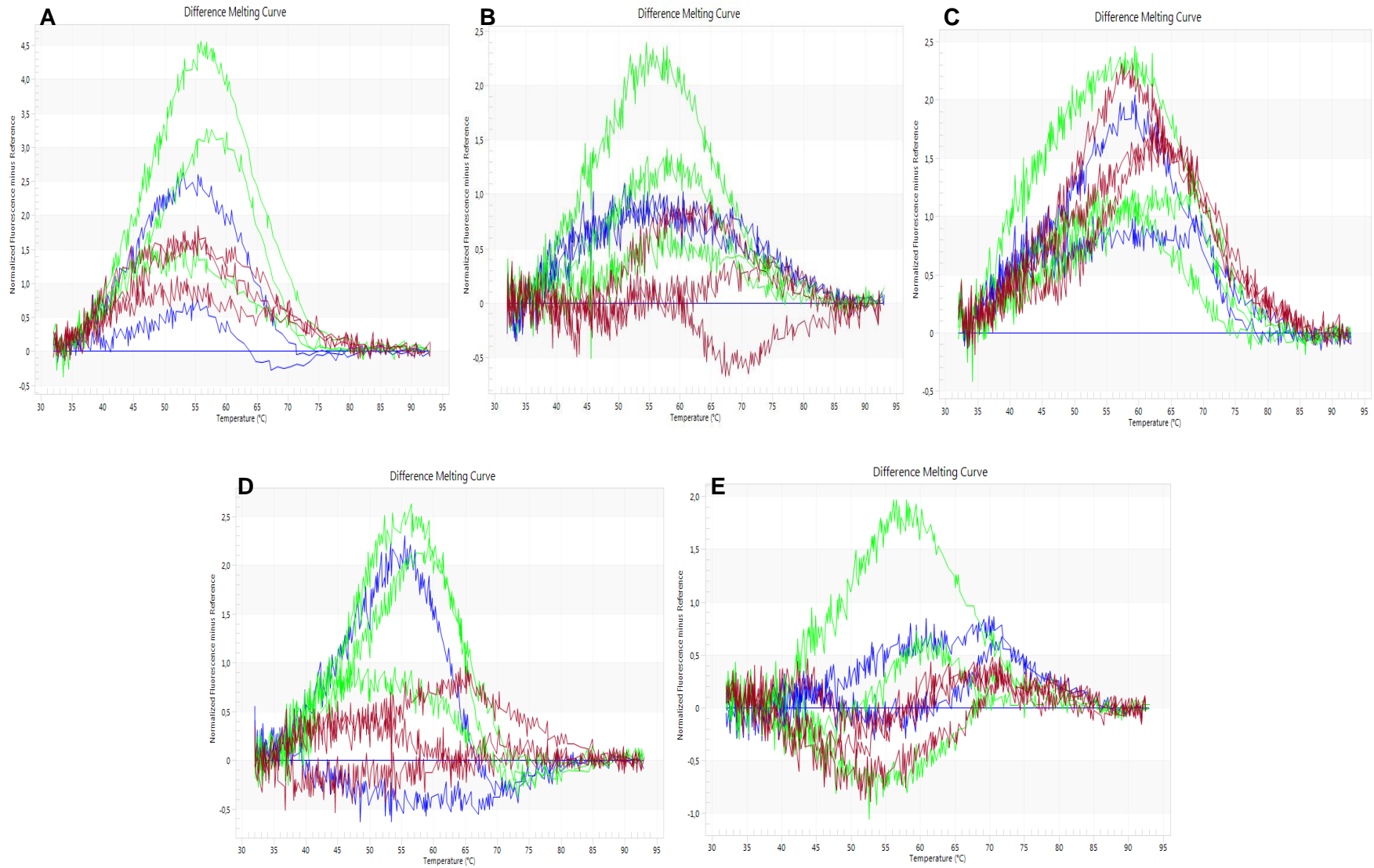


Figura 23. Comparación de las diferencias de las curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap bajo PBS-TWEEN AL 0,05%. Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina, agua y Gonyautoxina bajo diferentes concentraciones de toxinas. (A) 0,25 μM (B) 0,5 μM , (C) 1 μM , (D) 5 μM , (E) 10 μM . Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua.

Tabla 27. Resultados de las fluorescencias obtenidas con PBS-TWEEN al 0,05% ocupando el aptámero Handy Ap.
 Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Gonyautoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	agua	GTX
0,25	6,1	5,57
0,5	5,63	6,05
1	5,89	5,68
5	6,09	5,61
10	5,62	6,11

Para saber si obtenemos alguna tendencia lineal, se graficaron las 5 fluorescencias obtenidas por cada una de las concentraciones.

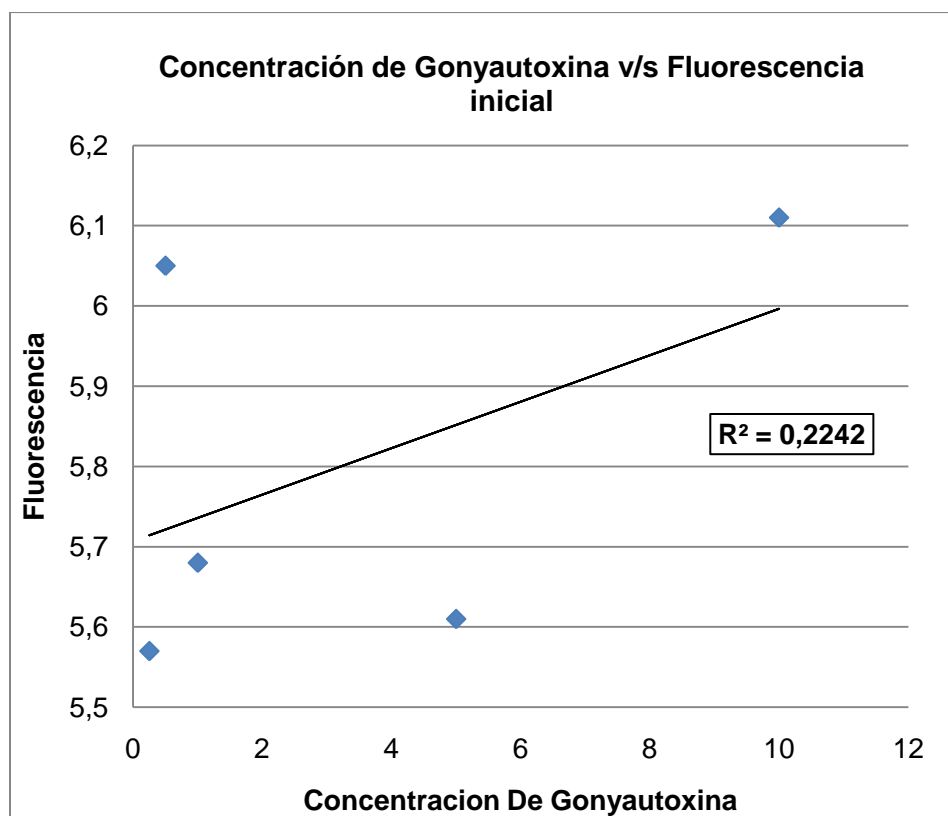


Gráfico 21. Concentración de Gonyautoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del PBS-TWEEN al 0,05% en su medio.

Los resultados indican que la correlación es igual a 0,2242, lo cual puede ser visualizado en el gráfico 21 bajo el análisis con PBS-TWEEN al 0,05%.

Al hacer el análisis para el extracto de marisco crudo también se ocuparon las dos diluciones al 15% y al 50%. Se analizó el comportamiento de aptámero Handy Ap con el extracto crudo de marisco y con GTX también.

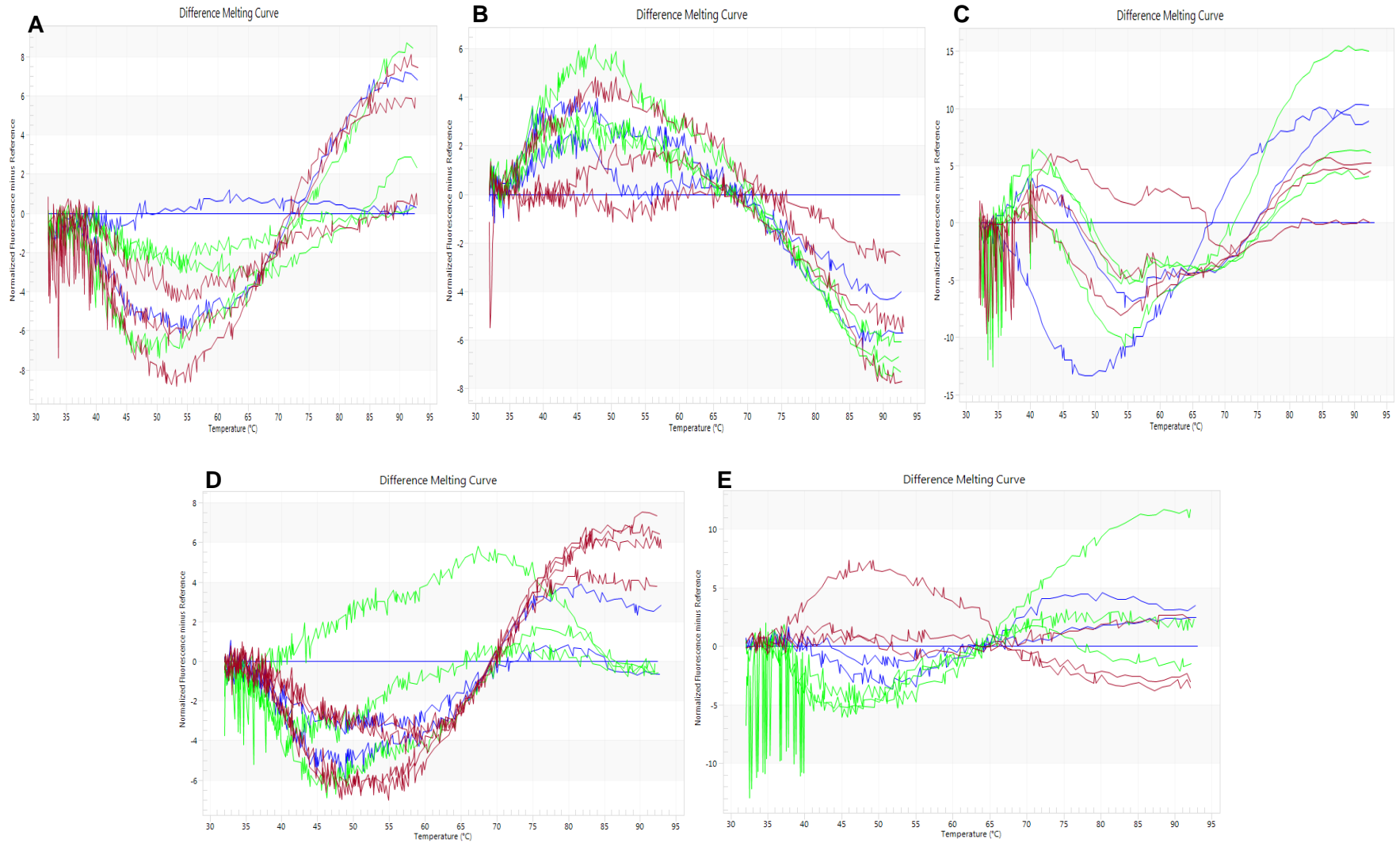


Figura 24. Comparación de las diferencias de las curvas de melting ocupando aptámero Handy Ap con extracto de marisco al 15% . Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina y Gonyautoxina bajo diferentes concentraciones de toxinas, además de agua pura. (A) 0,25 μ M (B) 0,5 μ M, (C) 1 μ M, (D) 5 μ M, (E) 10 μ M. Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua.

