

---

**DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA**

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria  
(CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

---

*Aptámeros para la detección de moléculas orgánicas pequeñas*

---

Trabajo de tesis para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de la  
Universidad Nacional de General Sarmiento

Autor: **Lic. María Belén Ponce**

Director: Dr. Javier M. Montserrat  
Co-Director: Dra. Silvana A. Ramírez

Diciembre 2015

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

### FORMULARIO "E" TESIS DE POSGRADO

Niveles de acceso al documento autorizados por el autor

**El autor de la tesis puede elegir entre las siguientes posibilidades para autorizar a la UNGS a difundir el contenido de la tesis: (a)**

- a) *Liberar el contenido de la tesis para acceso público. (X)*
- b) *Liberar el contenido de la tesis solamente a la comunidad universitaria de la UNGS.*
- c) *Retener el contenido de la tesis por motivos de patentes, publicación y/o derechos de autor por un lapso de cinco años.*

a. Título completo del trabajo de Tesis:

Aptámeros para la detección de moléculas orgánicas pequeñas

b. Presentado por (Apellido/s y Nombres completos del autor):

Lic. María Belén Ponce

c. E-mail del autor: belenponce@gmail.com; mponce@ungs.edu.ar

d. Estudiante del Posgrado (consignar el nombre completo del Posgrado):

Doctorado en Ciencia y Tecnología

e. Institución o Instituciones que dictaron el Posgrado (consignar los nombres desarrollados y completos):

Universidad Nacional de General Sarmiento

f. Para recibir el título de (consignar completo):

a) Grado académico que se obtiene: Doctor

b) Nombre del grado académico: Doctor en Ciencia y Tecnología

g. Fecha de la defensa: 01 / 12 / 2015  
  día   mes    año

h. Director de la Tesis (Apellidos y Nombres):

Dr. Javier M. Montserrat; Dra. Silvana A. Ramírez

i. Tutor de la Tesis (Apellidos y Nombres): ---

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

- j. Colaboradores con el trabajo de Tesis: ---
- k. Descripción física del trabajo de Tesis (cantidad total de páginas, imágenes, planos, videos, archivos digitales, etc.): 221 páginas.
- l. Alcance geográfico y/o temporal de la Tesis: ---
- m. Temas tratados en la Tesis (palabras claves): Aptámeros, SELEX, deltametrina, aptasensores, fosforotioato, electroquímica.
- n. Resumen en español (hasta 1000 caracteres):

Este trabajo tiene por objetivo desarrollar la metodología para la construcción de un sensor aptamérico de base electroquímica para la deltametrina, un piretroide utilizado como insecticida. Esto implicó dos líneas de desarrollo:

i) La puesta a punto del proceso de selección molecular *in vitro* (SELEX), con especial énfasis en la aplicación de nuevas estrategias de selección (SELEX-Negativa; FluMagSELEX) y la optimización de las diferentes condiciones de cada etapa del proceso.

ii) El estudio de las etapas necesarias para la construcción de un aptasensor electroquímico utilizando un sistema modelo. Para ello se empleó el aptámero que reconoce adenosina desarrollado por Szostak en 1995, explorando su anclaje al electrodo vía un grupo fosforotioato. Se optimizaron también las condiciones de introducción del marcador redox (ferroceno) y se avanzó en su ensamblado para cuantificar dicho analito empleando técnicas electroquímicas.

- o. Resumen en portugués (hasta 1000 caracteres):

Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia para a construção de um aptasensor eletroquímico para a detecção de deltametrina, um piretróide utilizado como inseticida. Para o desenvolvimento deste projeto será necessário seguir duas etapas:

i) Ajustamento do processo molecular *in vitro* (SELEX), com ênfase na aplicação de novas estratégias de seleção (SELEX-Negativa; FluMagSELEX) e a otimização das diferentes condições das etapas do processo.

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

---

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

ii) Estudo da construção de um aptasensor eletroquímico utilizando um sistema modelo, onde será empregado um aptâmero que detecta adenosina, desenvolvido por Szostak em 1995, e avaliada a fixação do grupo fosforotioato ao eletrodo de trabalho. As condições de otimização do marcador redox também serão estudadas com ferrocianeto e após este procedimento será realizado o análise da substância de interesse através de técnicas eletroquímicas.

p. Resumen en inglés (hasta 1000 caracteres):

The aim of this work is to develop the methodology for the construction of an electrochemical aptasensor for deltamethrin, a pyrethroid used as an insecticide. This involved two lines of development:

i) The set-up of the molecular *in vitro* selection process (SELEX), with special emphasis on the implementation of new strategies for selection (Negative-SELEX; FluMagSELEX) and the optimization of the different conditions in each process stage.

ii) The study of the necessary stages for the construction of an electrochemical aptasensor using a model system. For this, the aptamer that recognizes adenosine developed by Szostak in 1995 was used, exploring the anchorage to the electrode via a phosphorothioate group. The conditions for introducing the redox marker (ferrocene) were also optimized and progress was made in the assembling in order to quantify the analyte using electrochemical techniques.

q. Aprobado por (Apellidos y Nombres del Jurado):

Firma y aclaración de la firma del Presidente del Jurado:

Firma del autor de la tesis:

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

---

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

---

### *Aptámeros para la detección de moléculas orgánicas pequeñas*

---

#### Publicaciones:

“Adenosine Reagentless Electrochemical Aptasensor Using a Phosphorothioate Immobilization Strategy”.

H. Ceretti, B. Ponce, S. A. Ramírez, J. M. Montserrat. *Electroanalysis*, **2010**, 22, 147-150.

#### Presentaciones a congresos:

“Avances en la señeción de un aptámero para deltametrina”. *30° Congreso Argentino de Química*. Buenos Aires. **2014**.

“Aptámero de adenosina y secuencias complementarias: estrategias para el desarrollo de señal”. *7° Congreso Argentino de Química Analítica*. Mendoza. **2013**.

“Avances en la selección de un aptámero para Deltametrina”. *5° Congreso Iberoamericano de Química Analítica – 2° Congreso Uruguayo de Química Analítica*. Montevideo, Uruguay. **2012**.

“Desarrollo de aptasensores de base electroquímica para aplicaciones ambientales”. *Argentina y Ambiente 2012 - I Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental - I Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental*. Mar del Plata. **2012**.

“Estrategias para funcionalizar superficies de oro con un grupo ferroceno vía enlace S-Au”. *V Encuentro de Física y Química de Superficies*. Rosario, Santa Fé. **2011**.

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

---

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

“Modificación química de superficies de oro policristalino para su aplicación en la inmovilización de oligonucleótidos”. *XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica*. Córdoba. **2011**.

“Deltametrina e imazetapir: avances en el desarrollo de aptasensores para su detección”. *XXVIII Congreso Argentino de Química*. Lanús. **2010**.

“Avances en el desarrollo de sensores de base aptamérica para moléculas orgánicas pequeñas”. *XVII Simposio Nacional de Química Orgánica*. Mendoza. **2009**.

“Autoensamblado de aptámeros vía fosforotioato a superficies de Au policristalino: estrategia para el desarrollo de sensores electroquímicos”. *IV Encuentro de Física y Química de Superficies*. La Plata. **2009**.

“Desarrollo de sensores bioelectroquímicos de base aptamérica para la cuantificación de productos fitosanitarios en matrices ambientales”. *V Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental*. Mar del Plata. **2008**.

### Aportes Originales:

*(Especificar cuales son los aportes originales o innovadores conseguidos en la realización de esta tesis. Indicar donde se encuentran. Máximo una carilla.)*

El campo de aplicación de este trabajo de tesis es el de las moléculas orgánicas pequeñas de relevancia ambiental, en particular, la deltametrina. Habitualmente estos contaminantes orgánicos son determinados utilizando sistemas de cromatografía instrumental con detectores específicos y/o métodos basados en anticuerpos. En este sentido, el desarrollo de un aptámero contra deltametrina intenta ser una alternativa al uso de dichas metodologías. Los aptámeros, secuencias cortas de ADN o ARN seleccionadas *in vitro* para un *target* específico, presentan constantes de afinidad comparables a los anticuerpos, pero poseen una estabilidad química y bioquímica superior. Además, requieren protocolos de síntesis más simples en comparación con el desarrollo *in vivo* de los anticuerpos. Las habilidades de reconocimiento específicas de los aptámeros combinadas con las propiedades de detección selectiva, sensible y transportable a campo de la electroquímica, transforman a los aptasensores de base electroquímica en dispositivos interesantes tanto desde el punto de vista básico como aplicado.

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

---

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

En este sentido, se avanzó en el diseño de todas las etapas del proceso de evolución molecular para obtener el aptámero (Capítulo 4), desde la modificación química del *target*, su inmovilización sobre un soporte sólido, hasta las técnicas de biología molecular y de control y cuantificación de las secuencias seleccionadas. Cabe destacar que dichas técnicas de evolución molecular *in vitro* no han sido desarrolladas en nuestro país, como tampoco se encuentra reportado el aptámero contra la deltametrina.

Se trabajó, también, en el desarrollo de un aptasensor electroquímico utilizando como sistema modelo el aptámero de ADN contra ATP/adenosina (Capítulo 3). La propuesta fue explorar las ventajas comparativas de la modificación fosforotioato frente a la modificación tiol, en relación con su utilización como anclaje sobre la superficie del electrodo. El fosforotioato, además de ser una alternativa más económica y sencilla químicamente, ofrece otras ventajas como el poder ser introducido en cualquier posición de la secuencia y no necesitar ser activado antes de ser usado.

Si bien el trabajo se centra en una aplicación concreta de relevancia ambiental y ocupacional, la puesta a punto de todas las técnicas necesarias, tanto para desarrollar el aptámero, como para su inmovilización sobre una superficie conductora y la optimización de las estrategias de desarrollo de señal, serán un conjunto de conocimientos que luego podrán aplicarse a otros campos de interés.

## Agradecimientos

---

**Quisiera agradecer a todos los que me ayudaron y acompañaron durante estos años de trabajo y aprendizaje: los que formaron parte científicamente y los que, a pesar de no tener vínculo con la ciencia, estuvieron presentes.**

A Javier y a Silvana por el apoyo, por confiar en mí, por permitirme trabajar en el laboratorio. Por enseñarme y guiarme a lo largo de tantos años.

A Helen. ¡Profesora! Qué decir... ¡GRACIAS! Por el aguante, por la compañía, por las risas, por las broncas, por las enseñanzas, por los consejos; este camino no hubiese sido el mismo sin su presencia. Imposible haber tenido una mejor compañera de ruta. ¡Cancún nos espera!

A Lau Robaldo por su ayuda con los experimentos de marcación, por enseñarme a trabajar con los geles de acrilamida, y por todas esas charlas durante las extensas corridas de HPLC. Por los mates que no tomo y los helados que sí disfrutamos. Por los consejos y la compañía.

A Henry, por la ayuda en la etapa de síntesis. Por todas las columnas que no separaron y las plaquitas “chinito”. Por el aguante, las charlas y toda la ayuda brindada.

Al Dr. Claudio Pereira, al Dr. León Bouvier y a la Dra. Mariana Miranda, del Laboratorio de Biología Molecular de Trypanosoma Cruzi (LBMTTC) del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, por toda la ayuda con las PCRs.

A Guille Menéndez, por la asistencia con los experimentos de fluorescencia.

A Maca y a Matías, por ser los “biólogos de cabecera”. Por la ayuda con la bendita biología molecular, los geles, las PCRs, las fotos y las tinciones. Por estar siempre dispuestos a colaborar y a pensar los posibles motivos de las n PCRs que no dieron.

A la UNGS, al CONICET, a la ANPCyT y a la OPCW por el financiamiento del proyecto. Al INGEBI y a todos los integrantes del Laboratorio de Química de Ácidos Nucleicos, Adolfo, Lau, Maru, Rodrigo y Maria, por facilitarme las instalaciones, el equipamiento y la ayuda, para muchos de los experimentos realizados.

A mis viejos, Sandra y Gerardo, por estar siempre. Porque me inculcaron la importancia del esfuerzo, la perseverancia, y las ganas de salir adelante. Por todo el cariño y el apoyo que siempre me brindaron. A vos, Pá, porque estás presente en mi corazón. A toda mi familia, porque muchas veces sin entender de que se trata, estuvieron presentes.

A Javi, por el increíble aguante. Por todo el apoyo, por los consejos de “ingenieri”, por cuidarme y acompañarme. Porque seguramente sin su presencia, su calma, todo hubiese sido mucho más cuesta arriba.

A las brujas, Gri y Ale, por todas esas meriendas rosas tan relajantes. Por las risas, los enojos y los llantos. Por la compañía, el cariño, por estar y ser mis amigas. A Ale, por la paciencia en las clases particulares de Word y la ayuda con el tratamiento de imágenes.

A las no tan brujas, Ire, Mery, Ana y Peque, por la compañía, las risas y el aguante. A Mery, Ire, Matías y Mauricio, por todo el material autoclavado. No se sabe bien porque, pero las PCRs empezaron a funcionar cuando Mauricio se fue. A la Peque, por la ayuda con los cromatogramas del CG.

A mamá Silvia por tener siempre una palabra de aliento, de fuerza. Por todo el cariño y la compañía.

A las chiquis, Mel, Eve y Lei, por prestarme siempre una oreja, por el cariño. A Mel, por todos los traslados del famoso tupper de RMN.

A Guido, por todos los ferrocenitos dibujados, minimizando mi estado de crisis durante la escritura.

# Índice

<b>Capítulo 1</b>	<b>Introducción</b>	<b>14</b>
1.1.	El problema: la cuantificación de productos fitosanitarios	15
1.2.	Un dispositivo: los biosensores	17
1.2.1.	Biosensores de afinidad	19
1.2.1.1.	Elemento de reconocimiento: Ácidos nucleicos	21
1.3.	Una alternativa: los aptámeros	29
1.4.	Aptasensores	40
1.4.1.	Inmovilización	40
1.4.1.1.	Oro	41
1.4.1.2.	Nanotubos de carbono (NTC)	41
1.4.1.3.	Otros	42
1.4.2.1.	Aptasensores basados en el tipo <i>target-induced structure switching</i> (TISS)	43
1.4.2.1.1.	Aptasensores del tipo TISS con transducción electroquímica	43
1.4.2.1.2.	Aptasensores del tipo TISS con transducción óptica	47
1.4.2.1.3.	Aptasensores del tipo TISS con transducción acústica	49
1.4.2.2.	Aptasensores basados en el tipo <i>sandwich</i> o <i>sandwich-like</i>	51
1.4.2.3.	Aptasensores basados en el tipo <i>target-induced dissociation</i> o <i>displacement</i> (TID)	53
1.4.2.4.	Aptasensores basados en el tipo <i>competitive replacement</i>	55
1.4.3.	Factores que afectan el desempeño de los aptasensores	56
1.4.3.1.	Uso del <i>linker</i> y del separador	56
1.4.3.2.	Regeneración superficial	57
1.4.3.3.	Condiciones fisicoquímicas óptimas	58
1.5.	<i>Targets</i> : moléculas orgánicas pequeñas	59
1.5.1.	Sistema modelo: ATP	59
1.5.2.	Productos fitosanitarios de interés ambiental: plaguicidas	61
1.5.2.1.	Piretroides	62
1.5.2.1.1.	Deltametrina	63
<b>Capítulo 2</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>66</b>
2.1.	Materiales	67
2.1.1.	Reactivos	67
2.1.2.	Cromatografía, separación y purificación	69
2.1.3.	Enzimas	70
2.1.4.	Resinas y <i>Beads</i> Magnéticos modificados	70
2.1.5.	Radioisótopos	70
2.1.6.	Marcadores de peso molecular	70
2.1.7.	Nucleótidos y Oligonucleótidos	70
2.1.7.1.	Aptámero para ATP ( <b>Apt-ATP</b> )	70
2.1.7.2.	Secuencias complementarias al <b>Apt-ATP</b>	72
2.1.7.3.	Secuencias utilizadas en el proceso de SELEX	72
2.1.7.3.1.	Biblioteca de ADN <sub>ss</sub> ( <b>BiblioADN<sub>ss</sub></b> )	72
2.1.7.3.2.	Secuencias cortas para optimizar la electroforesis planar	72
2.1.7.3.3.	<i>Primers</i> para PCR	72
2.1.7.4.	Nucleótidos	73
2.1.8.	Buffer y soluciones	73
2.1.8.1.	Reacciones de marcación con $\gamma$ - <sup>32</sup> P en el extremo 5'	73
2.1.8.2.	Electroforesis planar	73
2.1.8.3.	Solución piraña	74
2.1.8.4.	Buffer fosfato 10 mM pH 7,0	74
2.1.8.5.	Buffer de reducción del <b>Apt-ATP</b>	74
2.1.8.6.	Buffer de reconocimiento aptámero-ATP/Adenosina	74
2.1.8.7.	Buffer TEAA 10X pH 7 (HPLC)	74
2.1.8.8.	Buffer PBS 10 mM pH 7,2	75

2.1.8.9. Buffer PBS 0,3 M pH 7,4.....	75
2.1.8.10. Buffer de hibridización .....	75
2.1.8.11. Buffer PCR .....	75
2.1.8.12. Buffer de <i>binding</i> SELEX.....	75
2.1.8.13. Buffer de elución SELEX .....	76
2.1.8.14. Buffer SSC 20X pH 7,2 .....	76
2.1.8.15. <i>Dynabeads M-280 Streptavidin</i> .....	76
2.1.9. Electrodo.....	76
2.1.9.1. Electrodo de trabajo.....	76
2.1.9.2. Contraelectrodo y electrodo de referencia .....	76
2.2. Equipamiento .....	77
2.3. Protocolo para la limpieza de superficies de oro.....	78
2.3.1. Láminas de oro policristalino .....	78
2.3.1.1. Experimentos radioquímicos.....	78
2.3.1.2. Experimentos electroquímicos.....	78
2.3.2. Electrodo comercial de oro policristalino .....	78
2.4. Protocolo para la modificación superficial con 6-mercaptohexanol (MCH) .....	79
2.5. Activación del <b>ácido carboxiferroceno (FcCOOH, 1)</b> para dar <i>N</i> - <b>hidroxisuccinimidilcarboxiferroceno (FcNHS, 2)</b> .....	79
2.6. Ensayos con el <b>Apt-ATP</b> .....	80
2.6.1. Reacción de marcación con <sup>32</sup> P .....	80
2.6.2. Geles de poli(acrilamida) (PAGE) al 40% en condiciones desnaturalizantes .....	81
2.6.3. Protocolo para la reducción del puente disulfuro del <b>Apt-ATP</b> .....	81
2.6.4. Protocolo para la inmovilización de <b>Apt-ATP</b> .....	82
2.6.5. Protocolo para los ensayos de evaluación de la estabilidad térmica del <b>Apt-ATP</b> .....	82
2.6.6. Protocolo para los ensayos de reconocimiento de $\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP .....	82
2.6.7. Protocolo para la derivatización con Fc del <b>Apt-ATP</b> inmovilizado .....	83
2.6.8. Protocolo para la derivatización del <b>Apt-ATP</b> con Fc en solución .....	83
2.6.8.1. Derivatización del <b>Apt-ATP</b> con <b>FcNHS (2)</b> .....	83
2.6.8.1.1. Derivatización en buffer PBS 0,3 M pH 7,4 .....	83
2.6.8.1.2. Derivatización en buffer HEPES 0,2 M pH 7,2 : DMF 5:1 V/V.....	83
2.6.8.1.3. Derivatización en buffer NaHCO <sub>3</sub> /Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,5 M pH 9 : DMSO 3:1 V/V.....	84
2.6.8.1.4. Derivatización en buffer NaHCO <sub>3</sub> /Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,5 M pH 9 : DMSO 1:1 V/V.....	84
2.6.8.6. Método para correr <b>Fc-NH-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts</b> en el HPLC-UV .....	85
2.6.9. Experimentos con estructuras de ADN <sub>ds</sub> .....	85
2.6.9.1. Hibridización .....	85
2.6.9.2. PAGE al 20% en condiciones no desnaturalizantes.....	85
2.6.9.3. Incubación con el <i>target</i> (adenosina, AMP) o con el control (2-desoxiguanosina) .....	86
2.7. Ensayos con el 3-MPA.....	86
2.8. Experimentos electroquímicos .....	87
2.8.1. Técnicas electroquímicas utilizadas.....	87
2.8.1.1. Voltametría Cíclica (VC).....	87
2.8.1.2. Cronoamperometría .....	88
2.8.1.3. Voltametría de pulso diferencial (VPD) .....	89
2.8.1.4. Voltametría de onda cuadrada (VOC).....	89
2.8.2. Determinación de la capacidad de los electrodos .....	91
2.8.2.1. VC.....	91
2.8.2.2. Cronoamperometría .....	91
2.8.3. Determinación de la densidad superficial por CronoQ.....	91
2.8.4. Detección electroquímica de adenosina por VOC .....	91
2.8.5. Sistema modelo 3-MPA.....	91
2.9. Obtención del <i>target</i> .....	92
2.9.1. Extracción de <b>deltametrina (4)</b> .....	92
2.9.2. Obtención de <b>ácido dibromovinil-2,2-dimetilciclopropanoico (CPCA, 5)</b> a partir de la <b>deltametrina (4)</b> .....	93
2.9.2.1. Hidrólisis de <b>deltametrina (4)</b> .....	93
2.9.2.2. Alcohólisis enzimática de <b>deltametrina (4)</b> .....	93
2.9.2.3. Saponificación directa del Decis Forte .....	94

2.9.3. Aminoprotección de <b>2-(2-aminoetoxi)etanol (7)</b> para obtener el <b>9H-fluoren-9-ilmetil[2-(2-hidroximetoxi)etil]carbamato (8)</b> .....	95
2.9.4. Activación del <b>CPCA (5)</b> .....	96
2.9.4.1. Activación con NHS .....	96
2.9.4.2. Activación <i>in situ</i> del <b>CPCA (5)</b> con DCC y acoplamiento con <b>9H-fluoren-9-ilmetil[2-(2-hidroximetoxi)etil]carbamato (8)</b> .....	96
2.9.4.3. Formación del cloruro de <b>3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanmetanoilo (6)</b> .....	97
2.9.5. Acoplamiento del <b>9H-fluoren-9-ilmetil[2-(2-hidroximetoxi)etil]carbamato (8)</b> con el <b>3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanmetanoilo (6)</b> para dar el <b>3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-(2-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo]amino)etoxi)etilo (9)</b> .	97
2.9.6. Desprotección de <b>3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-(2-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo]amino)etoxi)etilo (9)</b> con piperidina para obtener el <b>3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-(2-aminoetoxi)etilo (10)</b> .....	98
2.10. Estabilidad de <b>3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-(2-aminoetoxi)etilo (CPCA-NH<sub>2</sub>, 10)</b> en buffer Tris-HCl 10mM pH 7,6 .....	99
2.11. Optimización de las condiciones para la cuantificación de la inmovilización por CG .....	99
2.11.1 Método para correr <b>CPCA-NH<sub>2</sub></b> .....	99
2.11.2. Derivatización del <b>3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-(2-aminoetoxi)etilo (10)</b> con anhídrido trifluoroacético para dar el <b>3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-{2[(trifluoroacetil)amino]etoxi)etilo (CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 11)</b> .....	100
2.11.2.1. Derivatización con aislamiento del compuesto <b>11</b> y posterior purificación.....	100
2.11.2.2. Derivatización <i>in situ</i> sin aislamiento del compuesto <b>11</b> .....	101
2.11.3. Método para correr <b>CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b> .....	101
2.11.4. Derivatización de <b>CPCA (5)</b> con 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropanol para dar <b>3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2,2,2-trifluoro-1-(trifluorometil)etilo (12)</b> .....	101
2.12. Inmovilización del <b>CPCA-NH<sub>2</sub></b> (compuesto <b>10</b> ) sobre el soporte sólido .....	102
2.12.1. Soporte sólido: <i>ECH Sepharose 4B</i> .....	102
2.12.1.1. Cuantificación indirecta .....	102
2.12.1.2. Cuantificación directa .....	103
2.12.2. Soporte sólido: <i>BcMag Carboxy-terminated Magnetic Beads</i> .....	104
2.12.2.1. Cuantificación indirecta .....	104
2.12.2.2. Cuantificación directa .....	105
2.13. Preparación de la pre-columna de selección (SELEX-Negativa).....	106
2.14. Diseño del proceso de SELEX .....	106
2.14.1. Detección de pequeñas cantidades de ADN <sub>ss</sub> por electroforesis planar .....	106
2.14.1.1. PAGE al 20% en condiciones desnaturalizantes.....	106
2.14.1.2. Geles de agarosa al 2% .....	107
2.14.2. Purificación de las secuencias de ADN <sub>ss</sub> .....	107
2.14.2.1. Precipitación con <i>Glycogen</i> .....	107
2.14.2.2. Purificación con Kit comercial ( <i>DNA Clean &amp; Concentrador<sup>TM</sup>-5</i> ).....	107
2.14.3. Amplificación por PCR simétrica.....	108
2.14.4. Marcación de la <b>BiblioADN<sub>ss</sub></b> .....	109
2.14.5. Acondicionamiento de los productos de PCR.....	109
2.14.5.1. <i>Beads</i> modificados con estreptavidina.....	109
2.14.5.1.1. <i>Streptavidin Magnosphere Paramagnetic Particles (SA-PMPs)</i> .....	109
2.14.5.1.2. Dynabeads M-280 Streptavidin (DB-MS) .....	110
2.15. SELEX-Negativa (Ciclo 1 y Ciclo 2).....	111
2.16. Procedimientos generales.....	111
2.16.1. Tinción con Nitrato de Plata (para PAGE) .....	111
2.16.2. Tinción con <i>Sybr Safe</i> .....	112
2.16.3. Tinción con Bromuro de Etidio .....	112

## Resultados y Discusión ..... 113

## Capítulo 3 Avances para el desarrollo de un aptasensor de base electroquímica 114

3.1. Objetivo.....	115
--------------------	-----

3.2. Sistema modelo: Aptámero para ATP.....	118
3.2.1. Determinación de la densidad superficial del aptámero inmovilizado sobre una superficie de oro...	118
3.2.1.1. Método radioquímico.....	118
3.2.1.2. Métodos electroquímicos.....	121
3.2.2. Evaluación del reconocimiento del <i>target</i> (ATP) por medio del aptámero inmovilizado por métodos radioquímicos.....	131
3.2.3. Armado de un aptasensor electroquímico para el reconocimiento de adenosina/ATP.....	133
3.2.4. Puesta a punto de la reacción de derivatización del aptámero con un grupo electroactivo en solución.....	138
3.3. Sistema modelo: 3-MPA.....	143
3.4. Estrategia para el desarrollo de señal: estructuras doble cadena de ADN (ADN <sub>ds</sub> ).....	145
3.5. Conclusión.....	150

## Capítulo 4 Desarrollo de la metodología para la obtención de un aptámero contra **deltametrina** ..... 152

4.1. Objetivo.....	153
4.2. Inmovilización de un fragmento de la <b>deltametrina</b> sobre un soporte sólido.....	155
4.2.1. Modificación química de la <b>deltametrina</b> .....	155
4.2.2. Inmovilización del <i>target</i> sobre un soporte sólido (Primera etapa del proceso de SELEX).....	158
4.2.2.1. Optimización de las condiciones para la cuantificación por CG-ECD de la inmovilización.....	161
4.2.2.1.1. Cuantificación indirecta.....	161
4.2.2.1.2. Cuantificación directa.....	163
4.2.2.2. Inmovilización del <b>CPCA-NH<sub>2</sub></b> sobre soportes sólidos.....	164
4.2.2.2.1. Soporte sólido: <i>ECH Sepharose 4B</i> .....	164
4.2.2.2.2. Soporte sólido: <i>BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads</i> .....	169
4.3. Preparación de la pre-columna de selección (SELEX-Negativa).....	174
4.4. Diseño del proceso de SELEX.....	175
4.4.1. <i>Pool</i> de ADN inicial.....	175
4.4.2. Detección de pequeñas cantidades de ADN <sub>ss</sub> por electroforesis planar.....	176
4.4.3. Purificación de las secuencias de ADN <sub>ss</sub> .....	177
4.4.3.1. Precipitación con <i>Glycogen</i> .....	177
4.4.3.2. Purificación con Kit comercial.....	179
4.4.4. Amplificación por PCR simétrica.....	180
4.4.5. Marcación de la <b>BiblioADN<sub>ss</sub></b> .....	186
4.4.6. Acondicionamiento de los productos de PCR.....	188
4.5. Desarrollo de los ciclos de selección-amplificación (SELEX).....	191
4.5.1. Ciclo 1: SELEX-Negativa.....	192
4.5.2. Ciclo 2: SELEX-Negativa.....	194
4.6. Conclusión.....	195

## Capítulo 5 Conclusiones Generales –Proyecciones a futuro..... 196

5.1. Sistema modelo: adenosina.....	197
5.2. Producto fitosanitario de interés ambiental: <b>deltametrina</b> .....	197
5.3. Proyecciones a futuro.....	198

## Bibliografía..... 199

<b>Anexo</b> .....	<b>210</b>
Abreviaturas.....	210
Espectros de RMN.....	212

# *Capítulo 1*

## *Introducción*

## 1.1. El problema: la cuantificación de productos fitosanitarios

La actividad agraria es una de las más importantes en nuestro país, tanto en términos económicos, como en relación con la extensión de los recursos naturales que involucra. Un aspecto especialmente relevante de la misma es el empleo de productos fitosanitarios, hecho que se ha incrementado en forma sostenida durante los últimos cuarenta años<sup>1</sup>. Esta práctica impacta sobre los recursos agua, suelo, biodiversidad y sobre los propios trabajadores, según ha sido identificado tanto a nivel nacional como así también por organismos internacionales involucrados en cuestiones ambientales.

La detección y monitoreo en forma inmediata de contaminantes en el medio ambiente, tales como moléculas orgánicas pequeñas, toxinas y patógenos, resulta crucial para evitar riesgos tanto para la salud humana como para el ambiente.

El Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Oficina Regional para América Latina y el Caribe (PNUMA/ORPALC) ha lanzado un informe, “GEO América Latina y el Caribe: Perspectivas del Medio Ambiente 2003”<sup>2</sup>, donde se señala como uno de los temas prioritarios la contaminación de suelos y aguas naturales con agroquímicos y la necesidad de reducir la exposición a sustancias tóxicas en la industria, la agricultura y la ganadería.

Asimismo, en la “Agenda Ambiental Nacional”<sup>3</sup>, desarrollada por la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable del Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación, se destaca como prioridad en salud y ambiente, en el apartado 6.2 sobre “Nuevas Líneas de Acción”, avanzar en los estudios relativos a diagnósticos de calidad ambiental en cuanto a tipo y fuentes de exposición ocupacional a contaminantes, entre otros. Sin embargo el impacto ambiental de las prácticas de producción agrícolas, ha sido, en Argentina, una preocupación abordada sólo recientemente, como se pone de manifiesto por el bajo número de proyectos de investigación en esta área<sup>4</sup>.

Una de las razones por las cuales el monitoreo ambiental de los sistemas productivos es una asignatura pendiente en nuestro país, puede estar relacionado con la complejidad de las herramientas analíticas y la alta formación técnica de los recursos humanos para ejecutar dichas técnicas. Dentro de las técnicas analíticas comúnmente utilizadas para dicha detección se pueden mencionar la cromatografía gaseosa o líquida acoplada a espectrometría de masa (CG-EM, CL-EM)<sup>5</sup>. Dichos procedimientos analíticos implican generalmente un tratamiento previo de la muestra, como por ejemplo, una extracción líquido-líquido<sup>6</sup>, el empleo de cartuchos de extracción de fase

sólida C<sub>18</sub><sup>5a</sup> y/o procedimientos de extracción con asistencia de ultrasonido<sup>7</sup>. Para el análisis por CG (detector de captura de electrones (ECD) y EM), los extractos, además, deben ser derivatizados con diferentes reactivos, de forma tal de aumentar la sensibilidad del método o eventualmente la volatilidad del analito.

Si bien éstas son técnicas con una alta selectividad y bajos límites de cuantificación, requieren un tratamiento previo de la muestra, equipos costosos con detectores adecuados para poder medir en niveles de trazas y personal capacitado para el uso de los mismos, resultando en análisis costosos y que no pueden ser realizados en la propia zona de producción. En este sentido el grupo de expertos que entre los años 1998-1999 elaboró para la Secretaría de Ciencia y Tecnología del Ministerio de Cultura y Educación de la Nación, el “Diagnóstico e Identificación de Áreas de Vacancia”<sup>8</sup> en la investigación científica y tecnológica de Argentina, ha destacado como área vacante en nuestro país el desarrollo de nuevas estrategias analíticas para el análisis de mezclas complejas multicomponentes orientadas al análisis de suelos.

Como consecuencia, el desarrollo de métodos de detección y cuantificación rápidos, transportables y de utilidad en matrices ambientales y fluidos biológicos, podría ser un aporte interesante a las herramientas de control del uso de este tipo de productos fitosanitarios, tanto en sistemas productivos, como en aplicaciones de control sanitario. Existe aún una gran necesidad de métodos de detección sensibles, simples, rápidos, económicos y portátiles para dichos analitos<sup>9</sup>, que se encuadran dentro de lo que podríamos llamar moléculas orgánicas pequeñas.

Los sensores químicos, fundamentalmente ópticos y electroquímicos, presentan dichas características y por lo tanto son candidatos ideales para el monitoreo ambiental. Un sensor es un dispositivo capaz de transformar un cambio físico o químico en una señal eléctrica procesable. La IUPAC define un sensor químico como un dispositivo capaz de transformar la información química, que puede ir desde la concentración de un componente específico en una muestra hasta el análisis de su composición total, en una señal analíticamente útil<sup>10</sup>.

Los sensores químicos contienen básicamente dos componentes: un elemento de reconocimiento y un transductor. El elemento de reconocimiento le otorga selectividad a una determinada especie química. Luego de que ocurre el evento de reconocimiento, el transductor lo traduce en una señal analítica útil.

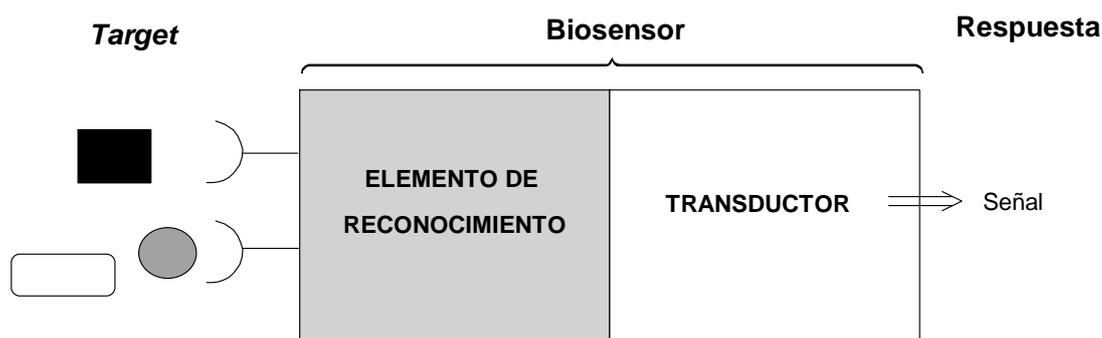
El elemento de reconocimiento puede estar basado en diferentes principios:

- principios físicos, donde no se lleva a cabo una reacción química (absorbancia, índice de refracción, conductividad, temperatura, masa, etc.).
- principios químicos, en los que una reacción química con la participación del analito (*target*) da lugar a la señal analítica (reducción de una especie, reacción de reconocimiento, etc.).

El transductor, como tal, no muestra selectividad<sup>10</sup>. Los sensores químicos se pueden clasificar, de acuerdo con el principio de funcionamiento del transductor, en dispositivos ópticos, electroquímicos, eléctricos, magnéticos, termométricos, acústicos, por ejemplo.

## 1.2. Un dispositivo: los biosensores

Cuando la reacción química involucra un proceso o una especie de origen biológico, el elemento de reconocimiento puede basarse en un principio bioquímico. En este caso los dispositivos son llamados biosensores y pueden considerarse como un subgrupo de los sensores químicos. La IUPAC define un biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un receptor o elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con el elemento transductor (*Figura 1-1*).



*Figura 1-1.* Componentes de un biosensor.

Los biosensores pueden diferenciarse en función de los elementos biológicos de reconocimiento utilizados. La naturaleza ha desarrollado un amplio conjunto de biomoléculas o estructuras biomoleculares que muestran una gran selectividad en el reconocimiento de alguna propiedad particular de un determinado *target*, de entre un

conjunto o una mezcla de ellos. Este fenómeno de reconocimiento selectivo de especies puede ser aprovechado con fines analíticos para el diseño y construcción de biosensores.

Dentro de los posibles elementos biológicos de reconocimiento se encuentran: células, membranas, enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.

En función del tipo de elemento de reconocimiento utilizado, los biosensores se pueden clasificar en: enzimáticos, de células enteras, o de afinidad<sup>11</sup>.

Las enzimas fueron los primeros elementos de reconocimiento utilizados en biosensores. Los biosensores enzimáticos miden la inhibición selectiva o la catálisis enzimática de un *target* específico<sup>12</sup>. Se han utilizado ampliamente en las últimas dos décadas en la determinación de insecticidas organofosforados<sup>13</sup>, aprovechando que dichas sustancias tienen la capacidad de inhibir la enzima colinesterasa.

Otro elemento de reconocimiento muy usado, especialmente para el monitoreo de contaminantes ambientales, son las células enteras tales como las bacterias, los hongos, las levaduras, las células animales, etc. Estos biosensores con células enteras detectan una respuesta celular relacionada con la toxicidad de una muestra y se han aplicado para la detección de *targets* de interés ambiental<sup>14</sup>, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos<sup>15</sup> y metales pesados<sup>16</sup>. Presentan ciertas ventajas, como por ejemplo, la capacidad de indicar la biodisponibilidad, esto es, el efecto y las interacciones que el *target* tiene en un sistema vivo. En contraposición a la detección instrumental que mide la concentración total del *target* en una muestra, los biosensores con células enteras miden su biodisponibilidad e indican si el mismo puede ser asimilado o puede afectar directamente a un organismo vivo, exponiendo las posibles interacciones tóxicas. Tal vez la principal dificultad en el desarrollo de dichos biosensores es lograr una adherencia del elemento de reconocimiento al transductor, ya que el mismo debe permanecer vivo para poder llevar adelante su capacidad de sensado. Los métodos más sencillos para lograrlo implican el encapsulado de la célula dentro de polímeros o geles tales como agar, agarosa, alginatos, poliacrilamida, etc. La principal dificultad radica en que la difusión del *target* a través del polímero/gel disminuye los tiempos de reacción y que el mismo puede adsorberse irreversiblemente, haciendo que el biosensor sea un dispositivo de un único uso.

Un tercer grupo de elementos de reconocimiento lo constituyen los compuestos moleculares basados en fenómenos de afinidad; se unen específicamente a *targets* individuales o grupos de *targets* estructuralmente relacionados.

### 1.2.1. Biosensores de afinidad

Los biosensores de afinidad son muy sensibles, selectivos y versátiles, ya que los elementos de reconocimiento basados en dichos fenómenos se pueden obtener para una amplia variedad de *targets*.

Los anticuerpos han sido los elementos de reconocimiento basados en fenómenos de afinidad más populares. Se han reportado una gran variedad de biosensores inmunoquímicos para diferentes aplicaciones ambientales<sup>17</sup>, resultando ser una estrategia alternativa a la determinación analítica tradicional de muestras en matrices ambientales<sup>5b</sup>.

Las principales ventajas del uso de anticuerpos son: la posibilidad de ser utilizados en dispositivos transportables a campo que en general no requieren grandes habilidades de uso, son rápidos y económicos, potencialmente aplicables a un amplio rango de *targets*, útiles sobre diferentes matrices y presentan bajos límites de detección. Sin embargo, los anticuerpos presentan algunas limitaciones para la detección de contaminantes en alimentos y en el medio ambiente. Los anticuerpos policlonales son relativamente económicos, pero su obtención implica la utilización de animales. Además del problema ético del uso de animales, resulta difícil obtener anticuerpos para compuestos tóxicos y moléculas pequeñas que no pueden provocar una respuesta inmune. Otra desventaja importante de los anticuerpos policlonales es su unión inespecífica. Esta desventaja puede ser minimizada parcialmente usando anticuerpos monoclonales, pero las técnicas de obtención de los mismos son costosas, laboriosas y requieren mucho tiempo. Por otro lado, tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales pierden sus propiedades de reconocimiento bajo condiciones ambientales, restringiendo su uso a condiciones fisiológicas. Además, son sensibles a cambios de temperatura y sufren desnaturalizaciones irreversibles, teniendo un tiempo de vida limitado. Por último, existe una falta de control molecular durante la producción *in vivo* del anticuerpo, mostrando variabilidad en el desempeño de un mismo anticuerpo obtenido en lotes diferentes.

El desarrollo de la biotecnología, la nanotecnología y la química superficial ha permitido la posibilidad de obtener novedosos elementos de reconocimiento basados en fenómenos de afinidad que permiten un desarrollo complementario al de los anticuerpos. Entre ellos se encuentran los fagos, los polímeros moleculares impresos (*molecular imprinted polymers*) y los ácidos nucleicos<sup>11</sup>.

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y usan las células de la bacteria huésped como fábrica para su propia replicación. Tienen la habilidad de exponer péptidos o proteínas en su superficie; de esta manera es posible preparar péptidos o proteínas con afinidad por toda clase de *targets*, desde moléculas pequeñas hasta proteínas, e inclusive células<sup>18</sup>. El uso de fagos como elementos de reconocimiento, presenta las ventajas de que son sensibles y específicos, su obtención es rápida, económica y no depende del uso de animales, poseen además, una gran estabilidad. La desventaja radica en que los *targets* deben ser inmovilizados durante el proceso de obtención de los fagos. En el caso de las proteínas o células, esto se puede llevar a cabo fácilmente por adsorción en superficies con afinidad por grupos polares, pero en el caso de las moléculas pequeñas, se requieren funcionalizaciones específicas que permitan su inmovilización.

Los polímeros moleculares impresos son materiales entrecruzados con sitios de reconocimiento generados artificialmente. Son capaces de unirse a un *target* imitando la actividad biológica de los receptores naturales tales como los anticuerpos. La impresión molecular involucra el armado de un “molde” de monómeros funcionales polimerizables entorno al *target*. El monómero se une al *target*, y el complejo resultante es copolimerizado con entrecruzadores en presencia de un iniciador. Luego de la polimerización, se remueve el *target* con exhaustivos lavados, dejando los sitios específicos de reconocimiento en el polímero, los cuales son complementarios al *target* en tamaño, forma y posición de los grupos funcionales. Una ventaja importante de este tipo de elementos de reconocimiento en comparación con los anticuerpos, es su gran estabilidad debido a las propiedades típicas de los polímeros tales como su elevada tolerancia térmica, química y mecánica. Además, la preparación de los mismos es relativamente fácil y económica, sin embargo, se requieren conocimientos de síntesis química, y muchas veces la eliminación del *target* luego de la polimerización resulta dificultosa. Los polímeros moleculares impresos han sido utilizados como elementos de reconocimiento en diversos sensores de moléculas pequeñas tales como la atrazina<sup>19</sup>.

Los biosensores clásicos basados en ácidos nucleicos (genosensores) se basan en la afinidad natural entre secuencias de ácido nucleicos. Gracias a la estructura tridimensional única que adquieren las secuencias de ácidos nucleicos, resulta posible diseñar biosensores basados en ácidos nucleicos para el reconocimiento de cualquier tipo de *target*.

### 1.2.1.1. Elemento de reconocimiento: Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son estructuras poliméricas, cuyos monómeros son los nucleótidos (Figura 1-2)<sup>20</sup>. Existen dos tipos de ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), que a su vez pueden encontrarse en sistemas biológicos interactuando con proteínas u organelas para dar macromoléculas de estructura y función variable.

