



FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA  
O QUÍMICA

**DESARROLLO DE APTÁMEROS DE ALTA  
AFINIDAD POR GONYAUTOXINA MEDIANTE  
SELECCIÓN IN VITRO**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO EN CIENCIAS MENCIÓN  
BIOLOGÍA

FRANCO LEONARDO FIGUEROA GRENETT

DIRECTOR  
DR. PABLO CONEJEROS ABRAHAM

Valparaíso, Chile  
2015

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	7
1.1 FLORECIMIENTOS ALGALES NOCIVOS	7
1.2 VENENO PARALIZANTE DE MOLUSCO: GONYAUTOXINA	8
1.3 MÉTODOS DE DETECCIÓN PARA VPM	9
1.3.1 BIOENSAYO DE RATÓN	9
1.3.2 MÉTODOS BIOMOLECULARES	10
1.4 APTÁMEROS	11
1.5 SISTEMA DE EVOLUCIÓN DE LIGANDOS POR ENRIQUECIMIENTO EXPONENCIAL (SELEX)	12
1.5.1 CONJUGACIÓN DE GTX A PERLAS MAGNÉTICAS	12
1.5.2 SELEX DE SSDNA PARA GONYAUTOXINA	13
<b>2. HIPÓTESIS</b>	15
<b>3. OBJETIVOS</b>	16
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
4.1 CONJUGACIÓN DE PERLAS MAGNÉTICAS A GONYAUTOXINA	17
4.1.2 PRUEBA DE CONJUGACIÓN MB-GTX	17
4.3 SELEX CONVENCIONAL PARA ROUND 1 Y 2	18

4.3.1 PURIFICACIÓN Y PRECIPITACIÓN DE DNA POST RECUPERACIÓN DE HEBRA SIMPLE	23
4.3.2 SELEX CONVENCIONAL ROUND 3-10: ELIMINACIÓN DE SECUENCIAS AFINES A PERLAS MAGNÉTICAS	23
4.4 MÉTODO DE ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE APTÁMEROS	24
4.5 SELEX ALTERNATIVO: RECUPERACIÓN DE LA HEBRA CON <i>PRIMER REVERSE</i> BIOTINILADO	24
4.6 CLONACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES	25
4.6.1 EXTRACCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS	27
4.6.2 VERIFICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DIGITAL DE SECUENCIAS	28
<b>5. RESULTADOS</b>	29
5.1 CONJUGACIÓN MB-GTX	29
5.2 CURVAS DE AMPLIFICACIÓN Q-PCR PILOTO DE AP+# PARA SELEX CONVENCIONAL Y ALTERNATIVO	30
5.2.1 CURVAS DE MELTING DE SELEX CONVENCIONAL Y ALTERNATIVO	34
5.2.2 CICLOS DE AMPLIFICACIÓN Y PEAKS DE MELTING DE SELEX CONTROL NEGATIVO ALTERNATIVO	37

<b>5.3 CLONACIÓN Y TRANSFORMACIÓN</b>	<b>39</b>
<b>5.3.1 SECUENCIACIÓN DE APTÁMEROS</b>	<b>39</b>
<b>5.4 PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS</b>	<b>42</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>6.1 SOBRE LAS METODOLOGÍAS DE SELEX</b>	<b>43</b>
<b>6.2 SOBRE LA CONJUGACIÓN MB-GONYAUTOXINA</b>	<b>44</b>
<b>6.3 SOBRE LOS CICLOS DE AMPLIFICACIÓN</b>	<b>45</b>
<b>6.3.1 CONTROL NEGATIVO DEL SELEX ALTERNATIVO</b>	<b>46</b>
<b>6.3.2 CURVA DE PCR EN FORMA DE CAMPANA</b>	<b>46</b>
<b>6.4 ANÁLISIS DE CURVAS DE FUSIÓN</b>	<b>47</b>
<b>6.4.1 SOBRE SUBPRODUCTOS</b>	<b>47</b>
<b>6.4.2 SOBRE MATERIAL ESPECÍFICO</b>	<b>47</b>
<b>6.4.3 SOBRE CONTROL NEGATIVO DEL SELEX ALTERNATIVO</b>	<b>48</b>
<b>6.5 SECUENCIACIÓN Y ESTRUCTURAS SECUNDARIAS</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>8. REFERENCIAS</b>	<b>53</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>61</b>

Los florecimientos algales nocivos (FAN) se presentan en todos los océanos del mundo y las microalgas que constituyen las FAN son habituales de los ecosistemas acuáticos. Su efecto nocivo se debe a las toxinas presentes en éstas y son las responsables del veneno paralizante de molusco (VPM). Estas toxinas son concentradas en organismos acuáticos filtradores de microalgas, como moluscos bivalvos, los que al ser consumidos por humanos provocan serios daños a la salud e incluso la muerte. El envenenamiento provocado por el consumo de moluscos es una patología causada por la saxitoxina y sus más de 26 análogos. Dentro de las toxinas paralizantes la gonyautoxina (GTX) es la que se encuentra en mayor porcentaje en el VPM en Chile. Además estas floraciones han llegado a transformarse en un serio problema para salud pública y la economía local. Actualmente muchos de los ensayos disponibles para detección de VPM emplean anticuerpos o animales vivos. Y el más recurrente para detectar saxitoxina es el ensayo ratón. Esta tesis se centró en el desarrollo de aptámeros contra gonyautoxina para un futuro sistema de detección que aporte a los retos asociados a la limitada disponibilidad de anticuerpos y el uso de animales. El procedimiento consistió en una selección *in vitro* de aptámeros mediante la metodología de SELEX convencional que utilizó perlas magnéticas para la inmovilización del objetivo. En contraparte se realizó una novedosa variante de SELEX al que se llamó alternativo, que utilizó la molécula de gonyautoxina libre, presentado ventajas relacionadas con la rentabilidad y la reducción de tiempo de ensayo.

En esta tesis se muestran posibles aptámeros dirigidos a gonyautoxina que fueron obtenidos mediante SELEX convencional y alternativo. Estos se caracterizaron por medio de curvas de fusión de alta resolución, análisis de secuencias y predicción de estructuras plegables, y puede observarse una alta similitud entre ellos. Se prevé que si efectivamente son aptámeros afines a Gonyautoxina, esta tesis contribuiría con el desuso ensayos costosos como el uso de anticuerpos y/o ensayos que perjudiquen el bienestar animal.