En la tabla 28 se muestran las fluorescencias iniciales promedio pertenecientes a GTX, bajo el uso del extracto de marisco al 15% ocupando el aptámero Handy Ap.

Tabla 28. Resultados de las fluorescencias obtenidas con extracto de marisco al 15% ocupando el aptámero Handy Ap. Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Gonyautoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	GTX
0,25	7,8	9,6
0,5	10,3	11,1
1	6	8,2
5	7,51	7,18
10	7,19	7,95

Siguiendo los mismos procedimientos anteriores, se graficaron los cinco promedios de las fluorescencias obtenidas. Ver gráfico 22.

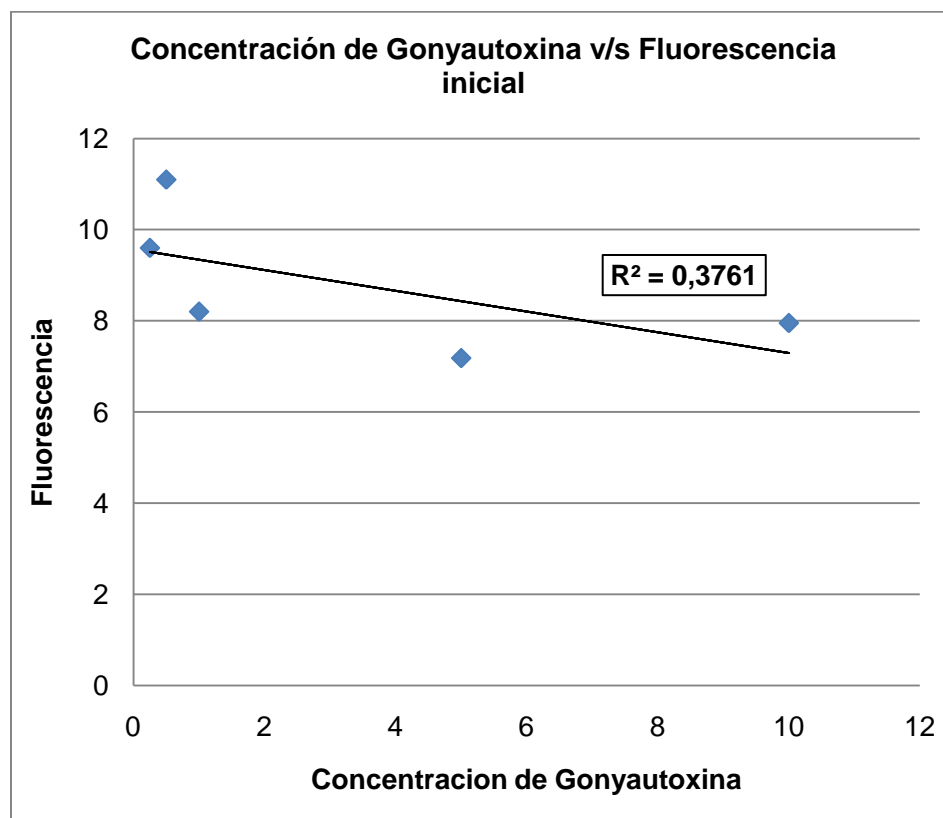


Gráfico 22. Concentración de Gonyautoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia de extracto de marisco al 15%.

Los resultados indican que la correlación es de 0,3761 con extracto crudo de marisco al 15% para GTX, si vemos en uno de los apartados anteriores, se observa la correlación de STX, la cual fue de 0,6179. De todos estos análisis este es el mejor valor obtenido bajo un protocolo que no utilizara agua pura.

Por último se hizo un análisis al 50% de extracto de marisco. Las diferencias de las curvas de melting presentaron un nivel de ruido mayor que con extracto crudo de marisco al 15% (figura 25).

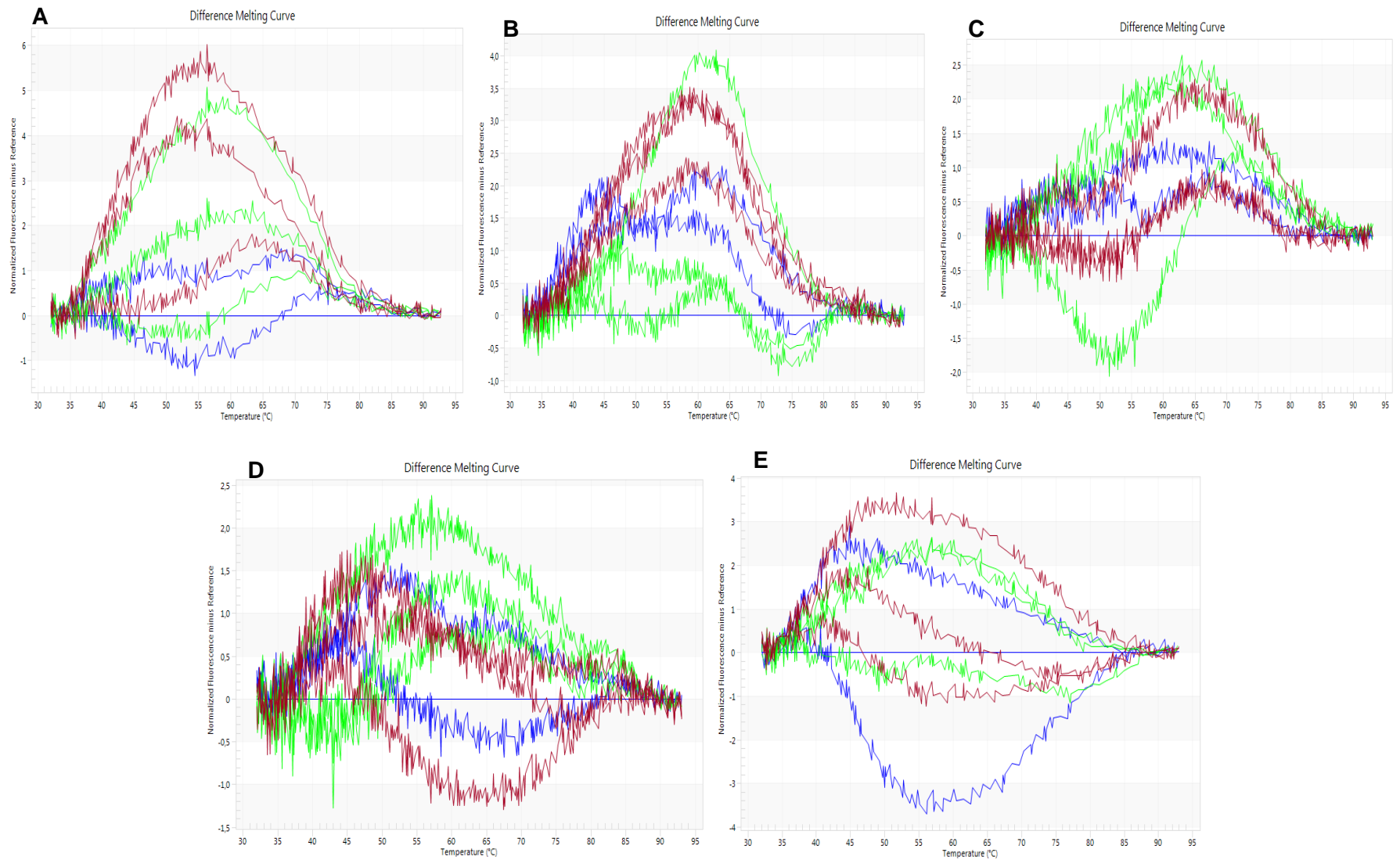


Figura 25. Comparación de las diferencias de las curvas de melting ocupando el aptámero Handy Ap con extracto de marisco al 50%. Se muestran los gráficos con los niveles de ruidos en las diferencias de las curvas de melting con Saxitoxina, agua y Gonyautoxina bajo diferentes concentraciones de toxinas. (A) 0,25 μ M (B) 0,5 μ M, (C) 1 μ M, (D) 5 μ M, (E) 10 μ M. Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua

La tabla 29 detalla cada promedio de las fluorescencias iniciales promedio para las cinco concentraciones estudiadas.

Tabla 29. Resultados de las fluorescencias obtenidas con extracto de marisco al 50% ocupando el aptámero Handy Ap. Fluorescencias de los promedios de los triplicados para Gonyautoxina ocupando el aptámero Handy Ap.

μM	Agua	GTX
0,25	7,38	7,15
0,5	7,43	7,15
1	7,46	7
5	7,34	7,13
10	7,19	6,73

Para saber si obtenemos alguna tendencia, se graficaron las cinco fluorescencias estudiadas.