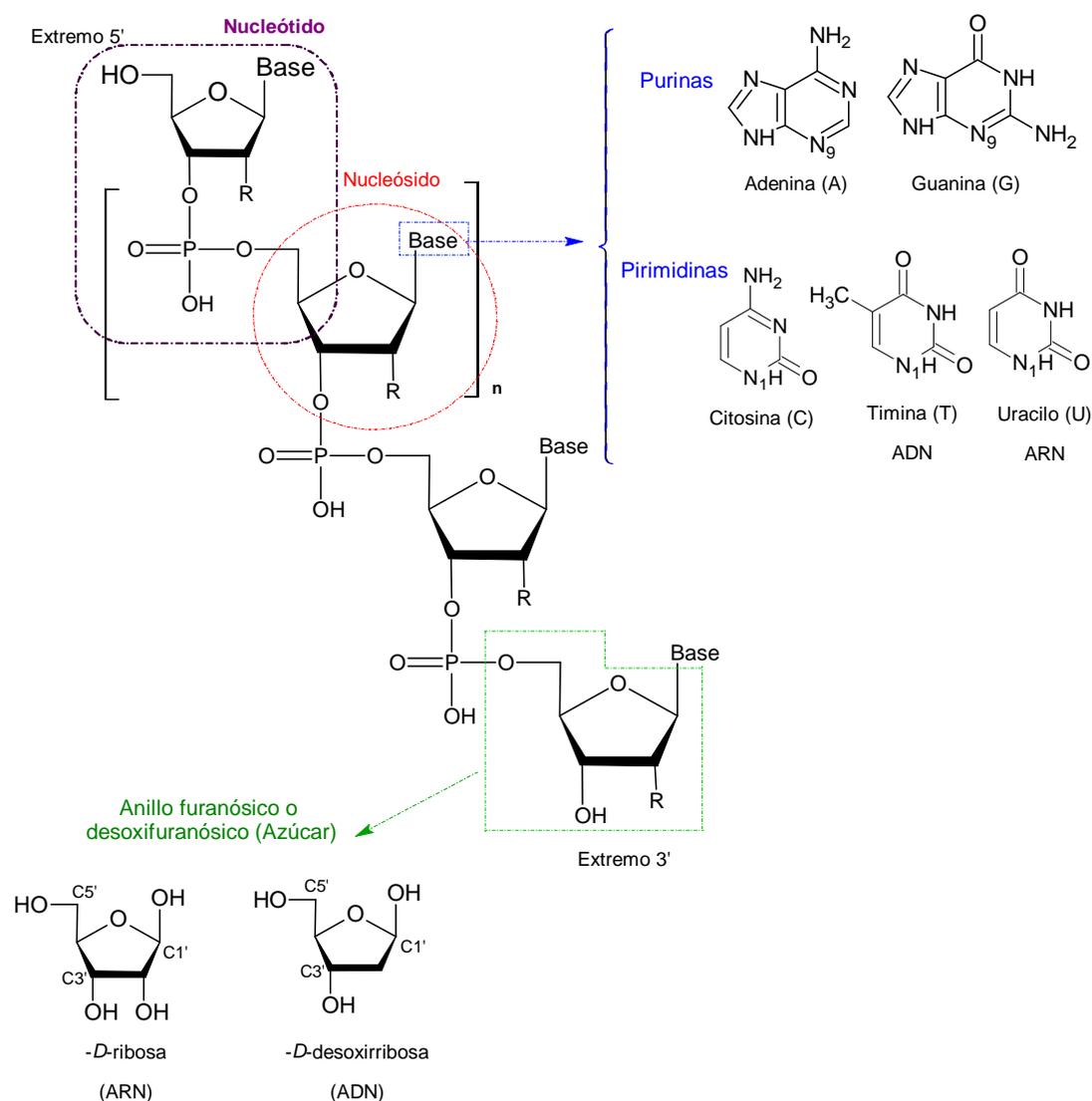


Figura 1-2. Composición de los ácidos nucleicos.

La estructura tridimensional que adquiere una secuencia de ADN o ARN está determinada por las propiedades y la conformación de los nucleótidos que la componen.

Los nucleótidos están constituidos por tres subunidades (ver *Figura 1-2*):

I. Anillo furanósico o desoxifuranósico:  $\beta$ -D-ribosa en moléculas de ARN o  $\beta$ -D-2'-desoxirribosa para el caso del ADN.

II. Grupo diéster fosfato: permite la unión entre dos nucleótidos, involucrando al oxígeno del carbono 5' de un nucleótido y al oxígeno del carbono 3' del siguiente.

III. Base nitrogenada aromática: está unida al azúcar mediante una unión  $\beta$ -glicosídica entre el carbono 1' de la pentosa y los nitrógenos de las posiciones 1 en pirimidinas (citosina, C; timina, T; uracilo, U) o 9 en bases purínicas (adenina, A; guanina, G). El plano de la base está casi perpendicular al azúcar.

El producto de la unión de la base nitrogenada al azúcar recibe el nombre de nucleósido. La esterificación entre un hidroxilo del nucleósido y el ácido fosfórico da origen a un nucleótido que son las unidades utilizadas para construir cadenas de polinucleótidos (oligonucleótidos, en el caso de cadenas cortas, hasta 100 nucleótidos).

Los oligonucleótidos pueden obtenerse utilizando sintetizadores automáticos que utilizan la estrategia de síntesis en fase heterogénea, permitiendo la preparación secuencial y ordenada de cadenas de ADN o ARN. Las reacciones se llevan a cabo en fase sólida, el primer nucleósido se encuentra unido a un soporte de sílice de poro controlado (CPG) y permanece unido hasta la finalización de la síntesis. Esta metodología utiliza la química de las cianoetilfosforamiditas<sup>21</sup>; monómeros precursores que contienen diversos grupos protectores estratégicamente diseñados para removerlos de forma selectiva y ortogonal.

La *Figura 1-3* muestra los grupos protectores característicos de dichos monómeros. El extremo 5' se protege con dimetoxitritilo (DMTr), que puede ser removido en medio ácido. La fosforamidita unida al hidroxilo 3' que tiene un grupo *N,N*-diisopropilamino, puede activarse en medio ácido y actuar como un buen grupo saliente en una reacción de sustitución nucleofílica. Los grupos protectores de las bases y del esqueleto fosfato, son lábiles en medio básico y pueden ser removidos con amoníaco concentrado al finalizar la síntesis. En el caso del ARN, resulta necesaria la protección del OH en 2', evitándose así, un posible ataque intramolecular durante las etapas de activación. Estos grupos protectores, habitualmente silanos, se remueven específicamente con la ayuda de fluoruros.

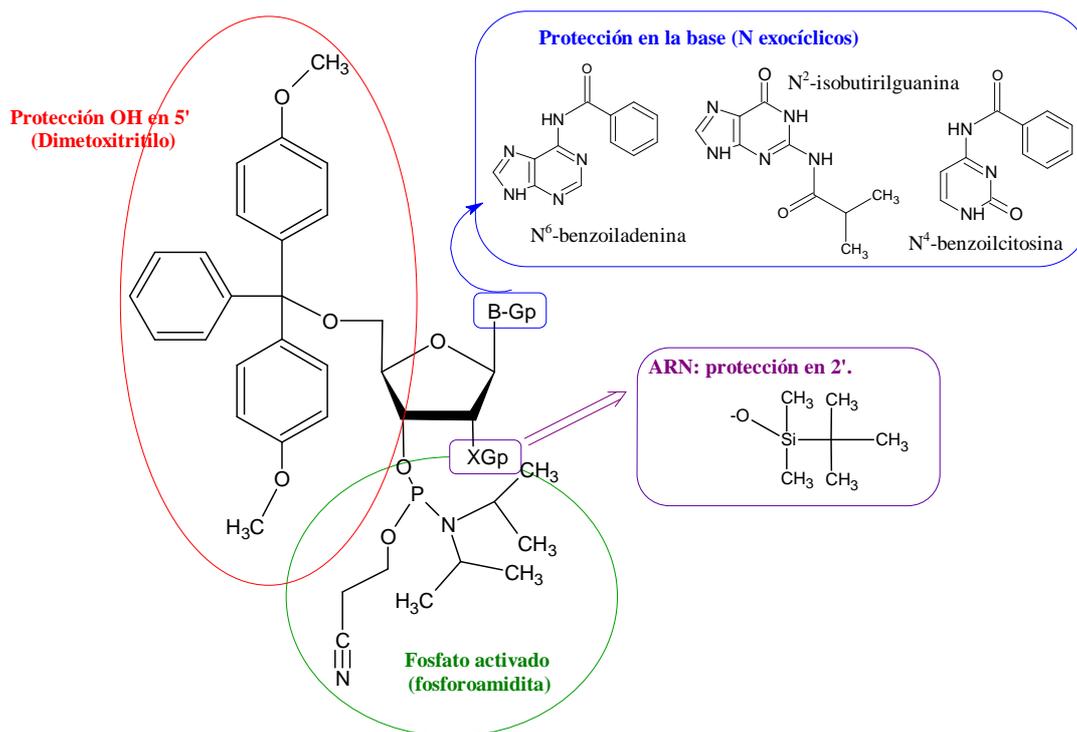


Figura 1-3. Estructura de las cianoetilfosforoamiditas.

En la *Figura 1-4* se esquematiza un ciclo de síntesis, el cual incluye los pasos para adicionar un nucleótido a la cadena. La síntesis se realiza desde la posición 3' a la 5' contrariamente a la reacción biosintética; esto se debe a la mejor eficiencia de la reacción química de condensación de monómeros. El primer paso involucra la desprotección del hidroxilo del carbono 5' previamente protegido con DMTr. Esta reacción se lleva a cabo en medio ácido, utilizando di o tricloroacético. Una vez desprotegido el extremo 5', se procede a incorporar el siguiente monómero. La fosforamidita correspondiente se activa con un ácido débil (tetrazol) en presencia de un nucleófilo (OH 5' de la cadena en formación), ocurriendo así, el acoplamiento. Dado que la extensión de la cadena no se da de forma cuantitativa, se busca bloquear las secuencias que no reaccionaron en la condensación y evitar que interfieran en los siguientes pasos de síntesis. Finalizada la etapa de acoplamiento, se trata con un agente acetilante dando origen a secuencias trunca que serán posteriormente separadas mediante una purificación cromatográfica. El siguiente paso es la oxidación del triésterfosfito usando una mezcla de I<sub>2</sub> en Piridina/Tetrahidrofurano/H<sub>2</sub>O para dar un átomo de fósforo pentavalente característico del enlace fosfato de los ácidos nucleicos. Por último, un nuevo paso de detritilación permite el comienzo del siguiente ciclo. Dado

que el catión tritilo ( $\text{DMTr}^+$ ) liberado tiene una coloración naranja, la absorbancia a 490-495 nm se utiliza como indicador de la eficiencia de acoplamiento.

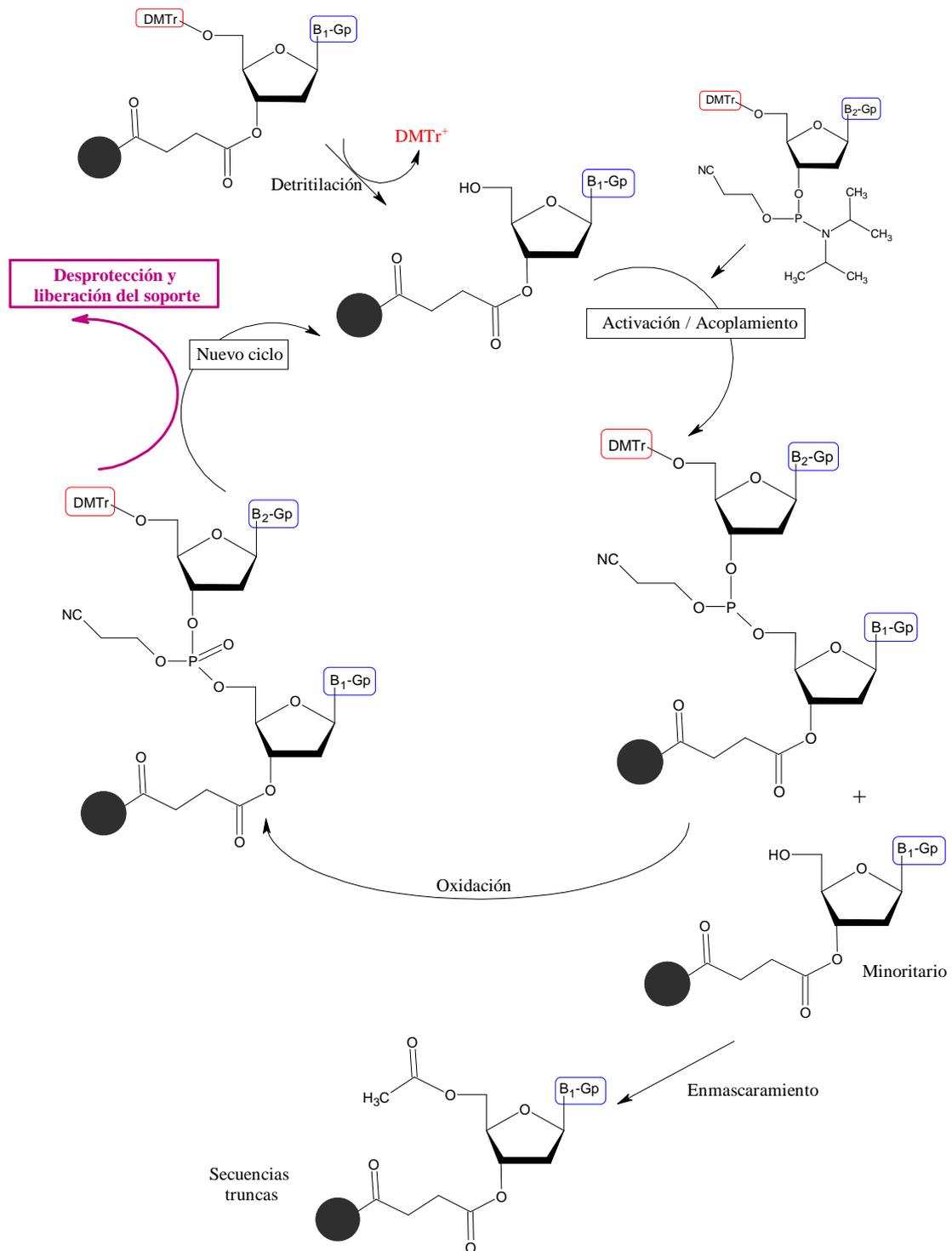


Figura 1-4. Esquema del ciclo de síntesis realizado por el sintetizador automático de oligonucleótidos.

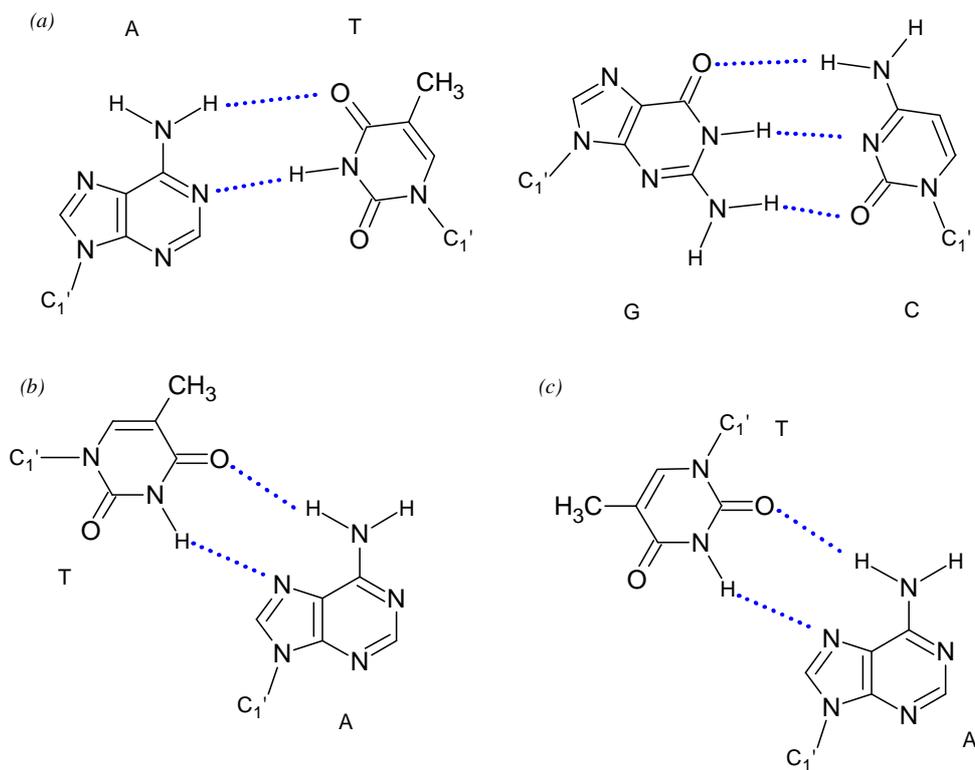
La repetición sucesiva de ciclos da origen a la secuencia de composición y largo deseados unida al soporte sólido y con los grupos protectores en las bases y en el fosfato. El tratamiento con amoníaco concentrado a 55°C permite liberar el oligonucleótido del soporte de sílice e hidrolizar los grupos protectores. Se obtiene como resultado, una mezcla de la secuencia completa (de largo  $n$ ) habitualmente acompañada de secuencias minoritarias más cortas ( $n-1$ ,  $n-2$ , etc.) y un conjunto de secuencias truncas y con los grupos protectores de las bases hidrolizados. El oligonucleótido desprotegido de la fase sólida, puede conservar el grupo protector DMTr en el extremo 5' ya que éste es lábil únicamente en medio ácido. Por ser un grupo voluminoso y lipofílico permite que la mezcla pueda ser purificada sin problemas por cromatografía de fase reversa. Por último, se aísla la secuencia deseada, se desprotege el extremo 5' en medio ácido y nuevamente se debe purificar el oligonucleótido del DMTr liberado mediante una extracción de la fase acuosa con éter etílico.

La rotación respecto a cada uno de los enlaces de los nucleótidos es la que le confiere la flexibilidad a la cadena nucleotídica y determina las propiedades macromoleculares. Al ser una zona de elevada densidad de carga negativa, la flexibilidad es necesaria para disminuir las repulsiones y dar origen a estructuras energéticamente estables. Las interacciones más importantes que presentan los ácidos nucleicos son las que involucran a las bases nitrogenadas y las relacionadas con el solvente e iones del medio. Las fuerzas presentes entre las bases se pueden agrupar en dos interacciones básicas: las de formación de puentes de hidrógeno en el mismo plano de las bases y las de apilamiento o *stacking*, que son perpendiculares a dicho plano. Estas fuerzas serán las responsables de formar estructuras macromoleculares o de posibilitar la interacción con otras moléculas.

El reconocimiento entre bases nucleicas se da por enlaces puente de hidrógeno. Existen muchos patrones posibles de formación de puentes de hidrógeno, pero en los ácidos nucleicos naturales, el modo más común es el propuesto por Watson y Crick<sup>22</sup> (Figura 1-5a). Las características de este apareamiento son la preferencia por la coplanaridad de las dos bases; la formación de tres puentes de hidrógeno para el apareamiento C-G y la formación de dos puentes de hidrógeno para el apareamiento T(U)-A.

Existen otras posibilidades de reconocimiento entre bases que difieren del propuesto por Watson y Crick, en donde pueden establecerse apareamientos no

convencionales entre dos purinas o pirimidinas. Dentro de las posibilidades se encuentran, por ejemplo, los apareamientos de *Hoogsteen*<sup>23</sup>, que involucran la participación de otros átomos de nitrógeno (*Figura 1-5b*), los de *Hoogsteen reverse*, que son similares a las anteriores pero rotando la posición de las bases (*Figura 1-5c*) o *wobble*<sup>24</sup>. Las propiedades de simetría de los pares de bases son importantes porque determinan las características estructurales de ordenamientos superiores como estructuras de doble cadena. Los apareamiento de tipo *Hoogsteen*, por ejemplo, son responsables de estructuras del tipo triples hélices.

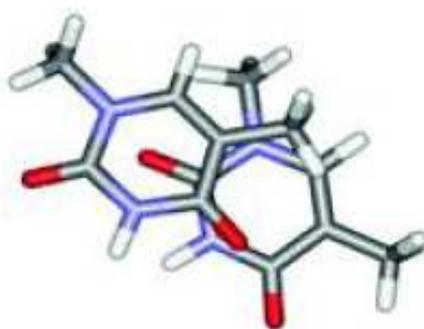


*Figura 1-5.* Interacciones puente de hidrógeno: (a) Watson y Crick, (b) *Hoogsteen*, (c) *Hoogsteen reverse*.

Además de servir para el reconocimiento horizontal entre bases, los puentes de hidrógeno son claves en muchas de las funciones que desempeñan los ácidos nucleicos. Tanto la unión específica a proteínas, como la posibilidad de unirse a pequeños ligandos se dan mayoritariamente a través de puentes de hidrógeno.

Las bases nucleicas también interactúan entre ellas por apilamiento o *stacking*. Dichas interacciones juegan un papel importante en la determinación y estabilización de las estructuras secundarias y terciarias, tanto del ADN como del ARN<sup>20a</sup>. El análisis de

las estructuras de rayos X de patrones de *stacking* de los complejos de diferentes bases libres cristalizados indica que las mismas tienden a ubicarse de forma tal de compensar los dipolos presentes y minimizar las repulsiones de tipo hidrofóbicas. Para ello, es necesario que dos bases se dispongan aproximadamente paralelas (*Figura 1-6*). Este tipo de interacción es debida mayormente a fuerzas dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y dipolo transitorio. Dichas fuerzas dependen de las bases particulares que estén interactuando, lo cual hace que la interacción de *stacking* dependa tanto de la composición de la cadena de oligonucleótido como de su secuencia.



*Figura 1-6.* Interacciones de apilamiento entre bases nitrogenadas.

Ambas interacciones (puente de hidrógeno y *stacking*) dan origen a la formación de una doble hélice cuando dos cadenas complementarias de ADN o ARN interactúan (*Figura 1-7*). En dicha hélice, el esqueleto hidrofílico de grupos fosfato y azúcares está expuesto al entorno y las bases están apiladas en el interior de la hélice, con sus planos perpendiculares al eje de la misma, generándose un surco mayor (*major groove*) y un surco menor (*minor groove*) en la superficie de la doble hélice (ver *Figura 1-7*).

La solvatación juega un papel muy importante en los cambios conformacionales de los ácidos nucleicos. Pueden distinguirse diversos grados de hidratación e interacción con los componentes de los mismos. Una primera capa de moléculas de agua corresponde a aquellas que interactúan directamente con los enlaces fosfato y los azúcares. Luego, se encuentran moléculas de agua menos estructuradas y con características similares a las del seno de la solución.

Los ácidos nucleicos son polianiones en condiciones fisiológicas y por ello normalmente están rodeados de iones o moléculas que apantallan las repulsiones de carga entre los fosfatos y las neutralizan parcialmente. En el interior celular están presentes cationes inorgánicos en concentraciones micromolares, que se hallan

normalmente unidos al ADN. Los más comunes son  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$ . Los cationes monovalentes interactúan de manera poco específica con la secuencia, en cambio, los divalentes están normalmente ligados a los oxígenos, aunque también pueden asociarse con los átomos de las bases y los azúcares o bien coordinarse a moléculas de agua para favorecer zonas específicas de interacción con el ácido nucleico. En general, los iones van a tener propiedades estabilizadoras, aunque pueden producir el efecto contrario si se trabaja a concentraciones muy elevadas.

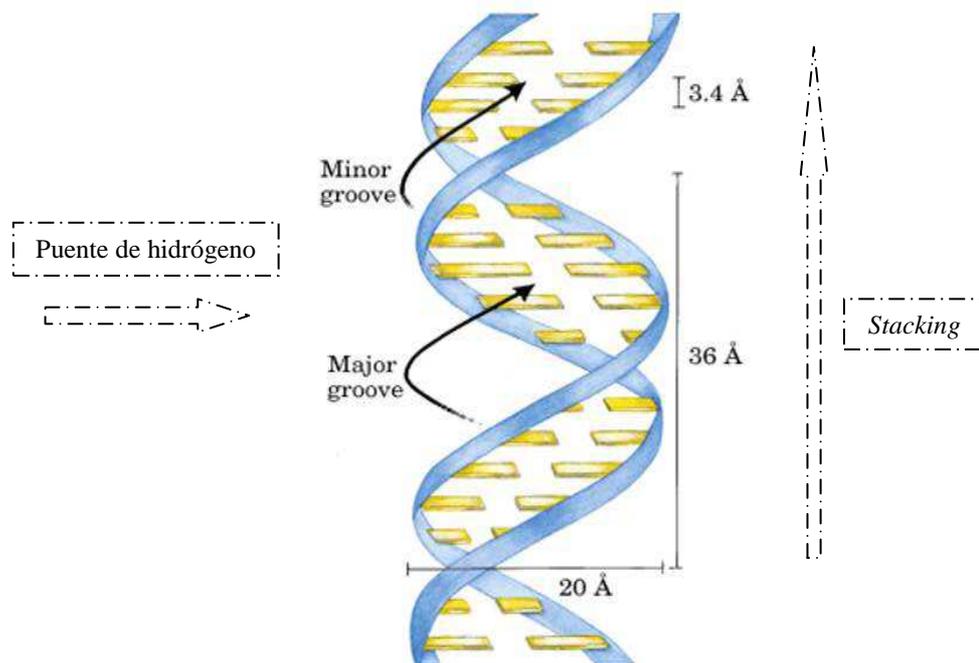


Figura 1-7. Estructura de la doble hélice.

Como resultado de las numerosas interacciones entre los componentes de los ácidos nucleicos y el entorno, se generan estructuras tridimensionales secundarias y terciarias complejas y variadas. La *Figura 1-8* muestra algunos de los patrones de estructuras secundarias que pueden encontrarse en los ácidos nucleicos naturales o sintéticos.

La estructura de los oligonucleótidos simple cadena ( $ss$ ) puede adoptar varias morfologías tridimensionales, donde se pueden reconocer en la misma molécula, pequeñas zonas doble cadena ( $ds$ ) helicoidales, con formación de *loops*, *juntions*, etc.<sup>25</sup>. Básicamente, su estabilidad está gobernada por las interacciones de *stacking* e interacciones con agua e iones. A diferencia de las estructuras simple cadena, la interacción de dos cadenas complementarias conlleva a la formación de una hélice

cuyas características pueden ser definidas con bastante precisión. En este caso, la estructura está determinada tanto por interacciones puente de hidrógeno como de *stacking*, y con los iones y solvente<sup>26</sup>.

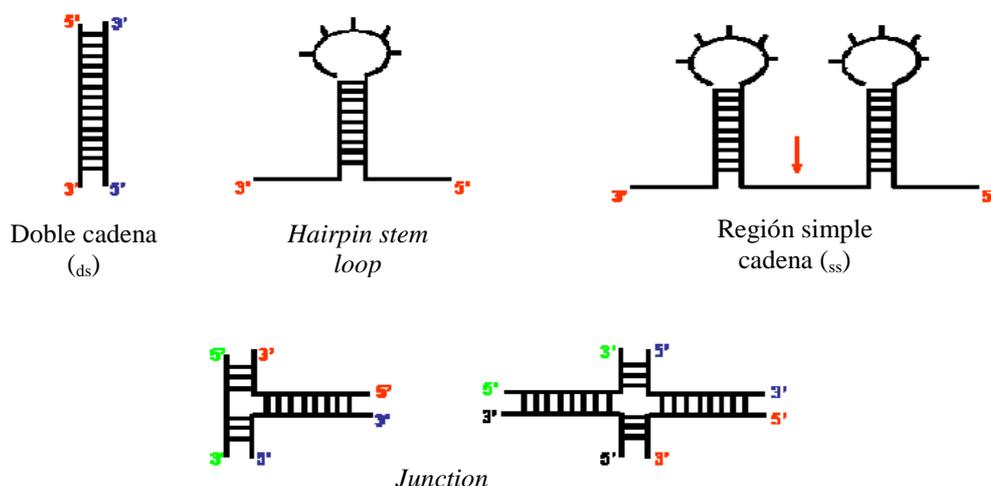


Figura 1-8. Algunas posibles estructuras secundarias de los ácidos nucleicos.

Dicha estructura es sumamente compleja y rica en información biológica. El grado de comprensión y de información estructural con el que se cuenta actualmente se ha logrado mayoritariamente por la conjunción de métodos experimentales tales como difracción de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), de absorción ultravioleta, dicroísmo circular, técnicas de microscopía y análisis computacional. De esta manera, se ha logrado generar una base de datos termodinámicos y estructurales que son de utilidad como punto de partida para un análisis detallado de la estructura de los ácidos nucleicos y su interacción con ligandos tales como proteínas, azúcares, lípidos y fármacos<sup>27</sup>. El conocimiento de la estructura y de las funciones de los ácidos nucleicos, específicamente, su capacidad de desempeñarse tanto como moléculas que contienen información, como ligandos capaces de unirse o como catalizadores, ha abierto nuevos escenarios en el desarrollo de biosensores de afinidad.

### 1.3. Una alternativa: los aptámeros

Dentro de las estrategias alternativas a la utilización de anticuerpos como elementos de reconocimiento se encuentran los ácidos nucleicos. Aprovechando la

estructura tridimensional de dichas secuencias, se los puede utilizar como polímeros capaces de funcionar como ligandos específicos.

En 1990, se desarrolló un método de selección-amplificación de oligonucleótidos<sup>28</sup>, que permitió obtener secuencias con afinidad por moléculas (*targets*) que no eran ácidos nucleicos. El proceso se denominó SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) o en términos más generales, evolución molecular *in vitro*. Los ligandos de base nucleotídica recibieron la denominación de aptámeros, palabra que deriva del latín “*aptus*” que significa “encajar”.

Los aptámeros se definen como secuencias de ADN<sub>ss</sub> o ARN<sub>ss</sub>, aisladas de colecciones combinatorias de oligonucleótidos, que son capaces de unirse por interacciones intermoleculares a un amplio rango de *targets*<sup>29</sup>, que van desde las moléculas orgánicas pequeñas<sup>30</sup>, tales como vitaminas, antibióticos, aminoácidos, nucleótidos<sup>31</sup> y péptidos, hasta las proteínas<sup>32</sup>, e inclusive las células<sup>33</sup>, con gran afinidad y selectividad<sup>34</sup>. La estructura del complejo aptámero-*target* revela la clave de las interacciones moleculares que le confieren especificidad a dicho complejo, incluyendo el *stacking* de las bases, los puentes de hidrógeno específicos, la complementariedad molecular y las fuerzas dispersivas.

La *Figura 1-9* muestra una representación simplificada de las distintas etapas involucradas en el proceso de SELEX. Se parte de una colección combinatoria de secuencias de ADN o ARN sintética (biblioteca) la cual se incuba con el *target* (selección) en un buffer específico a una dada temperatura. Cada miembro en una biblioteca es un oligómero lineal de una secuencia única. La complejidad, o la diversidad molecular, de una biblioteca depende del número de posiciones aleatorias de los nucleótidos<sup>35</sup>. Teóricamente, una biblioteca que contiene una región aleatoria de 40 nucleótidos contiene  $1,2 \times 10^{24}$  secuencias individuales ( $4^{40}$ ). Sin embargo, en la práctica, la complejidad de una biblioteca combinatoria oligonucleotídica típica obtenida por síntesis en fase sólida se limita a  $10^{14} - 10^{15}$  secuencias individuales, consecuencia de las limitaciones en la cantidad de masa de biblioteca de la cual se parte. El éxito de encontrar moléculas únicas (aptámeros) que interactúan con un *target* particular radica esencialmente en la diversidad de la biblioteca utilizada.

La biblioteca generalmente se diseña de forma de tener una región aleatoria de entre 40 - 60 nucleótidos flanqueada por dos zonas de secuencia fija. La posición de cada nucleótido en la región aleatoria se sintetiza a partir de una mezcla de

fosforoamiditas que contienen, para el caso del ADN, los cuatro nucleótidos (A, G, C y T) en proporciones acordes a la eficiencia de acoplamiento de los monómeros individuales. Como los aptámeros se pueden obtener a partir de bibliotecas de ADN así como también de ARN, las bibliotecas de ADN sintetizadas químicamente se convierten enzimáticamente a bibliotecas de ARN (Figura 1-9). Para ello se diseña un promotor para la ARN polimerasa (T7 ARN polimerasa, por ejemplo), dentro de una secuencia fija de la biblioteca para la síntesis *in vitro* de ARN<sup>36</sup>.

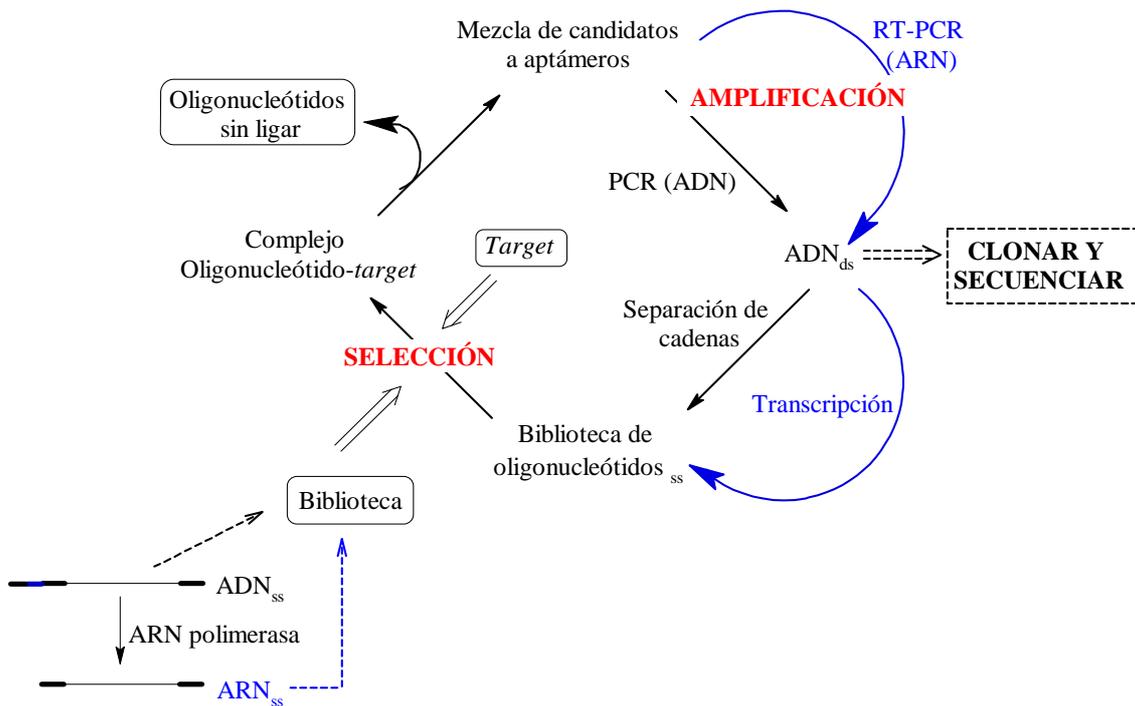


Figura 1-9. Esquema general del proceso de SELEX.

Durante la selección, una muy pequeña fracción de secuencias tienden a interactuar con el *target*, y dichas secuencias se separan del resto de la biblioteca usando alguna técnica de separación física<sup>37</sup>. Una alternativa para dicha separación, cuando los *targets* son peptídicos o proteicos, es utilizar la partición con filtros de celulosa. La selección *in vitro* de un aptámero de ARN que reconoce la T4 ADN polimerasa fue realizada por Tuerk y Gold<sup>28c</sup> utilizando membranas de nitrocelulosa. Luego de este primer logro, muchos aptámeros fueron seleccionados rápidamente usando dicha técnica de partición. La mayoría de los aptámeros seleccionados usando membranas de nitrocelulosa son aptámeros de ARN, lo que indica la idoneidad de dicha técnica de partición para separar eficientemente secuencia de ARN de sus complejos proteicos. Sin

embargo, algunos aptámeros de ADN se han seleccionado usando dicha técnica, por ejemplo el aptámero de ADN contra la proteína RecA de *E. coli*<sup>38</sup>.

Otra alternativa implica la inmovilización sobre un soporte sólido del *target* para generar una matriz de afinidad, en donde las secuencias que no interactúan con el *target* en el soporte sólido puedan ser removidas por simples pasos de lavado. Ellington y Szostak<sup>28b</sup> usaron dicha técnica de separación en la selección de un aptámero de ARN contra diferentes colorantes orgánicos. Dichas moléculas pequeñas tienen grupos donores y aceptores de hidrógeno como también superficies planas para interactuar con *beads* de agarosa. En el proceso de SELEX, el complejo aptámero-*target* se separa en la columna de agarosa, y las secuencias de ARN unidas se eluyen con soluciones de alta fuerza iónica. El uso de partículas magnéticas adsorbentes funcionalizadas con un sistema de separación magnético también se ha considerado como una herramienta útil para la separación de proteínas y ácidos nucleicos. Usando *beads* magnéticos, se ha seleccionado un aptámero de ARN contra el virus de la influenza<sup>39</sup>. Este tipo de separación magnética evita varios pasos intermedios como centrifugaciones, filtraciones, etc.

A continuación, la población de secuencias unidas al *target* (mezcla de candidatos a aptámeros, *Figura 1-9*) se aíslan y amplifican para obtener una biblioteca enriquecida que puede ser utilizada en el próximo ciclo de selección/amplificación. En el caso de partir de una biblioteca de ADN, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación; si la biblioteca es de ARN, se usa primero una etapa de transcripción a ADN con una transcriptasa inversa, seguida de una amplificación por PCR (RT-PCR). Las secuencias de ADN<sub>ss</sub> obtenidas luego de la separación de las cadenas de los productos de PCR se incuban con una muestra fresca de *target* en el siguiente ciclo de selección. La población de secuencias de ARN para el siguiente ciclo se obtiene por transcripción de los productos de PCR.

La eficiencia del enriquecimiento en secuencias que se unen al *target* con alta afinidad está gobernada por las condiciones experimentales elegidas para cada uno de los ciclos de selección (la relación de masa de biblioteca a *target*, la concentración de los cationes, la fuerza iónica, la temperatura, etc.). El progreso de dicho enriquecimiento puede determinarse llevando a cabo un análisis de afinidad de las poblaciones enriquecidas contra el *target* utilizando distintas estrategias de marcación como la isotópica y la fluorescente. Cuando se alcanza una saturación en la afinidad luego de varios ciclos de selección/amplificación, la biblioteca enriquecida se separa, se clona y

se secuencia para obtener la información de la composición de las diferentes moléculas seleccionadas. Las secuencias individuales son luego caracterizadas sobre la base de su habilidad para unirse al *target*. Generalmente, más del 90% de las secuencias en una biblioteca enriquecida son “ganadoras”, estos es, aptámeros que se unen al *target* usado en la selección<sup>40</sup>. Habitualmente es posible construir una secuencia consenso entre varios de los candidatos seleccionados, esto es, entre los candidatos que comparten rasgos comunes en la estructura primaria.

La cantidad de ciclos necesarios para la obtención de aptámeros depende, usualmente, del grado de exigencia impuesto en cada ciclo como así también de la naturaleza del *target*. En la mayoría de los casos, el enriquecimiento de afinidad se alcanza entre 8 y 15 ciclos. Existen también protocolos de SELEX automatizados para hacer que la obtención de aptámeros sea aún más rápida y más económica<sup>41</sup>, aunque no han alcanzado una gran difusión debido a lo poco generalizable de esta tecnología.

El alto grado de especificidad normalmente alcanzado para los aptámeros habitualmente es mejor que el de los anticuerpos<sup>42</sup>. Esto es un resultado de la demanda selectiva en el proceso de SELEX, que elimina las secuencias que se unen a análogos relacionados del *target*. Esto se logra con el proceso conocido como Contra-SELEX, que efectivamente descarta ligandos que tienen habilidad para unirse a análogos estructurales del *target*. En dicho proceso, la población de secuencias que se unen al *target* son sometidas a una elución de afinidad con análogos estructurales y las secuencias eluidas son descartadas. Polisky y colaboradores<sup>42</sup> seleccionaron un aptámero de ARN que reconoce teofilina con una constante de disociación ( $K_D$ ) de 0,1  $\mu$ M. Dicha afinidad es 10000 veces mayor que la afinidad de dicho aptámero por la cafeína, la cual difiere de la teofilina únicamente en un grupo metilo en el nitrógeno N-7 de su estructura. Estos autores luego del quinto ciclo de selección, cambiaron el protocolo de elución de los “candidatos”. En vez de eluir los mismos con teofilina, se eluyeron con una solución de cafeína (Contra-SELEX).

Con el objetivo de acortar los tiempos de selección de los aptámeros, el proceso de SELEXmicrofluídica (M-SELEX) integra el uso de *beads* magnéticos con la tecnología de microfluidos para aislar aptámeros en un solo paso de selección<sup>43</sup>. Dicho proceso de M-SELEX basado en un *chip*, presenta como ventaja la capacidad de controlar el campo magnético en un microcanal de forma tal de manipular la selección de las partículas magnéticas. Además, el uso de microcanales permite utilizar un pequeño número de moléculas de *target* y por lo tanto, trabajar con bajas

concentraciones del mismo. Dicha restricción crea un ambiente de competencia en la unión haciendo que sólo los aptámeros con mayor afinidad sean seleccionados. Usando esta estrategia, Soh y colaboradores<sup>43</sup> fueron capaces de seleccionar un aptámero con afinidad en el rango nanomolar para la cadena corta de la neurotoxina recombinante *Botulinum* en un único ciclo de selección.

Por otro lado, los métodos de selección basados en electroforesis capilar (CE-SELEX) aportan una metodología rápida para la partición de los aptámeros de las secuencias sin ligar durante el proceso de selección y por lo tanto reducen el tiempo del proceso. La selección se lleva a cabo en solución, evitando la necesidad de conjugar el *target* a un soporte sólido. Krylov y colaboradores<sup>44</sup> desarrollaron una técnica conocida como *non-SELEX*, donde utilizaron ciclos repetidos de partición sin la etapa de amplificación entre cada ciclo.

Una alternativa reciente para aumentar la funcionalidad de los aptámeros, especialmente aquellos que se unen a moléculas pequeñas, es incorporar alguna estructura secundaria en las secuencias de la biblioteca usadas para la selección<sup>45</sup>. Un ejemplo de estructura secundaria son las *junctions* (ver *Figura 1-8*). Dicha estructura provee una forma conveniente de generar aptámeros divididos que involucran dos secuencias de ácidos nucleicos que se autoensamblan en presencia del *target*. Heemstra y colaboradores describieron un procedimiento para seleccionar un aptámero dividido utilizando dicha arquitectura. Este método de selección muestra el potencial de ampliar el número de aptámeros que son específicos para moléculas pequeñas.

En forma equivalente a los anticuerpos, los aptámeros pueden utilizarse como elemento de reconocimiento molecular para aplicaciones analíticas. Sin embargo los aptámeros ofrecen algunas ventajas frente a los anticuerpos<sup>11,46</sup>: se pueden desarrollar contra *targets* tóxicos; en realidad, se pueden producir para cualquier molécula, aún cuando no generen una respuesta inmune; dentro de ellas, moléculas pequeñas como la adenosina, sus nucleótidos y la cocaína, las cuales han sido usadas extensamente como sistemas modelos<sup>9</sup>. Además, sus secuencias se pueden desnaturalizar-renaturalizar rápidamente, son estables largos tiempos en condiciones normales de almacenamiento y las condiciones físicas y químicas durante el proceso de selección se pueden controlar, pudiendo ser dirigidos para reconocer sitios estructurales o químicos específicos del *target*, un aspecto muchas veces imposibles en el caso de los anticuerpos<sup>47</sup>. Se producen por síntesis química lo que resulta en una gran homogeneidad de lotes de producción y una alta pureza y además, es un proceso que no requiere del uso de animales. Durante

dicha síntesis pueden ser modificados químicamente, incorporándoles marcadores específicos para el proceso de transducción (fluoróforos, marcadores redox, etc.) y/o grupos funcionales que faciliten su inmovilización sobre superficies.

Debido a su resistencia, pueden ser usados en una amplia variedad de buffers o solventes, simplificando la preparación de las muestras o haciendo posible las mediciones en extractos de compuestos poco solubles en agua. Por ejemplo, el ADN resulta estable en ciertos solventes orgánicos tales como etilenglicol, metanol, formamida, dimetilsulfóxido (DMSO), etc., formando puentes de hidrógeno<sup>48</sup>. Como se pueden seleccionar bajo condiciones no fisiológicas y/o condiciones de matrices reales, resultan particularmente útiles para el sensado de muestras alimenticias o ambientales<sup>49</sup>.

En comparación con los anticuerpos, presentan una alta especificidad pudiendo discriminar un *target* de moléculas con diferencias estructurales sutiles, como la presencia o ausencia de un grupo metilo<sup>42,50</sup> o un grupo oxhidrilo<sup>51</sup>. Presentan  $K_D$  que van desde el rango picomolar hasta micromolar. Otro aspecto interesante es que el evento de reconocimiento molecular suele estar asociado a un cambio conformacional del aptámero, lo que ofrece flexibilidad en el diseño de aptasensores.

Por las razones antes enumeradas el desarrollo de métodos alternativos de detección de moléculas utilizando aptámeros en lugar de anticuerpos ha alcanzado un importante grado de evolución, de forma tal que muchas de las estrategias inmunoquímicas para el desarrollo de una señal luego del evento de reconocimiento fueron extrapoladas al campo de los aptámeros<sup>52</sup>. En relación con las aplicaciones medicinales, se ha aprobado recientemente el uso de un aptámero contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por la *US Food and Drug Administration* para el caso de maculopatías degenerativas, lo cual abre el potencial de los aptámeros en las aplicaciones terapéuticas<sup>53</sup>.

Aunque se han obtenido aptámeros a través del proceso de SELEX utilizando ADN y ARN nativo, la composición de dichas secuencias es susceptible a la degradación mediada por nucleasas<sup>54</sup> y en menor medida a una degradación química y física. El grupo oxhidrilo en el carbono 2' del azúcar en el ARN adyacente al átomo de fósforo electrofílico en el puente fosfodiéster, hace que el ARN sea químicamente inestable bajo condiciones de elevado pH y temperatura. El ADN no posee un grupo oxhidrilo en el carbono 2' y por lo tanto, es mucho más estable frente a la hidrólisis en las mismas condiciones. De todas maneras, si bien la estabilidad de las secuencias de ARN y ADN en medios biológicos como el suero es muy dependiente de la secuencia y

estructura de las mismas, la velocidad de degradación en este caso suele ser mucho mayor que en condiciones estrictamente químicas.