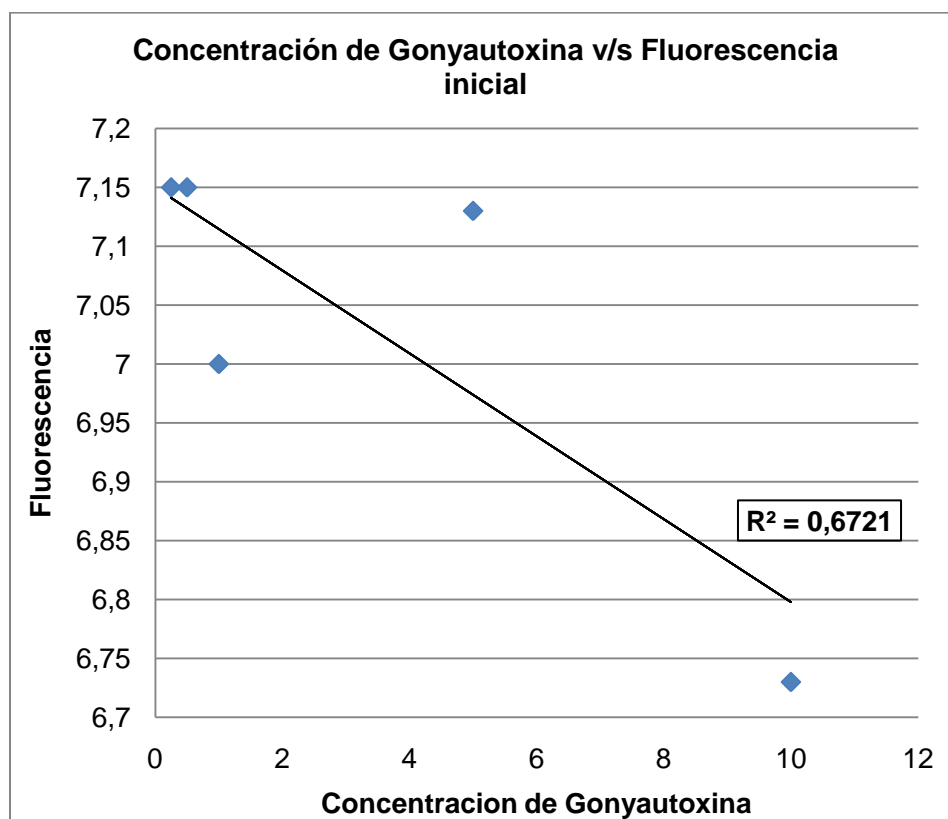


Gráfico 23. Concentración de toxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Ap. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Ap bajo la influencia del extracto de marisco al 50% en su medio.

La correlación obtenida por el gráfico 23 para GTX fue de 0,6721 con extracto crudo de marisco al 50%, un valor alto si se compara con el R^2 obtenido para STX ($R^2 = 0,0068$).

Finalmente, también se realizó un análisis el cual consistía en el análisis del aptámero Aptrim, este aptámero carecía de seis nucleótidos en su extremo 5' y 3'.

En la tabla 30 se muestran los promedios de las fluorescencias iniciales del aptámero con GTX.

Tabla 30. Resultados del diseño principal para la optimización del aptámero Handy Aptrim como un sistema para detectar Saxitoxina. Fluorescencias de los promedios de los triplicados de Gonyautoxina ocupando el aptámero Handy Aptrim.

μM	Agua	GTX
1	6,744	5,98
2	7,165	6,111
3	6,327	5,648
4	6,151	6,191
5	5,936	5,48
6	5,892	5,149
7	6,01	5,499
8	6,005	5,528
9	6,077	4,898
10	9,085	4,86

Se graficó las fluorescencias que se muestran en la tabla 30, esta es la fluorescencia inicial promedio del aptámero Aptrim más GTX.

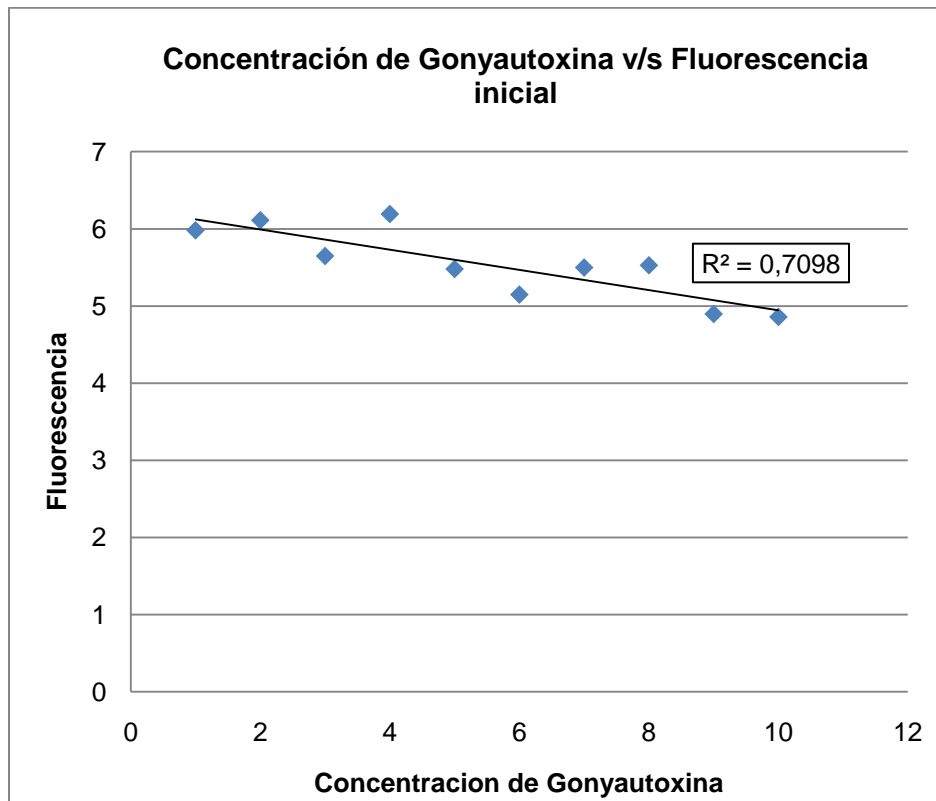


Gráfico 24. Concentración de Gonyautoxina versus Fluorescencia total del aptámero Handy Aprtrim. Se muestra la tendencia que tiene el aptámero Handy Aprtrim bajo la influencia del agua ultra pura libre de nucleasas en su medio.

La correlación obtenida para este aptámero al cual le faltaban bases nitrogenadas en sus dos extremos y bajo la interacción de GTX tuvo una correlación de 0,7098, la cual es mucho más alta que para STX, por lo tanto aprtrim muestra una relación lineal con GTX en los rangos que el aptámero Handy Ap no lo hace. Al parecer GTX influye en cualquier cadena de ADN, siendo no así para STX.

4.2.3 EVALUACION DE LA TEMPERATURA DE INICIO DE MELTING

Como se dijo en la sección 4.1, en los ensayos se utilizó una temperatura de inicio de melting de 30°C debido a que se observó previamente que a esta temperatura se formaban peaks de melting.

A continuación se presentan a modo de ejemplo gráficos correspondientes a los peaks de melting de las curvas de alta resolución correspondiente a experimentos con temperaturas iniciales de 40°C y a 30°C con cinco diferentes concentraciones de toxinas.

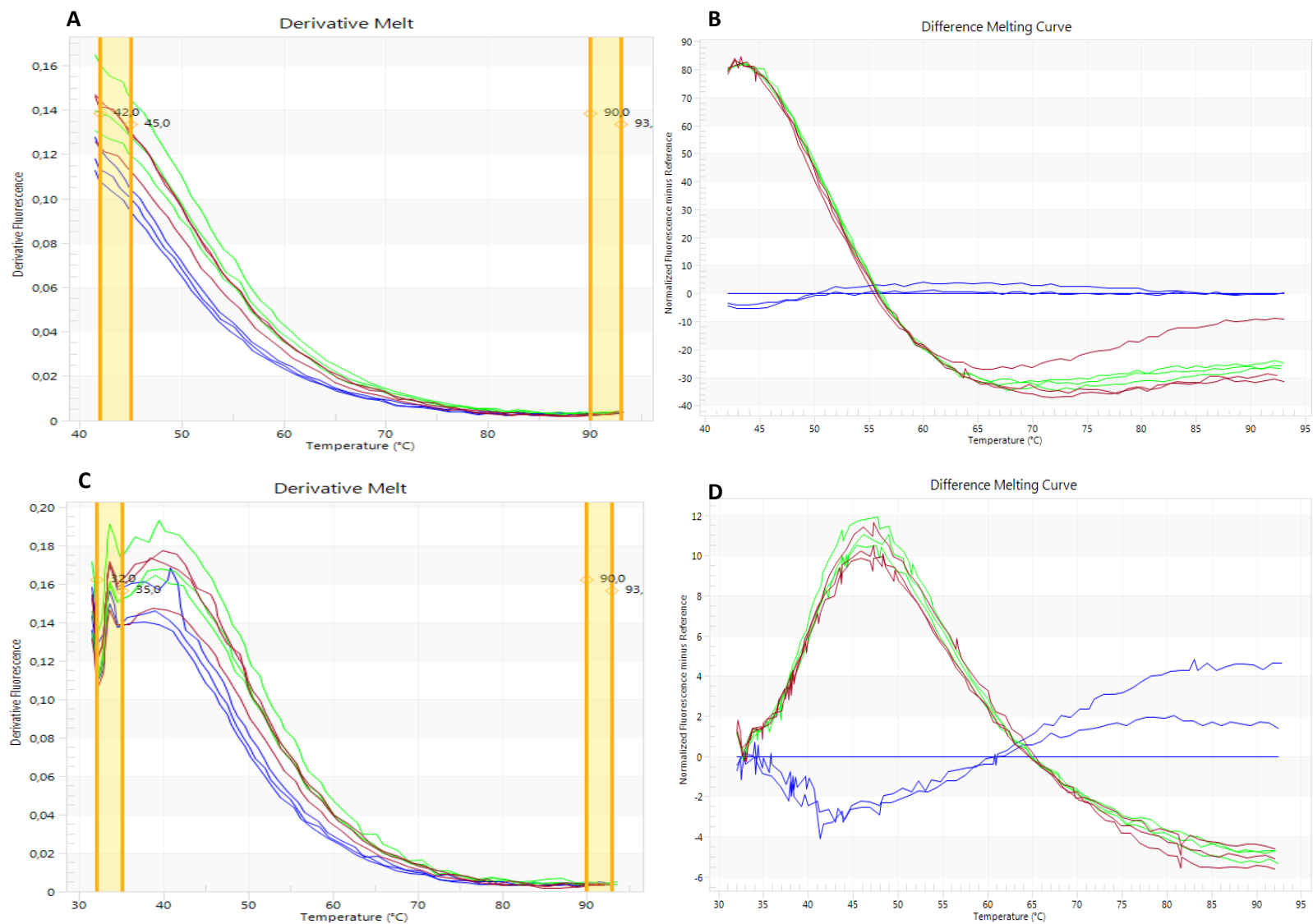


Figura 26. Comparación de las Curvas de alta resolución a una concentración de 1 μ M de toxina. Derivadas las curvas de HRM (dF/dT) (A) 40°C (C) 30°C. Normalización y diferencias de las curvas de melting (B) 40°C (D) 30°C. Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua.