La velocidad de la degradación mediada por nucleasas puede disminuirse considerablemente introduciendo sustituciones químicas en el esqueleto del ácido nucleico, principalmente modificaciones en la posición 2' de las pirimidinas<sup>55</sup>. Otra modificación estabilizadora comúnmente utilizada es la sustitución del puente fosfodiéster con un puente fosforotioato (Figura 1-10).

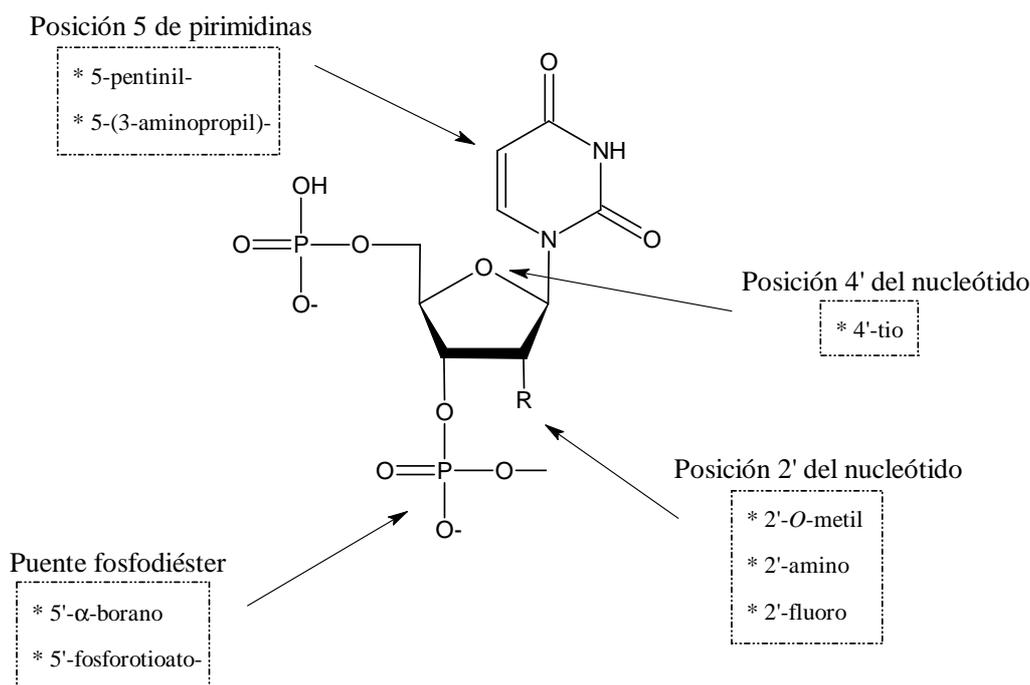


Figura 1-10. Posiciones susceptibles de modificación en la estructura del ADN/ARN.

Los avances en las terapias antisentido han contribuido a desarrollar una variedad de modificaciones químicas que pueden estabilizar los oligonucleótidos<sup>56</sup>, pero con la posible consecuencia de que dichas modificaciones debiliten las interacciones entre los aptámeros y sus *targets* alterando el plegamiento de los mismos cuando son aplicadas post-selección.

Una estrategia alternativa es llevar a cabo el proceso de SELEX usando una biblioteca de oligonucleótidos modificada (Mod-SELEX)<sup>57</sup>. Se han seleccionado aptámeros de ADN y ARN con alta afinidad y especificidad para una amplia variedad de *targets* como proteínas, péptidos y pequeñas moléculas, lo que sugiere que la base nitrogenada, el azúcar y el grupo fosfodiéster presentan la diversidad superficial

suficiente para el reconocimiento del *target*. De esta manera, el uso del proceso de Mod-SELEX, además de producir moléculas más estables, abre la posibilidad de obtener aptámeros con conformaciones y superficies de reconocimiento del *target* no accesibles en el ADN o ARN nativo.

Para poder llevar a cabo el proceso de Mod-SELEX, las bibliotecas modificadas químicamente deben ser sustratos en las etapas enzimáticas del proceso de SELEX que incluyen la amplificación directa usando ADN polimerasas, y la transcripción reversa de la biblioteca modificada en ADN seguida de la transcripción a base ARN (ver *Figura 1-9*). Se han reportado variantes mutadas de diversas polimerasas nativas que “aceptan”, como sustratos, nucleótidos modificados. Sousa y Padilla mostraron la utilización de una variante mutada de la T7 ARN polimerasa para polimerizar nucleótidos trifosfato de 2'-fluoropirimidinas y 2'-aminopirimidinas<sup>58</sup>. Otros trabajos llevaron al desarrollo de T7 ARN polimerasas mutadas capaces de utilizar como sustratos grupos más voluminosos en la posición 2' del azúcar, incluyendo los grupos metoxilo<sup>59</sup>.

Algunos de los nucleótidos modificados que se pueden utilizar en el proceso de SELEX con enzimas nativas se muestran en la *Figura 1-10*. Jayasena y colaboradores<sup>60</sup> seleccionaron un aptámero para la enzima elastasa usando una biblioteca que incluía 2'-aminopirimidinas y 2'-hidroxipurinas (nativas). Posteriormente, se seleccionó un aptámero con alta afinidad ( $K_D = 350$  pM) para el factor de crecimiento de fibroblastos usando la misma composición en la biblioteca<sup>61</sup>. Dicho aptámero resultó mil veces más estable en suero humano y en orina que su análogo de ARN nativo. La desventaja de este tipo de modificaciones es la dificultad para sintetizar las secuencias modificadas en la síntesis en fase sólida.

Otras moléculas que pueden ser sustratos de las polimerasas nativas y aportar resistencia a nucleasas son las 2'-fluoropirimidinas. Bibliotecas con dicha modificación fueron el punto de partida para la obtención del primer aptámero clínicamente aprobado para el uso terapéutico en humanos en Estados Unidos, el Macugen<sup>62</sup>.

Los 2'-*O*-metil nucleótidos son más económicos que sus análogos 2'-amino, 2'-fluoro o 2'-ribo nucleótidos. Keefe y colaboradores<sup>63</sup> llevaron adelante el proceso de SELEX para el VEGF<sub>165</sub> usando una librería que contenía diferentes proporciones de 2'-*O*-metil pirimidinas y purinas. Se utilizó una mutante de la T7 polimerasa para la amplificación, usando condiciones optimizadas para la transcripción de oligonucleótidos con un alto contenido de grupos metoxilos en la posición 2'. Dicho aptámero resultó estable frente a la degradación en suero *in vitro* por 48 horas. En un

segundo trabajo del mismo grupo se reportó la obtención de un aptámero para trombina partiendo de una biblioteca similar<sup>64</sup>.

Otra modificación posible es el puente boranofosfato. Éste se puede introducir en transcritos usando la T7 ARN polimerasa nativa y 5'- $\alpha$ -P-borano trifosfato nucleótidos. Dicho puente es isostérico e isoelectrónico con el puente fosfodiéster, pero es mucho más resistente a nucleasas<sup>65</sup>. Burke y colaboradores<sup>66</sup> han reportado la obtención de un aptámero para ATP usando bibliotecas que contenían nucleótidos modificados con boro.

El átomo de oxígeno en 4' del azúcar del nucleótido resulta una posición alternativa que puede ser susceptible de modificar. Matsuda y colaboradores<sup>70</sup> desarrollaron bibliotecas conteniendo 4'-tio UTP y CTP. Se preveía que dicha modificación aumentaría la resistencia a nucleasas y la fuerza de apareamiento entre las bases y por lo tanto, la estabilidad térmica de los aptámeros. Se llevó adelante el proceso de SELEX contra trombina y el aptámero obtenido mostró una  $K_D$  de 5 nM. Los autores mostraron que el ARN con grupos 4'-tio en cada purina es aproximadamente 50 veces más resistente que el ARN nativo.

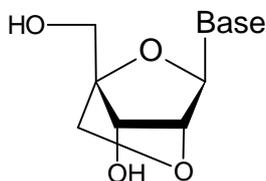
El puente internucleótido fosforotioato ha sido incorporado en terapias de antisentido desde hace aproximadamente una década, ya que aumenta la resistencia a nucleasas manteniendo la actividad RNasa H (capacidad de degradar ARN en híbridos ADN-ARN). En dicha modificación, el oxígeno libre del enlace fosfodiéster es reemplazado por un azufre. Estas modificaciones tienen la ventaja de que pueden ser sintetizadas con facilidad y presentan un incremento importante en la vida media del oligonucleótido. El puente fosforotioato generado es quiral y los oligonucleótidos que lo contienen son mezclas diastereoisoméricas. Gorenstein y colaboradores<sup>71</sup> seleccionaron un aptámero con alta afinidad ( $K_D$  7 nM) contra la proteína de la cápsula del virus de la encefalitis equina venezolana usando una biblioteca de ADN en la cual todos los puentes internucleotídicos de las A y C fueron fosforotioatos. El inconveniente de estas modificaciones es el efecto de unión inespecífica contra proteínas extra e intracelulares<sup>72</sup>.

Por otro lado, las modificaciones en la posición 5' de algunas bases, principalmente U, son las más aceptadas por las polimerasas nativas y permiten aumentar la diversidad funcional del nucleótido modificado. Latham y colaboradores<sup>67</sup> reportaron un aptámero de ADN contra trombina usando una biblioteca de ADN que contiene 5-pentil-2'-desoxiuridina. La secuencia del aptámero obtenido resultó

diferente de la previamente reportada para el mismo *target* utilizando una biblioteca de ADN nativo<sup>68</sup>, aunque la afinidad fue de 4 a 10 veces menor. Una biblioteca de ARN conteniendo 5-(3-aminopropil)desoxiuridina se usó para generar un aptámero contra ATP que mostró una  $K_D$  entorno de  $1 \mu M$ <sup>69</sup>.

El uso de las diferentes modificaciones antes mencionadas aumentan significativamente el tiempo de vida biológico de los aptámeros, sin embargo, dichas secuencias siguen siendo sustratos de las actividades metabólicas *in vivo*. Una alternativa para identificar oligonucleótidos resistentes a nucleasas implica la utilización de principios de quiralidad en el proceso *in vitro* de selección. Las primeras aplicaciones de esta técnica llevaron a la identificación de ligandos de ARN y ADN *L*-enantioméricos, llamados *Spiegelmers*, que se unen a arginina<sup>73</sup> y adenosina<sup>74</sup>. Los *Spiegelmers* reconocen a sus *targets* de la misma forma que los aptámeros, pero no son susceptibles a la degradación enzimática por nucleasas<sup>75</sup>. Para identificar un *Spiegelmer*, se debe sintetizar la imagen especular del *target*. Al realizar el proceso de SELEX, se seleccionan las secuencias aptaméricas (*D*-ácidos nucleicos) contra dichas imágenes especulares. Luego de la síntesis de las secuencias aptaméricas en su forma *L*-enantiomérica, el *Spiegelmer* resultante reconoce al *target* en su forma nativa con afinidad comparable<sup>76</sup>. Cabe destacar que en la mayoría de los casos publicados, los *targets* son moléculas pequeñas y por lo tanto, los respectivos enantiómeros se pueden sintetizar químicamente.

Los monómeros LNA (*Lock Nucleic Acids*) son 2'-*O*-4'-*C*-metilen- $\beta$ -*D*-ribofuranosilnucleósidos<sup>77</sup>. Se caracterizan por tener como azúcar una furanosa bicíclica con un puente entre el oxígeno del carbono 2' y el carbono 4' (*Figura 1-11*).



*Figura 1-11.* Estructura de los LNA.

Las secuencias de ADN que contienen dichos monómeros se caracterizan por su gran resistencia frente a las nucleasas<sup>78</sup>, por lo tanto, se ha avanzado en seleccionar aptámeros utilizando bibliotecas modificadas con LNAs. La única limitación es el uso

de polimerasas mutadas en la etapa de amplificación del proceso de SELEX de forma tal de que reconozcan dichos monómeros. Kuwahara y colaboradores<sup>79</sup> han seleccionado recientemente, un aptámero para trombina utilizando una biblioteca de ADN/LNA.

Un inconveniente asociado a la obtención de los aptámeros es que no existe un protocolo estandarizado para el proceso de selección, ya que las diferentes secuencias se seleccionan bajo condiciones diferentes y dichas condiciones son las que se deben utilizar para su funcionalidad. Además, los aptámeros son muy diversos en su composición (ADN, ARN, nativo y modificado), longitud, y características estructurales. Esta diversidad complica la transferencia de un ensayo de un aptámero a otro e implica la optimización del ensayo con cada aptámero. En contraste, los anticuerpos son biomoléculas altamente conservadas que permiten la transferencia de los ensayos con los diferentes anticuerpos.

## 1.4. Aptasensores

### 1.4.1. Inmovilización

La inmovilización es importante para el desarrollo y la integración de los aptámeros en diversos dispositivos. En los aptasensores, los aptámeros pueden ser anclados a una amplia variedad de superficies. Es importante que la estrategia de inmovilización permita que los mismos, en la superficie, mantengan su capacidad de reconocimiento y selectividad<sup>80</sup>. Esto se logra generalmente, anclando covalentemente el aptámero a una superficie modificada, o acoplándole un *linker* al mismo, y en algunos casos, a través de una fisorción no covalente.

En experimentos electroquímicos y de resonancia de plasmón superficial (SPR) es habitual la utilización de sustratos metálicos como soporte de la inmovilización. El oro es posiblemente el elemento más usado, fundamentalmente debido a la facilidad de formación de monocapas de sustancias ancladas por interacciones S-Au. En menor medida se utilizan otros sustratos, como nanotubos de carbono (NTC) y polímeros soportados sobre vidrio<sup>81</sup>; también silicio para algunas aplicaciones de microbalanza de cuarzo (QCM).

Se han desarrollado diversas estrategias de inmovilización de aptámeros, que dependen de la composición química de la superficie, la presencia de grupos de anclaje

en los aptámeros y la química utilizada para dicho anclaje. A continuación se describirán los más utilizados.

#### 1.4.1.1. Oro

El primer aptasensor sobre oro fue reportado en 2002<sup>82</sup>. Dicho metal resulta estable al aire y comercialmente disponible, como films y/o partículas. El método más utilizado para la inmovilización de los aptámeros sobre superficies de oro es a través de interacciones S-Au<sup>83</sup>, de forma similar a la formación de monocapas autoensambladas de alcanotioles (SAMs)<sup>84</sup>. En este caso se utilizan aptámeros funcionalizados, en los cuales se introduce químicamente la modificación tiol/disulfuro en los extremos de los mismos. Dichos aptámeros modificados se quimisorben espontáneamente sobre la superficie de oro. Esta estrategia de inmovilización de ADN ha sido usada por Tarlov<sup>85</sup> y otros<sup>86</sup>, que han estudiado el efecto de la densidad superficial y de las uniones no específicas en función de ciertos parámetros críticos.

Una alternativa atractiva consiste en el empleo de un grupo fosforotioato (Ts), en el cual uno de los oxígenos no enlazados del fosfodiéster se reemplaza por un azufre (ver *Figura 1-10*). Dicho grupo, además de ser más económico, ofrece otras ventajas frente al grupo tiol, como el poder ser introducido en cualquier posición de la secuencia<sup>87</sup>. El mismo puede ser obtenido en fase sólida usando el reactivo de Beaucage<sup>88</sup>.

La inmovilización de los aptámeros sobre oro también se puede lograr a través de interacciones específicas aprovechando la formación del complejo biotina-estreptavidina/avidina/neutravidina (constante de afinidad,  $K_A = 10^{15} \text{ M}$ )<sup>89</sup>. Esta técnica presenta la ventaja del control en la orientación de las moléculas inmovilizadas. Fu y colaboradores<sup>90</sup> inmovilizaron el aptámero contra IgE modificado con biotina en el extremo 5'. Se emplearon superficies de oro depositadas sobre un cristal de cuarzo, las que fueron previamente activadas con di(*N*-succinimidil)-3,3'-ditiodipropionato y avidina.

#### 1.4.1.2. Nanotubos de carbono (NTC)

La inmovilización de aptámeros en NTC generalmente involucra la modificación de los mismos antes del anclaje del aptámero a la superficie. La inmovilización de

aptámeros sobre las paredes de NTC, demostrada por Maehashi y colaboradores<sup>91</sup>, se logró utilizando dimetilformamida (DMF) como *linker*. Los aptámeros contra IgE se acoplaron luego covalentemente a través del grupo amino presente en el extremo 5' de los mismos. Merkoçi y colaboradores<sup>92</sup> desarrollaron un aptasensor para la detección de trombina inmovilizando el aptámero sobre NTC multipared soportados sobre electrotransductores de carbón serigrafados. El aptámero modificado con un grupo amino en el extremo 5' se inmovilizó sobre las superficies de los NTC a través de la activación con una carbodiimida.

### 1.4.1.3. Otros

El primer trabajo de inmovilización de aptámeros sobre un sustrato de vidrio fue reportado por Hieftje y colaboradores<sup>93</sup> en 1998, donde inmovilizaron el aptámero contra trombina modificado con un grupo amino en el extremo 3', utilizando el anclaje covalente a la superficie de vidrio a través de grupos imidazoles. Recientemente, Gaub y colaboradores<sup>94</sup> llevaron adelante la inmovilización de un aptámero sobre un sustrato de vidrio y polidimetilsiloxano, a través de estructuras de ADN<sub>ds</sub>, utilizando grupos aldehídos.

## 1.4.2. Transducción

Cuando los aptámeros interactúan con sus *targets*, generan un complejo aptámero-*target* con una conformación tridimensional específica. De acuerdo a la posición espacial relativa entre el *target* y el aptámero en el complejo formado, los *targets* se pueden dividir en dos grupos: grupo integrado (*embedded group*) o grupo de unión externa (*outside-binding group*). Los ligandos que pertenecen al primer grupo se localizan dentro de un bolsillo pequeño de unión formado por una secuencia especial de oligonucleótidos en el aptámero. Las moléculas pequeñas, tales como el adenosín trifosfato (ATP)<sup>95</sup>, cocaína<sup>96</sup> y teofilina<sup>97</sup>, son *targets* típicos que pertenecen a este grupo. Las biomacromoléculas, típicamente los *targets* proteicos, que poseen estructuras espaciales complejas y de alto peso molecular, pertenecen al grupo de unión externa. Algunas proteínas, como la trombina, tienen más de un sitio de unión al aptámero<sup>68</sup>, lo cual ofrece diversos diseños en las estrategias de sensado.

Se han reportado diferentes trabajos vinculados con la construcción de aptasensores. Dichos dispositivos se basan en diversas metodologías de transducción, incluyendo aptasensores electroquímicos, ópticos, acústicos, etc. El punto principal en el desarrollo de los mismos es producir una señal medible a partir de la interacción aptámero-*target*. Basado en estas consideraciones generales, Zhou y colaboradores han dividido las estrategias en cuatro tipos diferentes<sup>98</sup>:

- i. *Target-induced structure switching* (TISS)
- ii. *Sandwich* o *sandwich-like*
- iii. *Target-induced dissociation* o *displacement* (TID)
- iv. *Competitive replacement*

#### **1.4.2.1. Aptasensores basados en el tipo *target-induced structure switching* (TISS)**

En este caso, el *target* se une directamente al aptámero, junto con el correspondiente cambio conformacional del aptámero de una conformación desestructurada a un patrón específico, lo que consecuentemente lleva a cambios detectables que incluyen:

- (a) La posición, cantidad o estado de los marcadores, que se unen covalentemente al extremo del aptámero o se adsorben sobre el aptámero por fuerzas electrostáticas, de *stacking*, puentes de hidrógeno, etc.
- (b) El tamaño o la masa del aptámero, que acompaña a la formación del complejo aptámero-*target*.
- (c) Otras propiedades de los aptámeros, tales como la capacidad de estabilizar nanopartículas de oro (AuNPs), etc.

El diseño de tipo TISS se adapta a ambos grupos de *targets*. Se han reportado diversos aptasensores del tipo TISS, tales como los *aptamer beacons*<sup>99</sup> y los *target-responsive electrochemical aptamer switch* (TREAS)<sup>100</sup>.

##### **1.4.2.1.1. Aptasensores del tipo TISS con transducción electroquímica**

La transducción electroquímica es muy frecuente en aptasensores para determinar contaminantes en alimentos y medio ambiente ya que dichos sensores son fáciles de

usar, rápidos, sensibles, económicos y se pueden miniaturizar, por lo tanto, proveen dispositivos para el monitoreo *in situ*<sup>101</sup>. Incluyen una variedad de técnicas, como la voltametría, la amperometría y la espectroscopía de impedancia, que pueden ser elegidas dependiendo de la aplicación específica requerida.

En el caso de los aptasensores electroquímicos del tipo TISS, luego de la unión del *target* al aptámero inmovilizado en la superficie de un electrodo, los aptámeros cambian de una conformación flexible (*random-coil*) a una estructura terciaria rígida. Dicho cambio conformacional puede modificar la posición relativa con respecto a la superficie del electrodo, de marcadores redox (azul de metileno (MB), Ferroceno (Fc), etc.) que están unidos covalentemente al extremo del aptámero, generando un cambio en la señal electroquímica de los mismos. Pueden ser del tipo *signal-on*<sup>102</sup>, donde el cambio conformacional acerca el marcador redox a la superficie del electrodo (*Figura 1-12a*) o *signal-off*, donde se evidencia una disminución de la señal electroquímica al alejarse el marcador redox de la superficie del electrodo (*Figura 1-12b*).

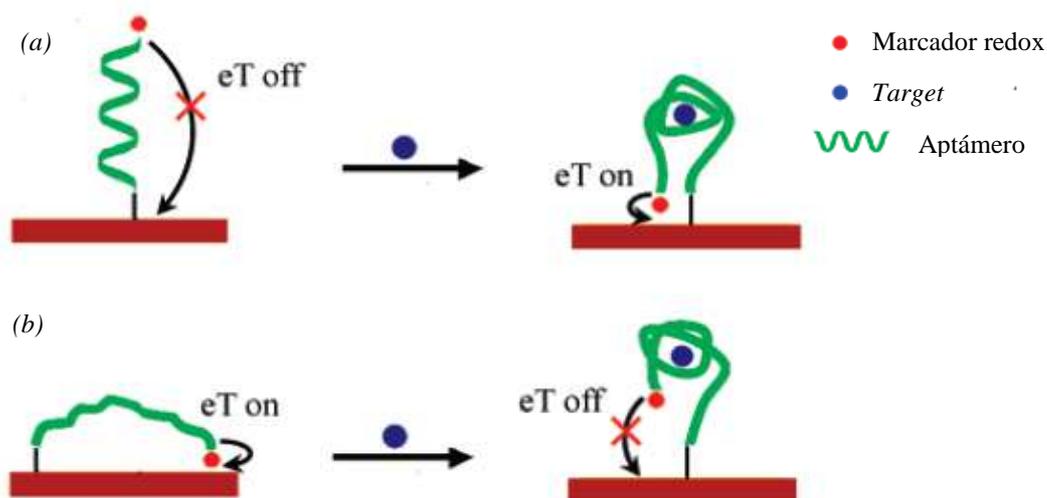


Figura 1-12. Aptasensor electroquímico de tipo TISS (a) *signal-on* (b) *signal-off*.

Gothelf y colaboradores<sup>103</sup> inmovilizaron covalentemente el aptámero contra teofilina modificado con Fc sobre un electrodo de oro. En ausencia de teofilina el aptámero está en una conformación flexible, y el Fc, distante del electrodo, de forma tal que la transferencia de carga (eT) es mínima. En presencia de teofilina, el aptámero se pliega en una estructura del tipo *hairpin*, y dicho cambio conformacional aumenta la eficiencia de la eT entre el Fc y la superficie del electrodo.

En el campo de la detección de productos fitosanitarios de interés ambiental, Zhao y colaboradores<sup>104</sup> desarrollaron un aptasensor electroquímico de tipo TISS para acetamiprida, un insecticida de la familia de los neonicotinoides. Para aumentar la sensibilidad del aptasensor, se electrodepositaron AuNPs en la superficie de un electrodo de oro. Dicho sistema se utilizó como plataforma para la inmovilización del aptámero. Con el agregado del *target*, la formación del complejo aptámero-acetamiprida resulta en un aumento de la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{et}$ ) dependiente de la concentración del *target*, lo cual puede ser detectado por espectroscopía de impedancia electroquímica (Figura 1-13). Se informó un rango lineal para la cuantificación de 5 nM a 600 nM con un límite de detección de 1 nM.

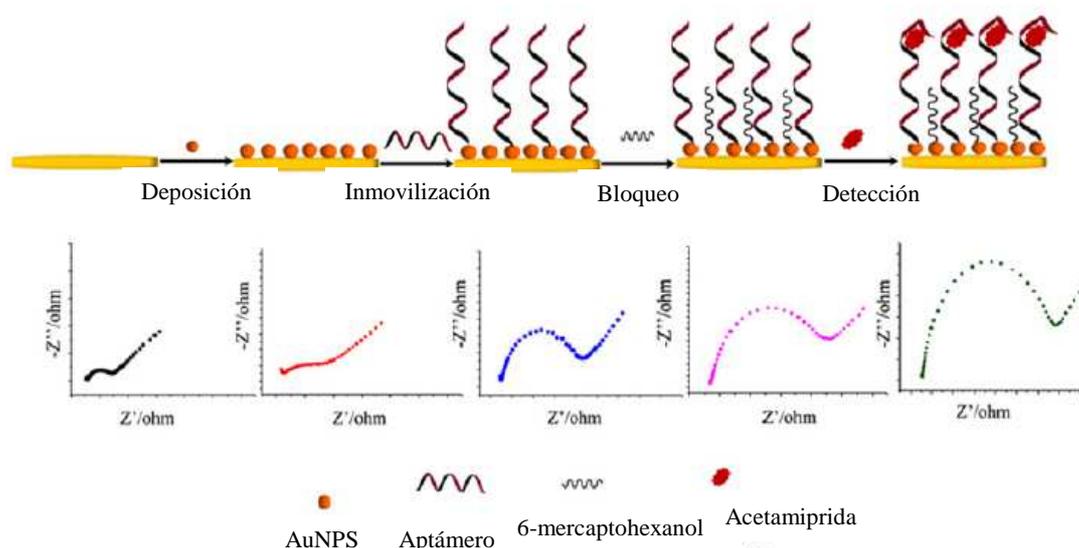


Figura 1-13. Aptasensor electroquímico de tipo TISS para acetamiprida desarrollado por Zhao y colaboradores<sup>104</sup> y respuesta típica por espectroscopía de impedancia electroquímica para las diferentes etapas de su construcción y uso.

Plaxco y colaboradores<sup>105</sup> pusieron a punto un aptasensor para trombina utilizando un aptámero marcado con MB. Antes del reconocimiento del *target*, el marcador redox puede transferir electrones a la superficie del electrodo debido a la conformación flexible del aptámero. Sin embargo, una vez que la trombina es capturada por el aptámero, el MB se mantiene alejado de la superficie del electrodo, resultando en una disminución de la señal electroquímica.

Los aptasensores de tipo *signal-on* producen una señal positiva, lo cual amplía el rango de detección. Sin embargo, la flexibilidad de los aptámeros inmovilizados en la

superficie de un electrodo puede generar señales de base (*background*) y afectar la reproducibilidad de los mismos. Para evitar dicho problema, el aptámero inmovilizado se puede hibridar con su secuencia complementaria formando secuencias de ADN<sub>ds</sub>. De esta forma se minimiza la eT en ausencia del *target*, ya que el aptámero se encuentra en una estructura rígida, alejando el marcador redox de la superficie del electrodo. En presencia del *target*, la secuencia complementaria se libera y el aptámero cambia a la estructura terciaria rígida unida al *target*, acercando, en general, el marcador redox a la superficie del electrodo. Esta estrategia de sensado se conoce como TREAS (Figura 1-14).

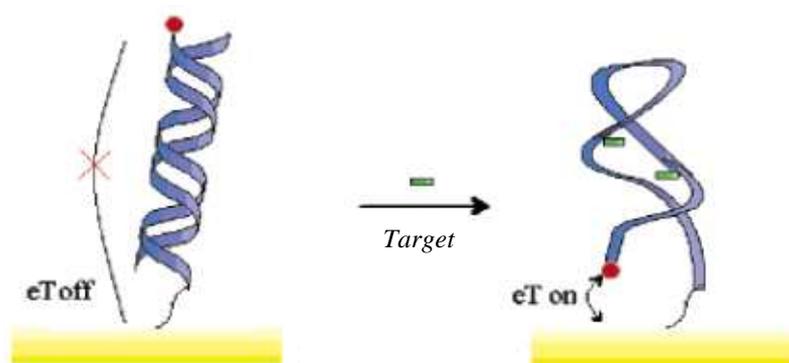


Figura 1-14. Aptasensor electroquímico de tipo TREAS.

Fan y colaboradores<sup>100</sup> desarrollaron un aptasensor de tipo TREAS *signal-on* para detectar ATP con alta sensibilidad y selectividad. Inmovilizaron el aptámero, en su forma de ADN<sub>ds</sub>, doblemente marcado con un grupo tiol en el extremo 3' y un Fc en el 5', sobre superficies de oro. El Fc se encuentra alejado de la superficie del electrodo (aproximadamente 10 nm) y por lo tanto no puede intercambiar electrones eficientemente con la superficie de oro. En presencia de ATP, se estabiliza la estructura terciaria del aptámero, la cual deshibridiza el ADN<sub>ds</sub> liberando la secuencia complementaria. Como consecuencia, el Fc se acerca a la superficie del electrodo generando una señal electroquímica medible (eT on). En ese caso, el diseño de la secuencia complementaria es importante. La constante de disociación del aptámero y su secuencia complementaria, junto con la constante de disociación del aptámero y su *target*, influyen marcadamente en el desempeño de dichos aptasensores.

### 1.4.2.1.2. Aptasensores del tipo TISS con transducción óptica

Los aptámeros han sido ampliamente utilizados como elementos de reconocimiento en aptasensores ópticos, tanto en sistemas con marcación como en aquellos libres de marca (*label-free*). Las técnicas más usadas son fluorescencia y colorimetría (UV-vis).

En los *aptamer beacons*<sup>106</sup>, se acoplan en los extremos de la secuencia del aptámero (*Figura 1-15a*)<sup>107</sup> o de su secuencia complementaria (*Figura 1-15b*)<sup>108</sup>, un fluoróforo (F) que puede generar una señal fluorescente detectable y un *quencher* (Q) que puede inhibir dicha señal. La posición relativa del F y del Q, que determina la intensidad de la señal, se relaciona con la presencia del *target* y por lo tanto, con la conformación del aptámero<sup>109</sup>.

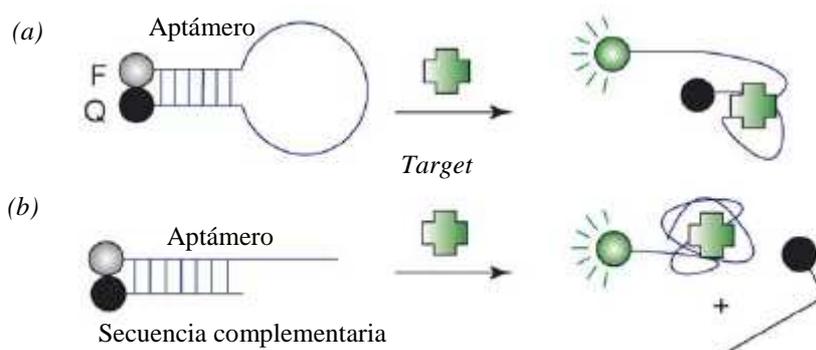


Figura 1-15. *Aptamer beacons*. (a) Con la secuencia del aptámero modificada. (b) Con la secuencia del aptámero y la secuencia complementaria modificada. F: fluoróforo; Q: quencher.

Zeng y colaboradores<sup>110</sup> desarrollaron una plataforma de sensado para la detección de la micotoxina ocratoxina A. En ausencia del *target*, el aptámero marcado con fluoresceína se hibridiza con una secuencia complementaria que contiene un Q. Dicha hibridización acerca el Q a la fluoresceína (ver *Figura 1-15b*). Luego del agregado de la ocratoxina A, se produce un cambio conformacional que libera la secuencia que contiene al Q, generando un aumento de la señal de fluorescencia (*signal-on*). Además de la facilidad de marcación de los ácidos nucleicos con fluoróforos, la detección fluorescente es muy utilizada debido a su potencial uso en tiempo real. Landry y colaboradores<sup>96</sup> construyeron un *aptamer beacon* utilizando el aptámero contra cocaína. En ausencia del *target*, el F y el Q se ubican alejados entre sí.

El reconocimiento de la cocaína induce un reordenamiento estructural del aptámero que implica el acercamiento de los extremos del mismo y por lo tanto, generando una disminución de la señal (*signal-off*).

Los ensayos colorimétricos son otra técnica de detección óptica comúnmente utilizada. En los últimos años, las AuNPs se han utilizado ampliamente debido a los cambios espectroscópicos que se evidencian durante la agregación o dispersión de las mismas inducida por la presencia del *target*. Wang y colaboradores<sup>111</sup> prepararon un aptasensor que traslada el evento de reconocimiento del *target* (ATP) a un proceso de deshibridización de la secuencia de ADN<sub>ds</sub> formada por el aptámero y una secuencia complementaria. Dicho proceso puede ser detectado con AuNPs en un ensayo colorimétrico (*Figura 1-16*). En ausencia de ATP, las AuNPs no se estabilizan por la estructura rígida del ADN<sub>ds</sub>; por lo tanto, los autores sugieren que en presencia de sal, las mismas pueden agregarse (azul). En presencia del *target*, la unión del mismo al aptámero induce un cambio estructural, liberando la secuencia complementaria en una conformación *random-coil*. Las AuNPs son estabilizadas por la secuencia libre, mostrando una resistencia a la agregación en presencia de sal (rojo).

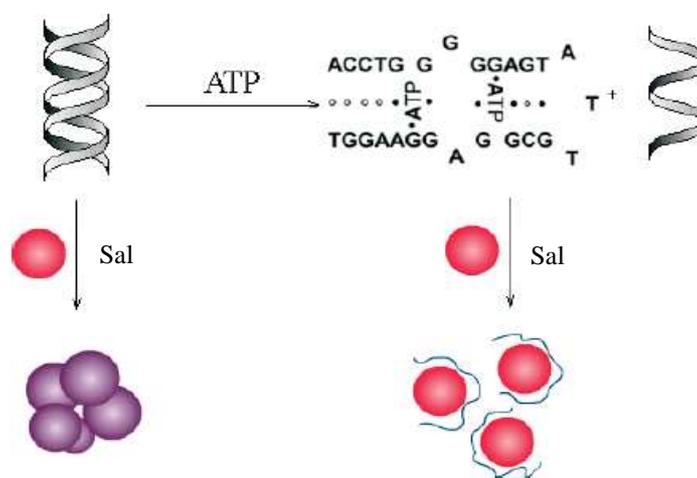


Figura 1-16. Aptasensor de tipo TISS con detección colorimétrica para ATP<sup>111</sup>.

Zhao y colaboradores<sup>112</sup> desarrollaron un aptasensor colorimétrico del tipo TISS para acetamiprida. De la misma forma que en el caso anterior, el aptasensor se basó en el cambio de color inducido por la presencia del *target* que se logra durante la

agregación de AuNPs (Figura 1-17). Se logró detectar acetamiprida en el rango lineal de 75 nM a 7,5  $\mu$ M con un límite de detección de 5 nM.

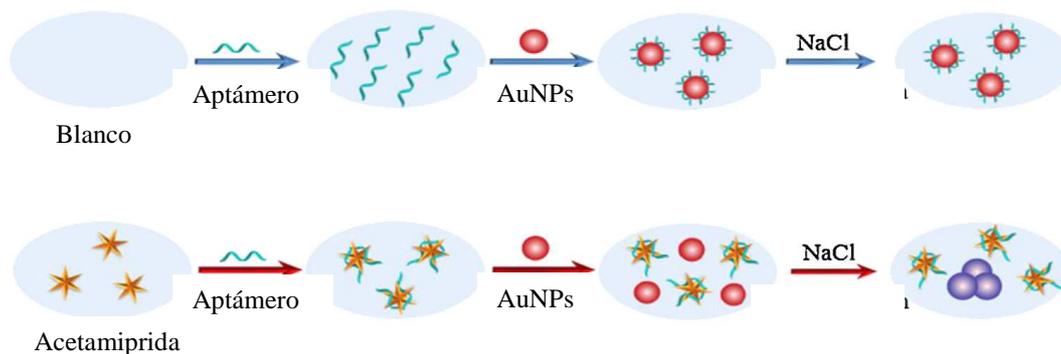


Figura 1-17. Aptasensor colorimétrico de tipo TISS para acetamiprida<sup>112</sup>.

#### 1.4.2.1.3. Aptasensores del tipo TISS con transducción acústica

Frecuentemente las técnicas sensibles a cambios de masa incluyen dispositivos de SPR, de microbalanza de cuarzo (QCM) y de onda acústica superficial<sup>113</sup>.

En el caso de SPR, se inmoviliza el aptámero en la superficie de un *chip* metálico y se inyecta la solución del *target* a flujo constante. El instrumento monitorea los cambios en el ángulo de resonancia que ocurren en la superficie del *chip* cuando el *target* en solución se une al aptámero inmovilizado. La señal es proporcional a las moléculas unidas y se mide en unidades de resonancia. Las moléculas pequeñas son difíciles de detectar usando SPR convencional ya que el cambio en el índice de refracción debido a la unión de las mismas es generalmente pequeño. De forma tal de extender la aplicación de los aptasensores con detección por SPR a moléculas pequeñas, Wang y Zhou<sup>114</sup> combinaron las ventajas de los aptámeros con el efecto de amplificación que producen las AuNPs para diseñar un aptasensor de tipo TISS para adenosina (Figura 1-18).

El aptámero se inmovilizó en el film de oro, pudiendo posteriormente hibridizar con la secuencia complementaria marcada con AuNPs. Dicho proceso generó un gran aumento en la señal de SPR. Sin embargo, el aptámero cambió su estructura de ADN<sub>ss</sub> a una estructura terciaria en presencia de adenosina (*target*), inhibiéndose la capacidad de hibridizar con la secuencia marcada con AuNPs. Por lo tanto, el cambio en la señal de SPR resultante del proceso de hibridización entre el aptámero y la secuencia marcada disminuyó (*signal-off*) con el aumento de la cantidad de aptámeros que poseen dicha

estructura terciaria. Este valor fue proporcional a la concentración de adenosina (1 nM a 1  $\mu$ M).

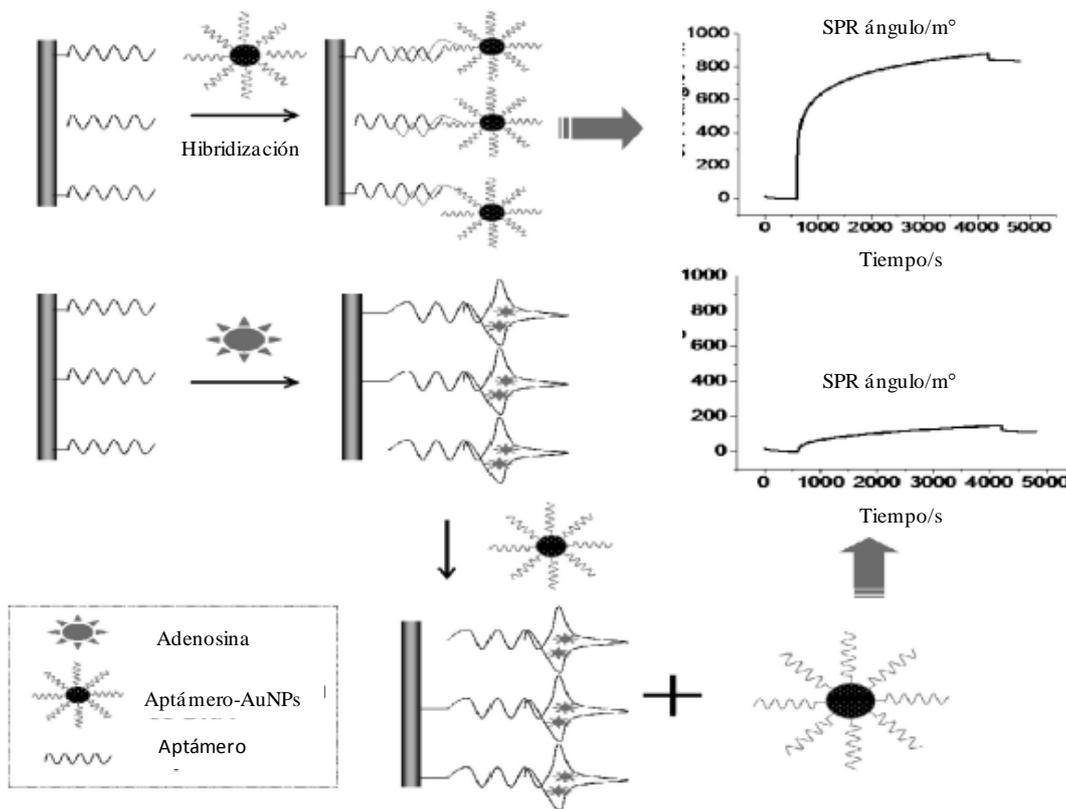


Figura 1-18. Aptasensor de tipo TISS con detección por SPR desarrollado por Wang y Zhou<sup>114</sup>.

En el caso de la técnica de QCM, se inmoviliza el aptámero sobre un metal depositado sobre la superficie de un material piezoeléctrico como el cuarzo (Figura 1-19). La frecuencia del sistema se mide en tiempo real, y se puede seguir el reconocimiento mientras ocurre. El aumento en la masa como resultado de la unión del *target* al aptámero inmovilizado genera una disminución en la frecuencia de resonancia<sup>115</sup>.

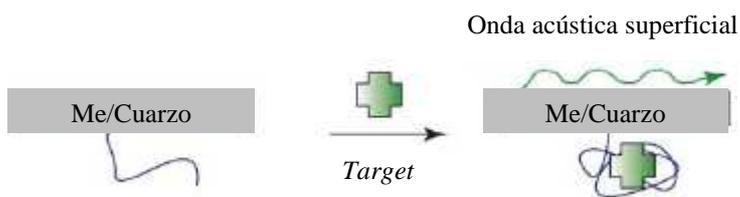


Figura 1-19. Aptasensor acústico.

Ban y colaboradores<sup>116</sup> pusieron a punto un aptasensor del tipo TISS para detectar el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), un marcador selectivo para la tuberculosis, empleando espectroscopía de impedancia electroquímica y QCM; utilizando un aptámero tanto en base ADN como ARN. Los resultados mostraron que la sonda aptamérica de ARN pudo detectar hasta 100 fM del *target*, mientras que en base ADN, 1 pM.

#### 1.4.2.2. Aptasensores basados en el tipo *sandwich* o *sandwich-like*

Como su nombre lo indica, este tipo de aptasensores consisten en al menos tres partes: “una pieza de jamón” entre “dos piezas de pan”<sup>98</sup>. Algunos *targets* proteicos, como la trombina y el PDGF, tienen dos sitios de unión, lo cual les da la capacidad de unirse a dos moléculas de reconocimiento y formar un complejo del tipo *sandwich*. Como estas proteínas se pueden unir tanto a aptámeros como a anticuerpos, las estructuras *sandwich* tienen tres formatos diferentes: aptámero-proteína-aptámero, aptámero-proteína-anticuerpo y anticuerpo-proteína-anticuerpo. Los dos primeros fueron ampliamente utilizados en el diseño de diversos aptasensores con transducción electroquímica. Li y colaboradores<sup>117</sup> desarrollaron un aptasensor electroquímico para la detección del PDGF usando una estructura de tipo *sandwich* y la amplificación de la señal con AuNPs (*Figura 1-20*).

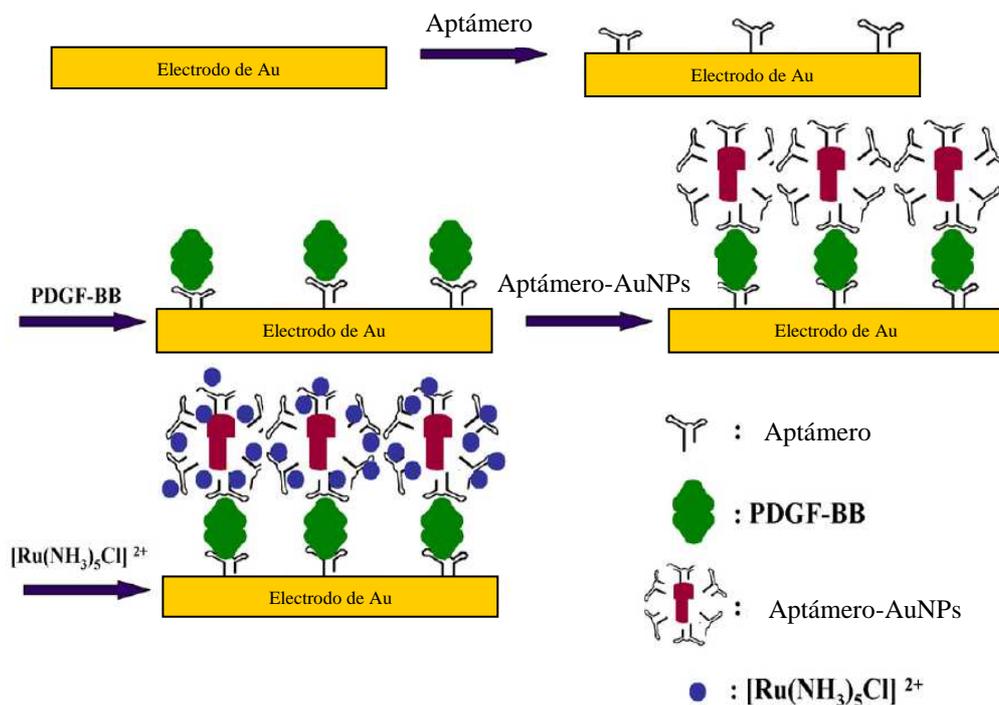
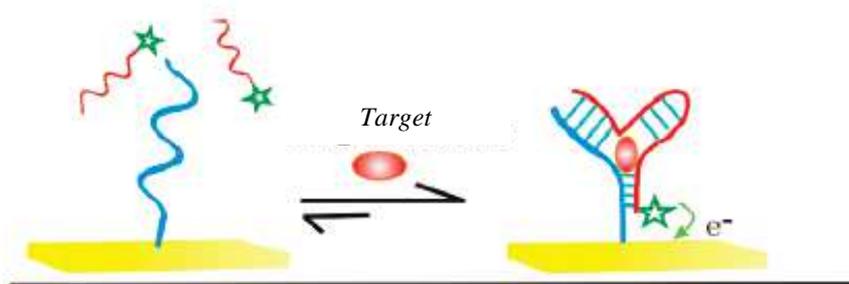


Figura 1-20. Aptasensor electroquímico de tipo *sandwich* desarrollado por Li y colaboradores<sup>117</sup>.

Se inmovilizó el aptámero sobre la superficie del electrodo usando la interacción S-Au. En presencia del *target*, el mismo resulta capturado en la superficie formando el complejo con el aptámero. Luego otra secuencia del aptámero modificada con AuNPs que están cargadas negativamente, reconoce al *target* y se unen a la superficie del electrodo formando una estructura *sandwich*. Por último, la sonda cargada positivamente  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}]^{+2}$ , queda retenida sobre dicha estructura a través de interacciones electrostáticas. La señal electroquímica obtenida resultó directamente proporcional a la concentración de PDGF.

Como el diseño del tipo *sandwich* requiere que el *target* se una a dos sitios, difícilmente puede ser aplicado con los *targets* perteneciente al grupo integrado, esto es, con las moléculas pequeñas. Un único aptámero, dividido en dos fragmentos, presenta un equilibrio entre sus dos partes disociadas y un complejo asociado y plegado. Si el *target* se une al complejo con gran afinidad, la presencia del mismo favorece el equilibrio hacia la formación de dicho complejo (*Figura 1-21*), creando un ensayo de tipo *sandwich* con las dos mitades del aptámero. Plaxco y colaboradores<sup>118</sup> probaron un ensayo electroquímico de tipo *sandwich* dividiendo la secuencia aptamérica en dos fragmentos, uno de los cuales se inmovilizó sobre la superficie de un electrodo de oro y el otro se modificó con MB. La presencia del *target* (cocaína o ATP) indujo la asociación de los dos fragmentos y generó un aumento de la concentración de MB en la superficie del electrodo, la cual se cuantificó por voltametría. Lo importante a tener en cuenta en este tipo de aptasensores es que el sitio de corte en el aptámero debe ser seleccionado haciendo una evaluación de la estructura secundaria predicha para el mismo, de forma tal de asegurar que el corte elegido no impida la unión del *target*.



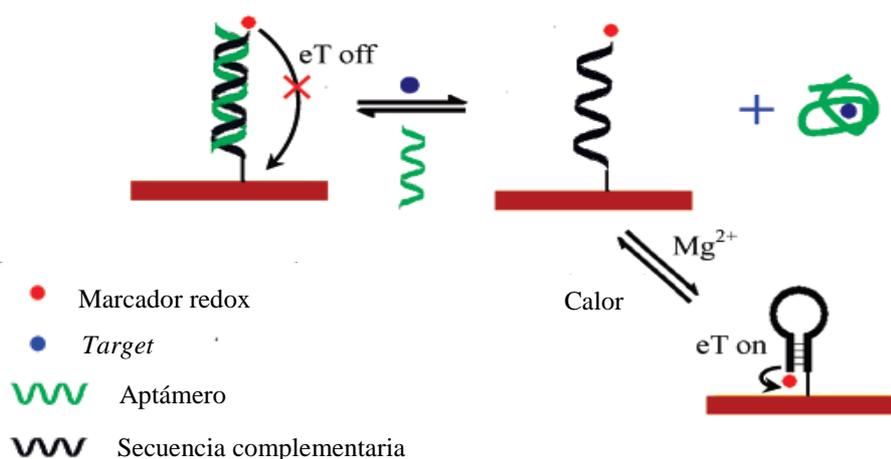
*Figura 1-21.* Aptasensor electroquímico de tipo *sandwich* desarrollado por Plaxco y colaboradores<sup>118</sup>.

### 1.4.2.3. Aptasensores basados en el tipo *target-induced dissociation* o *displacement* (TID)

Tanto los aptasensores del tipo TISS como los de tipo *sandwich*, implican ensayos dependientes de la estructura. La construcción de dichos aptasensores depende de la conformación especial de los aptámeros o de la estructura del complejo aptámero-*target*. Además, en el caso de que la transducción sea electroquímica, implican la unión del *target* con el aptámero en la superficie de un electrodo, lo cual resulta otra desventaja para la generalización del aptasensor.

Se ha planteado una estrategia independiente de la estructura, dentro de la cual se incluyen los aptasensores del tipo TID. En este tipo de aptasensores, las secuencias complementarias al aptámero, en vez del aptámero en sí, se utilizan como anclajes para localizar al aptámero. Luego de la incubación con el *target*, el complejo se libera a la solución, lo cual lleva a cambios en una señal detectable.

Mao y colaboradores<sup>119</sup> han reportado un aptasensor para la detección de ATP utilizando la secuencia complementaria del aptámero, el cual estaría exento del problema de unión al *target*. La secuencia complementaria se modifica en ambos extremos, con un marcador redox (Fc) y con un grupo de anclaje a la superficie de oro (grupo tiol). Dicha secuencia se hibridiza con el aptámero para formar una estructura de ADN<sub>ds</sub> que se inmoviliza sobre la superficie del electrodo (*Figura 1-22*).

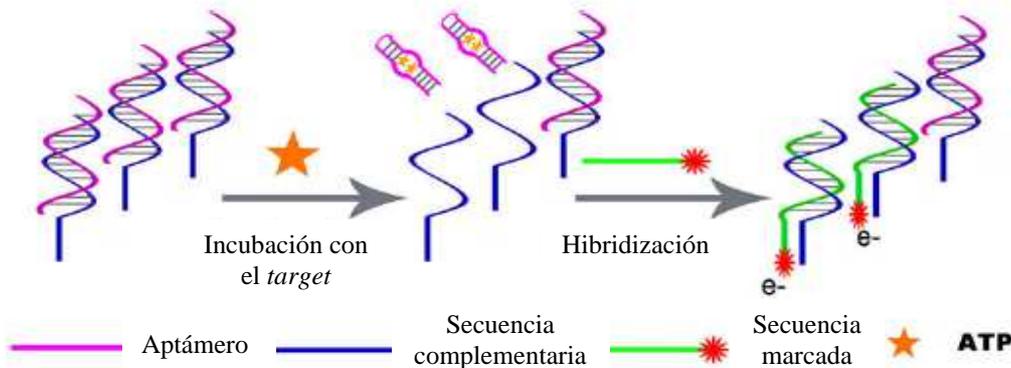


*Figura 1-22.* Aptasensor electroquímico de tipo TID *signal-on* desarrollado por Mao y colaboradores<sup>119</sup>.

En presencia de ATP (*target*), el aptámero se disocia de su secuencia complementaria hacia la solución, dejando la secuencia de ADN<sub>ss</sub> complementaria sobre la superficie del electrodo. Esta secuencia, puede en presencia de cationes Mg<sup>+2</sup>, plegarse en una estructura *hairpin*, acercando el Fc a la superficie del electrodo (*signal-on*).

Yu y colaboradores<sup>120</sup> desarrollaron una estrategia más general para eliminar la dependencia de la estructura de la secuencia complementaria del aptámero. Trabajando con adenosina como *target* modelo, prepararon un sustrato usando un electrodo de oro modificado con una SAM de 1,6-dimercaptohexano que facilita el ensamblado de AuNPs, sobre las cuales se inmoviliza la secuencia complementaria del aptámero. Se hibridiza dicha secuencia con el aptámero, formando una estructura de ADN<sub>ds</sub> en la superficie. La interacción con el target desplaza a la secuencia aptamérica, disminuyendo la cantidad de ADN<sub>ds</sub> y por lo tanto, disminuyendo la cantidad de marcador redox (MB), intercalado en dicha estructura de doble hélice. Otro aptasensor electroquímico para adenosina con una estrategia similar fue desarrollado por Shen y colaboradores<sup>121</sup>. La desventaja de dichas estrategias es que son del tipo *signal-off*, lo cual puede verse afectado por falsos positivos.

Li y colaboradores<sup>122</sup> construyeron un aptasensor electroquímico para ATP de tipo TID con una estrategia *signal-on*, más novedosa y potencialmente generalizable. El principio de funcionamiento se basa en que la interacción entre el *target* y el aptámero puede inducir la formación y posterior disociación del complejo *target*-aptámero de la superficie de un electrodo, y consecuentemente, la secuencia de ADN que permanece inmovilizada sobre el electrodo puede hibridarse nuevamente con una secuencia de ADN conjugada con un marcador redox (*Figura 1-23*).



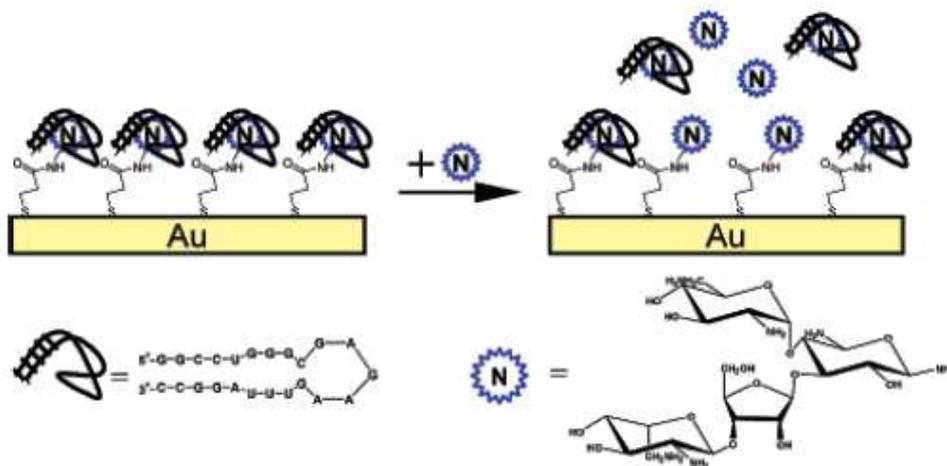
*Figura 1-23.* Aptasensor electroquímico de tipo TID *signal-on* desarrollado por Li y colaboradores<sup>122</sup>.

Esta estrategia del tipo TID presenta la ventaja de la independencia de la estructura tanto del aptámero como de su secuencia complementaria; adicionalmente, no es necesario introducir el marcador redox en el aptámero, lo cual podría afectar la interacción con el *target*.

#### 1.4.2.4. Aptasensores basados en el tipo *competitive replacement*

Como los aptámeros tienen características similares a los anticuerpos, algunos métodos utilizados en los anticuerpos se pueden extrapolar a los aptámeros. Por ejemplo, la mayoría de los inmunoensayos para moléculas pequeñas son ensayos del tipo competitivos basados en el reemplazo de anticuerpos unidos a una superficie por el *target* en solución. Este tipo de reemplazo se puede aplicar a ensayos basados en aptámeros.

En los aptasensores de tipo *competitive replacement*, se deben sintetizar anticipadamente las moléculas de *target* modificadas que generarán la señal. Para ello, se inmoviliza el aptámero y se incuba con el *target* modificado. Luego, se procede a la competencia del *target* no marcado presente en la muestra por el aptámero, resultando en un desplazamiento del *target* marcado, lo que es cuantificado. Tuñón-Blanco y colaboradores<sup>123</sup> han aplicado este tipo de aptasensores en la detección de la pequeña molécula Neomycina B por espectroscopía de impedancia faradaica (*Figura 1-24*).



*Figura 1-24.* Aptasensor de tipo *competitive replacement* desarrollado por Tuñón-Blanco y colaboradores<sup>123</sup>.

El *target* fue inmovilizado en una SAM de ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA) sobre electrodos de oro utilizando una activación con una carbodiimida. El aptámero se inmovilizó por afinidad al *target* sobre la superficie. Esta estrategia se prefirió frente a la inmovilización directa al electrodo para magnificar el cambio en la impedancia asociado al desplazamiento del aptámero por el *target* en solución.

### 1.4.3. Factores que afectan el desempeño de los aptasensores

#### 1.4.3.1. Uso del *linker* y del separador

La inmovilización de los aptámeros a un determinado soporte sólido afecta la afinidad, la sensibilidad del reconocimiento y la selectividad de estos ligandos. Por lo tanto, la técnica utilizada y la calidad de la inmovilización se deben considerar cuidadosamente a la hora de diseñar un aptasensor. La técnica de inmovilización superficial es generalmente dependiente de los grupos funcionales (tiol, amino, biotina) que pueda tener el aptámero. La inmovilización usando la interacción avidina-biotina provee una mejor sensibilidad en comparación con la quimisorción debido a la presencia de un *linker*. El *linker* que conecta el grupo funcional al aptámero se utiliza para favorecer el fácil acceso del *target* al sitio de unión en el aptámero<sup>80</sup>.

El uso de un *linker* o el agregado de una “cola” entre el sitio de unión y el aptámero pueden ayudar a mejorar el desempeño del sensor, aportando cierta flexibilidad a la molécula.

Por otro lado, luego de la inmovilización se suele realizar un tratamiento con un separador para remover y/o eliminar las interacciones inespecíficas entre los nitrógenos de las bases de la secuencia del aptámero y la superficie de oro (*Figura 1-25*)<sup>85a</sup>.

Los perfiles de concentración determinados por reflectividad de neutrones indican que las capas adsorbidas de ADN<sub>ss</sub> modificadas con un grupo tiol sobre una superficie de oro son compactas, sugiriendo la presencia de múltiples contactos entre cada secuencia de ADN y la superficie<sup>85b</sup>. Luego del tratamiento con un mercaptoalcano de cadena corta con un grupo oxhidrilo terminal, el ADN “se levanta” y se extiende alejándose de la superficie. Estos cambios son consistentes con la idea de que el ADN queda anclado a través del grupo tiol, mientras que el contacto entre el esqueleto del mismo y la superficie se evita por la formación de la monocapa de alcanotiol.

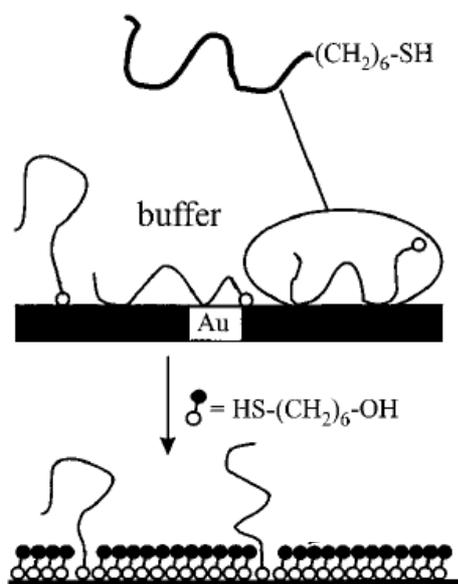


Figura 1-25. Efecto del separador en la inmovilización de ácidos nucleicos.

La concentración del aptámero usada en la inmovilización también es un parámetro importante que afecta el desempeño del aptasensor. Una concentración elevada de aptámero puede causar un impedimento estérico en la superficie. Mascini y colaboradores<sup>124</sup> evaluaron la influencia del pre-tratamiento y de la concentración (0,1  $\mu\text{M}$  – 1  $\mu\text{M}$ ) del aptámero en la sensibilidad, linealidad y reproducibilidad de un sensor usando trombina como sistema modelo. Un tratamiento térmico previo del aptámero calentándolo a 95°C por 1 minuto, seguido de un enfriamiento en hielo por 10 minutos, aseguró un correcto plegamiento del mismo y consecuentemente facilitó el acercamiento de la marca de biotina presente en el extremo 5' a la superficie del sensor modificada con estreptavidina.

### 1.4.3.2. Regeneración superficial

La rapidez de los equilibrios de desnaturalización-renaturalización en los aptámeros permite la regeneración de la superficie del sensor. La ventaja crucial es que se puede remover el *target* sin degradar las propiedades del aptámero. Los aptámeros que requieren  $\text{Mg}^{+2}$  para adquirir su estructura terciaria pueden ser regenerados efectivamente lavando la superficie con EDTA, el cual disocia el *target*<sup>82</sup>. También se pueden utilizar soluciones ácidas sin observar pérdida en la sensibilidad del sensor. Radi

y colaboradores<sup>99</sup> utilizaron una solución 1 M de HCl para remover a la trombina (*target*) del complejo con el aptámero sin afectar la eficiencia de unión y pudo ser reutilizado 25 veces. Alternativamente, el aptasensor para trombina descrito por Mascini y colaboradores<sup>124</sup> fue regenerado con un tratamiento con una solución 2 M de NaCl por 1 minuto y pudo ser utilizado hasta 20 veces sin pérdida de su eficiencia.

### 1.4.3.3. Condiciones fisicoquímicas óptimas

El pH del medio de sensado también juega un papel importante en el desempeño analítico del aptasensor. Diferentes aptasensores requieren diferentes condiciones de unión. El trabajo reportado por O'Sullivan y colaboradores<sup>125</sup> estudió el efecto del pH en la capacidad de reconocimiento de la trombina usando pHs que van desde 4,7 a 8,5. Bajo condiciones de pH más extremas, se obtuvieron señales bajas y un alto *background* debido a la desnaturalización del aptámero. Usando también a la trombina como sistema modelo, Hiankik y colaboradores<sup>126</sup> encontraron que el pH óptimo para una máxima respuesta del sensor es 7,5, debido al efecto que tiene el pH en la estructura del sitio de unión del aptámero.

La fuerza iónica es otro parámetro que afecta el desempeño del aptasensor, por lo cual diferentes cationes pueden tener un efecto estabilizador sobre algunas estructuras terciarias. La presencia de cationes  $K^+$  para mantener la integridad estructural en el aptasensor de trombina, sólo es necesaria bajo condiciones no óptimas tales como una alta temperatura<sup>125</sup>. Para evaluar la influencia de la fuerza iónica en la unión del aptámero de trombina, Hianik y colaboradores<sup>126</sup> llevaron adelante un experimento usando MB en diferentes concentraciones de NaCl, variando desde 0 mM a 500 mM. Los resultados mostraron que un aumento en la concentración de NaCl desde 140 mM a 500 mM disminuye la sensibilidad del sensor ya que al compensarse las cargas negativas del ADN se forma una estructura muy cerrada donde el MB no puede unirse. La agregación de la trombina a altas concentraciones de cationes  $Na^+$  también contribuye bajando la afinidad al aptámero.

## 1.5. Targets: moléculas orgánicas pequeñas

### 1.5.1. Sistema modelo: ATP

El ATP, como el adenosín monofosfato (AMP) y la adenosina, se clasifican como *targets* integrados, ya que cuando interactúan con el aptámero correspondiente<sup>31</sup> se localizan dentro de un bolsillo pequeño de unión. Existen estudios estructurales por RMN del complejo AMP-aptámero en base ADN, a partir de los cuales se obtuvo información de la estructura terciaria (Figura 1-26a) y del reconocimiento molecular en solución<sup>95</sup>.

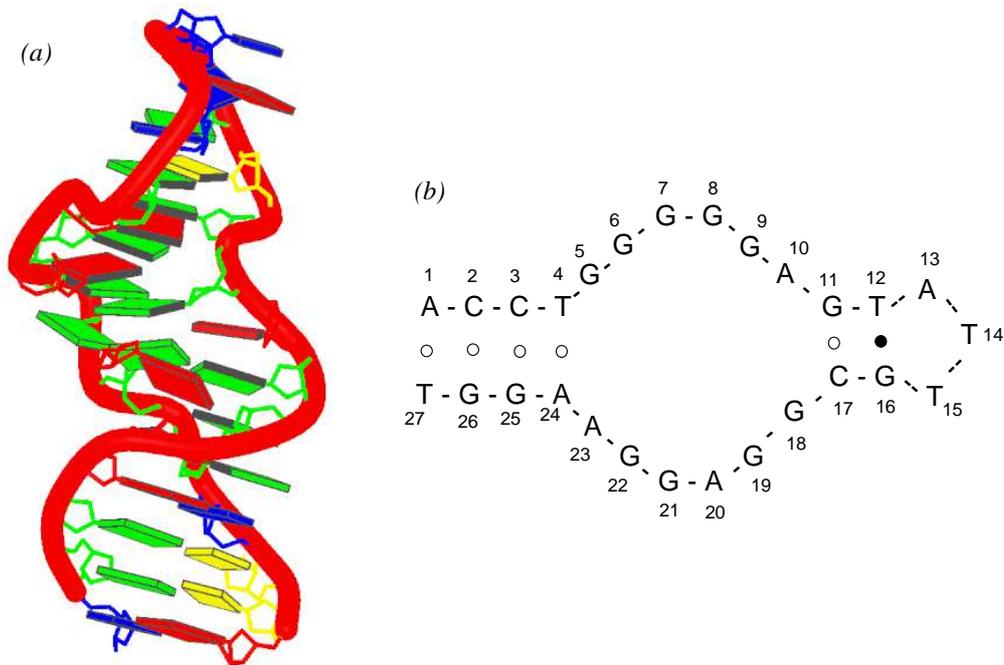


Figura 1-26. Aptámero de ATP/AMP/adenosina. (a) Estructura terciaria (1aw4)<sup>127</sup>. (b) Secuencia y tipos de apareamiento.

En la estructura terciaria del aptámero se pueden observar zonas de ADN<sub>ss</sub> y ADN<sub>ds</sub>. Este tipo de estructuras se conocen como *stemloop* (ver Figura 1-8). Se puede dividir la estructura en cuatro zonas:

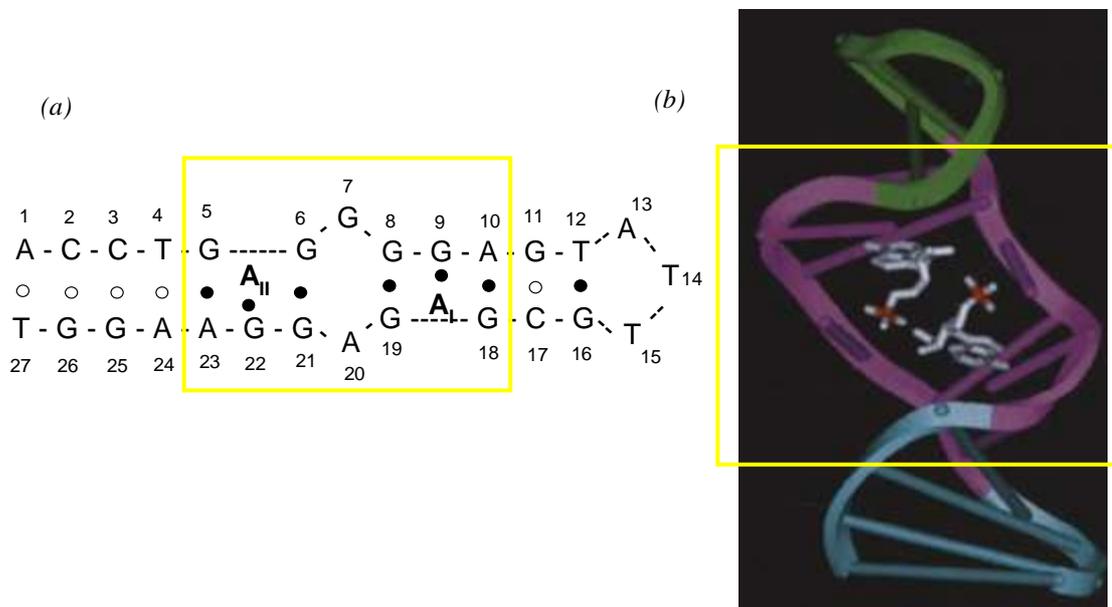
- 1) *Stem* 1: ADN<sub>ds</sub>.
- 2) *Loop* interno simétrico: zona de ADN<sub>ss</sub> rica en G, donde no hay apareamiento de bases.

3) *Stem 2*: ADN<sub>ds</sub>.

4) *Hairpin Loop*: zona de ADN<sub>ss</sub> donde no hay apareamiento de bases.

Como se puede observar en la *Figura 1-26b*, hay una zona de interacciones de tipo Watson-Crick (°) y otra zona mixta (•).

En la estructura secundaria para el complejo AMP-aptámero determinada por RMN en solución (*Figura 1-27a*) se puede observar una zona predominantemente de interacciones Watson-Crick (°), pares de *mismatches* G•G (interacciones de tipo *Hoogsteen reverse*) y G•A y dos sitios de reconocimiento G•AMP no equivalentes (A<sub>I</sub> y A<sub>II</sub>). La hélice está desenrollada en los sitios de unión del AMP e inclinada hacia la gruta mayor centrada sobre las moléculas de AMP unidas. Además, los residuos G19 y A20 son aproximadamente coplanares, como también lo son los residuos G6 y G7, resultando en la formación de dos plataformas de tres bases mutuamente apiladas (G8•G19)-A20 y (G21•G6)-G7. Esta arquitectura única de plataforma de tres bases está asociada con una gruta menor rectangular expandida que funciona como bolsillo de unión capaz de acomodar dos moléculas de AMP adyacentes (*Figura 1-27b*).



*Figura 1-27.* Complejo AMP (A)-aptámero. (a) Estructura secundaria determinada por RMN en solución. (b) Representación de cintas de la estructura en solución. El esqueleto de ADN se representa como cintas; y las bases y pares de bases como segmentos cilíndricos. El bolsillo de unión se muestra en violeta.

### 1.5.2. Productos fitosanitarios de interés ambiental: plaguicidas

Dentro de las moléculas orgánicas pequeñas de interés ambiental se encuentran los plaguicidas. Se los puede definir como el conjunto de las sustancias químicas empleadas por el hombre para controlar o combatir algunos seres vivos considerados como plagas. Se entiende por plaga: insectos, malezas, pájaros, mamíferos, moluscos, peces o microbios que compiten con los humanos para conseguir alimento, destruyendo la propiedad o propagando enfermedades. Los plaguicidas no son necesariamente venenos, pero pueden ser tóxicos para los humanos u otros animales<sup>128</sup>.

Las principales características de un plaguicida ideal son:

- ✓ Alta especificidad: el producto sólo afecta al organismo al que daña, dejando indemne al resto de los seres vivos y al medio ambiente.
- ✓ Baja toxicidad en humanos: el producto reviste un riesgo bajo para su uso tanto para el caso de intoxicaciones agudas como para exposiciones crónicas a bajas dosis.
- ✓ Baja toxicidad para el resto de la fauna: se contempla habitualmente su toxicidad para la fauna dulciacuícola y la fauna polinizadora (abejas).
- ✓ Baja dosis letal: el plaguicida es efectivo con poca cantidad.
- ✓ Bajo costo: el producto tiene que ser de bajo costo.
- ✓ De característica latente: el plaguicida permanece en el lugar durante un período de tiempo suficiente para interactuar y matar a la población constituyente de la plaga a combatir.
- ✓ No persistente ni acumulable: debe degradarse sin producir subproductos tóxicos, es decir no ser persistente ni acumularse en los tejidos de los animales de las diferentes cadenas tróficas tras haber actuado.

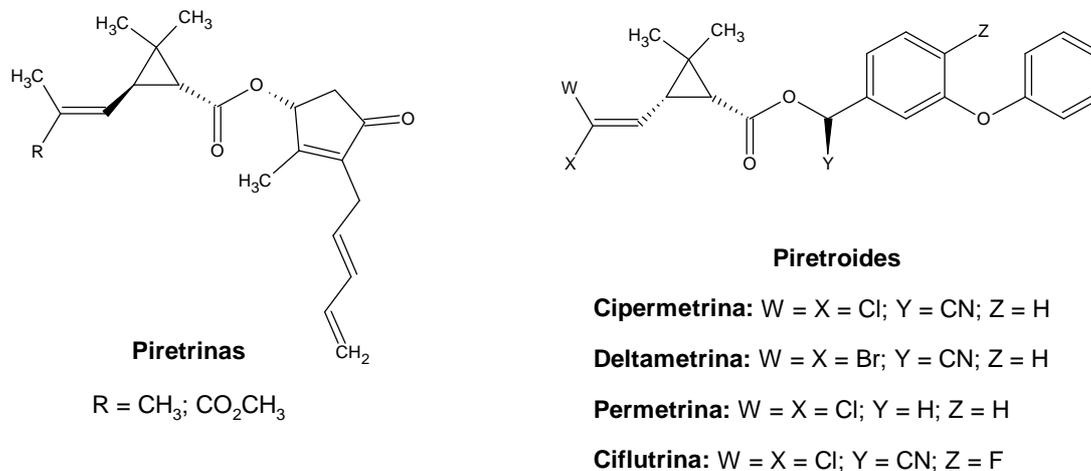
Según su constitución química, los plaguicidas pueden clasificarse en varios grupos, los más importantes son:

- Carbamatos.
- Organoclorados.
- Organofosforados.
- Piretroides.
- Neonicotinoides.

### 1.5.2.1. Piretroides

Los piretroides son compuestos con actividad insecticida que se aplican a cosechas, plantas de jardín y animales domésticos. Son sustancias químicas que se obtienen por síntesis y poseen una estructura muy parecida a sus análogos naturales, las piretrinas (*Figura 1-28*).

Desde los comienzos de los años 70, cuando se sintetizó el primer piretroide fotosensible, se han descubierto muchos otros. Los piretroides como la permetrina, cipermetrina, deltametrina y ciflutrina están dentro de los insecticidas más usados como consecuencia de su alta selectividad y debido a que son efectivos para un amplio espectro de plagas económicamente importantes<sup>6,129</sup>. Su uso se ha ido ampliando debido a la alta residualidad, bioacumulación y carcinogénesis de los plaguicidas organoclorados, como así también, al alto efecto tóxico de los carbamatos y organofosforados en organismos noplaga y en mamíferos. Los piretroides, en cambio, no poseen estas desventajas y debido a las bajas cantidades de producto necesarias para combatir las plagas, su costo operativo resulta conveniente.



*Figura 1.28.* Familia de las piretrinas y piretroides.

La contaminación de los ecosistemas acuáticos y terrestres con estos insecticidas está fundamentalmente asociada a su utilización en las prácticas agrícolas<sup>130</sup>. Además permanecen durante más tiempo en el medio ambiente que las piretrinas, ya que la modificación química en su estructura los hace más estables frente a la fotodegradación y al calor<sup>5a</sup>. También resultan muy utilizados en el combate hogareño de los mosquitos.

Sus cualidades en este último campo, son su alto poder de volteo y su baja acción en los mamíferos.

Los piretroides se absorben por piel, por inhalación y por el tracto gastrointestinal. Producen neurotoxicidad bloqueando los canales de sodio y potasio de la membrana de las neuronas en mamíferos e insectos<sup>131</sup>. Algunos piretroides afectan el sistema nervioso periférico, mientras que otros atacan el sistema nervioso central. La exposición breve a niveles muy altos de estos compuestos en el aire, los alimentos o el agua puede causar mareo, dolor de cabeza, náusea, espasmos musculares, falta de energía, alteraciones de la conciencia, convulsiones y pérdida del conocimiento. Luego de la absorción, son rápidamente metabolizados en animales de sangre caliente por hidrólisis del enlace éster o por oxidación, transformándose en ácidos carboxílicos parcialmente conjugados, que se eliminan en orina.

Estos compuestos entran al ambiente principalmente debido a su uso como insecticidas. En el aire son degradados rápidamente en 1-2 días por la luz o por otros compuestos que se encuentran en la atmósfera. También pueden adsorberse fuertemente al suelo y ser degradados por microorganismos, tanto en esta matriz como en el agua. Son muy poco solubles en agua y quedan retenidos en las capas superficiales del suelo, por lo que normalmente no lixivian al agua subterránea.

#### **1.5.2.1.1. Deltametrina**

La deltametrina (ver *Figura 1-28*) es un piretroide sintético con actividad insecticida y acaricida de amplio espectro. Actúa por contacto e ingestión afectando al sistema nervioso de los artrópodos y provocando su muerte. Es un compuesto tóxico para la vida acuática (particularmente peces), resultando equivalente a una neurotoxina<sup>132</sup>.

Forma parte del paquete de productos fitosanitarios utilizados en la soja transgénica y es uno de los insecticidas más utilizados en el control de insectos domésticos. Ha sido utilizada para prevenir la extensión de enfermedades transportadas por las garrapatas en perros, roedores y otros animales excavadores. Es efectiva en la eliminación de una amplia variedad de plagas de los hogares humanos, especialmente arañas, pulgas, cucarachas, hormigas, etc. Resulta más estable frente a la degradación que los piretroides alternativos, y tiene una actividad residual más prolongada. Los

residuos de la deltametrina se han encontrado ampliamente en productos agrícolas<sup>133</sup> y en alimentos<sup>134</sup>.

La deltametrina está clasificada como moderadamente tóxica por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los formulados comerciales están clasificados normalmente como nocivos o no clasificados, según la concentración. La OMS indica a la deltametrina como uno de los insecticidas recomendados para la fumigación de interiores y en el tratamiento contra los mosquitos<sup>135</sup>. Si bien la deltametrina no está incluida entre los plaguicidas más tóxicos, su utilización como insecticida doméstico ha incrementado los riesgos de exposición de poblaciones infantiles, particularmente en zonas con malaria o dengue<sup>136</sup>.

Los métodos analíticos para la detección de la deltametrina involucran procedimientos con múltiples pasos de tratamiento de la muestra seguidos de diferentes técnicas de detección, incluyendo CG-ECD, GC-EM<sup>137</sup>, CL combinada con una derivatización post-columna con marcadores fluorescentes (HPLC-FD)<sup>138</sup> o a través de la utilización de un detector de masas (HPLC-EM)<sup>139</sup>. También para este *target* existen ensayos inmunoquímicos acoplados a enzimas (ELISA)<sup>140</sup>.

Yu y colaboradores<sup>141</sup> han desarrollado un biosensor quimioluminiscente para la detección de deltametrina basado en *quantum dots* de CdTe y polímeros moleculares impresos, ensamblados capa por capa en una superficie de vidrio. Se obtuvo una relación lineal con la concentración de deltametrina en el rango de 0,053 µg/mL a 46,5 µg/mL con un límite de detección de 0,018 µg/mL. Raposo y colaboradores<sup>142</sup> fueron capaces de detectar concentraciones nanomolares de deltametrina en soluciones etanólicas utilizando un sensor. La capa de reconocimiento consistió en un film delgado, obtenido utilizando una técnica de capa por capa, resultando de la adsorción alternada de cloruro de polialilamina y de la sal sódica de poli[1-[4-(3-carboxi-4-hidroxifenilazo)bencensulfonamida]-1,2-etanodiilo], en un soporte sólido con electrodos de oro interdigitados. La respuesta del sensor, obtenida por medidas de espectroscopía de impedancia, resultó lineal con el logaritmo de la concentración del *target* en el rango micromolar a nanomolar.

A pesar del gran potencial de los aptámeros en general, a la fecha se ha desarrollado un único aptámero para un insecticida de la familia de los neonicotinoides, la acetamiprida<sup>143</sup>, probablemente debido a la dificultad para fijar este tipo de compuestos químicos estables y no reactivos a soportes sólidos<sup>144</sup>, etapa imprescindible para el desarrollo del proceso de SELEX.

Con todo lo antes expuesto y dado el amplio uso de la deltametrina, se consideró un interesante desafío el diseño del proceso de SELEX para dicho *target*. Paralelamente, se avanzó en la aplicación de los aptámeros en el desarrollo de aptasensores electroquímicos utilizando sistemas modelo.

## *Capítulo 2*

### *Materiales y Métodos*

## 2.1. Materiales

### 2.1.1. Reactivos

Acetato de etilo	Anedra
Acetonitrilo	Aberkon Química
Ácido acético	Anedra
Ácido bórico	Promega
Ácido carboxiferroceno	Sigma Aldrich
Ácido clorhídrico 37%	Merck
Ácido etilendiamintetraacético (EDTA)	Promega
Ácido 3-mercaptopropiónico	Sigma Aldrich
Ácido nítrico 65%	Anedra
Ácido sulfúrico 98%	Anedra
Acrilamida	Invitrogen
Adenosina	Pharma Waldhoff
Adenosín monofosfato sódico	Sigma Aldrich
Agarosa D-1 LE	BioAmérica Inc.
Agua oxigenada 30%	Cicarelli
Alcohol isoamílico	Sigma Aldrich
Alúmina 0.5 µm	Metrohm
2-(2-aminoetoxi)etanol 98%	Sigma Aldrich
Amoníaco 25%	Merck
Anhídrido acético	Sigma Aldrich
Azul de bromofenol	Sigma Aldrich
Bicarbonato de sodio	Anedra
Bromuro de etidio	Sigma Aldrich
Carbonato de sodio	Merck
Carbonato de sodio anhidro	Cicarelli
Carboxifluoresceína	Sigma Aldrich
Citrato de sodio dihidrato	J. T. Baker
Cloroformo	Anedra
Cloroformo deuterado	Sigma Aldrich
Cloruro de calcio	Merck

Cloruro de hexaaminrutenio(III)	Sigma Aldrich
Cloruro de magnesio	J. T. Baker
Cloruro de metileno	Anedra
Cloruro de sodio	Merck
Cloruro de potasio	Merck
Cloruro de tionilo	J. T. Baker
Decis Forte concentrado emulsionable	Bayer
2-desoxiguanosina	Sigma Aldrich
<i>N,N'</i> -d ciclohexilcarbodiimida	Sigma Aldrich
<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida	Sigma Aldrich
<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina	Sigma Aldrich
<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida	Sigma Aldrich
Dimetilformamida	J. T. Baker
Dimetilsulfóxido	Aberkon Química
Dioxano	Cicarelli
Ditiotreitol	Sigma Aldrich
Espermidina	Sigma Aldrich
Etanol 96%	QuímicaWisconsin
9-fluorenilmetil-cloroformato	Sigma Aldrich
Formaldehído 36%	Anedra
Fosfato diácido de potasio	J. T. Baker
Fosfato monoácido de potasio	Cicarelli
Fosfato monoácido de sodio	Anedra
<i>Glycogen</i> 20 µg/µL	Invitrogen
Hexacianoferrato (III) de potasio	Merck
1,1,1,3,3,3-hexafluoropropanol	Sigma Aldrich
Hexano	Anedra
HEPES <sup>1</sup>	Sigma Aldrich
Hidróxido de sodio	Anedra
<i>N</i> -hidroxisuccinimida	Sigma Aldrich
Isopropanol	Sintorgan
6-mercaptohexanol	Sigma Aldrich

---

<sup>1</sup> *N*-(2-hidroxietyl)-piperazina-*N'*-(2-etanosulfonato) de sodio

MES <sup>2</sup>	Sigma Aldrich
Metanol	Anedra
<i>N,N'</i> -metilenbisacrilamida	Invitrogen
Nitrato de plata	Anedra
Nitrato de sodio	Sigma Aldrich
Persulfato de amonio	Sigma Aldrich
Piridina	Reactivos Raudo
Sulfato de magnesio	J. T. Baker
Sulfato de sodio anhidro	Anedra
<i>Sybr Safe DNA gel stain</i> en DMSO 10000X	Invitrogen
Tetrahidrofurano	Aberkon Química
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamina	Invitrogen
Tiosulfato de sodio	C.C. J. Rapoport
Tolueno	Aberkon Química
Trietilamina	Sintorgan
Tris-(2-carboxietil)fosfina clorhidrato	Sigma Aldrich
Tris-HCl <sup>3</sup>	Sigma Aldrich
Urea	Invitrogen
<i>Xileno Cyanol</i> <sup>4</sup>	Invitrogen

### 2.1.2. Cromatografía, separación y purificación

Columna CG PEelite-5; 95% dimetilpolisiloxano: 5% difenilpolisiloxano (0,25 µl, 300 cm x 2,5 cm)	Perkin Elmer
Columna HPLC Kromasil 100 C18 (5 µm; 25 cm x 0,4 cm)	Gibco
Cromatofolio AL TLC 20x20 cm Sílica gel 60 F <sub>254</sub>	Merck
<i>DNA Clean &amp; Concentrador</i> <sup>TM</sup> -5	Zymo Research
Sephadex G-25 superfina	G.E Healthcare
Sílica gel 60 (0,063 mm – 0,200 mm)	Merck

<sup>2</sup> Ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico

<sup>3</sup> 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

<sup>4</sup> {[4-{(Z)-[4-(etilamino)-3-metilfenil][(4Z)-4-(etilimino)-3-metil-2,5-ciclohexadien-1-iliden]metil}-3-sulfinoxi)fenoxi]sulfinil}oxidanida de sodio

### 2.1.3. Enzimas

Cal B	Novozyme
<i>Fast PCR Hot Start</i> ADN Polimerasa	Kapa 2G
<i>Robust Hot Start</i> ADN Polimerasa	Kapa2G
T4 polinucleótido quinasa	Invitrogen
Taq ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>	Sigma Aldrich

### 2.1.4. Resinas y *Beads* Magnéticos modificados

<i>ECH Sepharose 4B</i>	Pharmacia Biotech
<i>BcMag<sup>TM</sup> Carboxy-terminated Magnetic Beads</i>	Bioclone Inc
<i>Streptavidin Magsphere Paramagnetic Particles</i>	Promega
<i>Dynabeads M-280 Streptavidin</i>	Invitrogen

### 2.1.5. Radioisótopos

$\gamma$ - <sup>32</sup> P-Adenosina trifosfato	Perkin Elmer
---	--------------

### 2.1.6. Marcadores de peso molecular

<i>Ladder 50 pb precisión</i>	Productos Biológicos
<i>PCR Marker 50-2000 bp</i>	Sigma Aldrich

### 2.1.7. Nucleótidos y Oligonucleótidos

#### 2.1.7.1. Aptámero para ATP (Apt-ATP)

La secuencia del aptámero de ATP (5'-ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GGT-3') fue reportada por Szostak et al<sup>31</sup>. Las secuencias de ADN fueron sintetizadas y purificadas por desalado (Sigma-Genosys, USA).

**5Ts-Apt:** La secuencia tiene 5 fosforotioatos en el extremo 5' seguidos de 5 Timinas adicionales como *linkers* (5'-TsTsTs TsTsT TTT TAC CTG GGG GAG TAT TGC GGA GGA AGG T-3').

**T-Apt:** La secuencia tiene 5 Timinas adicionales como *linkers* en el extremos 5' (5'-TTT T TA CCT GGG GGA GTA TTG CGG AGG AAG GT-3').

**C<sub>6</sub>-S-S-C<sub>6</sub>-Apt:** La secuencia tiene un puente disulfuro unido al extremo 5' del aptámero a través de una cadena de 6 átomos de carbono y 5 Timinas adicionales como *linkers* (CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-5'-TTT T TA CCT GGG GGA GTA TTG CGG AGG AAG GT-3').

**3Ts-Apt:** La secuencia tiene 3 fosforotioatos en el extremo 5' seguidos de 5 Timinas adicionales como *linkers* (5'-TsTsTs TTT TTA CCT GGG GGA GTA TTG CGG AGG AAG GT-3').

**1Ts-Apt:** La secuencia tiene 1 fosforotioato en el extremo 5' seguidos de 5 Timinas adicionales como *linkers* (5'-TsTT TTT ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GGT-3').

**NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts:** La secuencia tiene en el extremos 3', 1 Timina seguida de 5 fosforotioatos y 4 Timinas, y en el extremo 5', un grupo amino conectado a través de 6 grupos metilenos (NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-5'-ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GGT TTT TTsTs TsTsTs T-3').

**NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-S-S-C<sub>6</sub>:** La secuencia tiene un puente disulfuro unido al extremo 3' del aptámero a través de una cadena de 6 átomos de carbono, seguidos de 5 Timinas antes de la secuencia del aptámero, y en el extremo 5', un grupo amino conectado a través de 6 grupos metilenos (NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-5'-ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GGT TTT TT-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CH<sub>3</sub>-3').

### 2.1.7.2. Secuencias complementarias al Apt-ATP

Se utilizaron dos secuencias complementarias a la secuencia del **Apt-ATP** de diferente longitud. Las secuencias de ADN se sintetizaron y se purificaron por desalado (Sigma-Genosys, USA).

**C11:** 5'- CTC CCC CAG GT-3'.

**C27:** 5'-ACC TTC CTC CGA AAT ACT CCC CCA GGT-3'.

### 2.1.7.3. Secuencias utilizadas en el proceso de SELEX

#### 2.1.7.3.1. Biblioteca de ADN<sub>ss</sub> (**BiblioADN<sub>ss</sub>**)<sup>145</sup>

La **BiblioADN<sub>ss</sub>** consta de una zona aleatoria de 60 nucleótidos, flanqueada por dos secuencias fijas de 18 nucleótidos cada una, teniendo una longitud total de 96 nucleótidos. La misma se sintetizó y se purificó por PAGE (Sigma-Genosys, USA).

**BiBlioADN<sub>ss</sub>:** 5'-CGT ACG GAA TTC GCT AGC-N<sub>60</sub>-GGA TCC GAG CTC CAC GTG- 3'.

#### 2.1.7.3.2. Secuencias cortas para optimizar la electroforesis planar

Todas las secuencias se sintetizaron y purificaron por desalado (IDT, Biodynamics).

**ADN<sub>ss</sub> 18 mer:** 5'-CAC GTG GAG CTC GGA TCC-3'.

**ADN<sub>ss</sub> 27 mer:** 5'-ACC TTC CTC CGA AAT ACT CCC CCA GGT-3'.

#### 2.1.7.3.3. *Primers* para PCR

Todas las secuencias se sintetizaron y purificaron por desalado (IDT, Biodynamics).

**Primer Down** (18 mer): 5'-CAC GTG GAG CTC GGA TCC-3'.

**Primer Up** (18 mer): 5'-CGT ACG GAA TTC GCT AGC-3'.

**F-Primer up** (18 mer): Fluoresceína-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-5'-CGT ACG GAA TTC GCT AGC-3'.

**B-Primer down** (18 mer): Biotina-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-5'-CAC GTG GAG CTC GGA TCC-3'.

#### 2.1.7.4. Nucleótidos

Desoxirribonucleótidos trifosfato (**dNTPs**) *mix* 10 mM cada uno                      DSBIO

#### 2.1.8. Buffer y soluciones

Todas las soluciones fueron preparadas con agua MilliQ (18 MΩ . cm).

##### 2.1.8.1. Reacciones de marcación con $\gamma$ -<sup>32</sup>P en el extremo 5'

###### Buffer A 10X

Tris-HCl pH 7,6	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
Espermidina	1 mM
EDTA	1 mM
Ditiotreitol	50 mM

##### 2.1.8.2. Electroforesis planar

###### TBE 5X

Tris-HCl pH 8,3	445 mM
Ácido bórico	445 mM
EDTA	10 mM

###### Buffer de siembra desnaturizante

TBE pH 8,3	1X
Urea	7 M
EDTA	100 mM
Azul de bromofenol	0,1%
<i>Xileno cyanol</i>	0,1%

**Buffer de siembra no desnaturalizante**

TBE pH 8,3	1X
EDTA	100 mM
Azul de bromofenol	0,1%
<i>Xileno cianol</i>	0,1%

**2.1.8.3. Solución piraña**

Agua oxigenada 30%	1
Ácido sulfúrico 98%	3

**2.1.8.4. Buffer fosfato 10 mM pH 7,0**

$K_2HPO_4$	10 mM
$KH_2PO_4$	10 mM

**2.1.8.5. Buffer de reducción del Apt-ATP**

$MgCl_2$	100 mM
NaCl	100 mM
Buffer fosfato pH 7,0	10 mM

**2.1.8.6. Buffer de reconocimiento aptámero-ATP/Adenosina**

Tris-HCl pH 7,6	20 mM
NaCl	300 mM
$MgCl_2$	5 mM

**2.1.8.7. Buffer TEAA 10X pH 7 (HPLC)**

Acetato de trietilamonio	1 M
--------------------------	-----

#### 2.1.8.8. Buffer PBS 10 mM pH 7,2

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
NaCl	1 M
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM

#### 2.1.8.9. Buffer PBS 0,3 M pH 7,4

NaCl	0,3 M
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
KCl	2,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM

#### 2.1.8.10. Buffer de hibridización

Tris-HCl pH 8,2	25 mM
NaCl	300 mM

#### 2.1.8.11. Buffer PCR

##### 10X PCR buffer sin MgCl<sub>2</sub>

Tris-HCl pH 8,3	100 mM
KCl	500 mM

##### 5X Kapa 2G buffer A con MgCl<sub>2</sub>

#### 2.1.8.12. Buffer de *binding* SELEX

NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 7,6	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM

KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
Tween 20	0,02%

#### 2.1.8.13. Buffer de elución SELEX

Tris-HCl pH 8,0	40 mM
EDTA	10 mM
Urea	3.5 M
Tween 20	0,02%

#### 2.1.8.14. Buffer SSC 20X pH 7,2

NaCl	3 M
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O	300 mM

#### 2.1.8.15. Dynabeads M-280 Streptavidin

##### ***Binding and washing buffer (B&W) 2X***

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	2 M

### 2.1.9. Electrodo

#### 2.1.9.1. Electrodo de trabajo

Láminas de oro policristalino de 1,0 cm x 0,5 cm ( $A_{\text{geom}} = 2,01 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ )

Electrodos comerciales (Metrohm) de oro policristalino  $d = 1,6 \text{ mm}$

( $A_{\text{geom}} = 2,01 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ )

#### 2.1.9.2. Contraelectrodo y electrodo de referencia

El contraelectrodo utilizado en todos los casos consistió en un alambre de platino.

Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de Ag/AgCl. Dicho electrodo consiste en un alambre de Ag, recubierto con AgCl, inmerso en una solución 3 M de KCl saturada en AgCl.

## 2.2. Equipamiento

Agitador	SCientífica
Centrifuga refrigerada 5804R	Eppendorf
Concentrador plus	Eppendorf
Contador de centelleo	Rackbeta Pharmacia
Contador geiger manual	Survey Meter
Cromatógrafo Gaseoso AutoSystem XL (CG) con autosampler	Perkin Elmer
Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC)	Gilson
Detector de captura de electrones (CG-ECD)	Perkin Elmer
Enduro Electrophoresis Systems (electrophoresis planar)	Labnet
Espectrofluorómetro Cary Eclipse	Varian
Lámpara 254 nm UV/vis (detector HPLC)	Gilson
Mastercycler personal 5332	Eppendorf
Millipore Simplicity	Millipore
Mini-PROTEAN Tetra Cell	BIO-RAD
Nanodrop (DNA-50)	Thermo Scientific
Phosphoimager	Applied Biosystem
Potenciostato Autolab PGStat10 (GPES 4.9)	EcoChemie
RMN 500 MHz (UMYMFOR-Lanais)	Bruker
Rotavap	Büchi
Secadora de gel	H.Scient. Inst.
Shaker	Ferca
Speed-vac	Savant
Storm 820 (Image Quant 5.1)	Molecular Dynamics
Transiluminador Benchtop Variable (320 nm)	UVP

## 2.3. Protocolo para la limpieza de superficies de oro

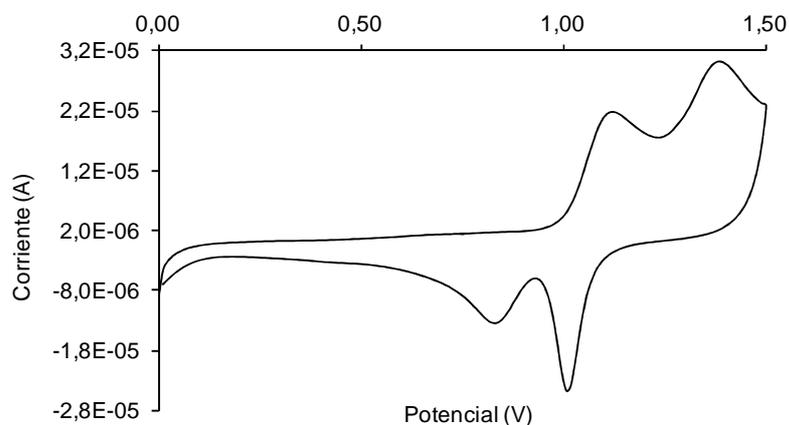
### 2.3.1. Láminas de oro policristalino

#### 2.3.1.1. Experimentos radioquímicos

Se sumergieron en solución piraña por 3 horas. Se enjuagaron con agua MilliQ por inmersión. Se secaron al aire.

#### 2.3.1.2. Experimentos electroquímicos

Se sumergieron en solución piraña por 15 minutos. Se enjuagaron con abundante agua MilliQ. Se llevaron al rojo en la llama de un mechero mecker. Se enfriaron en desecador y se midió la respuesta por voltametría cíclica (ver *Figura 2-1*) en una solución 1,8 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0 V a 1,5 V; V = 0,5 V/s).



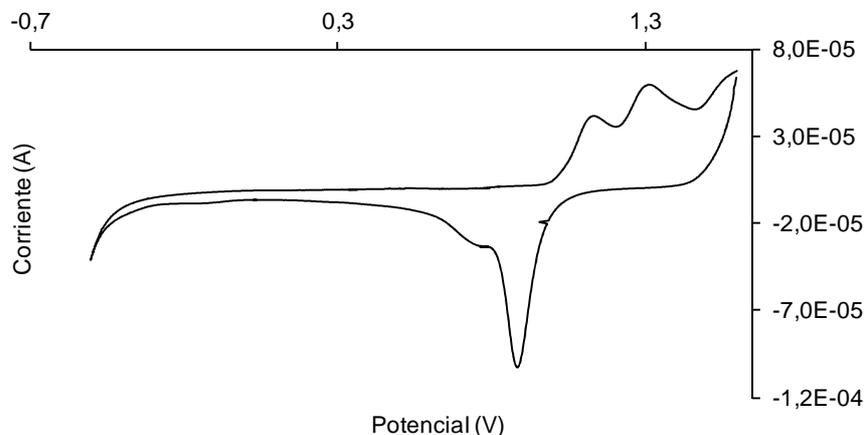
*Figura 2-1.* Voltagrama cíclico para una lámina de oro medido en una solución 1,8 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La velocidad de barrido fue de 0,5 V/seg.

El área de las láminas (n = 8) se determinó por voltametría cíclica en una solución 0,05 M de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], resultando un área de  $(85 \pm 2) \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ .

### 2.3.2. Electrodo comerciales de oro policristalino

Se pulieron mecánicamente con una suspensión de alúmina 0,5  $\mu\text{m}$ . Se enjuagaron con agua MilliQ por inmersión. Luego se sumergieron en una solución 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

por 30 minutos. Se enjuagaron con agua MilliQ por inmersión. Se realizaron 20 barridos (-0,5 V a 1,6 V) a 0,5 V/seg en una solución 0,5 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, hasta obtener un voltagrama típico de oro (ver *Figura 2-2*). Se enjuagaron con agua MilliQ y se secaron al aire.



*Figura 2-2.* Voltagrama cíclico para un electrodo de oro comercial medido en una solución 0,5 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La velocidad de barrido fue de 0,5 V/seg.

El área de los electrodos ( $n = 4$ ) se determinó por voltametría cíclica en una solución 0,02 M de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], resultando un área de  $(19 \pm 2) \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ .

#### 2.4. Protocolo para la modificación superficial con 6-mercaptohexanol (MCH)

La inmovilización de MCH se realizó por inmersión de la superficie de oro en 1,0 mL de una solución 1,5 mM de MCH. Se dejó por 1 hora 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Una vez finalizada la inmovilización, se lavó por duplicado por inmersión en 1,0 mL de agua MilliQ. Se dejó secar al aire.

#### 2.5. Activación del ácido carboxiferroceno (FcCOOH, 1) para dar *N*-hidroxisuccinimidilcarboxiferroceno (FcNHS, 2)

	Reactivo	Cantidad
	FcCOOH (1)	0,50 g
	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida (DCC)	0,49 g
	Dioxano	25 mL
	<i>N</i> -hidroxisuccinimida (NHS)	0,30 g

Se disolvió la DCC en 5,0 mL de dioxano. Se agregó gota a gota bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y durante aproximadamente 30 minutos, una solución de **FcCOOH (1)** y NHS en 20 mL de dioxano. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente por 20 horas, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Se observó la aparición de un sólido blanco. Se filtró y se descartó el sólido. Se rotaevaporó la solución, obteniéndose un sólido naranja. Se purificó por columna de sílica gel sembrando el residuo disuelto en CHCl<sub>3</sub>:MeOH 99:1, y como solvente de elución se utilizó CHCl<sub>3</sub>:MeOH 99:1. Se obtuvo un sólido naranja.

**Rendimiento: 96%                      Rf: 0,40 en CHCl<sub>3</sub>:MeOH 99:1**

**Compuesto 2:**

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 2,87 (d, J = 13,7 Hz, 4H, H1 y H2); 4,39 (s, 5H, H11, H12, H13, H14 y H15); 4,57 (t, J = 2,1 Hz, 2H, H7 y H10); 4,94 (t, J = 2,1 Hz, 2H, H8 y H9).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 25,68 (C1 y C2); 64,26 (C6); 70,81 (C11, C12, C13, C14 y C15); 72,84 (C7, C8, C9 y C10); 167,42 (C5); 169,61 (C3 y C4).

**2.6. Ensayos con el Apt-ATP**

**2.6.1. Reacción de marcación con <sup>32</sup>P**

Reactivo	Cantidad
Buffer A 10X	0,002 mL
ADN	0,50 g
γ-ATP <sup>32</sup> P	20 μCi
Agua estéril	hasta 0,020 mL
T4 polinucleótido quinasa	20 U
Cloroformo:alcohol isoamílico 24:1	0,10 mL

Se mezcló el buffer A 10X, el ADN, el γ-ATP<sup>32</sup>P y el agua. Luego, se adicionó la enzima T4 polinucleótido quinasa y se incubó a 37°C durante una hora. La reacción se enfrió en hielo y se agregó agua hasta alcanzar un volumen final de 0,020 mL. Se extrajo con CHCl<sub>3</sub>:alcohol isoamílico 24:1 y la fase acuosa se purificó por Sephadex-G25, usando como solvente agua estéril. Se juntaron alícuotas de 0,50 mL cada una y se evaporó el solvente en la centrífuga de vacío. Se resuspendió cada alícuota en 0,010 mL de agua estéril y se determinó la marca de las mismas con un contador de centelleo (2,0 mL de solución de centelleo con 5,0 x 10<sup>-4</sup> mL de cada alícuota). Se corroboró la

integridad del ADN marcado con un gel de poliacrilamida al 40% en condiciones desnaturalizantes.

### 2.6.2. Geles de poliacrilamida (PAGE) al 40% en condiciones desnaturalizantes

Se utilizaron minigeles de 10 x 8,2 cm aproximadamente (espaciador de 0,75 mm). Para 2 minigeles se utilizó:

Reactivo	Cantidad
Urea	5,0 g
Acrilamida: <i>N,N'</i> -metilenbisacrilamida (38:2)	5,0 mL
TBE 5X	2,0 mL
Persulfato de amonio 10%	0,10 mL
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamino (TEMED)	0,030 mL
Agua estéril	3,0 mL

Se mezclaron la urea, la solución de acrilamida:*N,N'*-metilenbisacrilamida, el buffer TBE y el agua. Se sonicó por 15 minutos para eliminar el oxígeno disuelto y se agregó el TEMED y el persulfato de amonio. Se armaron los geles dejando polimerizar por 45 minutos y se realizó una precorrida a 20 mA/minigel en buffer TBE 1X por 30 minutos. Se sembró un volumen de ADN marcado, de forma tal de tener aproximadamente 1500 cuentas/calle, en 0,010 mL de buffer de siembra desnaturalizante. La corrida se realizó en buffer TBE 1X a 250 V por 1 hora. Una vez separadas las bandas, los geles se lavaron con H<sub>2</sub>O:HAcO:MeOH 8:1:1 durante 1 hora con agitación suave para eliminar la urea. Por último, los geles se secaron en una secadora de gel, con calentamiento por 45 minutos y a temperatura ambiente por 20 minutos. El gel seco se expuso a una placa sensible a <sup>32</sup>P y se determinó la marca radiactiva.

### 2.6.3. Protocolo para la reducción del puente disulfuro del Apt-ATP

Reactivo	Cantidad
Solución 200 µM del <b>Apt-ATP</b>	10 µL
Tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 10 mM	10 µL

Se mezcló la solución del **Apt-ATP** con el TCEP a 4°C y en oscuridad por 5 horas, obteniéndose una concentración final del **Apt-ATP**, 100 µM. Se diluyó la solución anterior en el buffer de reducción hasta alcanzar la concentración deseada de **Apt-ATP**.

#### **2.6.4. Protocolo para la inmovilización de Apt-ATP**

Se depositó sobre la superficie de oro limpia, una gota de 0,010 mL del **Apt-ATP** de la concentración correspondiente. Se dejó durante 20 horas en oscuridad a 4°C. Para detener la inmovilización, la superficie de oro se lavó por duplicado por inmersión en 1,0 mL de agua MilliQ durante 15 minutos.

#### **2.6.5. Protocolo para los ensayos de evaluación de la estabilidad térmica del Apt-ATP**

Los electrodos modificados se sumergieron en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,4 a 80°C por 20 minutos. Se enjuagaron con el mismo buffer y se procedió a determinar la densidad superficial por cronocoulombimetría (CronoQ).

#### **2.6.6. Protocolo para los ensayos de reconocimiento de $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP**

Se preparó una solución de adenosina  $2,7 \times 10^{-6}$  M en el buffer de reconocimiento<sup>31</sup>. Se agregaron 0,010 mL de una solución  $5,9 \times 10^{-7}$  M de  $\gamma$ -ATP<sup>32</sup>P, resultando una concentración final de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP igual a  $2,4 \times 10^{-10}$  M y de adenosina,  $2,7 \times 10^{-6}$  M.

Se sumergieron las láminas de oro policristalino modificadas con el **5Ts-Apt** + MCH en 0,9 mL de la solución anterior por 2 horas a temperatura ambiente y con agitación leve (50 rpm). Luego de transcurrido el tiempo, se lavaron las láminas por duplicado por inmersión en agua MilliQ.

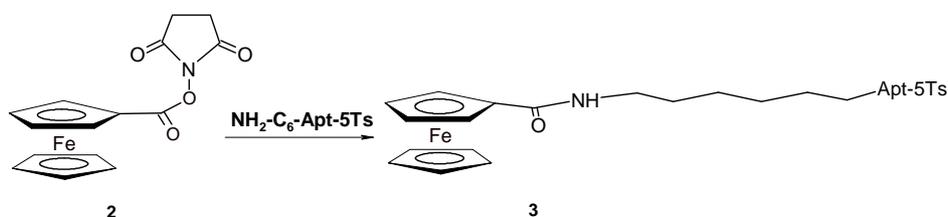
Por último, se cubrieron con papel film y se expusieron en las placas de revelado toda la noche.

### 2.6.7. Protocolo para la derivatización con Fc del Apt-ATP inmovilizado

Se preparó una suspensión de **FcNHS**, mezclando 0,033 g ( $1,0 \times 10^{-4}$  moles) en HEPES 0,20 M pH7,2 : DMF 1,2 : 1 V/V. En ella se sumergieron las superficies de oro con el **Apt-ATP** inmovilizado, en oscuridad y a temperatura ambiente con agitación por 12 horas. Se detuvo la derivatización por inmersión en una solución 0,20 M de buffer HEPES pH 7,2.

### 2.6.8. Protocolo para la derivatización del Apt-ATP con Fc en solución

#### 2.6.8.1. Derivatización del Apt-ATP con FcNHS (2)



#### 2.6.8.1.1. Derivatización en buffer PBS 0,3 M pH 7,4

Reactivo	Cantidad
<b>FcNHS (2)</b>	0,005 g
<b><math>\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Apt-5Ts}</math> 200 <math>\mu\text{M}</math></b>	12,5 $\mu\text{L}$
Buffer PBS 0,3 M pH 7,4	87,5 $\mu\text{L}$

Se disolvió el  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Apt-5Ts}$  en buffer PBS 0,3 M pH 7,4. Luego se agregó el **FcNHS** y se dejó reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente.

#### 2.6.8.1.2. Derivatización en buffer HEPES 0,2 M pH 7,2 : DMF

5:1 V/V

Reactivo	Cantidad
<b>FcNHS (2)</b>	0,005 g
<b><math>\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Apt-5Ts}</math> 200 <math>\mu\text{M}</math></b>	12,5 $\mu\text{L}$
Buffer HEPES 0,2 M pH 7,2	72,9 $\mu\text{L}$
DMF	14,6 $\mu\text{L}$

Se disolvió el **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** en buffer HEPES 0,2 M pH 7,2. Luego se agregó el **FcNHS** disuelto en DMF. Se dejó reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente.

#### 2.6.8.1.3. Derivatización en buffer NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M pH 9 :

**DMSO 3:1 V/V**

Reactivo	Cantidad
<b>FcNHS (2)</b>	0,005 g
<b>NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts</b> 200 μM	12,5 μL
Buffer NaHCO <sub>3</sub> /Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,5 M pH 9	65,6 μL
DMSO	21,9 μL

Se disolvió el **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** en buffer NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M pH 9. Luego se agregó el **FcNHS** disuelto en DMSO. Se dejó reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente.

#### 2.6.8.1.4. Derivatización en buffer NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M pH 9 :

**DMSO 1:1 V/V**

Reactivo	Cantidad
<b>FcNHS (2)</b>	0,005 g
<b>NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts</b> 200 μM	25 μL
Buffer NaHCO <sub>3</sub> /Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,5 M pH 9	87,5 μL
DMSO	87,5 μL

Se disolvió el **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** en buffer NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M pH 9. Luego se agregó el **FcNHS** disuelto en DMSO. Se dejó reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente con agitación vigorosa.

Luego de la reacción de derivatización, se purificó la misma utilizando una resina Sephadex G-25 y agua como solvente de elución.

### 2.6.8.6. Método para correr Fc-NH-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts en el HPLC-UV

La reacción de derivatización se controló por HPLC utilizando como solventes de elución buffer TEAA 1X pH 7,0 y acetonitrilo. El programa utilizado (programa 6) fue:

Tiempo (min)	% Acetonitrilo
0	10
20	25
30	60
40	90
60	10
Flujo 0,7 mL/min	

### 2.6.9. Experimentos con estructuras de ADN<sub>ds</sub>

#### 2.6.9.1. Hibridización

Reactivo	Cantidad	Programa: 
<b>Apt-ATP</b> 200 μM	13,75 μL	
<b>C11 o C27</b> 200 μM	13,75 μL	
Buffer hibridización	472,50 μL	

Se preparó una mezcla para cada estructura de ADN<sub>ds</sub> (**M11** y **M27**) y se fraccionó en 5 tubos de 100 μL cada uno. Se realizó la hibridización controlada en el termociclador.

#### 2.6.9.2. PAGE al 20% en condiciones no desnaturizantes

Se utilizaron minigeles de 10 x 8,2 cm aproximadamente (espaciador de 0,75 mm). Para 2 minigeles se utilizó:

Reactivo	Cantidad
Acrilamida: <i>N,N'</i> -metilenbisacrilamida (38:2)	4,7 mL
TBE 5X	0,7 mL
Persulfato de amonio 10%	93,8 $\mu$ L
TEMED	4,9 $\mu$ L
Agua estéril	1,5 mL

Se mezcló la solución de acrilamida:*N,N'*-metilenbisacrilamida, el buffer TBE y el agua. Se sonicó por 15 minutos para eliminar el oxígeno disuelto y se agregó el TEMED y el persulfato de amonio. Se armaron los geles dejando polimerizar por 45 minutos y se realizó una precorrida a 300 V en buffer TBE 1X por 45 minutos. Se sembró un volumen de ADN en 0,002 mL de buffer de siembra no desnaturalizante. La corrida se realizó en buffer TBE 1X a 300 V por 1 hora. Una vez finalizada la corrida, se realizó la tinción del mismo con nitrato de plata.

### 2.6.9.3. Incubación con el *target* (adenosina, AMP) o con el control (2-desoxiguanosina)

Se incubó el **Apt-ATP** con soluciones de AMP/adenosina/2-desoxiguanosina de la concentración correspondiente, en el buffer de reconocimiento (20 mM Tris pH 8,2 + 300 mM NaCl + 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Se probaron distintas condiciones de temperatura, de tiempos de incubación y de concentración de los analitos.

## 2.7. Ensayos con el 3-MPA

Se inmovilizó el 3-MPA a partir de una solución 20 mM de 3-MPA en EtOH:H<sub>2</sub>O 9:1 depositando una gota (0,025 mL, 24 horas a 18°C y oscuridad) sobre la superficie de oro. Se activó el grupo carboxílico con 0,050 mL de una solución 100 mM de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) en una solución 10 mM de buffer MES pH 5,5. Se dejó tapado por 30 minutos en oscuridad y 18°C. Posteriormente, se lo hizo reaccionar con 0,050 mL de una solución 50 mM de etilendiamina en una solución 10 mM de buffer HEPES pH 8,0, durante 24 horas a 18°C y en oscuridad. Por último, las superficies de oro se trataron por inmersión en 0,75 mL de una suspensión de **FcNHS** (0,005 g) en buffer NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M pH 9 : DMSO 1:1 V/V, con agitación

vigorosa, por 24 horas, a temperatura ambiente y en oscuridad. La derivatización se detuvo por inmersión en buffer  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M pH 9,0.

## 2.8. Experimentos electroquímicos

Para desoxigenar la celda las soluciones se purgan con  $\text{N}_2$ .

### 2.8.1. Técnicas electroquímicas utilizadas

Existe una amplia variedad de técnicas electroquímicas desarrolladas para determinar los parámetros cinéticos y termodinámicos de las reacciones de electrodo. La técnica a utilizar dependerá del sistema químico y de la información que se desee obtener. En este trabajo de tesis se utilizaron principalmente cuatro técnicas electroquímicas: voltametría cíclica, cronoamperometría, voltametría de pulso diferencial y voltametría de onda cuadrada. A continuación se describe brevemente el fundamento de cada una de ellas<sup>146</sup>.

#### 2.8.1.1. Voltametría Cíclica (VC)

En la VC se hace un barrido lineal del potencial a una dada velocidad de barrido, a partir de un potencial inicial ( $E_1$ ) hasta un potencial final ( $E_2$ ), pudiendo regresar, nuevamente, al mismo potencial inicial  $E_1$  u a otro valor  $E_3$  y así sucesivamente (*Figura 2-3*). Los límites de potencial definen las reacciones electródicas que se permiten que se produzcan y la velocidad de barrido, la escala de tiempo en la que se examina el proceso electroquímico. Se grafica la respuesta de corriente del sistema en función del potencial aplicado, obteniéndose la curva intensidad de corriente – potencial ( $i$  vs.  $E$ ) o curva voltamétrica.

Esta técnica aporta información acerca del proceso de electrodo, ya que dependiendo de la forma de la curva voltamétrica se podrá conocer la reversibilidad del mismo. El análisis de las curvas corriente - potencial también permite detectar procesos acoplados a los de oxidación y reducción, por ejemplo adsorción o desorción de una especie electroquímicamente activa, o reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de carga.

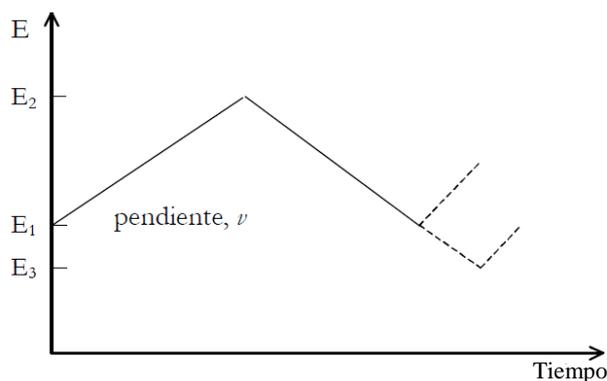


Figura 2-3. Perfil de potencial en función del tiempo para VC.

### 2.8.1.2. Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica en la cual el potencial del electrodo se cambia instantáneamente (Figura 2-4) y se mide la corriente en función del tiempo.

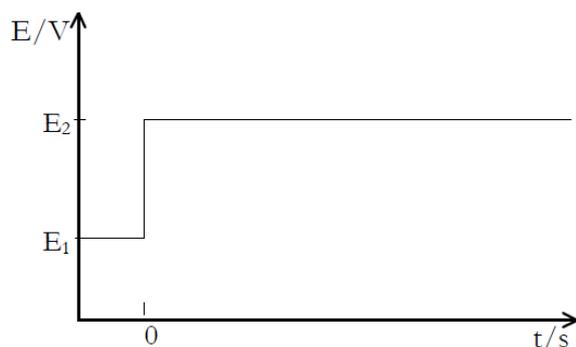


Figura 2-4. Potencial en función del tiempo para un experimento de cronoamperometría.

La corriente integrada, o la carga Q, como función del tiempo en un experimento cronoamperométrico viene dada por la integración de la expresión de Cottrell:

$$Q = \frac{2nFAD_0^{1/2}C_0^*}{\pi^{1/2}} t^{1/2} \quad (\text{ecuación 2-1})$$

donde n es el número de electrones intercambiados por la reacción, F la constante de Faraday (C/equiv), A el área del electrodo (cm<sup>2</sup>), D<sub>0</sub> el coeficiente de difusión de la especie electroactiva (cm<sup>2</sup>/s) y C<sub>0</sub><sup>\*</sup> la concentración del *target* en el seno de la solución (mol/cm<sup>2</sup>).

A tiempos cortos predominan los procesos de carga de la doble capa electroquímica y a tiempos largos, los procesos de convección natural y posibles vibraciones.

### 2.8.1.3. Voltametría de pulso diferencial (VPD)

En la VPD, el barrido de potencial no se realiza de forma lineal como en la voltametría cíclica, sino que se aplica un perfil caracterizado por pulsos de potencial de baja amplitud (Figura 2-5). En esta técnica se toman dos medidas de corriente por cada pulso de potencial aplicado, la primera de ellas a tiempo  $\tau'$ , inmediatamente antes del pulso, y la segunda a tiempo  $\tau$ , justo antes de la finalización del pulso. En esta última medición, la corriente capacitiva, correspondiente a la carga de la doble capa, ya habrá caído a cero haciendo que la corriente medida sea netamente faradaica. De esta forma, la técnica gana sensibilidad respecto de las técnicas no pulsadas. El registro del experimento corresponde a un gráfico de la diferencia de corriente,  $\delta i = i(\tau) - i(\tau')$  en función del potencial base,  $E$ .

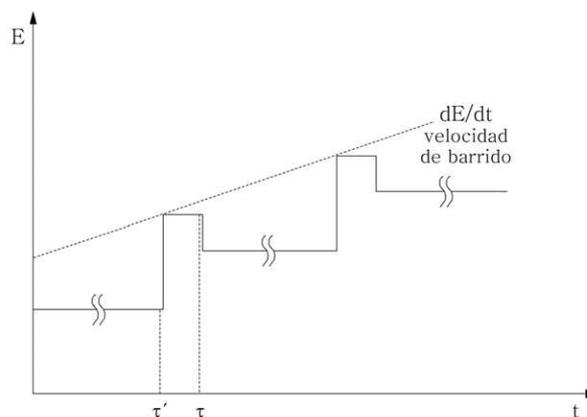


Figura 2-5. Programa de potencial en un experimento de voltametría de pulso diferencial.

### 2.8.1.4. Voltametría de onda cuadrada (VOC)

La VOC combina los mejores atributos de los métodos voltamétricos de pulso, una buena línea de base, la sensibilidad de la VPD, la capacidad diagnóstica de la voltametría normal de pulso y la habilidad para caracterizar productos de manera directa. También permite medir en un amplio rango de escala temporal como en el caso de las técnicas polarográficas de pulso. La forma del pulso puede ser interpretada como un caso particular de la VPD, en el cual el periodo de pre-electrólisis y el pulso son de

igual duración, y éste tiene la dirección opuesta al barrido aplicado. La interpretación de los resultados se facilita considerando la forma de la onda como un barrido en estado estacionario, al cual se superpone un doble pulso simétrico, uno en la dirección directa y otra en la inversa (Figura 2-6).

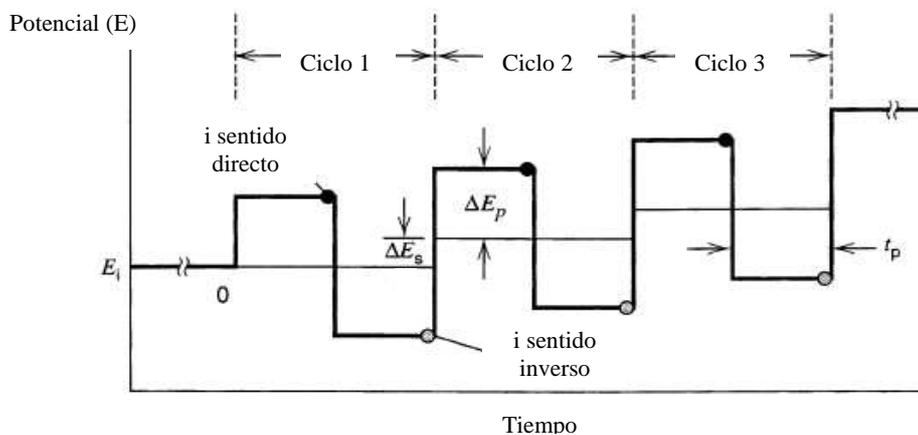


Figura 2-6. Esquema de la forma del pulso y medición en VOC.

Dado que la capa difusional no se renueva al inicio de cada ciclo, la condición inicial de la misma es el resultado de su evolución en los pulsos previos. Dicha capa es función, no sólo de la forma de la onda aplicada, sino de la cinética y los procesos químicos asociados al electrodo. Los procesos faradaicos controlan el límite de detección en VOC.

Con respecto a las aplicaciones, al igual que la VC, la VOC posee una gran capacidad diagnóstica especialmente cuando se analizan las corrientes directa e inversa. La técnica permite obtener información sobre los procesos de electrodos para un amplio rango de potencial en un tiempo acotado. La ventaja con respecto a VC es la supresión de la corriente de base, por lo tanto, es posible medir a concentraciones menores que las requeridas para una VC. En un sentido amplio la VOC es mejor que la VC para evaluar parámetros cuantitativos en sistemas en los cuales se conocen los mecanismos. Una de las debilidades de la VOC con respecto a la VC, es que resulta intuitivamente más difícil de interpretar en términos químicos. Además en la VC el barrido inverso cubre un amplio rango de potencial, hecho que permite detectar procesos que están separados por una brecha de potencial más grande. Finalmente, la VC cubre una mayor escala de tiempo que la VOC. Para el análisis cuantitativo, la VOC es generalmente la mejor opción en cuanto a métodos de pulso.

## **2.8.2. Determinación de la capacidad de los electrodos**

### **2.8.2.1. VC**

+0,1 V a -0,4 V; 0,1 V/s en una solución 0,01 M de buffer Tris-HCl pH 7,4.

### **2.8.2.2. Cronoamperometría**

Salto de potencial de 0,5 V (+0,1 V a -0,4 V) en una solución 0,01 M de buffer Tris-HCl pH 7,4.

## **2.8.3. Determinación de la densidad superficial por CronoQ**

Salto de potencial de 0,5 V (+0,1 V a -0,4 V) en una solución 0,01 M de buffer Tris-HCl pH 7,4 (blanco) y en una solución 50  $\mu\text{M}$  de cloruro de hexaaminrutenio (III) (RuHex) en una solución 0,01 M de buffer Tris-HCl pH 7,4.

Velocidad de muestreo =  $0,0001\text{s}^{-1}$

## **2.8.4. Detección electroquímica de adenosina por VOC**

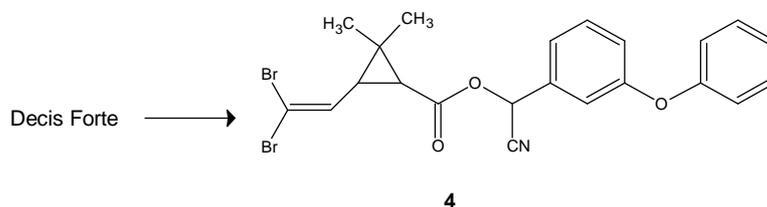
Se realizaron agregados sucesivos de una solución 1 mM de adenosina en una solución 0,2 M de buffer HEPES pH 7,2 en la celda electroquímica. El rango de concentraciones de trabajo varió desde 4,0  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ . La respuesta del Fc se midió por VOC, siendo el rango de potencial de 0,1 V a 0,6 V y el incremento de potencial de 0,0051 V.

## **2.8.5. Sistema modelo 3-MPA**

**Detección de Fc (VPD):** -0,1 V a 0,6 V; en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,9.

## 2.9. Obtención del *target*

### 2.9.1. Extracción de deltametrina (4)



A la muestra (50 mL) se le agregó hexano (60 mL) y agua destilada (60 mL) en una ampolla de extracción de 250 mL. La solución se dejó en reposo por un día, quedando una fase acuosa (FA1) que se descartó, una emulsión (E1) y una fase orgánica (FO1). La E1 se volvió a extraer con hexano (60 mL), obteniéndose una fase orgánica (FO2) y una emulsión (E2). Dicha emulsión se trató con NaCl, dejándola reposar por varios días. Se separó la fase acuosa (FA2) y se guardó la fase orgánica (FO3).

Las fases orgánicas (FO1, FO2 y FO3) se juntaron y se trataron con sulfato de sodio anhidro durante un día. Se filtró la suspensión obtenida y la solución se rotaevaporó. Se obtuvo una mezcla de un aceite junto con un precipitado blanco. Dicha mezcla se recristalizó, disolviéndola en la mínima cantidad de EtOH caliente. Se la introdujo en un baño de agua fría hasta aparición de un precipitado blanco, se filtró al vacío y se volvió a recristalizar con EtOH. Finalmente se obtuvo un precipitado blanco.

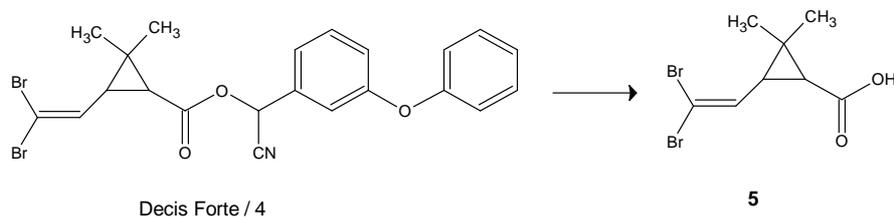
**Rendimiento: 50%    Punto de fusión: 100°C    Rf: 0,49 en hexano:AcOEt 9:1**

#### Compuesto 4:

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 1,20 (s, 3H, H7); 1,24 (s, 3H, H6); 1,91 (d, 1H, J<sub>5-3</sub>= 8,16 Hz, H5); 2,07 (t, 1H, J<sub>3-5</sub>= 8,16 Hz, J<sub>3-2</sub>= 8,16 Hz, H3); 6,37 (s, 1H, H9); 6,70 (d, 1H, J<sub>2-3</sub>= 8,16 Hz, H2); 7,02-7,17 (m, 5H, H14, H16, H18, H20 y H22); 7,24-7,40 (m, 4H, H12, H13, H19 y H21).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 14,89 (C7); 28,07 (C6); 28,69 (C4); 30,92 (C5); 36,40 (C3); 62,22 (C9); 90,81 (C1); 115,83 (C10); 117,52 (C16); 119,33 (C18 y C22); 120,05 (C14); 121,98 (C20); 124,05 (C12); 129,94 (C19 y C21); 130,59 (C13); 133,24 (C2); 156,14 (C17); 158,14 (C15); 168,38 (C8).

## 2.9.2. Obtención de ácido dibromovinil-2,2-dimetilciclopropanoico (CPCA, 5) a partir de la deltametrina (4)



### 2.9.2.1. Hidrólisis de deltametrina (4)

Reactivo	Cantidad
<b>Deltametrina (4)</b>	0,50 g
EtOH	5,0 mL
NaOH 1 M	3,5 mL

Se disolvió la **deltametrina** en EtOH y se agregó la solución de NaOH gota a gota a través de un refrigerante. Se calentó la mezcla a reflujo en baño de agua por 24 horas, controlando el avance de la reacción por cromatografía en capa delgada (c.c.d.). Se acidificó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta pH 1 y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se rotaevaporó. Se purificó por columna de sílica gel, sembrando el residuo en una pastilla y utilizando como solvente de elución hexano:AcOEt 8:2.

**Rendimiento: 14%**

**Rf: 0,35 en hexano:AcOEt 8:2**

### 2.9.2.2. Alcohólisis enzimática de deltametrina (4)

Reactivo	Cantidad
<b>Deltametrina (4)</b>	0,025 g
EtOH	2,0 mL
Cal B	0,015 g

Se disolvió la **deltametrina** en EtOH y se agregó la enzima Cal B. Se dejó con agitación a 37°C por 3 días, controlando el avance de la reacción por c.c.d. No se observaron cambios por lo tanto se descartó la reacción.

### 2.9.2.3. Saponificación directa del Decis Forte

Reactivo	Cantidad
<b>Decis Forte</b>	50 mL
EtOH	100 mL
NaOH 2 M	20 mL
HCl 37%	3,4 mL
AcOEt	160 mL
NaOH 1 M	90 mL
HCl 1 M	120 mL

Se mezcló el **Decis Forte** junto con el EtOH y la solución de NaOH en un balón de 250 mL y se calentó a reflujo a 70°C en baño de glicerina por una semana, controlando el avance de la reacción por c.c.d. Se acidificó con HCl y se rotaevaporó, haciendo sucesivos agregados de hexano para eliminar la mayor cantidad posible de agua. Se obtuvo un aceite, el cual se purificó por columna de sílica gel, sembrando el residuo en una pastilla con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y usando hexano:AcOEt 9:1 como solvente de elución. Se obtuvo un residuo compuesto por un aceite amarillo y un sólido blanco. Se disolvió el crudo obtenido de la columna en 60 mL de AcOEt y se realizaron dos extracciones sucesivas con 45 mL de una solución 1 M de NaOH cada una. Se juntaron ambas fases acuosas y se realizaron dos extracciones con 50 mL de AcOEt / 60 mL de una solución 1 M de HCl cada una. Se combinaron las fases orgánicas, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se rotaevaporó. Se obtuvo un sólido amarillento, el cual se purificó haciendo sucesivos lavados con hexano en frío. Finalmente, el sólido obtenido se purificó por columna de sílica gel sembrando el mismo en una pastilla, eluyendo con hexano:AcOEt 9:1, obteniéndose un sólido blanco.

**Rendimiento: 86%**

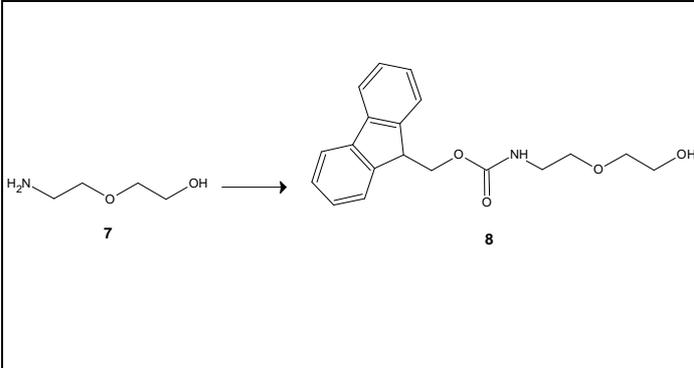
**Rf: 0,39 en hexano:AcOEt 8:2**

#### Compuesto 5:

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 1,27 (s, 3H, H7); 1,29 (s, 3H, H6); 1,86 (d, 1H, J<sub>5-3</sub>= 8,64 Hz, H5); 2,04 (t, 1H, J<sub>3-5</sub>= 8,64 Hz, J<sub>3-2</sub>= 8,64 Hz, H3); 6,72 (d, 1H, J<sub>2-3</sub>= 8,64 Hz, H2).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 15,02 (C7 y C6); 28,43 (C4); 31,65 (C5); 36,37 (C3); 89,80 (C1); 132,98 (C2); 177,36 (C8).