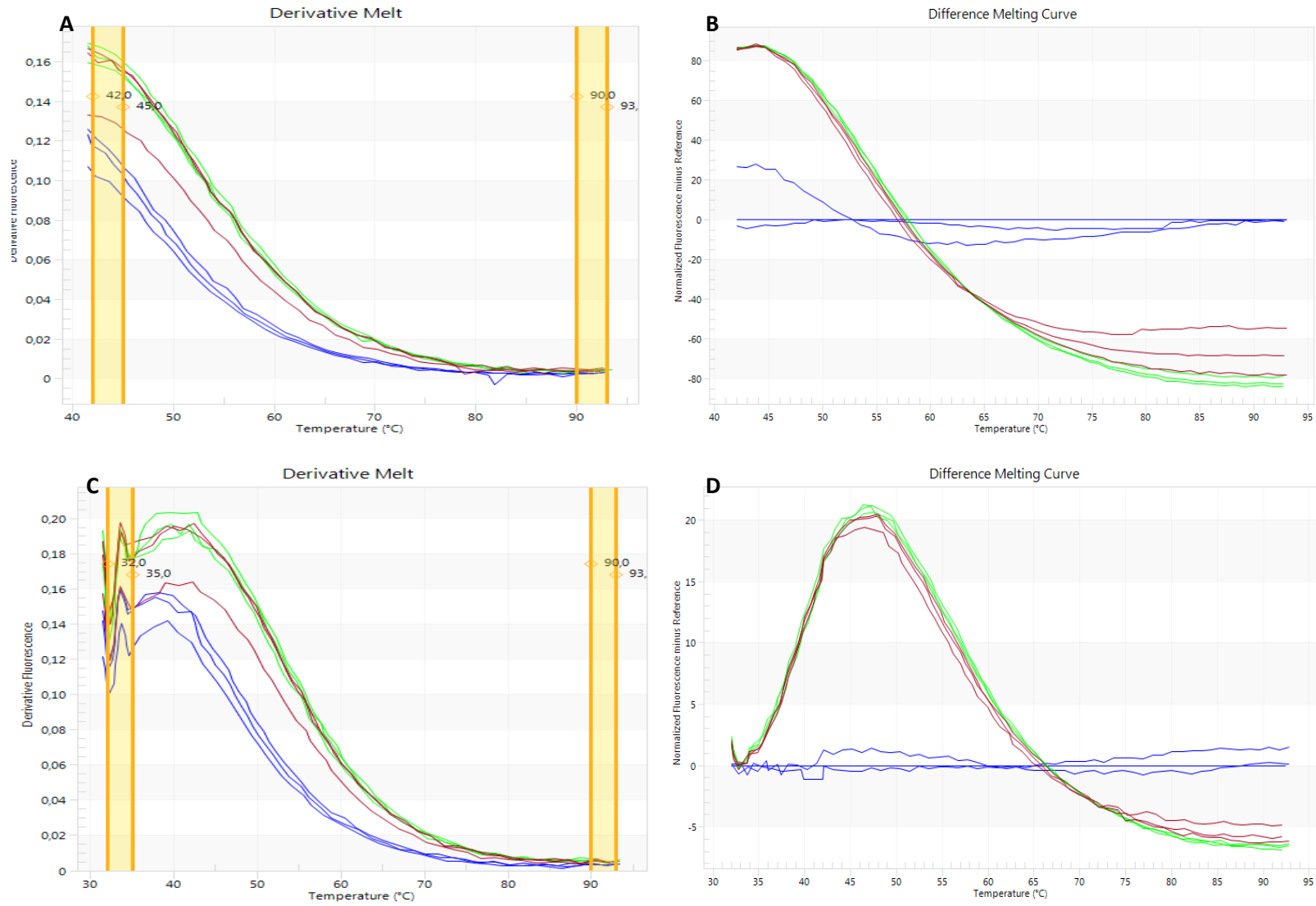


Figura 27 . Comparación de las Curvas de alta resolución a una concentración de 2 μM de toxina. Derivadas las curvas de HRM (dF/dT) (A) 40°C (C) 30°C. Normalización y diferencias de las curvas de melting (B) 40°C (D) 30°C. Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua.

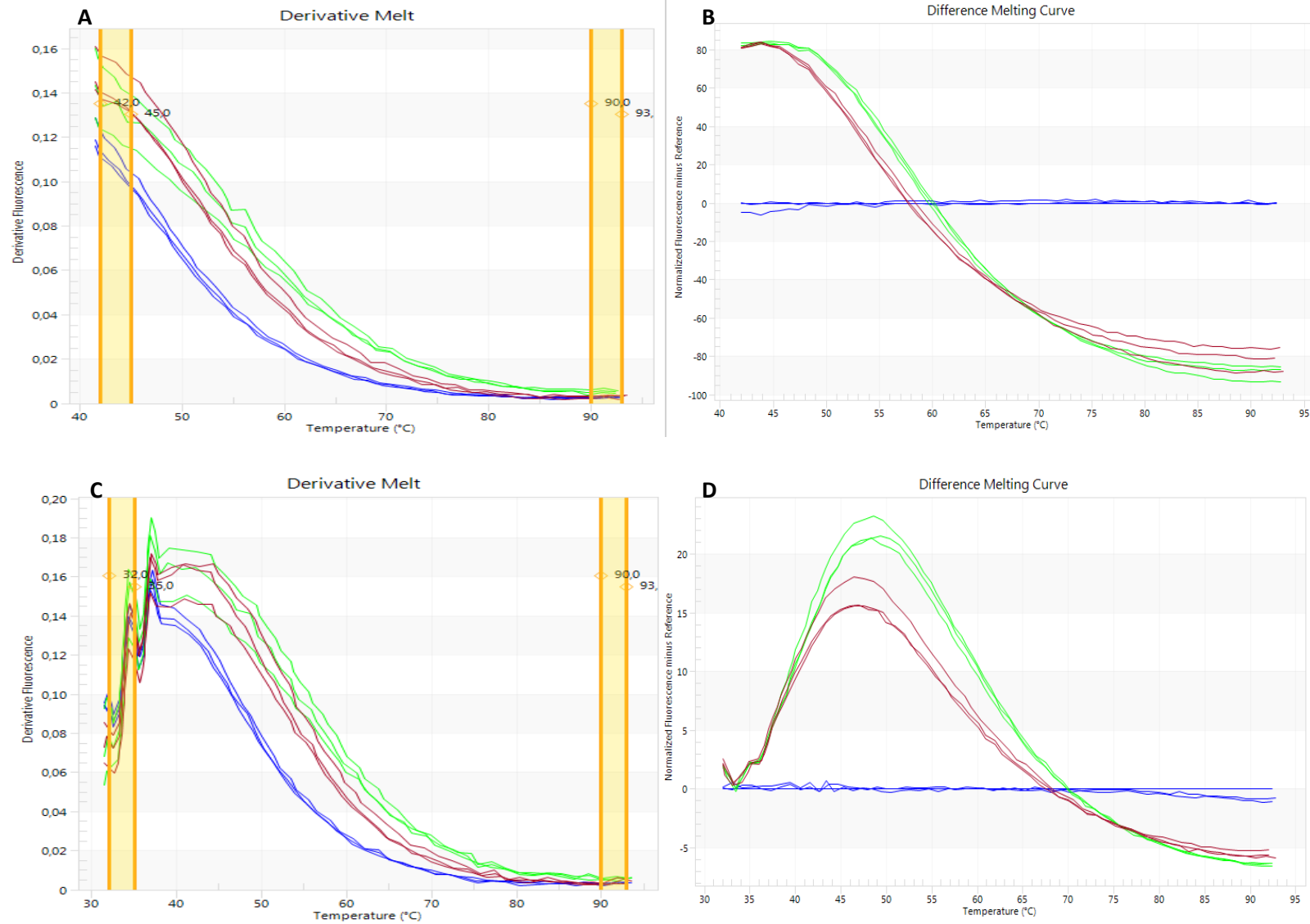


Figura 28. Comparación de las Curvas de alta resolución a una concentración de 3 μM de toxina. Derivadas las curvas de HRM (dF/dT) (A) 40°C (C) 30°C. Normalización y diferencias de las curvas de melting (B) 40°C (D) 30°C. Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua.