### 2.9.3. Aminoprotección de 2-(2-aminoetoxi)etanol (7) para obtener el 9H-fluoren-9-ilmetil[2-(2-hidroximetoxi)etil]carbamato (8)

	Reactivo	Cantidad
	2-(2-aminoetoxi)etanol (7)	1,0 mL
	9-fluorenilmetil-cloroformato (FMOC-Cl)	3,0 g
	<i>N,N'</i> -diisopropiletamina (DIPEA)	2,0 mL
	Tetrahidrofurano (THF)	21 mL
	NaHCO <sub>3</sub> (ss)	20 mL

Se disolvió el 2-(2-aminoetoxi)etanol junto con la DIPEA en THF destilado. Luego se agregó el FMOC-Cl teniendo cuidado ya que la disolución es levemente exotérmica. Se agitó a temperatura ambiente por 4 horas y media, controlando el avance de la reacción por c.c.d. Se rotaevaporó obteniéndose un aceite anaranjado. El crudo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se extrajo 2 veces con 20 mL de una solución 1 M de HCl cada una. Las fases orgánicas se juntaron y se extrajeron con NaHCO<sub>3</sub>, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se rotaevaporó, obteniéndose un sólido blanco junto con un aceite de color amarillo. Se purificó por columna de sílica gel sembrando el residuo en una pastilla y como solvente de elución se utilizó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 100:2. Se obtuvo un aceite amarillo.

**Rendimiento: 75%**

**Rf: 0,35 en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 100:5**

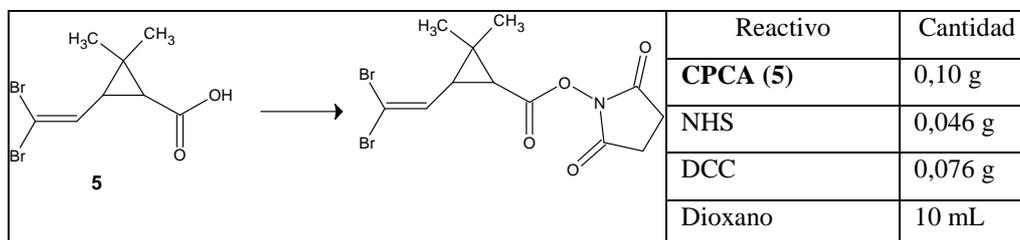
#### Compuesto 8:

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 3,32 (m, 2H, H4); 3,46 (t, 4H, J<sub>2-1</sub> = 4,32 Hz, H2 y H3); 3,64 (t, 2H, J<sub>1-2</sub> = 4,32 Hz, H1); 4,17 (m; 1H, H7), 4,39 (d, 2H, J<sub>6-7</sub> = 6,72 Hz, H6), 7,27 (dt, 2H, J<sub>11-9</sub> = 7,68 Hz, J<sub>11-12</sub> = 7,20 Hz, H11 y H16); 7,36 (t, 2H, J<sub>10-9</sub> = 7,68 Hz, J<sub>10-12</sub> = 7,20 Hz, H10 y H17); 7,56 (d, 2H, J<sub>9-10</sub> = 7,68 Hz, H9 y H18); 7,72 (d, 2H, J<sub>12-11</sub> = 7,20 Hz, H12 y H15).

<sup>3</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 40,65 (C4); 47,06 (C7); 61,35 (C1); 66,28 (C6); 69,91 (C2); 72,12 (C3); 119,77 (C12 y C15); 124,83 (C9 y C18); 126,88 (C10 y C17); 127,50 (C11 y C16); 141,12 (C13 y C14); 143,76 (C8 y C19); 156,59 (C5).

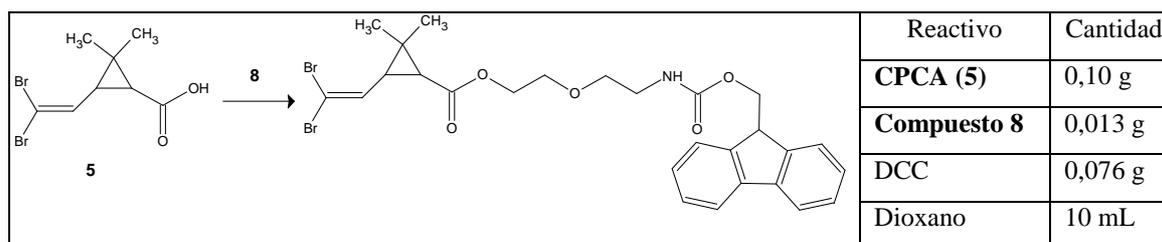
## 2.9.4. Activación del CPCA (5)

### 2.9.4.1. Activación con NHS



Se disolvió la DCC en 3,0 mL de dioxano destilado. Se preparó una solución en dioxano destilado (7 mL) del **CPCA (5)** y la NHS. Se agregó desde una ampolla gota a gota dicha solución sobre la DCC con agitación y a temperatura ambiente durante 20 minutos. La solución se puso turbia y finalmente apareció un precipitado blanco luego de 24 horas de reacción. Se controló el avance de la misma por c.c.d. Se filtró y se rotaevaporó la solución de dioxano. Se intentó purificar por columna de sílica gel sembrando el residuo en una pastilla, pero el mismo quedó retenido en la columna aún usando AcOEt como solvente de elución. Se descartó la reacción.

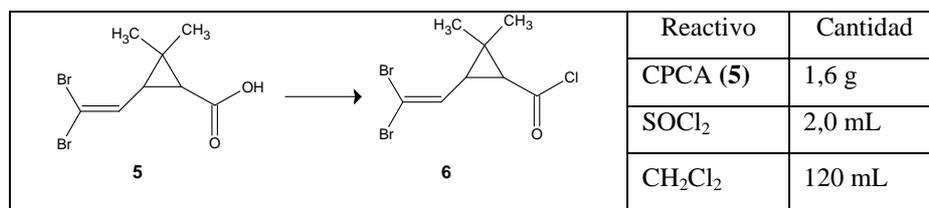
### 2.9.4.2. Activación *in situ* del CPCA (5) con DCC y acoplamiento con 9H-fluoren-9-ilmetil[2-(2-hidroximetoxi)etil]carbamato (8)



Se disolvió la DCC en dioxano (3,0 mL) con agitación. Por separado se disolvió el **CPCA (5)** y el **compuesto 8** en 7,0 mL de dioxano. Se agregó gota a gota desde una ampolla la última solución a la de DCC durante 20 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Se dejó reaccionando por 24 horas, controlando el avance de la misma por c.c.d. Se formó un sólido blanco el cual se filtró y se descartó. Se rotaevaporó la solución y se purificó por columna de sílica gel sembrando el residuo en una pastilla, y

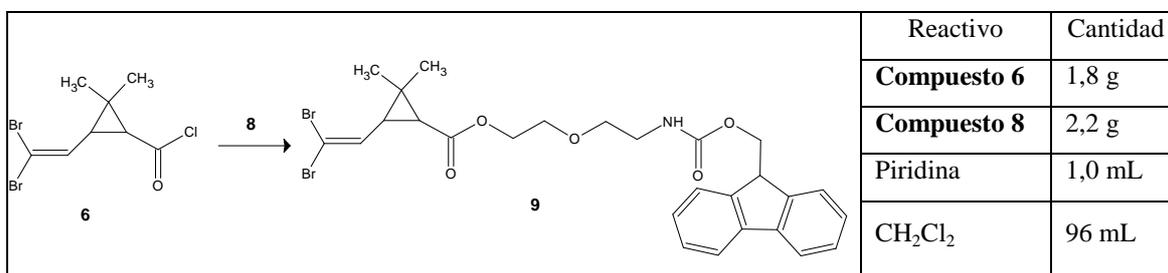
como solvente de elución se utilizó hexano:AcOEt 1:1. Se obtuvo un sólido blanco el cual al analizar el RMN no pareció ser el compuesto de interés.

### 2.9.4.3. Formación del cloruro de 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanmetanoílo (6)



Se disolvió el **CPCA (5)** en 80 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> destilado. Se agitó a temperatura ambiente con un refrigerante de aire. Se agregó a través del mismo el SOCl<sub>2</sub> rápidamente y se calentó en baño de agua a 50°C con agitación por 2 horas. La solución se tornó de color caramelo. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se rotaevaporó. Se hicieron dos agregados sucesivos de 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> cada uno, rotaevaporando luego de cada agregado. Se guardó el residuo en el freezer.

### 2.9.5. Acoplamiento del 9H-fluoren-9-ilmetil[2-(2-hidroximetoxi)etil]carbamato (8) con el 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanmetanoílo (6) para dar el 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-(2-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo]amino)etoxi)etilo (9)



Se disolvió el **compuesto 6** en 33 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> destilado. Por otro lado se disolvió el **compuesto 8** en 33 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> destilado junto con la piridina. Desde una ampolla se fue agregando esta última solución sobre la anterior, previamente enfriada en baño de hielo. Una vez finalizado el agregado se dejó la mezcla 10 minutos a 0°C y

luego 3 horas a temperatura ambiente con agitación, controlando el avance de la misma por c.c.d. Se rotaevaporó y luego se disolvió en 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se extrajo con 20 mL de agua destilada. Se repitió la extracción con agua. Se secó la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y rotaevaporó. Se purificó por columna de sílica gel sembrando el residuo en una pastilla, y como solvente de elución se utilizó hexano:AcOEt 7:3.

**Rendimiento: 51%**

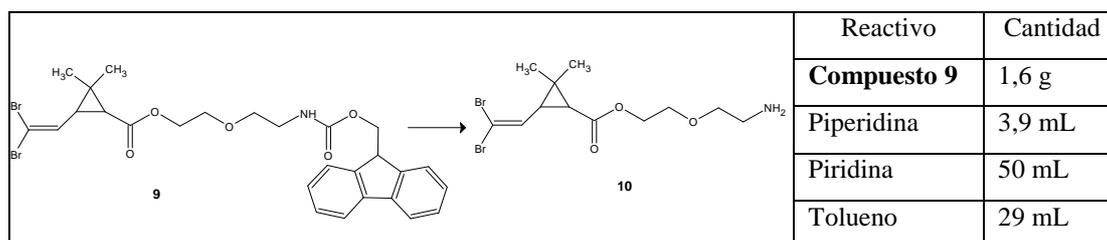
**Rf: 0,30 en hexano:AcOEt 7:3**

**Compuesto 9:**

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 1,27 (s, 6H, H6 y H7); 1,91 (d, 1H, J<sub>5-3</sub>= 8,12 Hz, H5); 1,98 (t, 1H, J<sub>3-5</sub>= 8,12 Hz, J<sub>3-2</sub>= 8,55 Hz, H3); 3,44 (m, 2H, H12); 3,60 (t, 2H, J<sub>11-12</sub>= 5,13 Hz, H11); 3,69 (m, 2H, H10); 4,25 (m, 3H, H9 y H15); 4,43 (d, 2H, J<sub>14-15</sub>= 6,84 Hz, H14); 5,27 (s, 1H; NH); 6,80 (d, 1H, J<sub>2-3</sub>= 8,55 Hz, H2); 7,35 (t, 2H, J<sub>18-17</sub>= 7,27, Hz H18 y H25); 7,63 (d, 2H, J<sub>17-18</sub>= 7,27 Hz; H17 y H26); 7,42 (m, 2H, H19 y H24); 7,79 (m, 2H, H20 y H23).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 14,95 (C6); 27,57 (C4); 28,25 (C7); 31,71 (C5); 35,63 (C3); 40,75 (C12); 47,16 (C15); 63,26 (C9); 66,62 (C14); 68,94 (C10); 69,99 (C11); 89,27 (C1); 119,90 (C20 y C23); 124,97 (C17 y C26); 126,95 (C18 y C25); 127,60 (C19 y C24); 133,40 (C2); 141,23 (C21 y C22); 143,85 (C16 y C27); 156,39 (C13); 170,31 (C8).

**2.9.6. Desprotección de 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2-(2-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo]amino}etoxi)etilo (9) con piperidina para obtener el 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2-(2-aminoetoxi)etilo (10)**



Se disolvió el **compuesto 9** en piridina agitando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó con jeringa la piperidina. Se tomaron alícuotas a los 5 minutos y a los 20 minutos de reacción. A cada alícuota se le agregaron 2 mL de tolueno y se rotaevaporó. Se redisolvió en el mínimo volumen de tolueno y se siguió por c.c.d. Se cortó la reacción luego de 1 hora y se rotaevaporó para eliminar la piridina, obteniéndose un sólido blanco. Se redisolvió en tolueno (25 mL) y se rotaevaporó para

eliminar todo resto de piridina. Se purificó por columna de sílica gel sembrando el residuo en una pastilla, y como solvente de elución se utilizó hexano:AcOEt 7:3. Se obtuvo un aceite amarillo.

**Rendimiento: 75%**

**Rf: 0,42 en EtOH con 2% de trietilamina**

### Compuesto 10:

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 1,25 (s, 3H, H6); 1,27 (s, 3H, H7); 1,91 (d, 1H, J<sub>5,3</sub>= 8,24 Hz, H5); 1,98 (t, 1H, J<sub>3,5</sub>= 8,24 Hz, J<sub>3,2</sub>= 8,70 Hz, H3); 2,27 (s, 2H, NH); 2,91 (s, 2H, H12); 3,55 (t, 2H, J<sub>11-12</sub>= 5,04 Hz, H11); 3,69 (t, 2H, J<sub>10-9</sub>= 4,58, H10); 4,23 (m, 2H, H9); 6,77 (d, 1H, J<sub>2,3</sub>= 8,70 Hz, H2).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 14,95 (C6); 27,53 (C4); 28,28 (C7); 31,73 (C5); 35,59 (C3); 41,47 (C12); 63,35 (C9); 68,84 (C10); 72,92 (C11); 89,14 (C1); 133,44 (C2); 170,33 (C8).

### 2.10. Estabilidad de 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-(2-aminoetoxi)etilo (CPCA-NH<sub>2</sub>, 10) en buffer Tris-HCl 10mM pH 7,6

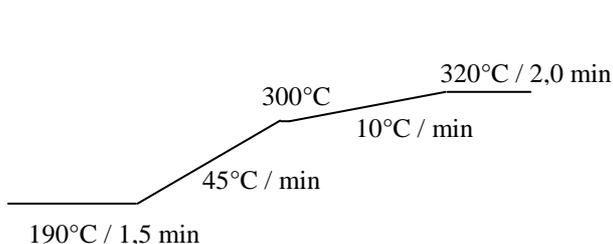
Reactivo	Cantidad
<b>Compuesto 10</b>	0,040 g
MeOH	0,50 mL
Buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,6	1,0 mL

Se disolvió el **compuesto 10** en la mínima cantidad de MeOH y se le agregó el buffer Tris-HCl. Se dejó con agitación a temperatura ambiente por 24 horas siguiendo la reacción por c.c.d.

### 2.11. Optimización de las condiciones para la cuantificación de la inmovilización por CG

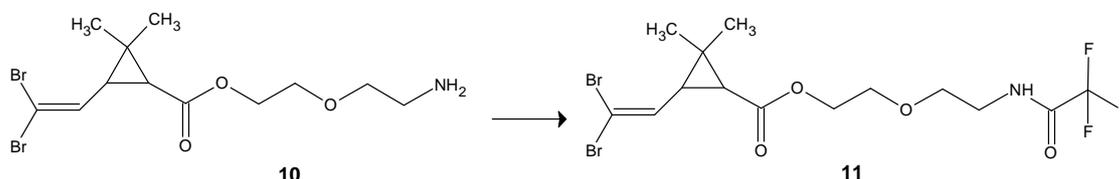
#### 2.11.1 Método para correr CPCA-NH<sub>2</sub>

##### Método bp2:



Gas carrier N<sub>2</sub> (30 psig)  
 Inyector: T = 280°C; V = 1 μL;  
 con *split* razón 20:1  
 Detector (ECD): T = 375°C;  
 Gas auxiliar N<sub>2</sub> (30 mL/min)

**2.11.2. Derivatización del 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2-(2-aminoetoxi)etilo (10) con anhídrido trifluoroacético para dar el 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2-{2[(trifluoroacetil)amino]etoxi}etilo (CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>, 11)**



**2.11.2.1. Derivatización con aislamiento del compuesto 11 y posterior purificación**

Reactivo	Cantidad
<b>Compuesto 10</b>	0,050 g
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2,0 mL
Trietilamina	50 μL
Anhídrido acético	50 μL
MeOH	5,0 mL

Se disolvió con agitación el **compuesto 10** en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> junto con la trietilamina. Se colocó la mezcla en un baño de hielo/agua y se agregó lentamente el anhídrido acético. Se dejó con agitación por 30 minutos. Se cortó la reacción por agregado de MeOH y se rotaevaporó obteniéndose un aceite amarillo. Se purificó por columna de sílica gel sembrando el residuo en una pastilla y como solvente de elución se utilizó hexano:AcOEt 9:1. Se obtuvo un aceite amarillo.

**Rendimiento: 53%**

**Rf: 0,89 en AcOEt con 1% de trietilamina**

**Compuesto 11:**

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 1,27 (s, 3H, H6); 1,29 (s, 3H, H7); 1,89 (d, 1H, J<sub>5-3</sub>= 8,55 Hz, H5); 2,00 (t, 1H, J<sub>3-5</sub>= 8,55 Hz, J<sub>3-2</sub>= 8,55 Hz, H3); 3,60 (m, 2H, H12); 3,66 (m, 2H, H11); 3,72 (t, 2H, J<sub>10-9</sub>= 4,70, H10); 4,26 (m, 2H, H9); 6,80 (d, 1H, J<sub>2-3</sub>= 8,55 Hz, H2).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 14,92 (C6); 27,68 (C4); 28,28 (C7); 31,69 (C5); 35,74 (C3); 39,55 (C12); 63,08 (C9); 68,60 (C10); 69,16 (C11); 89,39 (C1); 114,64, 116,94, 117,62 (C14); 133,32 (C2); 157,04, 157,33 (C13); 170,33 (C8).

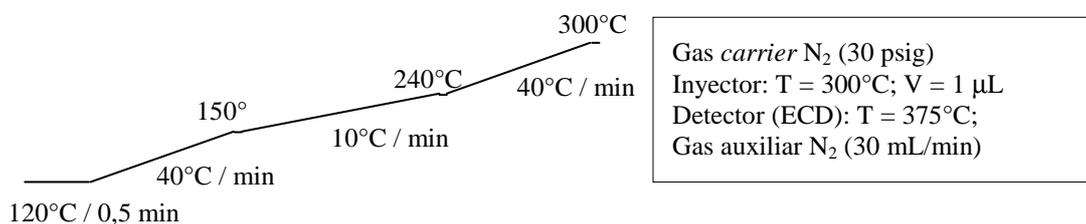
### 2.11.2.2. Derivatización *in situ* sin aislamiento del compuesto 11

Reactivo	Cantidad
<b>Compuesto 10</b>	0,0054 g
Tolueno	3,8 mL
Trietilamina	10 $\mu$ L
Anhídrido acético	5,0 $\mu$ L
MeOH	1,5 mL

Se preparó una solución del **compuesto 10** similar a la solución inicial de inmovilización sobre el soporte sólido. Para ello, se disolvió el producto en 0,25 mL de tolueno, resultando una solución de concentración  $2,2 \times 10^4$  ppm. Luego, se tomaron 5,0  $\mu$ L de dicha solución ( $1,1 \times 10^{-4}$  g de **(10)**) y se mezclaron con 2,0 mL de tolueno, la trietilamina y el anhídrido acético. Se dejó a temperatura ambiente con agitación ocasional por 1 hora. Si se considera un rendimiento del 100%, la concentración del **compuesto 11** en la solución final sería 67 ppm. Una vez transcurrido ese tiempo, se prepararon diferentes diluciones de dicha solución en tolueno:MeOH 1:1 para finalizar la reacción, dejando la mezcla por 1 hora con agitación ocasional a temperatura ambiente. Finalmente se analizaron dichas muestras por CG-ECD.

### 2.11.3. Método para correr CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

#### Método HFPCPCA2:



**2.11.4. Derivatización de CPCA (5) con 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropanol para dar 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2,2,2-trifluoro-1-(trifluorometil)etilo (12)**

	Reactivo	Cantidad
	<b>CPCA (5)</b>	0,51 g
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30 mL
	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida (DIC)	0,80 mL
	1,1,1,3,3,3-hexafluoropropanol (HFP)	0,54 mL

Se disolvió con agitación el **CPCA (5)** en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se agregó la DIC y el HFP y se dejó con agitación por 2 horas. Se rotaevaporó obteniéndose un sólido blanco. Se purificó por columna de sílica gel sembrando el residuo en una pastilla, y como solvente de elución se utilizó hexano:AcOEt 9:1. Se obtuvo un sólido blanco.

**Rendimiento: 80%**

**Rf: 0,92 en hexano:AcOEt 8:2**

### Compuesto 12:

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 1,50 (s, 3H, H6); 1,57 (s, 3H, H7); 2,50 (m, 2H, H5 y H3); 6,89 (m, 1H, H9); 6,93 (d, 1H, J<sub>2,3</sub>= 7,78 Hz, H2).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): (δ, ppm) 14,90 (C6); 27,23 (C7); 29,46 (C4); 30,42 (C5); 36,48 (C3); 66,27 (C9); 91,27 (C1); 132,69 (C2); 120,98 (C10 y C11); 167,23 (C8).

## 2.12. Inmovilización del CPCA-NH<sub>2</sub> (compuesto 10) sobre el soporte sólido

### 2.12.1. Soporte sólido: *ECH Sepharose 4B*

#### 2.12.1.1. Cuantificación indirecta

Reactivo	Cantidad
<b>Compuesto 10</b>	0,020 g
<i>ECH Sepharose 4B</i>	0,74 g
DMF	53 mL
EDC	0,040 g

Se determinó la densidad aparente de la resina ( $\delta = 0,74 \text{ g/cm}^3$ ). Se lavó 3 veces una porción de resina con 15 mL de DMF, centrifugando 5 minutos para separar el sobrenadante. Se agregó al pellet de la tercera centrifugación 3 mL de DMF y se lo

colocó en una jeringa para poder escurrir el solvente por decantación. Se tomaron 0,74 g de pellet (1,0 mL;  $1,4 \times 10^{-5}$  moles de  $\text{CO}_2\text{H}$ ) y se suspendieron en 4,0 mL de DMF. Se agregó la EDC ( $2,1 \times 10^{-4}$  moles). Se agitó a 120 rpm y  $25^\circ\text{C}$  por 1 hora. Se agregó el **compuesto 10** disuelto en 1,0 mL de DMF y se continuó agitando en las mismas condiciones por 48 horas (C/EDC).

Se tomaron alícuotas de 5,0  $\mu\text{L}$  en función del tiempo y se derivatizaron según el protocolo mencionado anteriormente (**ver 2.11.2.2.**). Las alícuotas derivatizadas se inyectaron en el CG – ECD (método bp2).

Control negativo (control, S/EDC): Se realizó un experimento blanco exactamente igual pero sin el agregado de EDC (activante).

Curva de calibrado: Se preparó una solución 520 ppm en tolueno del **compuesto 10** y se derivatizó según el protocolo mencionado anteriormente (**ver 2.11.2.2.**), resultando una solución madre 3,2 ppm del **compuesto 11**. Se prepararon diluciones de dicha solución, las cuales se inyectaron en el CG – ECD (método bp2).

#### 2.12.1.2. Cuantificación directa

Reactivo	Cantidad
<i>ECH Sepharose 4B C/EDC</i>	0,020 mL
NaOH 5% <i>m/V</i>	2,0 mL
EtOH 96%	2,0 mL
$\text{NH}_3$ (c)	1,0 mL
$\text{H}_2\text{SO}_4$ 20% <i>m/V</i>	2,0 mL
Tolueno	2,0 mL
DIC	10 $\mu\text{L}$
HFP	10 $\mu\text{L}$

Se realizaron 4 lavados sucesivos de la resina, centrifugando luego de cada lavado a  $3000 \times g$  y  $25^\circ\text{C}$  por 10 minutos, con 1,0 mL de la solución de NaOH por duplicado, luego con 1,0 mL de agua y por último con 1,0 mL de EtOH. Se llevó a sequedad y se le agregó 1,0 mL de EtOH y 1,0 mL de  $\text{NH}_3$  (c). Se calentó en baño de agua a  $40^\circ\text{C}$  por 5 horas. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a  $3000 \times g$  y  $25^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Al pellet se le agregó 1,0 mL de agua y se centrifugó nuevamente. Se juntaron los dos

sobrenadantes y se rotaevaporó el solvente. Al residuo obtenido se le agregó el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se controló que el pH esté entre 0 y 1. Se extrajo con 1,0 mL de tolueno. Se separó la fase orgánica y se repitió la extracción de la fase acuosa con tolueno. Ambas fases orgánicas se juntaron, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró. Al sobrenadante se le agregó la DIC y el HFP y se agitó a temperatura ambiente por 2 horas y 30 minutos. Por último las muestras se inyectaron en el CG - ECD (método HFPCPCA2).

Control negativo (control; S/EDC): Se realizó un experimento exactamente igual pero trabajando con *ECH Sepharose 4B S/EDC*.

Curva de calibrado: Se preparó una solución 10120 ppm de **CPCA** en tolueno y se derivatizó según el protocolo mencionado anteriormente (**ver 2.11.4**), resultando una solución madre 1,5 ppm del **compuesto 12**. Se prepararon diluciones de dicha solución, las cuales se inyectaron en el CG – ECD (método HFPCPCA2).

## 2.12.2. Soporte sólido: *BcMag Carboxy-terminated Magnetic Beads*

### 2.12.2.1. Cuantificación indirecta

Reactivo	Cantidad
<b>Compuesto 10</b>	0,0050 g
<i>BcMag Carboxy-terminated Magnetic Beads</i>	0,50 mL
DMF	4,8 mL
EDC	0,0050 g

Se tomaron 500 µL de una suspensión de *beads* (2 µmoles de COOH) y se lavaron 4 veces con 1,0 mL de DMF, separando por imantación en cada paso y descartando el sobrenadante. Se agregaron 600 µL de DMF y la EDC. Se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Se disolvió el **compuesto 10** en 150 µL de DMF y se agregó dicha solución a los *beads*. Se dejó agitando a temperatura ambiente por el tiempo que corresponda (C/EDC).

Se tomaron alícuotas de 5 µL en función del tiempo y se derivatizaron según el protocolo mencionado anteriormente (**ver 2.11.2.2.**). Las alícuotas derivatizadas se inyectaron en el CG – ECD (método bp2).

Control negativo (control, S/EDC): Se realizó un experimento exactamente igual pero sin el agregado de EDC (activante).

Curva de calibrado: Se preparó una solución 520 ppm del **compuesto 10** en tolueno y se derivatizó según el protocolo mencionado anteriormente (**ver 2.11.2.2.**), resultando una solución madre 3,2 ppm del **compuesto 11**. Se prepararon diluciones de dicha solución, las cuales se inyectaron en el CG – ECD (método bp2).

### 2.12.2.2. Cuantificación directa

Reactivo	Cantidad
<i>BcMag Carboxy-terminated Magnetic Beads C/EDC</i>	0,070 mL
NaOH 5% m/V	1,0 mL
EtOH 96%	0,80 mL
NH <sub>3</sub> (c)	1,0 mL
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20% m/V	2,0 mL
Tolueno	2,0 mL
DIC	10 µL
HFP	10 µL

Se realizaron 4 lavados sucesivos de los *beads*, con 0,50 mL de la solución de NaOH por duplicado, luego con 0,50 mL de agua y por último con 0,50 mL de EtOH. Se llevó a sequedad y se resuspendió en 0,50 mL de EtOH. Se toman 0,070 mL de la misma y se le agregó 0,30 mL de EtOH y 1,0 mL de NH<sub>3</sub> (c). Se calentó en baño de agua a 40°C por 5 horas. Se separó el sobrenadante y al pellet se le agregó 1,0 mL de agua. Se separó el sobrenadante nuevamente y se juntó con el anterior. Se rotaevaporó el solvente. Al residuo obtenido se le agregó el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se controló que el pH esté entre 0 y 1. Se extrajo con 1,0 mL de tolueno. Se separó la fase orgánica y se repitió la extracción con tolueno de la fase acuosa. Ambas fases orgánicas se juntaron, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró. Al sobrenadante se le agregó la DIC y el HFP y se agitó a temperatura ambiente por 2 horas y 30 minutos. Por último las muestras se inyectaron en el CG-ECD (método HFPCPCA2).

Control negativo (control; S/EDC): Se realizó un experimento exactamente igual pero trabajando con *BcMag Carboxy-terminated Magnetic Beads S/EDC*.

### 2.13. Preparación de la pre-columna de selección (SELEX-Negativa)

Reactivo	Cantidad
<b>Compuesto 7</b>	0,0050 mL
<i>BcMag Carboxy-terminated Magnetic Beads</i>	0,10 mL
DMF	1,023 mL
EDC	0,0050 g

Se lavaron los *beads* 3 veces con 0,30 mL de DMF, separando por imantación en cada paso y descartando el sobrenadante. Se agregaron 0,12 mL de DMF y la EDC. Se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Se disolvió el **compuesto 7** en 3  $\mu$ L de DMF y se agregó dicha solución a los *beads*. Se dejó agitando a temperatura ambiente por 120 horas.

### 2.14. Diseño del proceso de SELEX

#### 2.14.1. Detección de pequeñas cantidades de ADN<sub>ss</sub> por electroforesis planar

##### 2.14.1.1. PAGE al 20% en condiciones desnaturalizantes

Se utilizaron minigeles de 10 x 8,2 cm aproximadamente (espaciador de 0,75 mm). Para 2 minigeles se utilizó:

Reactivo	Cantidad
Acrilamida: <i>N,N'</i> -metilenbisacrilamida (38:2)	6,7 mL
TBE 5X	1,0 mL
Persulfato de amonio 10%	134 $\mu$ L
TEMED	7,0 $\mu$ L
Agua estéril	2,3 mL
Urea	5,0 g

Se utilizó la cuba *miniprotean tetra de Bio-Rad*. Se mezcló la solución de acrilamida:*N,N'*-metilenbisacrilamida, el buffer TBE y el agua. Se sonicó por 15 minutos para eliminar el oxígeno disuelto y se agregó el TEMED y el persulfato de amonio. Se armaron los geles dejando polimerizar por 45 minutos y se realizó una

precorrida a 300 V en buffer TBE 1X por 45 minutos. Se sembraron X mL de ADN en 0,002 mL de buffer de siembra desnaturizante. La corrida se realizó en buffer TBE 1X a 300 V por 1 hora y 15 minutos. Una vez finalizada la corrida, se realizó la tinción correspondiente del mismo.

#### 2.14.1.2. Geles de agarosa al 2%

Reactivo	Cantidad
Agarosa	1,0 g
TBE 1X	50 mL
Agente de tinción	X $\mu$ L

Se suspendió la agarosa en el buffer TBE. Se calentó hasta ebullición y cuando se empieza a enfriar se le agregó el agente de tinción. Se dejó gelificar en oscuridad por 20 minutos en la cuba electroforética (peine 10 x 1,5). Se sembraron X  $\mu$ L de ADN en 0,002 mL de buffer de siembra no desnaturizante. La corrida se realizó en buffer TBE 1X a 100 V por 30 minutos. Una vez finalizada la corrida, se observan las bandas directamente en el transiluminador.

#### 2.14.2. Purificación de las secuencias de ADN<sub>ss</sub>

##### 2.14.2.1. Precipitación con *Glycogen*

Se mezcló la muestra con 2,4 volúmenes de isopropanol frío (4°C) y exceso de *glycogen* (5  $\mu$ L). Se dejó 48 horas a -18°C. Se centrifugó a 5°C y 11000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se repitió la centrifugación. Se dejó a temperatura ambiente. Se resuspendió en el volumen correspondiente de agua MilliQ estéril y se corroboró la efectiva recuperación del ADN<sub>ss</sub> por absorbancia (232 nm).

##### 2.14.2.2. Purificación con Kit comercial (*DNA Clean & Concentrador*<sup>TM-5</sup>)

Se mezcló la muestra con 5 volúmenes de *DNA Binding Buffer*. Se agitó con el vórtex. Se transfirió la mezcla a la columna con un tubo colector. Se centrifugó a 10000

x g por 1 minuto. Se transfirió la columna a otro tubo colector y se le agregó 200 µL de *Wash Buffer*. Se centrifugó a 10000 x g por 1 minuto. Este último paso se realizó por duplicado. Se transfirió la columna a otro tubo colector y se eluyó el ADN<sub>ss</sub> con 20 µL de agua MilliQ estéril centrifugando a 10000 x g por 1 minuto.

### 2.14.3. Amplificación por PCR simétrica

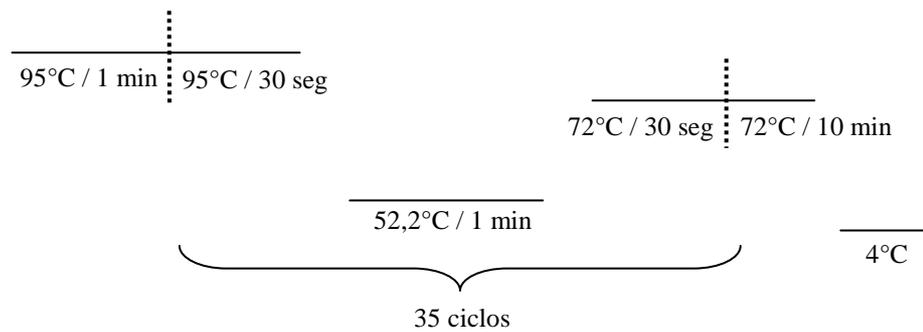
Se trabajó con material autoclavado. Se preparó una *master mix* para un volumen final de cada PCR de 50 µL (1 µL de **BiblioADN<sub>ss</sub>** + 49 µL de *master mix*).

#### Master Mix:

Reactivos	Master Mix A		Master Mix B	
	V(µL)	Concentración final	V(µL)	Concentración final
Buffer 10X PCR	5,0	1X	5,0	1X
d’NTPs 10 mM c/u	1,0	200 µM	1,0	200 µM
<b>Primer up</b> 13,3 µM	0,77	0,20 µM	1,9	0,50 µM
<b>Primer down</b> 20,5 µM	0,48	0,20 µM	1,2	0,50 µM
Taq 5 U/µL	0,20	1U final	0,20	1U final
Agua MilliQ autoclavada	41,55	--	40,70	--

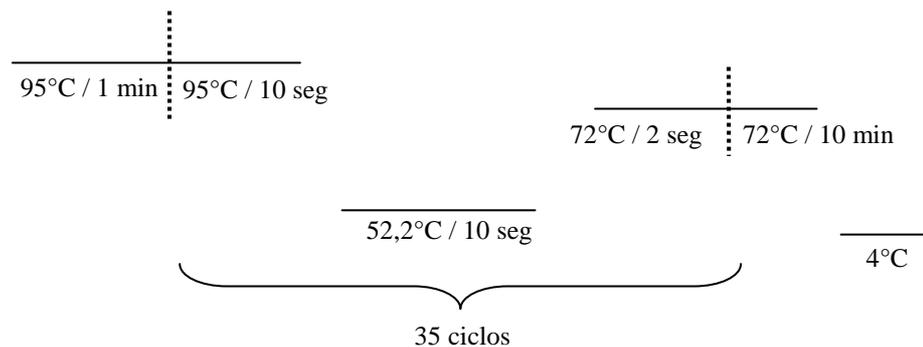
#### Programa

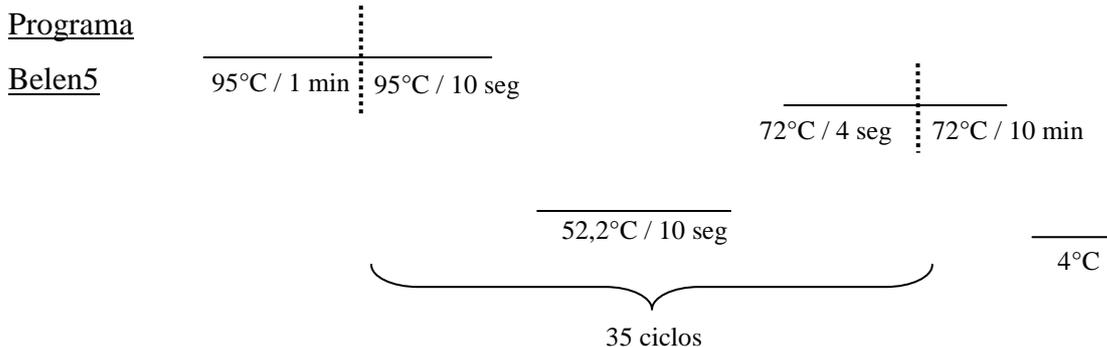
##### Belen2



#### Programa

##### Belen4





#### 2.14.4. Marcación de la BiblioADN<sub>ss</sub>

Se prepararon diversas diluciones del **F-Primer up** en agua MilliQ estéril. Los espectros de fluorescencia en estado estacionario fueron determinados en un espectrofluorómetro *Varian Cary Eclipse*, equipado con un soporte multicubeta termostatzado mediante un sistema *peltier*. Los espectros de emisión fueron corregidos por la sensibilidad del detector. Las concentraciones de los fluoróforos se ajustaron de manera de que su absorbancia sea menor a 0,1 para evitar efectos de filtro interno, autoapagamiento, etc.

Condiciones: excitación 480 nm; emisión 490-700 nm (máximo 515 nm); *slits* excitación/emisión (10/10); PMT: *Medium*.

#### 2.14.5. Acondicionamiento de los productos de PCR

##### 2.14.5.1. *Beads* modificados con estreptavidina

##### 2.14.5.1.1. *Streptavidin Magnisphere Paramagnetic Particles* (SA-PMPs)

Se tomó la cantidad correspondiente de SA-PMPs (1 mg de ADN requiere 0,6 mL de SA-PMPs). Se separó magnéticamente el sobrenadante y se descartó. Se lavó por triplicado con 300  $\mu$ L de buffer SSC 0,5X. Se resuspendió en 100  $\mu$ L de buffer SSC 0,5X. Por otro lado, se llevó la cantidad de ADN a un volumen final de 500  $\mu$ L en buffer SSC 20X y agua MilliQ estéril, de forma tal de que la concentración final del buffer sea 5X. Se mezclaron las SA-PMPs con el ADN, dejándolo por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave ocasionalmente. Se separó el sobrenadante

magnéticamente. Se lavaron las SA-PMPs por cuatuplicado con 300  $\mu$ L de buffer SSC 0,1X. La elución del ADN se probó por agregado de 150  $\mu$ L de:

- ⇒ H<sub>2</sub>O MilliQ estéril a 25°C
- ⇒ H<sub>2</sub>O MilliQ estéril a 37°C
- ⇒ H<sub>2</sub>O MilliQ estéril a 90°C
- ⇒ NaOH 0,15 M a 37°C
- ⇒ NaOH 0,15 M a 90°C

En todos los casos, se separó el sobrenadante magnéticamente. Se evaporaron las muestras a sequedad y se re-suspendieron en 20  $\mu$ L de agua MilliQ estéril, para cuantificar por absorbancia.

#### 2.14.5.1.2. Dynabeads M-280 Streptavidin (DB-MS)

La capacidad de unión de los *beads* resultó ser:

Blanco biotilado	Reconocimiento/mL
ADN <sub>ds</sub> ( $\mu$ g)	10
ADN <sub>ss</sub> (pmol)	200

Se tomó la cantidad correspondiente de DB-MS y se agregó igual volumen de B&W buffer, o como mínimo, 1,0 mL del mismo. Se separó magnéticamente el sobrenadante y se descartó. Se resuspendió en el mismo volumen de B&W buffer 2X que se utilizó inicialmente. Por otro lado, se llevó la cantidad de ADN a un volumen final de 1,0 mL en agua MilliQ estéril, de forma tal que la concentración final del NaCl sea 1 M. Se mezclaron las DB-MS con el ADN, dejándolo por 15 minutos a 20°C con agitación suave ocasionalmente. Se separó el sobrenadante magnéticamente. Se lavaron las DB-MS por triplicado con 1,0 mL de B&W buffer 1X. La elución del ADN se probó por agregado (15 minutos) de 1,0 mL de:

- ⇒ H<sub>2</sub>O MilliQ estéril a 20°C
- ⇒ H<sub>2</sub>O MilliQ estéril a 90°C

En todos los casos, se separó el sobrenadante magnéticamente. Se evaporaron las muestras a sequedad y se re-suspendieron en 300  $\mu$ L de agua MilliQ estéril, para cuantificar por absorbancia.

## 2.15. SELEX-Negativa (Ciclo 1 y Ciclo 2)

Se disolvieron 2,5 nmoles de la **BiblioADN<sub>ss</sub>** en 500  $\mu\text{L}$  de Buffer de *binding* SELEX. Se calentó la solución a 90°C por 10 minutos, seguido de un enfriamiento rápido a 4°C por 15 minutos. Finalmente, se llevó a 25°C por 10 minutos (**M1**).

Se incubó dicha solución con la cantidad de *BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads* modificados con el *linker* (6,25  $\mu\text{L}$  (0,025 nmoles) de una suspensión de beads 4 nmoles/mL), con agitación suave por 30 minutos a 25°C. Se separó el sobrenadante magnéticamente (**S1**). Los *beads* se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ estéril a 90°C por 15 minutos y se separó el sobrenadante magnéticamente (**S2**). Se juntaron los dos sobrenadantes (**S1** + **S2**) y se fraccionó en 4 porciones iguales. Se precipitaron las muestras con glycogen siguiendo el protocolo mencionado anteriormente (ver **2.14.2.1**). Se re-suspendió cada fracción en 100  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ estéril y se juntaron (**S3**). Se cuantificaron todas las muestras (**M1**, **S1**, **S2** y **S3**) por absorbancia. Se evaporaron las muestras a sequedad y se utilizó el *pellet* de la muestra **S3** como pool inicial para el siguiente ciclo de SELEX-Negativa (**Ciclo 2**).

## 2.16. Procedimientos generales

### 2.16.1. Tinción con Nitrato de Plata (para PAGE)

1. Fijación del gel: se sumergió el gel por 10 minutos en una solución 10% de EtOH y luego, 3 minutos en una solución 1% de  $\text{HNO}_3$ .
2. Se realizaron 2 lavados sucesivos con agua destilada.
3. Tinción: se sumergió el gel por 40 minutos en una solución 0,1% de  $\text{AgNO}_3$  + 0,15% de formaldehído 36%.
4. Se realizó un lavado con agua destilada.
5. Revelado: se sumergió el gel por 10 minutos en 100 mL de una solución 3% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 100  $\mu\text{l}$  de formaldehído 36% + 2  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  2 mg/100 ml.
6. Solución stop: se sumergió el gel en una solución 10% de ácido acético por 5 minutos.

### **2.16.2. Tinción con Sybr Safe**

1. Geles de agarosa: se agregó directamente 5  $\mu\text{L}$  del reactivo al gel en el armado del mismo. Luego de la corrida se reveló por observación directa de las bandas en el transiluminador.
2. PAGE: se diluyó 1:10 el reactivo en buffer TBE 1X. Luego de la corrida, se incubó el gel por 30 minutos protegido de la luz y con agitación suave. Se observaron las bandas en el transiluminador.

### **2.16.3. Tinción con Bromuro de Etidio**

Geles de agarosa: se agregó 3,5  $\mu\text{L}$  del reactivo 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el gel durante el armado del mismo, resultando una concentración final  $5 \times 10^{-8}$   $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Luego de la corrida se lo reveló, por observación directa de las bandas en el transiluminador.

## *Resultados y Discusión*

## *Capítulo 3*

# **Avances para el desarrollo de un aptasensor de base electroquímica**

### 3.1. Objetivo

El objetivo de este capítulo es evaluar la factibilidad de desarrollo de un aptasensor electroquímico (sensor E-AB) desde la perspectiva de las diferentes etapas involucradas. La combinación del uso de aptámeros con métodos de detección electroquímica permite sensar un *target* de forma rápida, simple y con bajo costo.

Se trabajó con el aptámero comercial que reconoce adenosina/ATP desarrollado por Szostak<sup>31</sup> (ver **1.5.1.**), como modelo para este desarrollo. La adenosina es un nucleósido endógeno en todas las células humanas, que juega un rol esencial en el sistema cardiovascular y nervioso del cuerpo humano<sup>147</sup>. Además, está involucrada en la expansión de la arteria coronaria y mejora el flujo de sangre. Es por esto que resulta importante en diagnóstico clínico, el monitoreo sensible, simple y específico de dicha molécula<sup>148</sup>. Además, tanto la adenosina como sus nucleótidos (AMP, adenosín difosfato y ATP) han sido muy usados como sistemas modelos en el desarrollo de ensayos basados en aptámeros<sup>149</sup>.

Se optimizaron las condiciones de inmovilización del aptámero sobre una superficie de oro (grupo de anclaje, concentración de aptámero, etc.), para luego evaluar las mejores condiciones para el reconocimiento del *target*. Se avanzó, entonces, en la construcción del sensor E-AB, cuyo principio de funcionamiento se basa en los sensores electroquímicos del tipo *molecular beacon* desarrollados por Heeger y colaboradores<sup>150</sup>. La presencia del *target* induce un cambio conformacional, el cual se puede traducir en una respuesta electroquímica cuantificable<sup>103,105,151</sup> (ver *Figura 3-1*).

En una segunda etapa, se trabajó en la optimización de la respuesta de dicho sensor, buscando por un lado, las mejores condiciones para introducir en el aptámero el marcador electroquímico, y por otro lado, mejorar la respuesta electroquímica de dicho marcador (ver *Figura 3-1*). Para esto último, se trabajó con un sistema modelo simplificado, el 3-MPA, de forma de poder estudiar la introducción del Fc (marcador electroactivo).

La generación de la señal en los sensores E-AB del tipo TISS (ver **1.4.2.1.**) proviene del acercamiento del Fc a la superficie del electrodo (ver *Figura 3-1*). Esto puede no ocurrir siempre, ya que el cambio conformacional que sufre el aptámero en presencia del *target*, podría acercar (*signal-on*) o alejar (*signal-off*) el Fc de la superficie, dependiendo de la estructura única del aptámero con el *target* en cuestión. Por otro lado, en el sensado de moléculas orgánicas pequeñas, como es el caso de la

adenosina, se busca magnificar el pequeño cambio conformacional generado por el reconocimiento de dichas moléculas, en una señal, que en este caso es de naturaleza eléctrica. Para superar estas limitaciones, se puede reducir la superficie del electrodo alcanzando un tamaño similar al aptámero<sup>149</sup> y/o usar secuencias aptaméricas más largas que la región de reconocimiento o secuencias complementarias al aptámero, de forma tal de inducir un cambio estructural detectable.

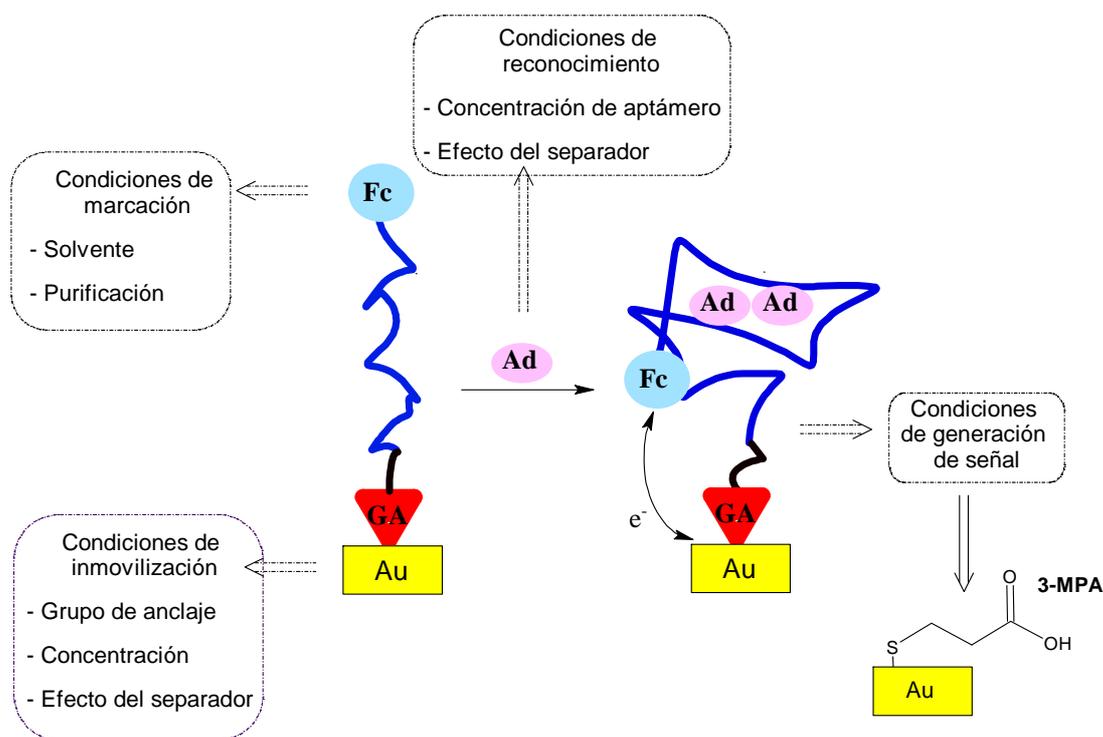


Figura 3-1. Representación esquemática de la arquitectura del sensor E-AB de tipo TISS *signal-on* y las condiciones que se optimizaron. GA: grupo de anclaje; Fc: ferroceno; Ad: adenosina.

En este sentido, se han reportado sensores E-AB potencialmente generalizables (ver Figura 3-2), cuyo principio de funcionamiento involucra el desplazamiento de una secuencia de ADN complementaria al aptámero (deshibridización), inducido por la presencia del *target* (E-AB de tipo TREAS, ver 1.4.2.1.1.)<sup>100,152</sup>. En presencia del *target*, se estabiliza la estructura terciaria del aptámero, que desnaturaliza la secuencia de ADN<sub>ds</sub>, liberando la secuencia complementaria de ADN, de la misma forma que ocurre en solución<sup>108</sup>. El Fc está inicialmente distante de la superficie del electrodo, por lo tanto no puede intercambiar electrones eficientemente con el mismo (estado *eT OFF*, Figura 3-2). Luego del reconocimiento, el Fc se acerca a la superficie del electrodo y genera una señal electroquímica medible (*eT ON*, Figura 3-2).

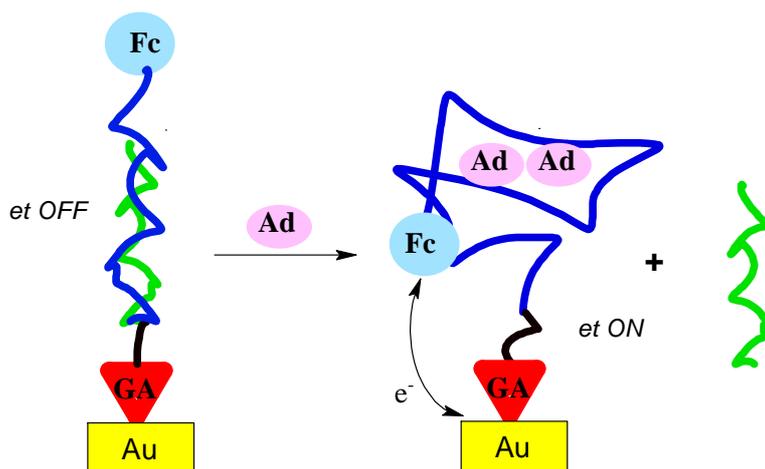


Figura 3-2. Representación esquemática de la arquitectura del sensor de tipo TREAS. GA: grupo de anclaje; Fc: ferroceno; Ad: adenosina.

En este sentido, se realizaron aportes para el armado de un sensor de tipo TREAS. Se trabajó, en la construcción de secuencias de ADN<sub>ds</sub> utilizando el aptámero y secuencias complementarias de diferentes longitudes (cantidad de nucleótidos), de forma tal de evaluar, luego, la competencia entre la estructura de ADN<sub>ds</sub> y el *target* (Ad). La capacidad del aptámero para unirse al mismo depende del plegamiento y de la estructura tridimensional, la cual se ve afectada por las condiciones y el buffer de incubación. Se probaron, entonces, diferentes condiciones para dicho reconocimiento en solución (temperatura y tiempo de incubación, composición del buffer de incubación, etc.) usando las estructuras de ADN<sub>ds</sub> de distinto tamaño (Figura 3-3).

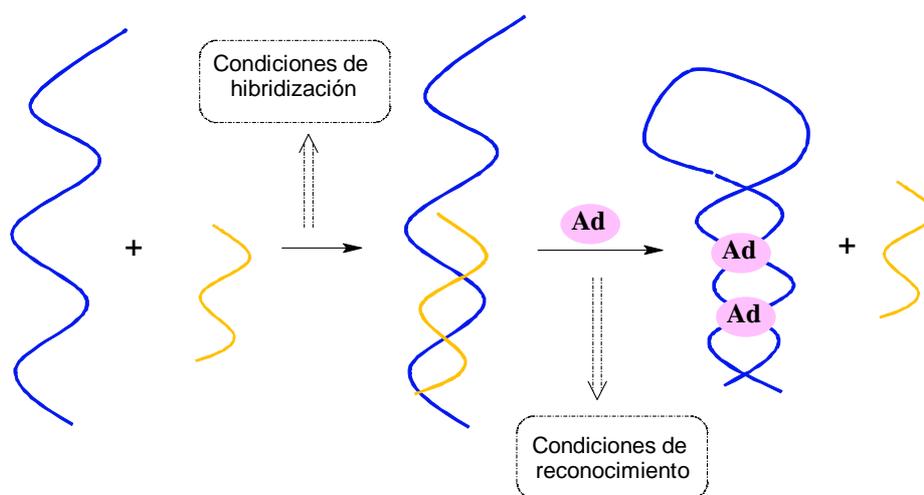


Figura 3-3. Representación esquemática del proceso de hibridación y de deshibridación por reconocimiento del *target* en solución. Ad: adenosina.

## 3.2. Sistema modelo: Aptámero para ATP

### 3.2.1. Determinación de la densidad superficial del aptámero inmovilizado sobre una superficie de oro

El objetivo de estos experimentos fue corroborar cuali y cuantitativamente la efectiva inmovilización del aptámero para ATP (**Apt-ATP**) por dos métodos diferentes:

- Ensayos de marcación con  $^{32}\text{P}$  (método radioquímico): se marcan las secuencias de ADN para luego cuantificar la marca radioactiva, y por lo tanto, la cantidad de ADN inmovilizado<sup>85a</sup>.
- CronoQ (método electroquímico): se cuantifica la cantidad de marcador redox catiónico que compensa los residuos fosfato del ADN inmovilizado. Dicha carga es directamente proporcional a la densidad superficial del ADN<sup>153</sup>.

Se trabajó con diferentes secuencias modificadas del aptámero (ver *Figura 3-4*):

- ✓ **5Ts-Apt**: posee 5 grupos Ts<sup>154</sup> los cuales permiten el anclaje a la superficie de oro a través del azufre.
- ✓ **T-Apt**: no posee ningún grupo de anclaje. Permitió evaluar las interacciones inespecíficas a través de los átomos de nitrógeno de las bases del aptámero a la superficie de oro<sup>155</sup> (ver **1.4.3.1.**).
- ✓ **C<sub>6</sub>-S-S-C<sub>6</sub>-Apt**: posee un puente disulfuro en el extremo 5'. El mismo puede ser reducido, de forma tal, de obtener un grupo tiol que permite el anclaje a la superficie de oro (**HS-C<sub>6</sub>-Apt**).

#### 3.2.1.1. Método radioquímico

Se marcaron las secuencias del aptámero, **5Ts-Apt** y **T-Apt**, con  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP y la enzima T4 polinucleótido quinasa. Dicha enzima cataliza la transferencia de un grupo fosfato marcado con  $^{32}\text{P}$  al extremo 5' de la secuencia de ADN.

Ambas secuencias se purificaron y se corroboró mediante PAGE la integridad de las mismas, observándose una única banda en los geles luego del proceso de marcación.

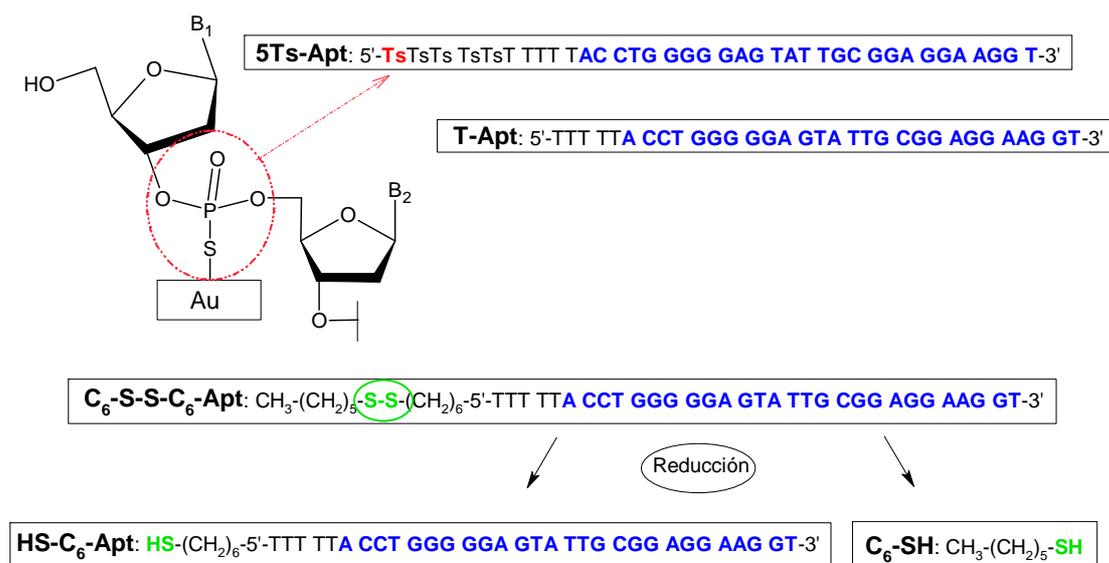


Figura 3-4. Secuencias modificadas del aptámero: **5Ts-Apt**, **T-Apt** y **C<sub>6</sub>-S-S-C<sub>6</sub>-Apt** (**HS-C<sub>6</sub>-Apt**). En rojo, grupo Ts; en azul, secuencia del Apt-ATP, en verde, grupo disulfuro/tiol.

Se prepararon diluciones seriadas de ambas secuencias marcadas con soluciones de aptámero no marcado (0,055  $\mu$ M – 55  $\mu$ M) y se realizó una curva de calibrado de **5Ts-Apt** marcado (**5Ts-Apt\***) en papel de filtro para poder luego, al inmovilizarlo sobre la superficie de oro, cuantificar comparativamente la densidad superficial de los mismos (Figura 3-5), en ambos casos utilizando un *Phosphoimager*. Considerando el tamaño de la gota sobre la superficie del papel (0,010 mL) y sabiendo la concentración del **5Ts-Apt\*** depositada, se pudo estimar el número de moléculas por unidad de área.

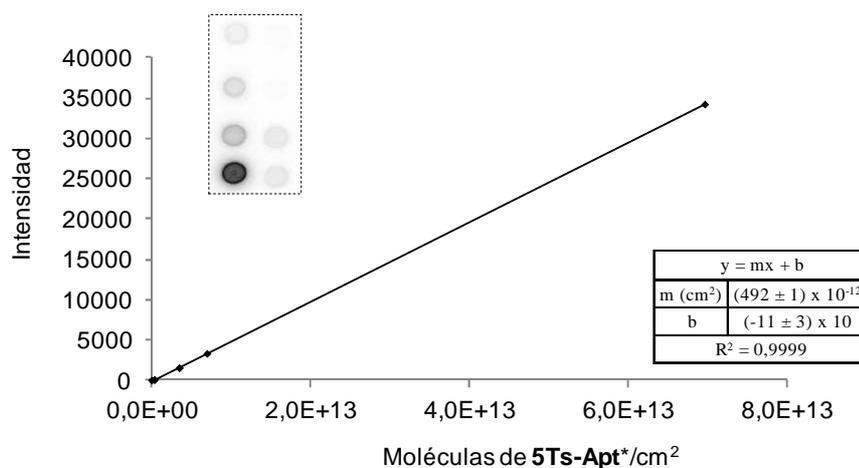


Figura 3-5. Curva de calibrado del **5Ts-Apt\***. *Inserto:* Imagen escaneada de los distintos puntos de la curva de calibrado.

Se limpiaron láminas de oro policristalino con solución piraña y se inmovilizaron las diferentes diluciones de **5Ts-Apt** sobre la superficie de las mismas. Posteriormente se realizó un tratamiento con MCH. El objetivo de dicho tratamiento fue evaluar la eficiencia del mismo como separador para remover y/o eliminar las interacciones inespecíficas entre los nitrógenos de las bases y la superficie de oro<sup>85a</sup>. Finalmente, se cuantificó la densidad superficial, utilizando la curva de calibrado en papel.

Los valores de moléculas de **5Ts-Apt** por  $\text{cm}^2$  antes y después del tratamiento con MCH se presentan en la *Tabla 3-1*. Como se puede observar en la misma, existe una permanencia de la señal de  $^{32}\text{P}$  luego del tratamiento con MCH, la cual evidencia la inmovilización del **5Ts-Apt**. Los valores de densidad superficial obtenidos en la inmovilización del aptámero modificado con Ts están en concordancia con los valores reportados para el anclaje vía grupos tioles sin separador  $(44 \pm 4) \times 10^{12}$  moléculas/ $\text{cm}^2$ )<sup>86b</sup>. Trabajos previos de modelado han calculado la densidad superficial de secuencias de ADN empaquetadas perpendicularmente a la superficie y con un radio de sección estimado de (0,6 - 0,7) nm/cadena, resultando ser de  $8 \times 10^{13}$  moléculas/ $\text{cm}^2$ , sin considerar los efectos de contraiones y de hidratación<sup>85c</sup>. Cabe destacar que dichos resultados reportados son para secuencias de ADN modificadas con grupos tioles y no con Ts. La presencia de cinco grupos Ts en el punto de anclaje, disminuiría la densidad superficial alcanzada ya que estaría ocupando una mayor sección de la superficie del electrodo.

[ <b>5Ts-Apt</b> ] ( $\mu\text{M}$ )	Número de moléculas/ $\text{cm}^2$	
	Antes del MCH	Después del MCH
0,055	$(74 \pm 7) \times 10^{10}$	$(35 \pm 4) \times 10^{10}$
5,5	$(49 \pm 5) \times 10^{11}$	$(20 \pm 2) \times 10^{11}$
40	$(20 \pm 3) \times 10^{12}$	$(72 \pm 7) \times 10^{11}$
55	$(50 \pm 5) \times 10^{12}$	$(28 \pm 3) \times 10^{12}$

*Tabla 3-1.* Comparación de la densidad superficial (moléculas por  $\text{cm}^2$ ) obtenidas por métodos radioquímicos en experimentos independientes ( $n=4$ ) de inmovilización de **5Ts-Apt**, antes y después del tratamiento con MCH.

Por otro lado, los resultados obtenidos muestran una dependencia de la densidad superficial con la concentración de **5Ts-Apt** depositada sobre la superficie, de forma tal

que resulta posible controlar el cubrimiento superficial por medio de la concentración del aptámero durante la etapa de inmovilización. Estos resultados son comparables a los obtenidos en nuestro grupo de trabajo utilizando otras técnicas electroquímicas (VC) y acústicas (QCM-D)<sup>156</sup>.

Se observó una disminución de aproximadamente el 50% del **5Ts-Apt** inmovilizado en la superficie luego del tratamiento con MCH, lo que está en concordancia con los datos de remoción de interacciones inespecíficas de oligonucleótidos<sup>85a</sup>. En el caso del **T-Apt** (40µM), la densidad superficial disminuyó luego del tratamiento con MCH de  $(50 \pm 5) \times 10^{12}$  moléculas/cm<sup>2</sup> a  $(35 \pm 6) \times 10^{11}$  moléculas/cm<sup>2</sup>, resultando en una remoción del 90% del mismo, que si bien es alta no es completa. En diferentes trabajos publicados se sugiere que algunas interacciones inespecíficas entre secuencia de ADN y la superficie de oro, pueden ser comparables a las fuertes interacciones S-Au<sup>155a</sup>. De hecho, la interacción Au-poliA se reportó como comparable o aún mayor que la interacción S-Au<sup>155b</sup>.

### 3.2.1.2. Métodos electroquímicos

Inicialmente, se determinó la capacidad ( $C_d$ ) de diferentes electrodos comerciales modificados con el **5Ts-Apt** en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,4. Estos resultados dan información de la estructura de la capa sobre la superficie del electrodo. Como muestra la *ecuación 3-1*, la  $C_d$  aumenta al disminuir la distancia entre la superficie del electrodo y el plano de mayor acercamiento de los iones en la solución ( $d$ ), y también aumenta al aumentar la constante dieléctrica del material en el medio interviniente ( $\epsilon$ ).

$$C_d = \frac{\epsilon}{4\pi d} \quad (\text{ecuación 3-1})$$

Entonces, se trabajó con electrodos comerciales de oro y se buscó por VC, el intervalo de potencial donde no existe eT (zona de doble capa). En ese intervalo se realizó el salto de potencial cronoamperométrico en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,4 (ver **2.8.1.2.**).

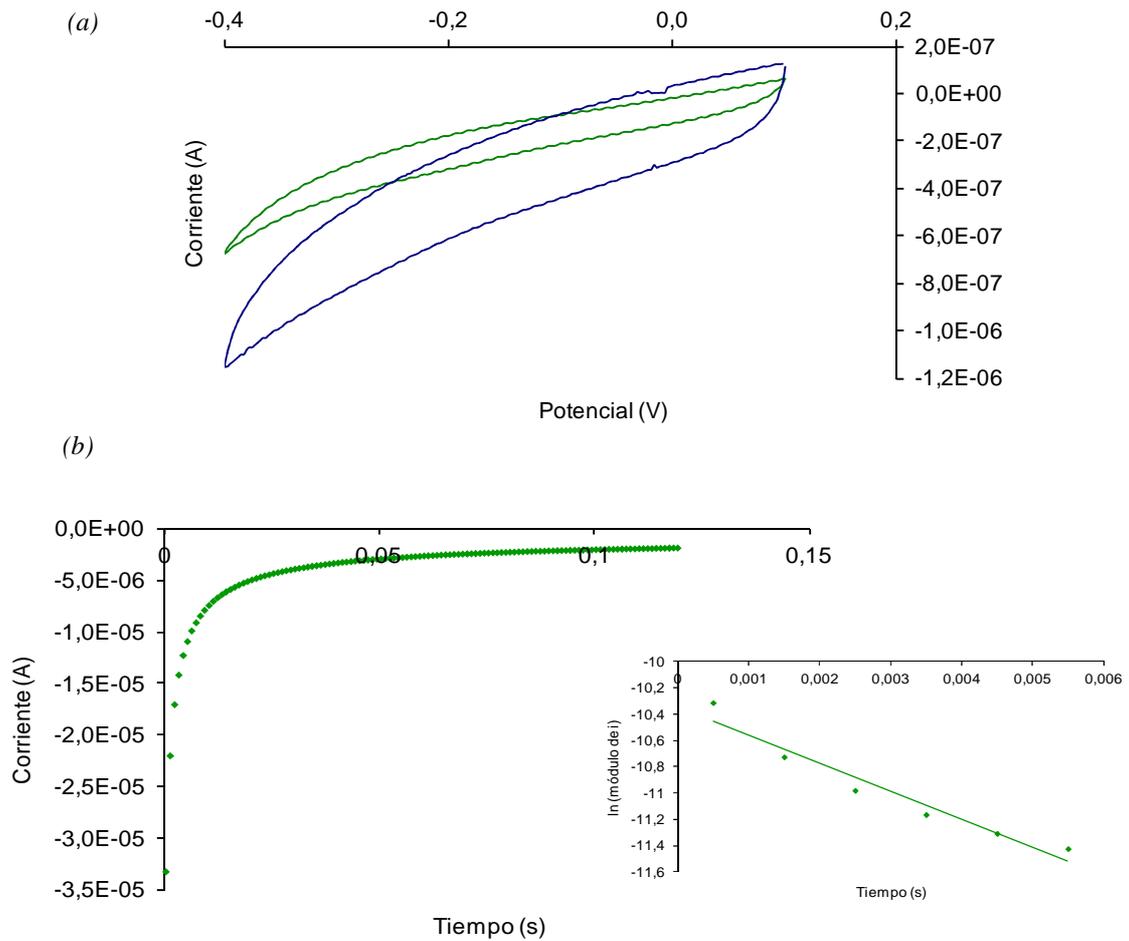
Se armaron cuatro construcciones diferentes sobre los electrodos:

- (a) electrodo de oro (control)
- (b) MCH 1,5 mM

(c) **5Ts-Apt** 50  $\mu\text{M}$

(d) **5Ts-Apt** 50  $\mu\text{M}$  + MCH 1,5 mM.

En la *Figura 3-6a* se comparan los voltogramas obtenidos para un electrodo de oro (azul) y para un electrodo de oro modificado con MCH (verde). Como se puede observar, al modificar la superficie de oro con MCH, la capacidad del electrodo disminuye considerablemente, como es de esperar para la formación de SAMs de tioles sobre superficies de oro<sup>157</sup>.



*Figura 3-6.*(a) VC en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,4 de un electrodo de oro (azul) y un electrodo de oro modificado con MCH (verde). La velocidad de barrido fue 0,1 V/s. (b)

Cronoamperometría ( $t < 0,1$  s) en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,4 de un electrodo de oro modificado con MCH. Pretratamiento: 1 s a 0,1 V. Salto de potencial de 0,1 V (1 s) a -0,4 V (0,12 s) vs. Ag/AgCl. Inserto: linealización a tiempos cortos.

Si se considera al sistema como un circuito resistencia-capacitor, la relación entre la corriente,  $i$ , y el tiempo,  $t$ , cuando se aplica un salto de potencial de magnitud  $E$  viene dada por la siguiente ecuación<sup>158</sup>:

$$i = \frac{E}{R_s} e^{\left(-t/R_s C_d\right)} \quad (\text{ecuación 3-2})$$

donde  $R_s$  es la resistencia de la solución y  $C_d$  la capacidad de la doble capa.

Esta relación es la que se observa, por ejemplo, en la *Figura 3-6b*, para el caso de un electrodo modificado con MCH. Al linealizar la ecuación anterior, se pudo calcular  $C_d$ . Los resultados se muestran en la *Tabla 3-2*. En ausencia de MCH, la capacidad del electrodo modificado con **5Ts-Apt** resultó similar a la del electrodo de Au sin modificación. Dichos resultados resultan sorprendentes, pero están en concordancia con valores encontrados en bibliografía<sup>153</sup>. Al comparar los resultados de capacidad para las capas mixtas de **5Ts-Apt** + MCH con respecto a las modificaciones con **5Ts-Apt**, se observó que las capas mixtas son menos permeables que en el caso del **5Ts-Apt** sólo. Una posible explicación de este hecho es que el tratamiento con MCH estaría ordenando la monocapa al levantar las moléculas de ADN unidas de manera inespecífica a la superficie, generando una construcción más compacta. Esto está en concordancia con los resultados obtenidos por marcación radioquímica.

Superficie del electrodo	Concentración (µM)	$C_d$ (µF/cm <sup>2</sup> ) (n = 4)	$C_d$ (µF/cm <sup>2</sup> ) <sup>153</sup>
Au	--	47 ± 22	43 ± 15
MCH	1500	17 ± 3	3,9 ± 0,1 (1000 µM)
<b>5Ts-Apt</b>	50	42 ± 28	25 ± 8 (Aptámero tiolado 1 µM)
<b>5Ts-Apt</b> + MCH	50 / 1500	8 ± 2	4,8 ± 0,2 (Aptámero tiolado 1 µM + MCH 1500 µM)

*Tabla 3-2.* Resultados de  $C_d$  en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,4 para diferentes construcciones sobre los electrodos de oro.

Para poder determinar la densidad superficial se usó una la técnica de CronoQ<sup>153</sup>. Cuando se sumerge un electrodo modificado con ADN en una solución electrolítica de baja fuerza iónica que contiene un catión polivalente capaz de sufrir un proceso redox, se intercambian los cationes nativos que compensan la carga de los residuos fosfato (cationes Na<sup>+</sup> por ejemplo), por los cationes de la solución, quedando retenidos electrostáticamente en la superficie. La densidad superficial de ADN se puede obtener al calcular la carga transferida debido a los cationes medidos en la superficie del electrodo. Dicha carga es directamente proporcional a la densidad superficial de ADN inmovilizado.

Un aspecto atractivo de la CronoQ es que la carga capacitiva de la doble capa y la carga debida a la reacción de especies adsorbidas en la superficie del electrodo se pueden diferenciar de la carga debida a la reacción de marcadores redox que difunden a la superficie del electrodo<sup>85a</sup>. Como consecuencia, si se trabaja en condiciones de equilibrio, se pueden medir las especies redox confinadas en la superficie en presencia de un marcador redox en solución. La corriente integrada, o la carga Q, como función del tiempo en un experimento cronocoulombimétrico viene dada por la integración de la expresión de Cottrell modificada (ver **2.8.1.2.**):

$$Q = \frac{2nFAD_0^{1/2}C_0^*}{\pi^{1/2}} t^{1/2} + Q_{dl} + nF\Gamma_0 \quad (\text{ecuación 3-3})$$

donde n es el número de electrones por marcador redox, F la constante de Faraday (C/equiv), A el área del electrodo (cm<sup>2</sup>), D<sub>0</sub> el coeficiente de difusión del marcador redox (cm<sup>2</sup>/s), C<sub>0</sub><sup>\*</sup> la concentración del analito en el seno de la solución (mol/cm<sup>2</sup>), Q<sub>dl</sub> la carga capacitiva (C) y (nFΓ<sub>0</sub>) la carga debida a la reducción de Γ<sub>0</sub> (mol/cm<sup>2</sup>) del marcador redox adsorbido.

El término Γ<sub>0</sub>, designado el exceso superficial, representa la cantidad de marcador redox confinado cerca de la superficie del electrodo. La ordenada al origen cronocoulombimétrica (Q cuando t=0) es entonces, la suma de la carga capacitiva más el término correspondiente al exceso superficial. Dicho exceso superficial se determina de la diferencia entre la ordenada al origen cronocoulombimétrica para experimentos idénticos en presencia y ausencia del marcador redox.

Bajo condiciones de saturación, la relación entre el exceso superficial del marcador redox y la densidad superficial de ADN vienen dada por:

$$\Gamma_{ADN} = \Gamma_0 \left( \frac{z}{m} \right) (N_A) \quad (\text{ecuación 3-4})$$

donde  $\Gamma_{ADN}$  es la densidad superficial del ADN en moléculas por  $\text{cm}^2$ ,  $m$  es el número de nucleótidos en la cadena de ADN,  $z$  es la carga del marcador redox y  $N_A$  es el número de Avogadro.

La validez del método se basa en 3 suposiciones: (1) el marcador redox se asocia al ADN estrictamente a través de interacciones electrostáticas; (2) la compensación de la carga de los residuos fosfatos del ADN se da únicamente por el marcador redox; y (3) la cantidad de marcadores redox retenidos electrostáticamente se puede determinar exactamente, esto es, todos los marcadores redox están electroquímicamente accesibles.

Como marcador redox se utilizó  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$  (RuHex). Estudios cristalográficos de la estructura del RuHex con ADN muestran que el complejo metálico se asocia únicamente a través de interacciones electrostáticas<sup>159</sup>. El RuHex carece de grupos orgánicos planos que se puedan intercalar entre las bases del ADN. Como consecuencia de esto, el RuHex se coordina estequiométricamente a los residuos fosfato del ADN en soluciones de baja fuerza iónica. Por otro lado, existen evidencias de que el RuHex no se adsorbe sobre SAMs de MCH, por lo tanto la carga medida correspondería únicamente a la del RuHex coordinado al aptámero<sup>157</sup>.

Para que se cumpla la *ecuación 3-3*, el potencial inicial en el salto aplicado debe ser un potencial donde prácticamente no ocurra electrólisis y el potencial final, un valor en el cual haya control difusional. Los potenciales apropiados se determinaron por VC de un electrodo modificado con MCH (ver *Figura 3-7*).

Un factor crítico es poder determinar con exactitud la carga de la doble capa,  $Q_{dl}$ . La capacidad del oro puede variar desde 20 a 60  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , y esa variabilidad limita la exactitud de las determinaciones. Como se puede observar en la *Tabla 3-2*, una ventaja de usar MCH es que disminuye considerablemente la capacidad del electrodo a un valor reproducible.

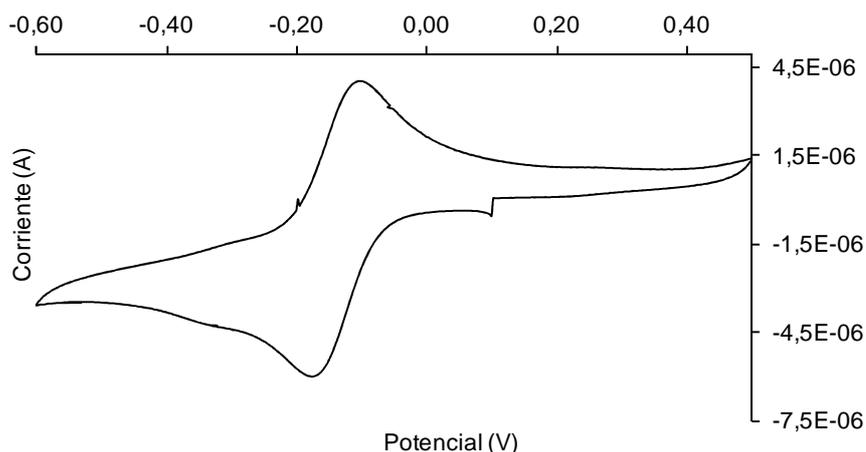


Figura 3-7. Respuesta por VC de un electrodo de oro modificado con MCH en una solución 1,25 mM de RuHex en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,4. La velocidad de barrido fue 0,1 V/s.

Entonces, se inmovilizaron las diferentes diluciones de **5Ts-Apt** sobre la superficie de electrodos comerciales. Posteriormente se realizó el tratamiento por inmersión con MCH.

Se determinó primero la carga capacitiva aplicando un salto de potencial cronocoulombimétrico (0,1 V a -0,4 V vs. Ag/AgCl) en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,4. Se introdujo el RuHex en la solución de buffer a una concentración tal que asegure la completa compensación de las cargas de los residuos fosfato del ADN (condición de saturación). Dicha concentración resulta ser  $50 \mu\text{M}$ <sup>157,160</sup>. El electrodo se dejó equilibrar en la solución por aproximadamente 5 minutos antes de comenzar el salto de potencial cronocoulombimétrico.

Una respuesta típica de CronoQ en ausencia y presencia de RuHex para un electrodo modificado con **5Ts-Apt**  $5,5 \mu\text{M}$  + MCH se muestra en la *Figura 3-8*.

El exceso superficial se determinó a partir de la diferencia entre la ordenada al origen en ausencia y presencia del RuHex. Como se observa en la *Tabla 3-3*, los valores de densidad superficial obtenidos para **5Ts-Apt** son comparables a datos bibliográficos de densidad superficial determinada por CronoQ para ADN modificado con un grupo tiol  $((1-10) \times 10^{12} \text{ moléculas/cm}^2)$ <sup>153</sup>. Por otro lado, se observó una dependencia de la densidad superficial con la concentración de **5Ts-Apt** depositada sobre la superficie del electrodo.

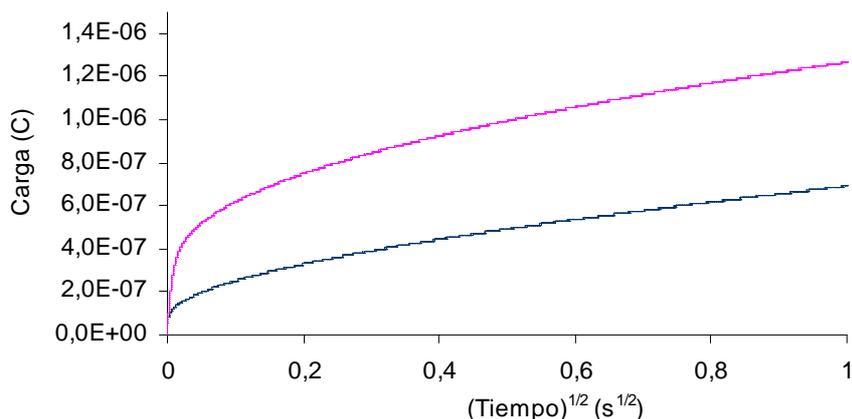


Figura 3-8. CronoQ (0,1 V a -0,4 V vs. Ag/AgCl) de un electrodo de oro modificado con **5Ts-Apt** 5,5  $\mu\text{M}$  + MCH en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,4 (azul) y en una solución 50  $\mu\text{M}$  de RuHex en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,4 (rosa).

Al comparar los resultados de densidad superficial medidos por CronoQ con los obtenidos por marcación radioquímica (ver Figura 3-9), se observa que los valores son comparables, salvo en el caso de la inmovilización de **5Ts-Apt** 55  $\mu\text{M}$ . En este caso, el valor de moléculas por unidad de área obtenido por  $^{32}\text{P}$  es considerablemente mayor que el obtenido por CronoQ. Esto podría deberse a que no haya sido suficiente el tiempo de equilibramiento en la solución de RuHex para esa concentración elevada de aptámero.

[ <b>5Ts-Apt</b> ] ( $\mu\text{M}$ )	Número de moléculas/ $\text{cm}^2$ Después del MCH
0,050	$(17 \pm 4) \times 10^{11}$
1,0	$(25 \pm 9) \times 10^{11}$
5,5	$(34 \pm 16) \times 10^{11}$
55	$(66 \pm 57) \times 10^{11}$

Tabla 3-3. Resultados de la densidad superficial (moléculas por  $\text{cm}^2$ ) obtenidos por CronoQ en experimentos independientes (n=4) de inmovilización de **5Ts-Apt**, después del tratamiento con MCH.

Para poder evaluar la eficiencia del anclaje vía Ts frente al anclaje tradicional vía un grupo tiol, se determinó la densidad superficial por CronoQ del **Apt-ATP** modificado con un grupo tiol. Para ello, se utilizó el **C<sub>6</sub>-S-S-C<sub>6</sub>-Apt** (ver Figura 3-4), el cual se redujo utilizando TCEP. Dicho agente reductor “rompe” el puente disulfuro del aptámero, generando un grupo tiol libre, de manera selectiva, completa y rápida<sup>161</sup>.

Presenta algunas ventajas frente a otros agentes reductores (Ditiotreitol o  $\beta$ -mercaptoetanol) como por ejemplo, que es más resistente a la oxidación en aire, resulta activo en medio ácido y básico y es más hidrofílico<sup>162</sup>. Además, a diferencia del ditiotreitol, el TCEP no se absorbe sobre la superficie de oro<sup>80</sup>.

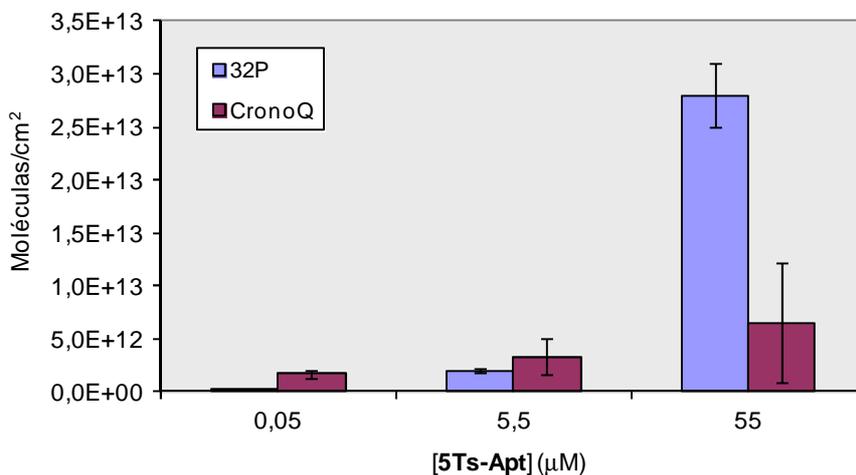


Figura 3-9. Comparación de los valores de densidad superficial obtenidos por CronoQ y por métodos radioquímicos para diferentes concentraciones de **5Ts-Apt**.

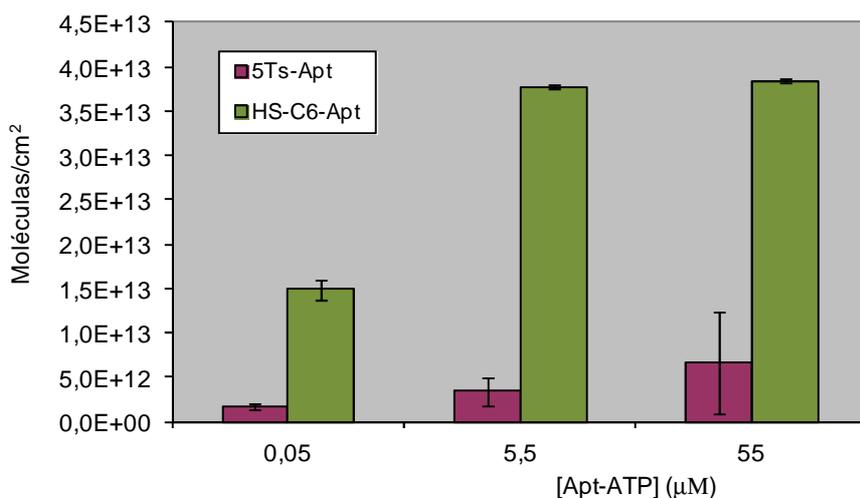
Luego de la reducción, la solución de **HS-C<sub>6</sub>-Apt** se diluyó hasta la concentración adecuada en el buffer de reducción. Se inmovilizaron las diferentes diluciones de **HS-C<sub>6</sub>-Apt** sobre la superficie de electrodos comerciales. Posteriormente se realizó el tratamiento por inmersión con MCH. Por último, se determinó la densidad superficial para las diferentes concentraciones por CronoQ (*Tabla 3-4*).

[ <b>HS-C<sub>6</sub>-Apt</b> ] (μM)	Número de moléculas/cm <sup>2</sup> Después del MCH
0,050	(149 ± 11) x 10 <sup>11</sup>
5,5	(378 ± 2) x 10 <sup>11</sup>
55	(385 ± 3) x 10 <sup>11</sup>

Tabla 3-4. Resultados de la densidad superficial (moléculas por cm<sup>2</sup>) obtenidos por CronoQ en experimentos independientes (n=4) de inmovilización de **HS-C<sub>6</sub>-Apt**, después del tratamiento con MCH.

Como se observa en la *Tabla 3-4*, la densidad superficial para la inmovilización del **HS-C<sub>6</sub>-Apt** es dependiente de la concentración de aptámero depositado sobre la superficie del electrodo, alcanzándose una situación de saturación en torno a 55  $\mu\text{M}$ .

Comparando estos resultados con aquellos determinados para el **5Ts-Apt** (*Figura 3-10*), se observa que la densidad superficial obtenida inmovilizando el aptámero a través de un grupo tiol es entre 5 a 10 veces mayor que para el anclaje vía Ts. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por QCM-D en nuestro grupo de trabajo<sup>156</sup>. Cabe destacar que al reducir el **C<sub>6</sub>-S-S-C<sub>6</sub>-Apt** sin una posterior purificación, se obtiene una solución equimolar del **HS-C<sub>6</sub>-Apt** y el **C<sub>6</sub>-SH** (ver *Figura 3-4*). La coadsorción del tioalcano corto podría permitir un mejor acomodamiento de las cadenas de ADN sobre la superficie del electrodo<sup>86,149,163</sup>, donde las cadenas se encontrarían más espaciadas y podrían interactuar más eficientemente con el RuHex. Esto no ocurre, en principio, en el caso del **5Ts-Apt**.



*Figura 3-10.* Comparación de los valores de densidad superficial obtenidos por CronoQ para diferentes concentraciones de **5Ts-Apt** y de **HS-C<sub>6</sub>-Apt**.

También se inmovilizó en las mismas condiciones el **T-Apt** 5,5  $\mu\text{M}$ , obteniéndose un valor de densidad superficial luego del tratamiento con MCH, de  $(7 \pm 3) \times 10^{11}$  moléculas/cm<sup>2</sup>. Dicho valor resultó mucho menor que para el caso del anclaje vía Ts y/o tiol; aunque no fue nulo. Esto sigue en concordancia con los resultados anteriormente obtenidos, donde se observa una interacción inespecífica entre la secuencia de ADN y la superficie de oro.

Para evaluar la estabilidad térmica del enlace Ts y además cuantos grupos Ts son necesarios para el anclaje, se trabajó con secuencias del **Apt-ATP** que contenían diferente cantidad de grupos Ts en el extremo 5': **5Ts-Apt**, **3Ts-Apt** y **1Ts-Apt** (ver **2.1.7.1**). Se inmovilizaron soluciones 5,5  $\mu\text{M}$  de dichas secuencias en diferentes electrodos. Posteriormente se realizó el tratamiento con MCH, y se determinó por CronoQ la densidad superficial (*Tabla 3-5*).

<b>Apt-ATP</b>	Número de moléculas/cm <sup>2</sup> Después del MCH
<b>5Ts-Apt</b>	$(34 \pm 16) \times 10^{11}$
<b>3Ts-Apt</b>	$(23 \pm 8) \times 10^{11}$
<b>1Ts-Apt</b>	$(77 \pm 2) \times 10^{11}$

*Tabla 3-5.* Resultados de la densidad superficial (moléculas/ cm<sup>2</sup>) obtenidas por métodos electroquímicos en experimentos independientes (n=3) de inmovilización de **5Ts-Apt**, **3Ts-Apt**, **1Ts-Apt**, después del tratamiento con MCH.

Como se observa en la *Tabla 3-5*, los valores de densidad superficial resultan comparables en los tres casos, siendo levemente mayor en el caso del **1Ts-Apt**. Esto podría explicarse teniendo en cuenta la posible disminución del ángulo entre la cadena de ADN y la superficie del electrodo, al aumentar el número de puntos de anclaje (Ts). Las cadenas de ADN estarían más paralelas a la superficie del electrodo<sup>164</sup> ocasionando un peor acomodamiento de las mismas.