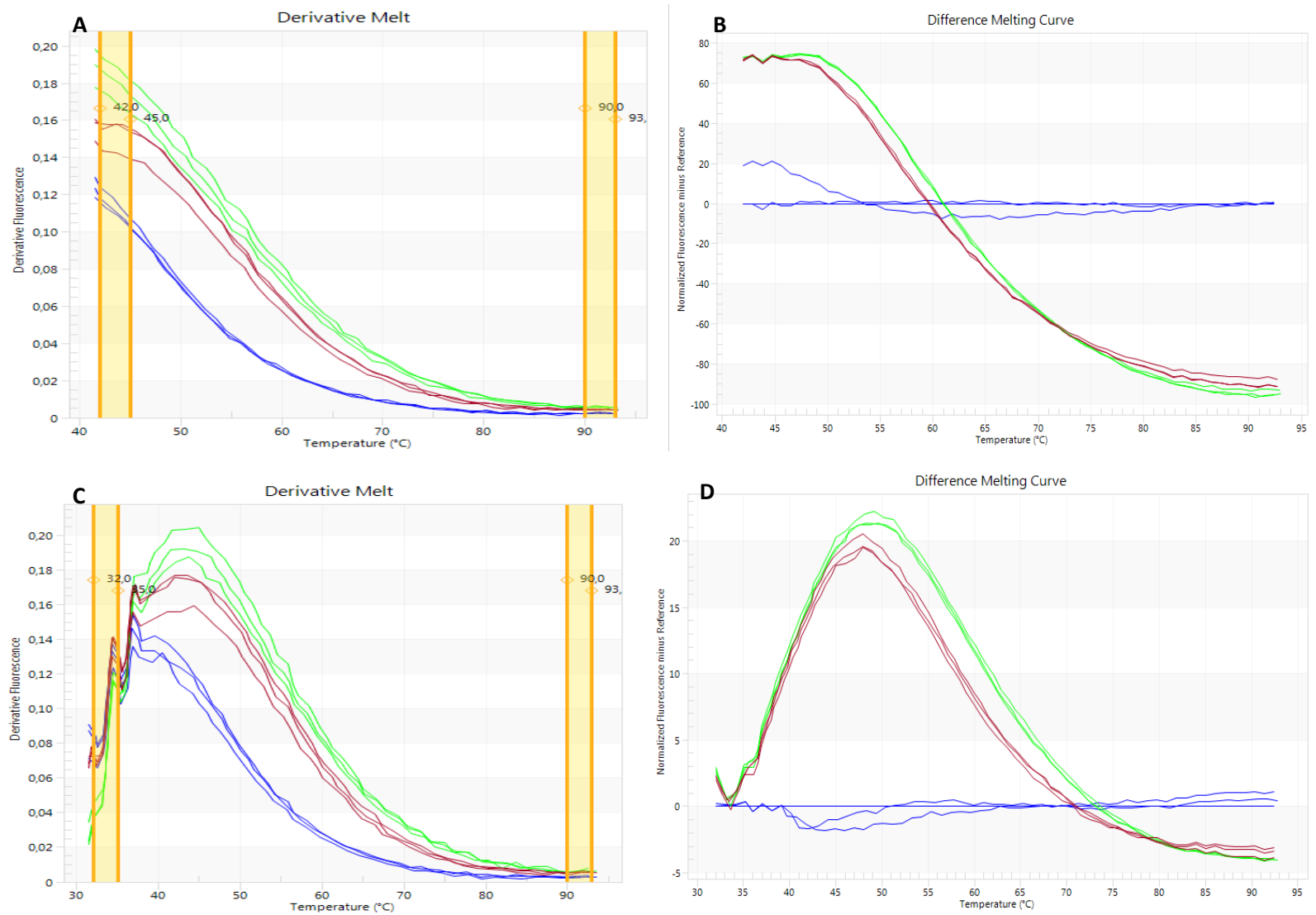


Figura 29. Comparación de las Curvas de alta resolución a una concentración de 4 μM de toxina. Derivadas las curvas de HRM (dF/dT) (A) 40°C (C) 30°C. Normalización y diferencias de las curvas de melting (B) 40°C (D) 30°C. Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua.

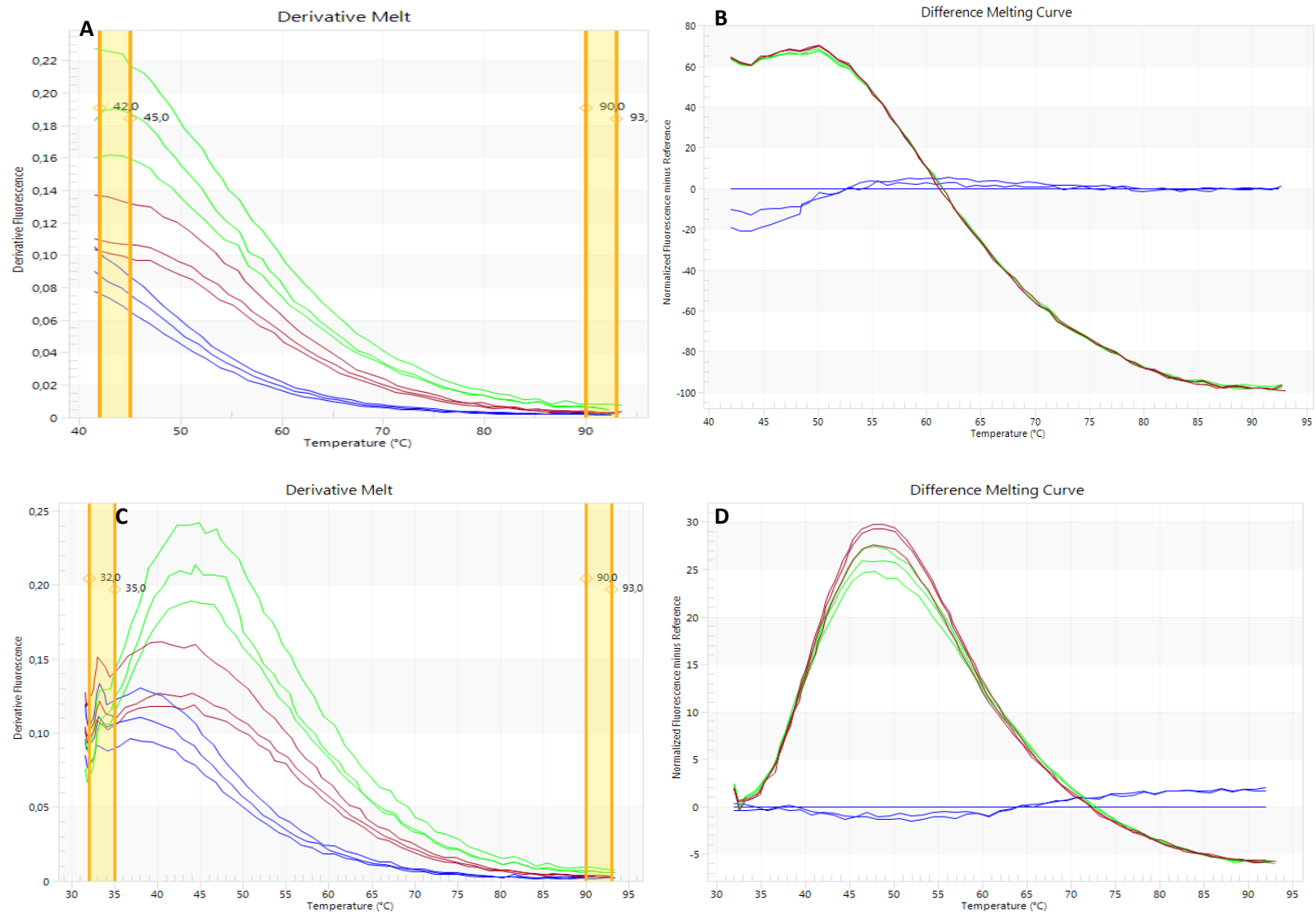


Figura 30. Comparación de las Curvas de alta resolución a una concentración de 5 μM de toxina. Derivadas las curvas de HRM (dF/dT) (A) 40°C (C) 30°C. Normalización y diferencias de las curvas de melting (B) 40°C (D) 30°C. Rojo: Saxitoxina, Verde: GTX, Azul: Agua.

5 DISCUSSION

5.1 DETECCIÓN DE STX MEDIANTE LA OBSERVACION DE CURVAS DE HIGH RESOLUTION MELTING

El método High Resolution Melting (HRM) es una manera simple y rentable de caracterizar secuencias de productos post-PCR, el cual se basa en disociaciones de las hebras de ADN detectando pequeñas diferencias en las secuencias analizadas mediante el uso de colorantes que se intercalan en el ADN de doble cadena [70]. En esta tesis se utilizó un fluoróforo llamado Eva Green[®] que es un agente intercalante fluorescente que se usa para análisis de curvas de alta resolución, este no emite una señal por sí mismo, sino que se convierte en fluorescente tras la unión al ADN de doble hebra.

HRM además de ser simple y rentable, es rápido, tiene un alto nivel de precisión y un bajo consumo de reactivos, ya que se requieren pequeños volúmenes para la reacción y análisis de cada muestra [70], eliminando así la necesidad de utilizar reactivos en grandes cantidades. Por estas cinco ventajas se eligió para poder aplicarlo como parte de una estrategia de detección, dado el supuesto previo de que el aptámero Handy unido a la toxina conformaría estructuras de hebra doble diferentes que las del aptámero libre, lo cual podría ser detectado mediante diferencias en fluorescencia.

Este sistema no se ha usado anteriormente como una técnica aplicable para la detección de analitos y el fluoróforo Eva Green hasta el momento no considera su aplicación en este sentido. En este trabajo se le quiere dar este uso ocupando como elemento de reconocimiento el aptámero Handy. El aptámero utilizado, Handy Ap, fue hecho para reconocer Saxitoxina [65].

Se analizó una serie de medios donde posiblemente podría haber algún tipo de relación entre Fluorescencia y diferentes concentraciones de Toxina. Uno de estos medios que es en el cual se obtuvo una mejor respuesta, es decir una relación directamente proporcional entre las variables anteriormente nombradas, fue en agua ultra pura libre de nucleasas. La respuesta es directamente proporcional, donde aparentemente aumenta la señal a medida que aumenta la unión del aptámero con la toxina [65], debería esperarse una correlación lineal, donde su correlación debe ser cercana a 1.

5.2 LIMITES DE DETECCIÓN

En el análisis del límite de detección superior, en los únicos intervalos analizados en donde se da una correlación adecuada y donde además este aptámero reacciona en forma selectiva al compararlo con una toxina de similares características (GTX), es entre 1 μM y 10 μM . Esto podría ser por una saturación de la toxina frente al aptámero en las concentraciones mayores, ya que la disponibilidad de estos podría ser insuficiente para enfrentar demanda de las moléculas de toxina presentes en estas concentraciones. En este punto es donde en el futuro hay que realizar un análisis más profundo para estudiar bien las concentraciones intermedias como por ejemplo 12 μM , 15 μM , 21 μM , etc. para poder determinar con exactitud el límite de detección superior debido a que en esta tesis se analizaron intervalos de concentraciones amplios (cada 10 μM).

Para el límite de detección inferior se analizó desde concentraciones que iban desde los 1 μM hasta los 0,01 μM , este último valor disminuía el valor de la correlación considerablemente, por lo tanto se considero como límite de detección inferior, el valor anterior a este, 0,025 μM . Dado este límite de detección, se denota más sensible que el sistema aplicado en ratones con extracto de marisco, donde su límite es de 0,77 μM . Por otro lado, en este rango de concentraciones, el aptámero no es selectivo ni específico, ya que la fluorescencia de Handy Ap es proporcional a la concentración tanto de STX como GTX, con R^2 son 0,84 y 0,88 respectivamente.

5.3 CONDICIONES DEL MEDIO DE REACCION QUE INFLUYEN EN LA DETECCION DE STX

En esta tesis se realizaron análisis con distintos medios, tales como Cloruro de Magnesio, PBS-TWEEN al 0,05% y extracto de marisco debido a que estos son medios donde se podría medir a futuro, en un eventual sistema aplicado. Por otro lado, el ensayo fue efectivo solamente cuando fue realizado en agua pura (destilada, desionizada, filtrada por MiliQ y libre de nucleasas), pero ¿qué tiene el agua ultra pura que hace que se genere una relación lineal?

Por ejemplo la utilización de $MgCl_2$ en los ensayos de PCR se debe a su cualidad de co-factor enzimático [70] y además contribuye a la estabilización de las dobles hebras de ADN, neutralizando las cargas de los grupos fosfatos de los nucleótidos que tienen tendencia a separarse. De las 3 concentraciones estudiadas, solo la equivalente a 0,5 mM tuvo una interacción positiva entre el aptámero Handy Ap y STX, la cual permitió que se obtuviera un R^2 igual a 7,6, pero sin embargo arrojó una correlación muy cercano a la de GTX, la cual fue de 7,3 habría que corroborar estos valores con Handy Rand1, bajo esta misma concentración de Cloruro de Magnesio y con distintas concentraciones de Toxinas. Para las otras dos concentraciones el $MgCl_2$, podría estar afectando la estabilidad del aptámero con la toxina y la conformación de dobles hebras dependientes de su concentración.

El cloruro de magnesio podría estabilizar tanto al aptámero, que no logra alcanzar su estructura estable para poder “capturar” STX. Otro factor quizás se deba a que altera el pH de la solución durante el proceso de disociación de las hebras del aptámero. Esta sal estaría experimentando una hidrólisis parcial cuyos iones presentes como el ion hidronio (H_3O^+) y el ion hidroxilo (OH^-), provenientes de la disociación del agua provocarían un desplazamiento del equilibrio de disociación del agua, modificando así el pH. Esta modificación podría estar influyendo en la configuración estable del aptámero y en su desplegamiento. Otra indicación de esto es que al analizar las diferencias de las curvas de melting se muestra bastante ruido en cada una de ellas y el ruido va aumentando a medida que aumenta la concentración de magnesio. Además, no se observa en las diferencias de las curvas de melting la típica curva del desplegamiento del ADN durante el HRM.

Algo similar ocurriría para el uso de PBS-TWEEN. Se eligió este buffer debido a que durante el descubrimiento del aptámero Handy, el proceso SELEX contra el complejo generado por los autores, STX-KLH, fue realizado en PBS-TWEEN al 0,05% [65]. Por lo tanto, el aptámero fue seleccionado en este medio y se pensó en la posibilidad que PBS-TWEEN fuera un compuesto necesario para la unión de Saxitoxina al aptámero. Es por esto que se analizó el comportamiento con el aptámero frente a las toxinas, tratándolo como uno de los componentes del medio. El que el ensayo no diera un buen resultado, puede deberse a que este medio presenta una mayor cantidad de sales, por lo tanto podría afectar incluso de mayor forma que con $MgCl_2$.

Ya sabiendo en que medio el ensayo puede ser utilizado, cabe preguntarse ¿qué pasaría si el ensayo se lleva a la práctica?, es decir, hacer análisis con extracto de marisco crudo al igual como se hace en el bioensayo de ratón, ¿funcionará de una manera eficiente? Ya se vio que la presencia de iones altera la especificidad y selectividad del aptámero, por lo que se hicieron dos diluciones del extracto uno llevado al 50% y el otro al 15%, para disminuir la presencia de iones en la reacción. Acá nuevamente se observa que posiblemente, la presencia de iones del extracto de marisco altera la especificidad del aptámero, alcanzando un R^2 para Gonyautoxina de 0,6721 para su fluorescencia inicial promedio para el 50% del extracto de marisco y un R^2 para Saxitoxina igual a 0,6179 para el 15% de concentración, esta mejor correlación obtenida para STX se debe a la menor presencia de iones.

Por lo que llevar este análisis a la práctica aún no es factible, quizás si se realizan análisis con concentraciones aún más bajas de extracto, se puede ocupar como un método de detección en la práctica, solo si pueden demostrarse condiciones en que la correlación es cercana a uno y sus curvas HRM permitan observar que ocurre un posible desplegamiento. También podría buscarse una alternativa para bajar la concentración de sales del extracto de marisco crudo como por ejemplo tratar al extracto de marisco mediante diálisis, donde se extraen las sales y el exceso de agua. Esto sin embargo, podría eliminar las toxinas, las cuales son de muy pequeño tamaño, siendo necesario escoger el tamaño de poro cuidadosamente.

Con estos puntos se puede entender el por qué de la eficacia del uso de agua pura como medio en el cual el aptámero es funcional. Como el agua pura está libre de sales que desestabilicen al aptámero [72], en estas condiciones lo único que lo estaría estabilizando sería STX. También el agua podría formar una red de puentes de hidrógeno entre otras moléculas de agua y con el aptámero otorgándole una estabilidad particular con Saxitoxina, incrementando el número de sectores que forman doble hebra y que producen fluorescencia neta.

5.4 REACTIVIDAD CRUZADA DE LA TECNICA DE DETECCION DE STX

Una consideración importante es que, Saxitoxina y Gonyautoxina son objetivos similares, solo varían en un grupo funcional (OSO_3^-). Es por esto que no es sorpresa que en ciertas condiciones experimentales, el aptámero Handy Ap reacciona positivamente con el analito GTX, a pesar de que su selección fue contra STX. Por otro lado cabe preguntarse: si son tan similares ¿por qué el aptámero Handy Ap discrimina un analito de otro a concentraciones que fluctúan desde los $1 \mu\text{M}$ hasta los $10 \mu\text{M}$? Esto se debe probablemente al proceso SELEX desarrollado para seleccionar el aptámero Handy Ap el cual fue dirigido solo a STX [72] y corrobora la idea de que los aptámeros pueden ser mucho más específicos que los anticuerpos, porque reconocen áreas puntuales. Se debe notar que los anticuerpos comerciales disponibles para STX reaccionan en forma cruzada con GTX en un 70% [77].

Pero ¿qué pasa entonces en los otros medios o a baja concentración donde si se muestra algún tipo de relación entre el Handy Ap y GTX? Se han creado aptámeros con afinidad a diversos analitos y uno de ellos fue el aptámero para ATP, el cual está constituido de 40 nucleótidos de largo y fue seleccionado para unirse a ATP, pero se unía a la zona que tienen en común ATP y AMP, seguidamente se refinó con más detalle la selección de estos nucleótidos y se generó uno contra el trifosfato, por lo tanto reaccionó de forma cruzada con GTP, UTP y por último CTP [76]. Un sistema similar podría darse con el aptámero Handy Ap, que bajo ciertas condiciones posee afinidad por la zona en común que tienen STX y GTX.

5.5 ESCISION DE BASES EN LOS EXTREMOS Y SU INFLUENCIA EN LA DETECCION DE STX

Otro análisis que se realizó fue el del aptámero Aprim, el cual corresponde al aptámero Handy al cual se le sustrajeron 6 nucleótidos en el extremo 5' (GGT ATT) y 6 nucleótidos en el extremo 3' (TCC TCT). La eliminación de estos nucleótidos se llevo para probar la posible reducción del tamaño total del aptámero, teniendo como conocimiento previo la sustracción de nucleótidos en el aptámero para cocaína [64], en donde se extrajeron cuatro pares de nucleótidos en los extremos del tallo S1, pero aún así su estructura se

mantuvo estable, aunque si se redujo la afinidad por cocaína llegando a los 20 μM , donde inicialmente era 10 μM [64].

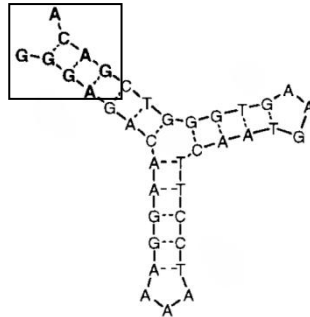


Figura 31. Plegamiento del aptámero para cocaína ante la presencia de este analito. En el recuadro se observan las bases eliminadas. Fuente: Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine.

Por otro lado, la ausencia de estos 6 nucleótidos si alteró la especificidad del aptámero Handy dirigido para Saxitoxina, demostrado y comparado con los experimentos realizados en esta tesis. Uno de las posibles explicaciones, es que al eliminar los nucleótidos en cada extremo lleva a que esta hebra simple de ADN se le impida unirse de una forma eficiente a Saxitoxina, pudiendo haber alterado los pliegues secundarios o terciarios “estables” para la unión de STX. La alteración de la estructura y función de los aptámeros dadas modificaciones puntuales ha sido descrita previamente detallándose que la afinidad de unión está dada por la capacidad de formar estructuras secundarias y terciarias estables [42]. Tal vez, la afinidad que logra el aptámero Handy por GTX está dada por una subestructura diferente a la requerida por el aptámero Handy Aprtrim. Esto se observa con las correlaciones obtenidas para las fluorescencias iniciales donde demostró el aptámero truncado Aprtrim presenta una mayor correlación para GTX que para STX.

Si bien es cierto que las secuencias eliminadas en el aptámero Aprtrim pertenecen a los sitios primers, los cuales permiten la amplificación por PCR, estos iniciadores desempeñarían un papel de estabilidad o conformación del aptámero Handy Ap [65].

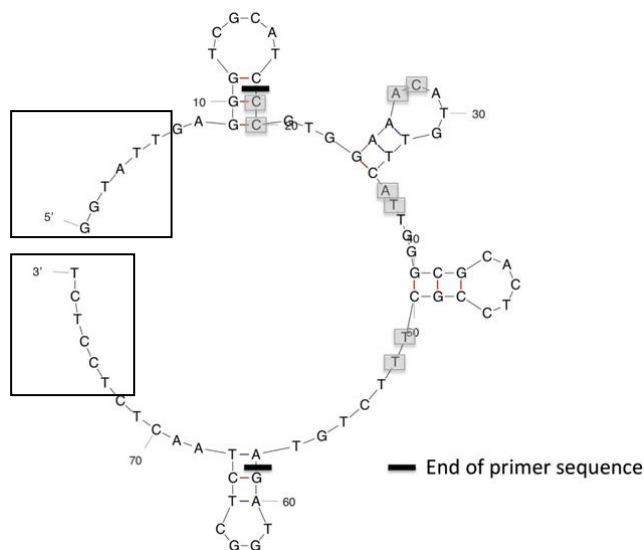


FIGURA 32. Predicción de la estructura y plegamiento del aptámero Handy Ap. La barra negra indica el término de las secuencias específicas para ST, en los recuadros se observan las bases nitrogenadas que fueron eliminadas para el aptámero Handy Aprim. Fuente: First report of the use of a saxitoxin–protein conjugate to develop a DNA aptamer to a small molecule toxin

Por lo tanto la falla en la eliminación de los nucleótidos de los extremos hizo imposible funcionalizar el aptámero mediante un fluoróforo y un Quencher en cada extremo para transformarlo en un sensor colorimétrico, como fue realizado en el aptámero para cocaína [64].

5.6 PERFILES DE DENATURACION

Para normalizar las curvas de denaturación respecto de la curva que presenta el blanco, se saca un promedio entre las distancias de curvas (del gráfico de las curvas de melting) entre las muestras que son referencia, y se les resta a las demás. Esto puede verse en las figuras desde el número 10 al 11, desde el 18 al 19 y desde la 25 a la 29. Los datos en el eje x son base, es decir se mantiene el rango de temperatura, en cambio en el eje Y, la fluorescencia se normaliza respecto al blanco. De modo que el software EcoStudy identifica y agrupa todos los análisis que presentan los mismos perfiles térmicos para poder mostrar las curvas de melting diferenciadas.

Para poder entender estos gráficos se debe analizar el gráfico de Temperatura v/s Fluorescencia, por ejemplo, desde la figura 25 a la 29, a medida que aumenta la temperatura, la fluorescencia total de todas las muestras (GTX, STX y agua) disminuyen, primero se comienza con una lenta disminución la cual es constante (pre-melting), seguidamente se observa un fuerte descenso de la fluorescencia, seguida por una lenta disminución de esta hasta que se mantiene constante (post-melting) ya no habiendo ADN de doble cadena es decir fluorescencia neta = 0. Con los datos obtenidos en este gráfico se puede calcular la primera derivada negativa de la fluorescencia con la temperatura ($-\Delta F/\Delta t$) [75] y se normaliza para poder contrarrestar los errores cometidos durante el procedimiento o por el instrumento. Este análisis solo se pudo realizar cuando la temperatura de inicio de melting era de 30°C, ya que en ese caso se muestra una curva con peak, el cual representa la temperatura de máxima denaturación del ADN [75] (aptámero mas toxina). Para el aptámero con STX este peak lo alcanza entre las temperaturas de 45°C y 50°C, el aptámero mas GTX entre 48°C y 52°C (figura 27 a una concentración de 3 μ M).

Los gráficos en su conjunto muestran que a medida que aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de denaturación ya que comienza a perder la fluorescencia hasta alcanzar un punto de inflexión [75]. GTX comienza a aumentar su velocidad de denaturación después que STX, hasta alcanzar su peak después, lo que quiere decir que STX pierde más rápido su fluorescencia. Esto puede dar indicio a que la denaturación/desplegamiento, en ambas muestras es diferente debido a que el mismo aptámero podría contener diferentes estructuras secundarias y terciarias ante las dos toxinas. Además el aptámero Handy Ap con Saxitoxina al cambiar sus condiciones, agregar más o menos cantidad de toxina, también cambia su denaturación, debido a que es la única que varía entre un gráfico y otra ya sea por amplitud o por altura, un factor puede ser que posea pocas interacciones suficientes como para mantener la estructura por un poco más tiempo y retrasar un poco más el desplegamiento.

Las líneas azules de los gráficos representan el aptámero sin toxina que al ser la referencia no presenta peaks, ya que se les resta a sí mismos.

Al ocupar Handy Rand1 con las toxinas, ver figura 11 y 19, su velocidad de denaturación fue más rápida, repentina y parecida al del agua, por eso se aproxima la curva a cero solo

con STX, en cambio para GTX su velocidad de denaturación igual fue mucho más rápida. Por lo tanto sus interacciones con las toxinas deben ser muy débiles, como para no mantener la estabilidad con estas.

A medida que va aumentando la concentración de toxina aumenta la fluorescencia, debido probablemente a que hay una mayor cantidad de moléculas de Saxitoxina interaccionando con el aptámero, habiendo una mayor cantidad de DNA de doble cadena a la cual Eva Green se puede unir. Esta relación no se da para Handy Rand1 con STX [65], demostrando la especificidad del aptámero Handy Ap.

La linealidad de la relación de la fluorescencia del aptámero Handy Ap con la concentración de STX, ocurre cuando la fluorescencia es medida a 30°C y no a 40°C, probablemente porque a más baja temperatura el aptámero alcanza su configuración 3D estable para atrapar a esta toxina. Luego a medida que aumenta la temperatura, se va desnaturalizando el ADN por lo que la fluorescencia va disminuyendo y estos agentes intercalantes emiten fluorescencia en un nivel bajo.

5.7 CONSIDERACIONES FINALES

El ensayo presentado en esta tesis, derivando un aptámeros contra STX como un método de detección fluorescente, se diferencia con el de ratón, debido a su límite de detección el cual es de 0,025 μM comparado con el ensayo ratón, con un límite de sensibilidad de 1 μM aproximadamente [73]. Es decir, el sistema desarrollado es unas 5 veces más sensible que el bioensayo en ratón y detecta en forma lineal hasta al menos los 10 μM . Esta última concentración es prácticamente imposible encontrarla en mariscos, en donde el nivel tóxico para humanos 2,67 μM [74].

Entonces si este aptámero es más sensible que el bioensayo validado internacionalmente se podría aplicar a futuro como sistema de detección, más sensible y mucho más económico, que los que se han desarrollado hasta ahora. Sin embargo se debiese mejorar aún más su robustez, para que sea utilizable en distintos medios, y así poder aplicarlo en un aptasensor, para usarlo en terreno reduciendo los costos.

6 CONCLUSION

Se pueden resaltar las siguientes conclusiones:

- El aptámero Handy demostró una capacidad de cambio mayor con Saxitoxina en un medio donde solo hubiera agua pura sin ningún otro componente extra como magnesio y PBS-TWEEN, donde además se observa una relación directamente proporcional de acuerdo a la fluorescencia inicial promedio y su concentración.
- Si se modifican las condiciones de análisis como por ejemplo extraer nucleótidos de los extremos del aptámero, agregar sales como magnesio o buffers que alteren el pH, harán cambiar la afinidad del aptámero para con la toxina a la cual fue dirigido.
- El aptámero Handy Ap bajo este método de análisis no puede ser aplicado en condiciones prácticas hasta el momento, porque solo funciona en agua y no en el extracto de marisco, el cual es el medio objetivo. Si se podría tratar este medio con diálisis para disminuir la cantidad de sales. También cabe destacar que hay que revisar cómo funcionan otros aptámeros que han sido publicados hasta la fecha en condiciones que no son las ideales.
- Las diferencias de las curvas de melting dan a conocer que hay un cambio en el aptámero al unirse a Saxitoxina, pero su denaturación es mucho más rápida que cuando este reacciona con GTX, tal vez porque sus interacciones no covalentes son muy pocas o muy débiles. Sus peaks de melting van cambiando de acorde a la concentración.
- El método basado en curvas de alta resolución, ha demostrado ser eficaz para poder aplicarlo en el sistema de detección de Saxitoxina, debido a que es una técnica rápida, sencilla y económica.
- En cuanto al límite de detección y rango lineal se obtuvieron mejores resultados en las concentraciones entre 0,025 μM y 10 μM respectivamente. Se pueden realizar

estudios posteriores para poder optimizar las condiciones experimentales y obtener correlaciones que se acerquen aún más a $R^2 = 1$.

7 BIBLIOGRAFIA

1. **Moreno I.M, Pereira, S. FRANCA and Cameán.** 2004. Toxic Cyanobacteria Strains Isolated From Blooms In The Guadiana River. *Biol. Res* 37: 405-417
2. **Hernández – Orozco, M.L and I. Gárate – Lizárraga.** 2006. Síndrome De Envenenamiento Paralizante Por Consumo De Moluscos. *Rev. Biomed.* 17 (1) 45 – 60.
3. **Van den Hoek, C., Mann, D.G. and Jahns, H.M.** 1995. *Algae: an introduction to phycology*, Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
4. **Thomas, C.R.** 1996. *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press, Inc. London.
5. **Anderson, J.T.**1998. The Effect Of Seasonal Variability On Germination And Vertical Transport Of A Cyst Forming Dinoflagellate, *Gyrodinium sp.*, In Chesapeake Bay. *Ecological Modelling* 112: 8 – 90.
6. **Yasumoto, T. and Murata, M.** 1993. Marine Toxins. *Chemical Reviews*, 93: 1897-1909.
7. **Botana, L.M., Rodriguez-Vieytes, M., Alfonso, A. and Louzao, M.C.** 1996. Phycotoxins: paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning. *In* Nollet, L.M.L. ed. *Handbook of food analysis - residues and other food component analysis*, Volume 2: 1147-1169.
8. **Alvarez-Falconí P.** 2009. Ácido Domoico e intoxicación amnésica por moluscos en salud pública. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*; 26(4): 505-16.
9. **Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P. and Poletti, R.** 1996a. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* 34(8): 923-935.

10. **Van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G. and Waldock, M.** 1993. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins* 2: 41-83.
11. **Bergillos F. and Rivas M. A.** 2013. Toxinología clínica. Lesiones por picaduras y mordeduras de animales, volumen 2. Pág: 828 – 829.
12. **Guzmán L and Campodónico I.** 1975. Marea Roja en la región de Magallanes. Publ. Inst. Patagonia Ser. Monografías. Punta Arenas, Chile, N°9, 44p.
13. **Marambio, J.C., Fernández, V., López, I., Varnava, C., Igor, R. and Uribe, J.C.** 1996. Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias, 13: 34-40.
14. **Ministerio de Salud. Instituto de salud pública.** 2012. Informe de Resultados. Programa Nacional de Vigilancia y Control de Intoxicaciones por Fenómenos Algales Nocivos. Chile.
15. **Wang, D.Z.** 2008, Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review. *Marine Drugs*. 6(2): p. 349.
16. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ed.),** 2004, Marine biotoxins. FAO Food and Nutrition Paper n°80. FAO, Roma.
17. **Lagos, N. W. and Andrinolo, D.,** 2000, Paralytic shellfish poisoning (PSP): Toxicology and kinetics; in Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, 203-16. Marcel Dekker, New York.
18. **ASVID,** Diseño de estrategia de imagen y posicionamiento para el mercado nacional, in Programa territorial integrado - PTI mitilidos2010.
19. **Mos, L.** 2001. Domoic acid: a fascinating marine toxin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9: 79-85.

- 20. Hollingworth, T. & Wekell, M.M.** 1990. Fish and other Marine Products 959.08. Paralytic shellfish poisoning. Biological Method, Final Action. In Hellrich, K. ed. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th Edition), pp. 881-882. Arlington, Virginia, USA.
- 21. AOAC.** Paralytic Shellfish Poison. Biological Method. Final Action. En: Hellrich, K. (ed.) Official Methods of Analysis. 15th Edition, pp. 881-882, Sección 959.08. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA.
- 22. Falconer, I.R.,**1992. Comparative evaluation of methods for testing the toxin content of cyanobacterial blooms and related wafersupplies, In; Resson, R.F.S. San J. Fitzgerald, L. Turczynowicz, O. El Saadi, D. Roder, T. Maynard and I. Falconer, 1994. Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). National Health and Medical Research Council (NHMRC). Looking Glass Press, Australia. 112p.
- 23. Falconer, I.R.,** 1993. Algal Toxins in seafood and drink wáter, Academic Press. USA, 108pp.
- 24. Ramirez, C.** 1998. Evaluación de biotoxinas por el método de bioensayo en ratón. In: Pérez-Linares, J. 2003. Caracterización de las secuencias ribosomales 16s (ADNr) de cianobacterias asociadas a eventos de toxicidad. Tesis maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S. México.
- 25. Jones, G.J., M. Burch, I.R. Falconer and K. Craig.** 1993. Cyanobacterial toxicity, In: Resson, R.F.S. San J. Fitzgerald, L. Turczynowicz, O. El Saadi, D. Roder, T. Maynard and I. Falconer, 1994. Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). National Health and Medical Research Council (NHMRC). Looking Glass Press, Australia. 112p.
- 26. Jellet, J.F.** 1993. Phytotoxins and Shelfish aquaculture. Word Aquaculture 21(4): 32-43.

- 27. Namikoshi, M., K.L. Rinehart, R. Sakai, K. Sivonen and W.W. Carmichael.** 1990. Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produce by the cyanobacterium (blue-green algae). *Nostoc* sp. In; Resson, R.F.S. San J. Fitzgerald, L. Turczynowicz, O. El Saadi, D. Roder, T. Maynard and I. Falconer, 1994. Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). National Health and Medical Research Council (NHMRC). Looking Glass Press, Australia. 112p.
- 28. Stevens, D.K and R.I. Krieger.** 1998. Analysis of anatoxin-a by GC/ECD, In: Resson, R.F.S. San J. Fitzgerald, L. Turczynowicz, O. El Saadi, D. Roder, T. Maynard and I. Falconer, 1994. Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). National Health and Medical Research Council (NHMRC). Looking Glass Press, Australia. 112p.
- 29. Resson, R.,** R.F.S. San J. Fitzgerald, L. Turczynowicz, O. El Saadi, D. Roder, T. Maynard and I. Falconer, 1994. Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). National Health and Medical Research Council (NHMRC). Looking Glass Press, Australia. 112p.
- 30. Chu, F.S., X.Huang, R.D. Wel and W.W. Camichael.** 1989. Production and characterizacion of antibodies against microcystins. *Appl. Environ. Microbiol* 55(8): 1928-1933.
- 31. Sar, E. A., Ferrario, M. E. and Reguera, B. (Eds.),** 2002, *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, Pontevedra.
- 32. Kleivdal, H., Kristiansen, S. I., Nilsen, M. V., Goksoyr, A., Briggs, L., Holland, P. and McNabb, P.,** 2007, Determination of domoic acid toxins in shellfish by biosense ASP ELISA-a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. *J AOAC Int*, 90: 1011-27.

- 33. Usleber E, Dietrich R, Bürk C, Schneider E, Märtlbauer E.** 2001. Immunoassay methods for paralytic shellfish poisoning toxins. *J AOAC Int.* **84**(5): p. 1649-56.
- 34. Llewellyn, L.E., J. Doyle, and A.P. Negri,**1998. A High-Throughput, Microtiter Plate Assay for Paralytic Shellfish Poisons Using the Saxitoxin-Specific Receptor, Saxiphilin* 1. *Analytical Biochemistry.* **261**(1): p. 51-56.
- 35. Tai-Chia Chiu; Chih-Ching Huang.**2009. Aptamer-Functionalized Nano-Biosensors. *Sensors (Basel),* 10356–10388.
- 36. J.R. Stetter; W. R. Penrose; S. Yao, J. Electrochem. Soc.** 2003,150, S11-S16.
- 37. M. Borisov, O.S. Wolfbeis.** 2008, *Chem. Rev.,* 108, 423.
- 38. T. Vo-Dinh, B. Cullum.** 2000, *J. Anal. Chem.,* 366, 540.
- 39. D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson.** 2001, *Biosens. Bioelectron.* 16,121.
- 40. Lechuga L.M, Calle Martín A.** 1995. Biosensores: Los dispositivos analíticos del futuro (II), *Revista de Plasticos Modernos* 471: 232-242.
- 41. Oliver M. J.** 2013. Resonadores piezoeléctricos como plataforma para el desarrollo de inmunosensores.
- 42. Klussman S.** 2006. *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications.* Willey-VCH. p: 518. ISBN: 978-3-527-31059-3.
- 43. Burke, D.H. and L. Gold,** 1997. RNA aptamers to the adenosine moiety of S-adenosyl methionine: structural inferences from variations on a theme and the reproducibility of SELEX. *Nucleic Acids Research.* **25**(10): p. 2020.

- 44. Tuerk C, Gold L.** 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*; 249 (4968): 505-10.
- 45. Ellington AD, Szostak JW.** 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*; 346 (6287):818–22.
- 46. Tombelli, S.; Minunni, M.; Mascini, M.** 2007. Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomol. Eng.*, 24, 191-220.
- 47. Tennico YH, Hutanu D, Koesdjojo MT, Bartel CM, Remcho VT.** 2010. On-chip aptamer-based sandwich assay for thrombin detection employing magnetic beads and quantum dots. *Anal Chem*, Jul:5591–7
- 48. Pinto A, Bermudo Redondo MC, Ozalp VC, O’Sullivan CK.** 2009. Real-time apta-PCR for 20 000-fold improvement in detection limit. *Mol Biosyst.*, May: 548–53.
- 49. Chen F, Hu Y, Li D, Chen H, Zhang X-L.** 2009. CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *PloS one.*, Jan: e8142.
- 50. Hernandez FJ, Dondapati SK, Ozalp VC, Pinto A, O’Sullivan CK, Klar TA, et al.** 2009. Label free optical sensor for Avidin based on single gold nanoparticles functionalized with aptamers. *J Biophotonics*, Apr: 227–31.
- 51. Diculescu VC, Chiorcea-Paquim A-M, Eritja R, Oliveira-Brett AM.** 2010. Thrombin-Binding Aptamer Quadruplex Formation: AFM and Voltammetric Characterization. *J Nucleic Acids.*, Jan; 2010.
- 52. Tombelli S, Mascini M.** 2010. Aptamers biosensors for pharmaceutical compounds. *Comb Chem High Throughput Screen*, 13 Aug: 641–9.

- 53. Fahrner RL, Knudsen HL, Basey CD, Galan W, Feuerhelm D, Vanderlaan M, et al.** 2001. Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes. *Biotechnol Genet Eng Rev.*, Jan: 301–27.
- 54. Chiarella P.** 2011. Production, novel assay development and clinical applications of monoclonal antibodies. *Recent patents on anti-cancer drug discovery.* May: 258–67.
- 55. Jayasena SD.** 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem. Sep:* 1628–50.
- 56. Szpechciński A, Grzanka A.** 2006. Aptamers in clinical diagnostics. *Postepy Biochem.* Jan: 260–70.
- 57. Tombelli S, Minunni M, Mascini M.** 2005. Analytical applications of aptamers. *Biosens Bioelectron.* Jun: 2424–34.
- 58. Ellington AD, Szostak JW.** 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature,* Aug: 818–22.
- 59. Renner S, Popov M, Schuffenhauer A, Roth H-J, Breitenstein W, Marzinzik A, et al.** 2011. Recent trends and observations in the design of high-quality screening collections. *Future Med Chem.* Apr;3(6):751–66.
- 60. Keefe AD, Pai S, Ellington A.** 2010. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* Jul;9(7):537–50.
- 61. Radi A-E, Acero Sánchez JL, Baldrich E, O’Sullivan CK.** 2006. Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor. *J Am Chem Soc.* Jan 11;128(1):117–24.

- 62. Kato, T., et al. 2000** In vitro selection of DNA aptamers which bind to cholic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, **1493**(1-2): p. 12-18.
- 63. Sassanfar, M. and J.W. Szostak**, 1993. An RNA motif that binds ATP.
- 64. Stojanovic, M.N., P. de Prada, and D.W. Landry**. 2001. Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *J Am Chem Soc.* **123**(21): p. 4928-31.
- 65. Sara M. Handy, Betsy Jean Yakes, Jeffrey A. DeGrasse, Katrina Campbell, Christopher T. Elliott, Kelsey M. Kanyuck, Stacey L. DeGrasse**. 2012. First report of the use of a saxitoxin–protein conjugate to develop a DNA aptamer to a small molecule toxin. *Toxicon* 61 30–37.
- 66. Gudrum H Reed, Jana O Kent and Carl T Wittwer**. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 8(6), 597-608.
- 67. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffrith, R.** 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 10:171-417.
- 68. Edwards, K. J., Logan, Julie, & Saunders, Nick**, 2004. *Real-Time PCR; An Essential Guide*. Horizon Bioscience Wymondham.
- 69. Eco™ Real-Time PCR System User Guide.**
- 70. Life technologies.** Real-time PCR handbook

- 71. White, R. et al.** 2003. Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5028-5033.
- 72. Whitehead P.** 2012. Agua ultrapura libre de impurezas biológicamente activas apta para técnicas PCR. P: 2-3.
- 73. VILLARROEL G.O.** 2004. Detección de toxinas paralizante, Diarreica y amnésica en mariscos de la XI región por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y bioensayo en ratones. *Cienc. Tecnol. Mar*, 27 (2): 33-42.
- 74. Ministerio de Salud. Instituto de salud pública. 2005.** Determinación de toxina paralizante de moluscos Bivalvos (VPM) Método biológico. P: 1-8.
- 75. Ruskova L., Raclavsky V.,** 2011. The potential of high resolution Melting analysis (HRMA) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* P 1 -14.
- 76. Sazani, P.L., R. Larralde, and J.W. Szostak.** 2004. A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP. *J. Am. Chem. Soc.* **126**(27): p. 8370-8371.
- 77. Pierce, R.H. and G.J. Kirkpatrick.** 2001. Innovative techniques for harmful algal toxin analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry.* **20**(1): p. 107-114.
- 78. FAO.** 2005. Biotoxinas marinas. P: 1 -52