Una vez determinada la densidad superficial, los electrodos modificados fueron expuestos a un *stress* térmico, sumergiéndolos en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,4 a 80°C por 20 minutos<sup>154b,c</sup>, y se volvió a determinar la densidad superficial por CronoQ. Este tratamiento también se realizó para electrodos modificados con **HS-C<sub>6</sub>-Apt** y con **T-Apt**, inmovilizados a partir de soluciones 5,5  $\mu\text{M}$ .

Como se observa en la *Figura 3-11*, el porcentaje de disminución relativa para el **1Ts-Apt** y **HS-C<sub>6</sub>-Apt** resulta comparable (60% - 70%), siendo la remoción de **T-Apt** significativamente mayor. Estos resultados indican una estabilidad térmica similar entre ambas modificaciones, lo que resulta importante a la hora de pensar en el armado de un sensor y el posible proceso de desnaturalización térmica para regenerar la estructura inicial del aptámero. Por otro lado, al comparar la estabilidad de las secuencias con

diferente cantidad de grupos Ts, se observó que el **3Ts-Apt** presentó el menor porcentaje de disminución relativa al calentar.

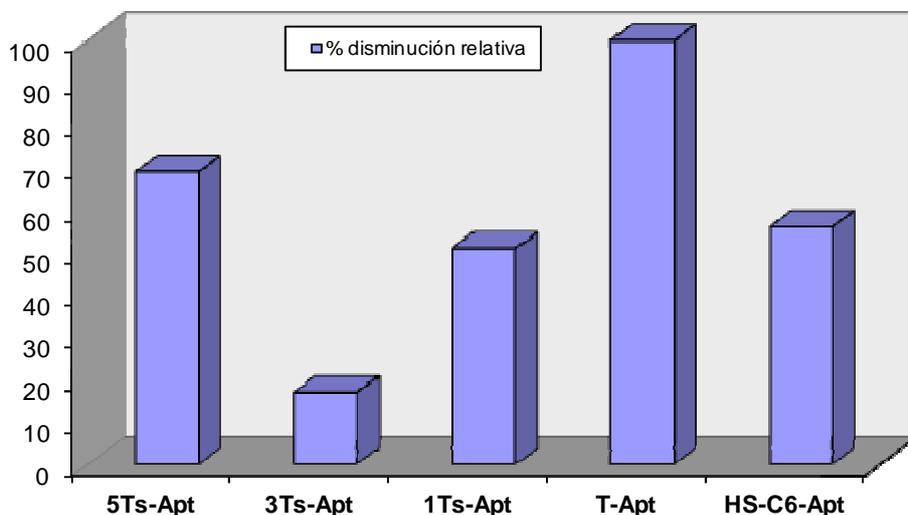


Figura 3-11. Comparación de los valores del porcentaje de disminución relativa de la densidad superficial obtenidos por CronoQ para diferentes electrodos modificados con **5Ts-Apt**, **3Ts-Apt**, **1Ts-Apt**, **HS-C<sub>6</sub>-Apt** y **T-Apt**, luego de la exposición a un *stress* térmico.

### 3.2.2. Evaluación del reconocimiento del *target* (ATP) por medio del aptámero inmovilizado por métodos radioquímicos

Otra variable crítica a estudiar es la influencia de la densidad superficial del aptámero inmovilizado en el desempeño del evento de reconocimiento molecular (ver **1.4.3.1.**)<sup>165</sup>. Se sabe que el congestionamiento molecular (medido como la densidad superficial del aptámero en la superficie del electrodo) puede afectar la respuesta del sensor<sup>166</sup>. Entonces el siguiente paso fue definir la mejor concentración de **Apt-ATP** inmovilizada de forma de optimizar el funcionamiento del sensor.

Para ello, se diluyó el  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP con una solución de adenosina preparada en el buffer de reconocimiento<sup>31</sup>, resultando una concentración final del *target* de 2,7  $\mu$ M. Se prepararon diluciones de la misma (0,00027  $\mu$ M – 0,27  $\mu$ M) y se construyó una curva de calibrado en papel para poder cuantificar la cantidad de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP reconocido por el aptámero (Figura 3-12), utilizando un *Phosphoimager*. Considerando que la gota de 0,010 mL sobre el papel genera un área de tamaño de 0,95 cm<sup>2</sup>, se pudo entonces estimar el número de moléculas de adenosina por cm<sup>2</sup> para cada punto de la curva (ver *Inserto (b)* Figura 3-12). A continuación, se construyó la capa de reconocimiento

inmovilizando el **5Ts-Apt** en diferentes concentraciones (0,055  $\mu\text{M}$  – 55  $\mu\text{M}$ ) sobre láminas de oro policristalino limpias con solución piraña. Luego se removieron las posibles interacciones inespecíficas con el tratamiento con MCH. Por último, las láminas de oro se incubaron con la solución 2,7  $\mu\text{M}$  de adenosina/ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (*Inserto (a) Figura 3-12*).

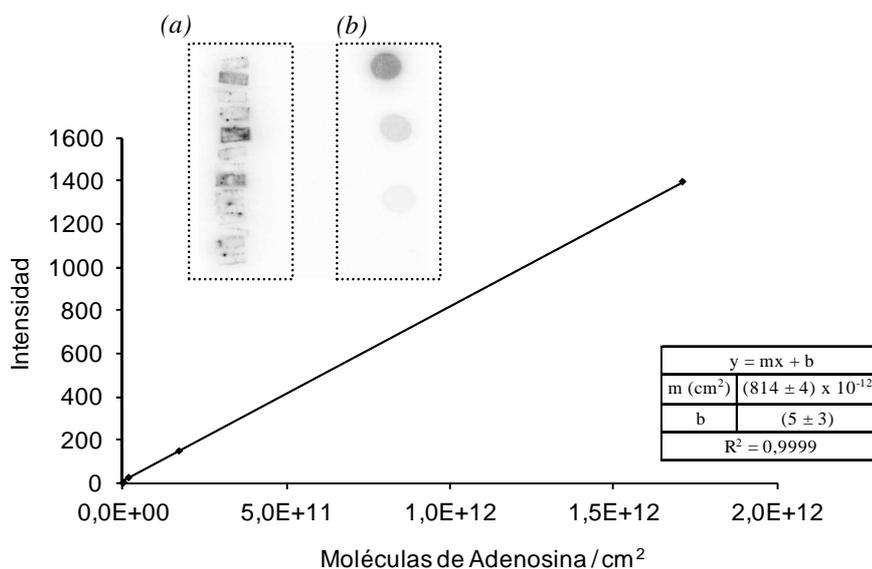


Figura 3-12. Curva de calibrado de Adenosina/ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP. *Inserto*. (a) Imagen escaneada de las distintas láminas de oro modificadas con **5Ts-Apt** + MCH + adenosina/ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP. (b) Imagen escaneada de los distintos spots de la curva de calibrado.

Los resultados de la *Tabla 3-6* muestran que la capacidad de reconocimiento del ATP es función de la densidad superficial de aptámero inmovilizado y la mejor respuesta se alcanza cuando la concentración del **5Ts-Apt** es 5,5  $\mu\text{M}$ , como se observa al presentar el mayor valor de  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP detectado. Esto correlaciona con resultados encontrados para otros sensores, donde la mejor respuesta se observa en los valores de menor densidad superficial<sup>165</sup>. Por otro lado, se puede concluir que es innecesario utilizar concentraciones tan elevadas de **Apt-ATP**, lo cual encarecería el posible armado del sensor.

Considerando que el aptámero puede reconocer dos moléculas de ATP<sup>95</sup>, se calculó el porcentaje de reconocimiento, resultando una eficiencia en el reconocimiento de aproximadamente el 50% en el caso de la concentración óptima de **5Ts-Apt** (5,5  $\mu\text{M}$ ) (*Tabla 3-6*).

[5Ts-Apt] ( $\mu\text{M}$ )	Número de moléculas de $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP /cm}^2$ (n=3)	Número de moléculas de $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP /cm}^2$ (calculado)	Porcentaje de Reconocimiento (%)
0,055	$(28 \pm 3) \times 10^9$	$7,0 \times 10^{11}$	4,0
5,5	$(18 \pm 2) \times 10^{11}$	$40 \times 10^{11}$	45
40	$(17 \pm 2) \times 10^{11}$	$144 \times 10^{11}$	12
55	$(28 \pm 3) \times 10^8$	$560 \times 10^{11}$	0,0050

Tabla 3-6. Número de moléculas de  $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$  por  $\text{cm}^2$  obtenidas por métodos radioquímicos en experimentos independientes de reconocimiento del *target* por el **5Ts-Apt**, luego del agregado de MCH.

### 3.2.3. Armado de un aptasensor electroquímico para el reconocimiento de adenosina/ATP

Se exploró el desempeño de un sensor para adenosina/ATP usando el **Apt-ATP**. El anclaje a la superficie del electrodo se hizo a través del grupo Ts y la detección del *target* (adenosina) se realizó utilizando técnicas electroquímicas, previa introducción de un marcador electroactivo (Fc) en la estructura del aptámero inmovilizado<sup>167</sup>.

El principio de funcionamiento del sensor se basa en el cambio conformacional del aptámero<sup>103</sup>. En ausencia de adenosina, el aptámero está en una conformación *random coil*, una estructura abierta, similar a un cable flexible, y un marcador electroactivo, el ferroceno (Fc) en este caso, puede estar a una distancia considerable de la superficie del electrodo (aproximadamente 10 nm) (ver *Figura 3-1*). La presencia de adenosina induce una transición del aptámero a una estructura bien definida (ver *Figura 1-25*)<sup>95,163a</sup>, en la cual se intercalan dos moléculas de adenosina en sitios adyacentes dentro de una gruta ancha de reconocimiento (*widened groove*), cambiando a una estructura secundaria tipo *stem-loop*. Este reordenamiento conformacional permite el acercamiento del Fc a la superficie del electrodo, lo que aumenta la eficiencia de la eT, y en definitiva traduce el evento de reconocimiento en una señal cuantificable.

El Fc es un candidato atractivo para el marcado de diversas moléculas, como por ejemplo los ácidos nucleicos, debido a su estabilidad en ambos estados de oxidación, la relativa facilidad de incorporación en la secuencia oligonucleotídica y la buena y reversible respuesta electroquímica<sup>121,168</sup>. Lo primero que se hizo fue activar el

**FcCOOH** (**1**, Figura 3-13) con DCC y NHS, obteniéndose el **FcNHS** (**2**, Figura 3-13)<sup>103,169</sup>. Dicho producto fue purificado y caracterizado por RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (ver *anexo*).

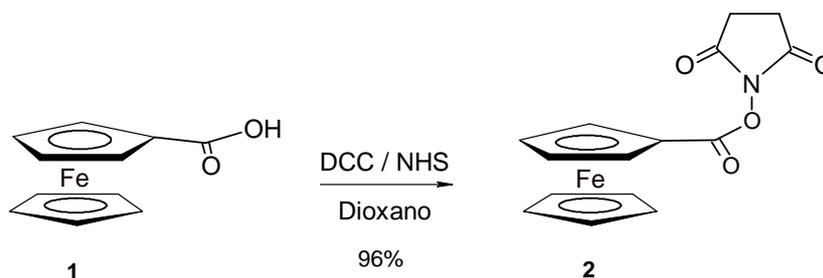


Figura 3-13. Esquema de reacción para la activación del **FcCOOH** (**1**) para dar el **FcNHS** (**2**).

Luego, se trabajó con una secuencia del **Apt-ATP**, cuyo extremo 5' está modificado con un grupo amino, el cuál sirvió para la incorporación del Fc. El extremo 3' del oligonucleótido estaba modificado con cinco grupos Ts de forma de asegurar el anclaje a la superficie de oro, **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** (ver Figura 3-14). Se inmovilizó una solución 5,5 μM de dicho aptámero sobre la superficie de electrodos comerciales de oro policristalino. Se derivatizó *in situ*<sup>103</sup> el grupo amino del **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** inmovilizado por inmersión del electrodo en una suspensión de **FcNHS** en 0,20 M de HEPES pH 7,2 : DMF 1,2 : 1 V/V. Por último, se modificó la superficie con MCH.



Figura 3-14. Secuencia modificada del aptámero: **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts**. En rojo, grupo Ts; en azul, secuencia del **Apt-ATP**.

El electrodo se expuso a concentraciones crecientes de adenosina (4,0 μM – 100 μM) para evaluar la habilidad de reconocer al *target* específicamente. Se utilizó VOC para medir la respuesta del Fc (Figura 3-15). En presencia de adenosina, el aptámero adopta una conformación cerrada, en dónde el Fc está en promedio más cerca de la superficie del electrodo, generando un aumento de la señal electroquímica para la cupla redox.

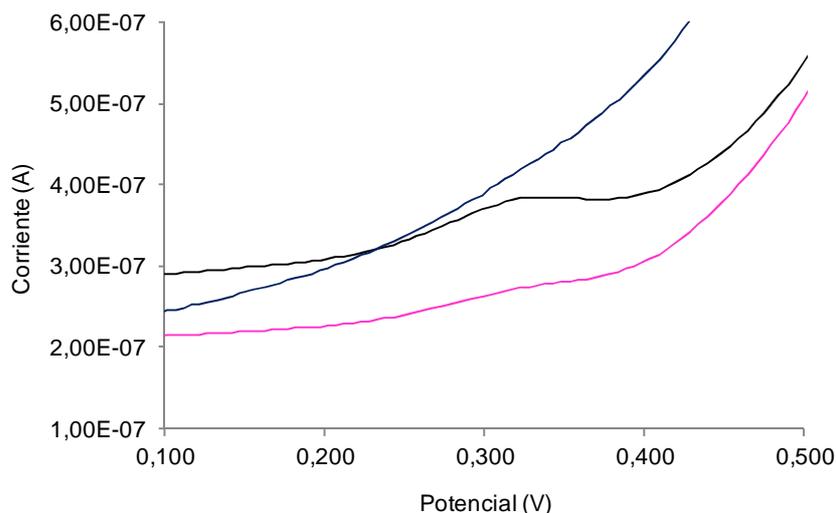


Figura 3-15. VOC en una solución 50  $\mu\text{M}$  de adenosina en 0,2 M de HEPES pH 7,2 del electrodo modificado con **Fc-NH-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** (luego del tratamiento con MCH) (negro). La curva rosa corresponde a la VOC del mismo electrodo en ausencia de adenosina (solución 0,2 M de HEPES pH 7,2). La curva azul corresponde a la VOC del mismo electrodo en una solución 100  $\mu\text{M}$  de 2-desoxiguanosina en 0,2 M de HEPES pH 7,2.

Como se observa en la *Figura 3-15*, aún en ausencia de adenosina, se observa una respuesta electroquímica mínima correspondiente a la eT del Fc<sup>103</sup>. En analogía con los sensores electroquímicos de ADN tipo *hairpin*<sup>99,100</sup>, se asume que esta pequeña respuesta se debe a una conformación desestructurada (*unfolded*) de la secuencia de ADN en la superficie del electrodo o a eventos de torsión (*bending*) de la secuencia oligonucleotídica en su conformación *random coil*.

Se registró el pico de corriente para cada concentración de adenosina ( $E_{\text{pico}} = 0,318\text{-}0,323$  V vs. Ag/AgCl, 3 M KCl (ac)) y se usó para construir una curva típica de respuesta (*Figura 3-16*). Se estimó la constante de disociación del aptámero inmovilizado del correspondiente gráfico de Scatchard y su valor,  $K_D = (5 \pm 3)$   $\mu\text{M}$ , está en concordancia con valores reportados previamente  $(6 \pm 3)$   $\mu\text{M}$ <sup>31</sup>.

La especificidad del sensor se corroboró usando una solución 100  $\mu\text{M}$  de 2-desoxiguanosina (nucléosido con estructura similar a la adenosina, ver *Figura 3-17*) sin obtener una respuesta electroquímica significativa (ver curva azul, *Figura 3-15*). Se sabe que el aptámero reconoce adenosina, AMP, ADP y ATP con la misma  $K_D$ <sup>31</sup>. Este hecho se puede entender teniendo en cuenta la estructura resuelta del aptámero por RMN<sup>95</sup>, donde se establece que los dos dominios de reconocimiento localizan las bases

purinas adentro de la estructura de *loop*, dejando el grupo hidroxilo 5' (y consecuentemente los fosfato) hacia afuera del bolsillo de unión.

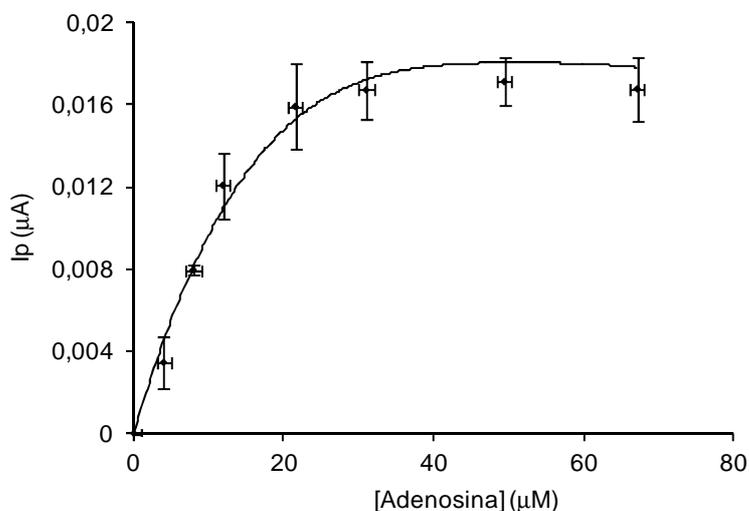


Figura 3-16. Curva de respuesta de un electrodo modificado con **Fc-NH-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** (luego del tratamiento con MCH) en función de la concentración de adenosina (n = 3).

Comparativamente, se exploró también el desempeño del aptasensor usando el **Apt-ATP** modificado con un puente disulfuro en un extremo y el grupo amino en el otro (**NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-S-S-C<sub>6</sub>**, Figura 3-18).

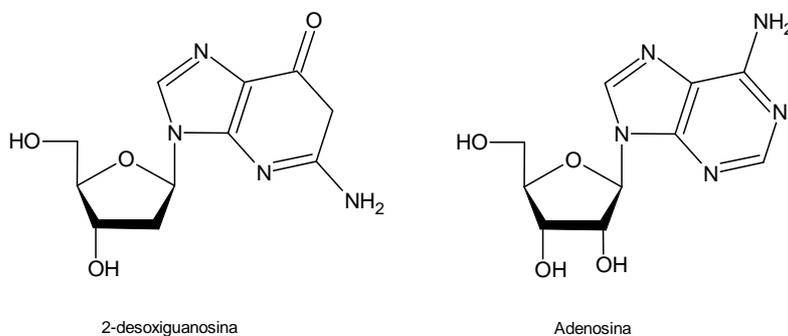


Figura 3-17. Estructura de la 2-desoxiguanosina y la adenosina.

Se utilizó una solución 200 µM de **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-S-S-C<sub>6</sub>**, el cual se redujo siguiendo el protocolo antes mencionado, de forma tal de obtener el grupo tiol libre para que reaccione con la superficie de oro. Luego de la reducción, la solución de **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-SH** se diluyó hasta la concentración de 5,5 µM en el buffer de reducción.

Se inmovilizó dicha solución sobre la superficie de electrodos comerciales de oro policristalino. Se derivatizó *in situ* el grupo amino del **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-SH** de igual manera que en el caso anterior. Por último, se modificó la superficie con MCH.



Figura 3-18. Secuencia modificada del aptámero:  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Apt-S-S-C}_6$  y  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Apt-SH}$ . En azul, secuencia del **Apt-ATP**; en verde, puente disulfuro/grupo tiol.

Entonces, se expuso la capa de reconocimiento a concentraciones crecientes de adenosina ( $4,0 \mu\text{M} - 50 \mu\text{M}$ ) para evaluar la capacidad de reconocer al *target*. Se empleó VOC para medir la respuesta del Fc (ver *Inserto Figura 3-19*).

Se registró el pico de corriente para cada concentración de adenosina ( $E_{\text{pico}} = 0,300\text{-}0,309 \text{ V vs. Ag/AgCl, 3M KCl (ac)}$ ) y se usó para construir una curva típica de respuesta. Como se observa en la *Figura 3-19*, se obtuvo una respuesta similar a la obtenida para el aptámero modificado con el grupo Ts, alcanzándose la saturación a una concentración menor.

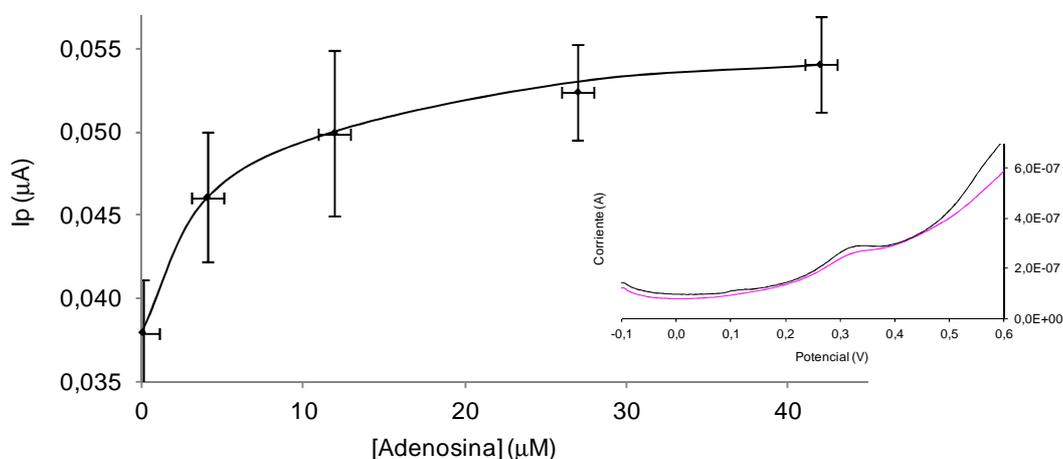


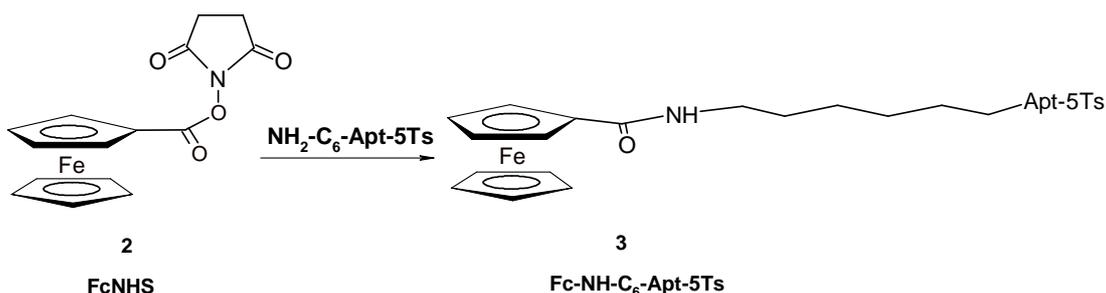
Figura 3-19. Curva de respuesta de un electrodo modificado con **Fc-NH-C<sub>6</sub>-Apt-SH** (luego del tratamiento con MCH) en función de la concentración de adenosina ( $n = 3$ ). *Inserto*: VOC del mismo electrodo en una solución  $27 \mu\text{M}$  de adenosina en  $0,2 \text{ M}$  de una solución  $10 \text{ mM}$  de buffer Tris-HCl +  $150 \text{ mM}$  NaCl +  $10 \text{ mM}$  MgCl<sub>2</sub> (negro). La curva rosa corresponde a la VOC del mismo electrodo en ausencia de adenosina (solución  $10 \text{ mM}$  de buffer Tris-HCl +  $150 \text{ mM}$  NaCl +  $10 \text{ mM}$  MgCl<sub>2</sub>).

Por otro lado, en este caso se obtuvo una señal considerable para el blanco, esto es, en ausencia de adenosina, pudiendo indicar una adsorción inespecífica de Fc sobre la superficie del electrodo. Como consecuencia de los altos valores de blanco en este

proceso de marcación, se decidió explorar una construcción diferente de la capa de reconocimiento, más específicamente, la modificación de la secuencia del aptámero previamente a la inmovilización.

### 3.2.4. Puesta a punto de la reacción de derivatización del aptámero con un grupo electroactivo en solución

Con el objetivo de evaluar si era posible mejorar el rendimiento de la derivatización con Fc, y por lo tanto aumentar la intensidad de la respuesta electroquímica, se evaluó la derivatización del aptámero en solución, para lo cual se trabajó con el **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts**. Se evaluaron diferentes condiciones para la reacción de derivatización de dicho aptámero con el **FcNHS (2)** para dar el **Fc-NH-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** (ver *Figura 3-20*), así como también de cuantificación/purificación del mismo por cromatografía líquida de alta resolución con detección por ultravioleta (HPLC-UV).



*Figura 3-20.* Esquema de reacción para la derivatización del **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** con **FcNHS (2)** en solución.

Inicialmente se probaron las condiciones de acoplamiento propuestas por Yu y colaboradores<sup>131</sup>, dónde el solvente utilizado para la derivatización es una solución 0,3 M de buffer PBS pH 7,4. El producto obtenido se inyectó en el HPLC-UV. Previamente se inyectaron también patrones de los reactivos (**FcNHS** y **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts**) y del **FcCOOH**, que podría ser un producto de descomposición del **FcNHS**. Como se puede observar en la *Figura 3-21*, no se evidenció ninguna señal cromatográfica diferente a los reactivos. No se observó la señal correspondiente al **FcNHS** ( $t_r = 33,13$  min), mientras que la señal correspondiente al **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** ( $t_r = 12,05$  min) disminuye en intensidad. Esto puede deberse a la baja solubilidad del **FcNHS** en el buffer utilizado,

por lo tanto, se decidió probar la derivatización utilizando algún co-solvente orgánico que favoreciera la solubilidad del **FcNHS** sin precipitar al ADN.

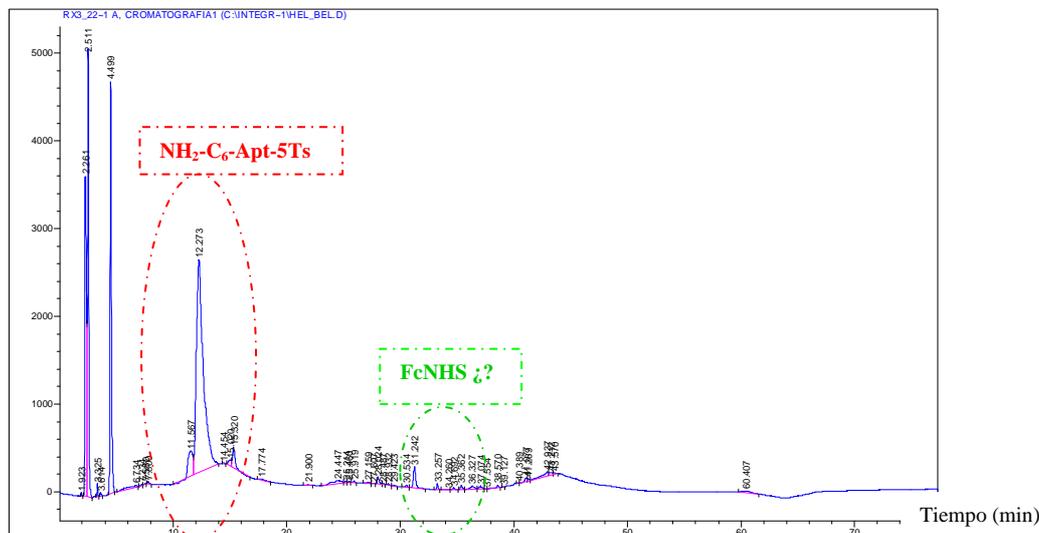


Figura 3-21. Cromatograma obtenido por HPLC-UV de la reacción de derivatización de **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** con **FcNHS** en una solución 0,3 M de buffer PBS pH 7,4.

Se probaron, entonces, dos condiciones de derivatización diferentes. La primera propuesta por Gothelf y colaboradores<sup>103</sup>, que proponen la utilización como solvente de reacción una mezcla de una solución 0,2 M de buffer HEPES pH 7,2 : dimetilformamida (DMF) 5:1 V/V.

Como se observa en la Figura 3-22, si bien la señal cromatográfica correspondiente al **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** ( $t_r = 11,81$  min) disminuye en intensidad comparándolo con la señal obtenida para el patrón (ver *Inserto Figura 3-22*) y se observa una señal de intensidad importante para el **FcNHS** ( $t_r = 33,41$  min), no se evidenció ninguna señal nueva tampoco en estas condiciones.

Se probó, entonces, con una segunda condición de derivatización, propuesta por Ihara y colaboradores<sup>168</sup>, en dónde se utiliza una mezcla de una solución 0,5 M de buffer  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9 : dimetilsulfóxido (DMSO) 3:1 V/V.

Como se puede observar en la Figura 3-23 se evidenció una señal cromatográfica a un  $t_r = 22,10$  min, que podría corresponder al **Fc-NH-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts**. Esto está en concordancia con resultados bibliográficos obtenidos para la purificación de secuencias similares modificadas con Fc<sup>154a</sup>. La señal a  $t_r = 15,21$  min corresponde al **FcCOOH** que se estaría obteniendo por descomposición del **FcNHS** en el medio de reacción (ver

Inserto Figura 3-23). Además, resultaron despreciables las señales correspondientes al  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Apt-5Ts}$  y al  $\text{FcNHS}$ .

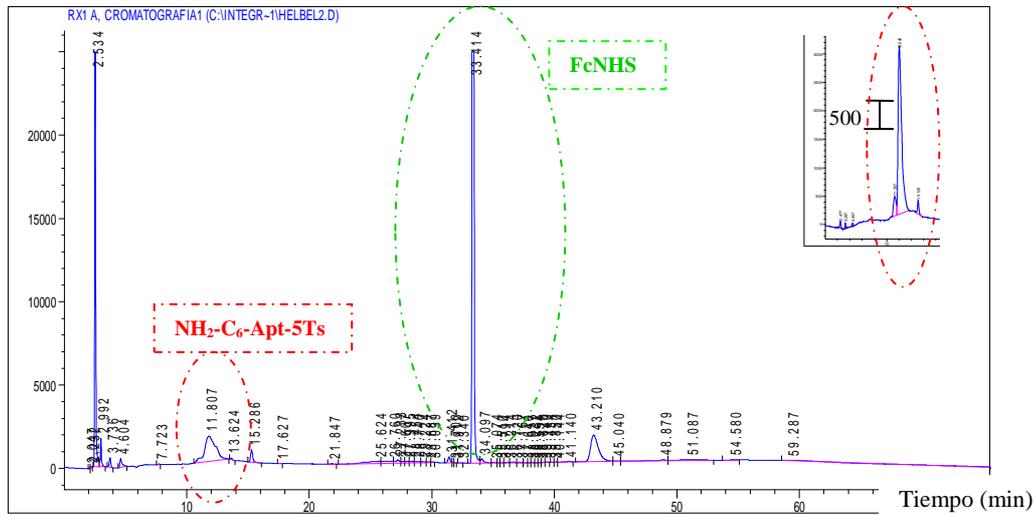


Figura 3-22. Cromatograma obtenido por HPLC-UV de la reacción de derivatización de  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Apt-5Ts}$  con  $\text{FcNHS}$  en una mezcla de una solución 0,2 M de buffer HEPES pH 7,2 : DMF 5:1 V/V. Inserto: Cromatograma obtenido por HPLC-UV de una solución 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Apt-5Ts}$ .

Al integrar la nueva señal y la señal del aptámero sin modificar (ver *Tabla 3-7*), se observó una relación de áreas  $\text{Fc-NH-C}_6\text{-Apt-5Ts}$  :  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Apt-5Ts}$  de 7 : 1. Si bien esa relación resulta bastante favorable, se estaría generando una cantidad de  $\text{FcCOOH}$  comparable a la cantidad de aptámero modificado y además aún existe una cantidad considerable de  $\text{FcNHS}$  sin disolverse en el medio de reacción.

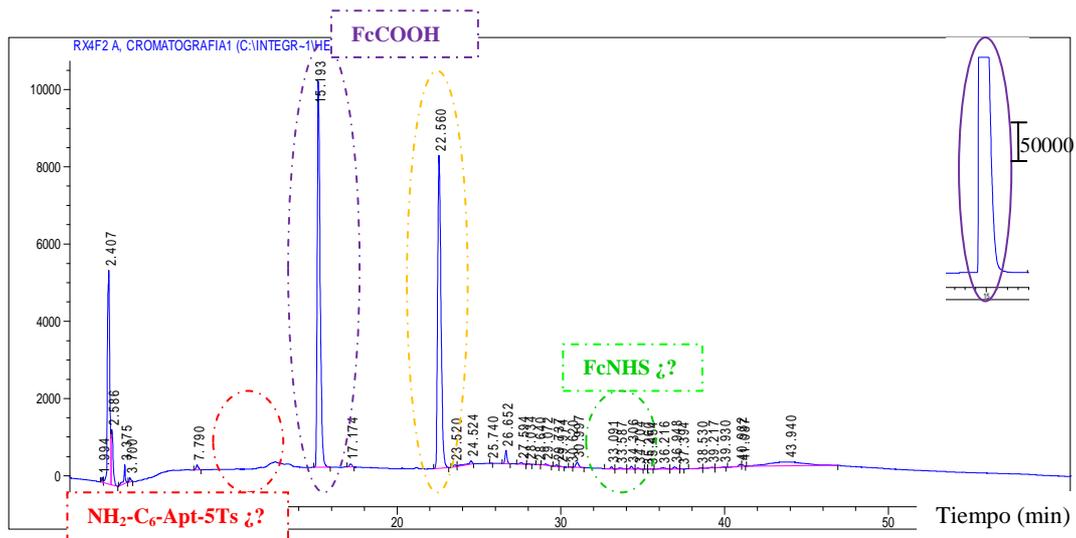


Figura 3-23. Cromatograma obtenido por HPLC-UV de la reacción de derivatización de  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Apt-5Ts}$  con  $\text{FcNHS}$  en una mezcla 0,5 M de buffer  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9 : DMSO 3:1 V/V. Inserto: Cromatograma obtenido por HPLC-UV de una solución 0,1 M de  $\text{FcCOOH}$ .

Se trabajó entonces intentando favorecer la solubilidad del **FcNHS** en el medio de reacción y de esta forma, intentar aumentar el factor de conversión de la misma. Con esta idea, se realizó la derivatización en una mezcla de una solución 0,5 M de buffer  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9 : DMSO 1:1 V/V, esto es, se aumentó la proporción de co-solvente. Además, se realizó la reacción dejando la suspensión por 24 horas a temperatura ambiente con agitación vigorosa.

Tiempo (min)	Área	Asignación
12.57	80075	<b>NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts</b>
15.21	445710	<b>FcCOOH</b>
22.10	540973	¿ <b>Fc-NH-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts?</b>
33.21	17943	<b>FcNHS</b>

Tabla 3-7. Resultados de tiempos de retención y áreas de los picos cromatográficos obtenidos por HPLC-UV para la reacción de derivatización de **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** con **FcNHS** en buffer  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5M pH 9 : DMSO 3:1 V/V.

Como se observa en la *Figura 3-24*, se mejoró la eficiencia de la reacción de derivatización ya que aumentó la relación entre el aptámero modificado y el **FcCOOH** presente en el medio de reacción. Esto también se observó al integrar dichas señales (ver *Tabla 3-8*), en dónde la relación de áreas **Fc-NH-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** : **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** resultó de 74 : 1 y la de **Fc-NH-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** : **FcCOOH**, 20 : 1.

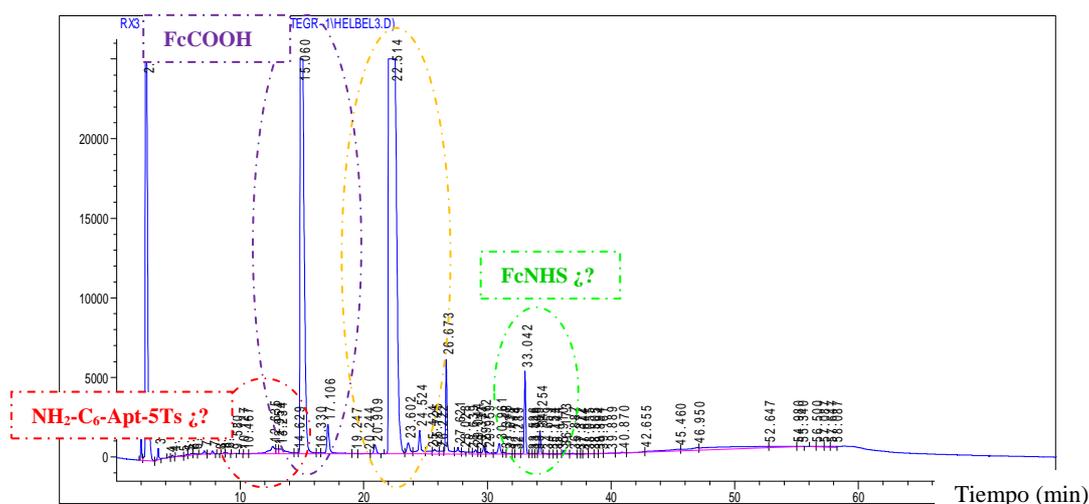


Figura 3-24. Cromatograma obtenido por HPLC-UV de la reacción de derivatización de **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** con **FcNHS** en una mezcla de una solución 0,5 M de buffer  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9 : DMSO 1:1 V/V.

Si bien con estas condiciones de derivatización se mejoró notablemente el rendimiento, aún existe en el medio de reacción una cantidad considerable de los productos vinculados con el Fc. Teniendo en cuenta la futura inmovilización del aptámero modificado sobre la superficie de un electrodo, es que resulta importante desarrollar protocolos de eliminación del exceso de **FcCOOH** y/o **FcNHS** en el medio de reacción, ya que ambos podrían adsorberse inespecíficamente sobre la superficie de oro generando señales electroquímicas que aumentarían notablemente el *background*.

En este sentido, se avanzó en una posible estrategia de purificación previa a la inyección en el HPLC-UV. Luego de la reacción de derivatización, se purificó la misma utilizando una resina Sephadex G-25 y agua, como solvente de elución. Dicha resina se utiliza para separar pequeñas moléculas durante la síntesis de biomoléculas de gran tamaño, como por ejemplo, para separar fenol durante la purificación del ADN.

Tiempo (min)	Área	Asignación
12.64	15007	<b>NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts</b>
15.06	570128	<b>FcCOOH</b>
22.51	1103697	¿ <b>Fc-NH-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts?</b>
33.04	41470	<b>FcNHS</b>

Tabla 3-8. Resultados de tiempos de retención y áreas de los picos cromatográficos obtenidos por HPLC-UV para la reacción de derivatización de **NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Apt-5Ts** con **FcNHS** en una mezcla de una solución 0,5 M de buffer NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9 : DMSO 1:1 V/V.

Si bien no se logró separar completamente el aptámero modificado del **FcCOOH**, se encontraron fracciones de la purificación dónde hay mayoritariamente uno u otro (*ver Figura 3-25*). Estos resultados se utilizaron como punto de partida para el desarrollo de un posible protocolo de derivatización de la secuencia del aptámero con Fc y posterior purificación. Actualmente se está avanzando en nuestro grupo de trabajo en dicho sentido.

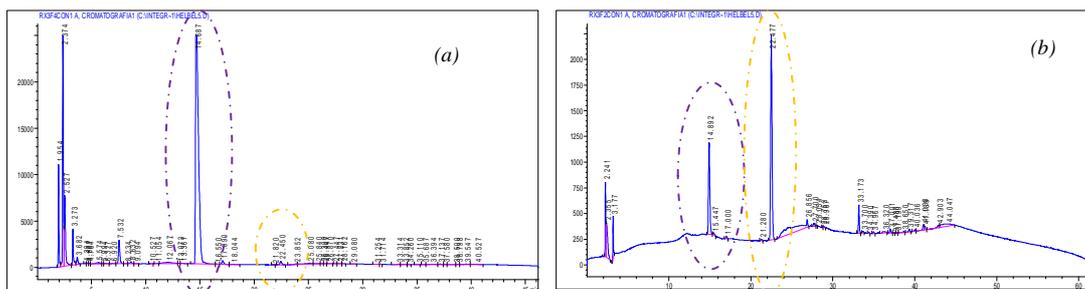


Figura 3-25. Cromatogramas obtenido por HPLC-UV luego de la purificación de la reacción de derivatización de  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Apt-5Ts}$  con **FcNHS** en buffer  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5M pH 9 : DMSO 1:1 V/V. (a) fracción 4 y (b) fracción 2.

### 3.3. Sistema modelo: 3-MPA

Con el objetivo de estudiar, comprender y optimizar tanto la reacción de derivatización en fase heterogénea como el funcionamiento del sensor, se trabajó con un sistema modelo simple, formado por un mercaptoalcano modificado en su extremo con un grupo carboxílico (3-MPA). El objetivo fue obtener superficies de oro modificadas con moléculas orgánicas funcionalizadas, introducirles un marcador electroactivo (Fc) y detectar dicha señal.

Para el armado de la superficie de oro funcionalizada, en una primera etapa se modificaron láminas de oro policristalino mediante la reacción de las mismas con 3-MPA (Figura 3-26a). Luego, se activó el grupo carboxílico con EDC (Figura 3-26b) y se lo hizo reaccionar con etilendiamina, obteniéndose la amida correspondiente (Figura 3-26c)<sup>170</sup>. Por último, se hizo reaccionar dicha amida con el **FcNHS** (**2**), usando las condiciones puestas a punto por HPLC en solución (Figura 3-26d).

Finalmente se realizó el tratamiento con MCH. En la inmovilización de oligonucleótidos sobre oro se utiliza el MCH para minimizar las interacciones inespecíficas N-Au. En este caso, se utilizó para remover posibles interacciones inespecíficas de los nitrógenos de la etilendiamina y/o del **FcNHS**, con la superficie de oro.

Se lograron señales reproducibles de Fc por VPD (Figura 3-27). La ruta explorada permitió obtener mediante reacciones químicas sencillas superficies de oro modificadas con un marcador electroactivo.

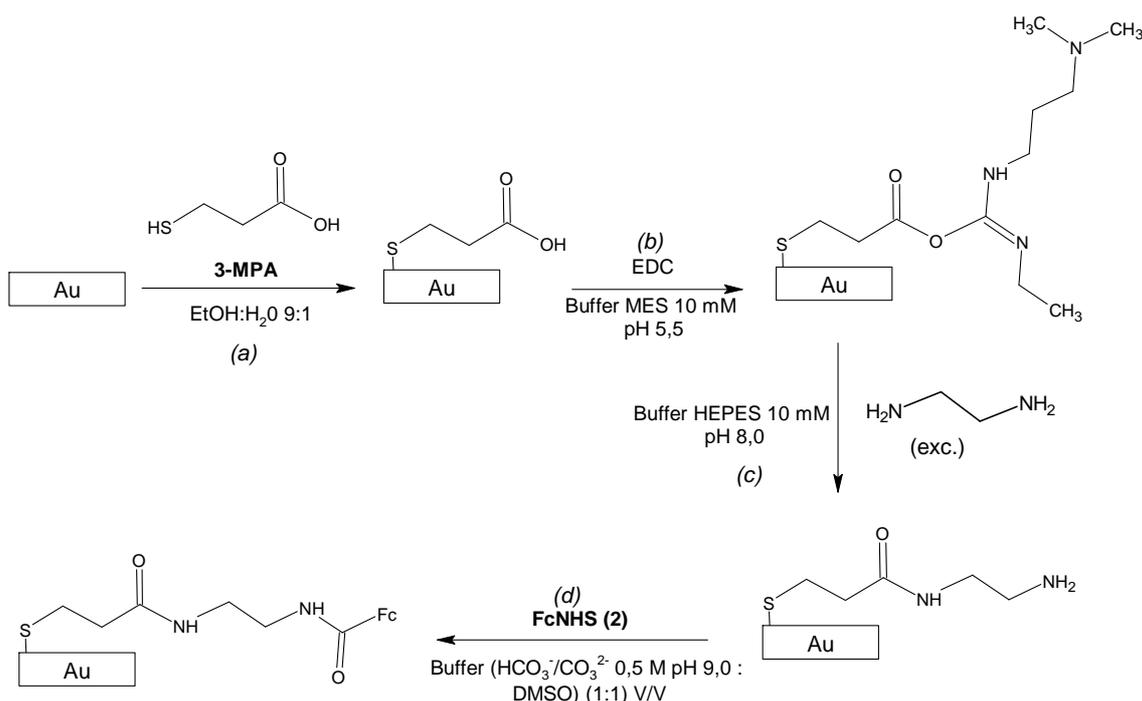


Figura 3-26. Esquema de modificación de la superficie de oro con 3-MPA.

Como se puede ver en la *Figura 3-27*, la señal de Fc permanece luego del tratamiento con MCH, disminuyendo considerablemente su intensidad. En principio, el MCH estaría efectivamente removiendo posibles interacciones inespecíficas, pero la permanencia de la señal confirmaría la introducción del Fc mediante la reacción en fase heterogénea.

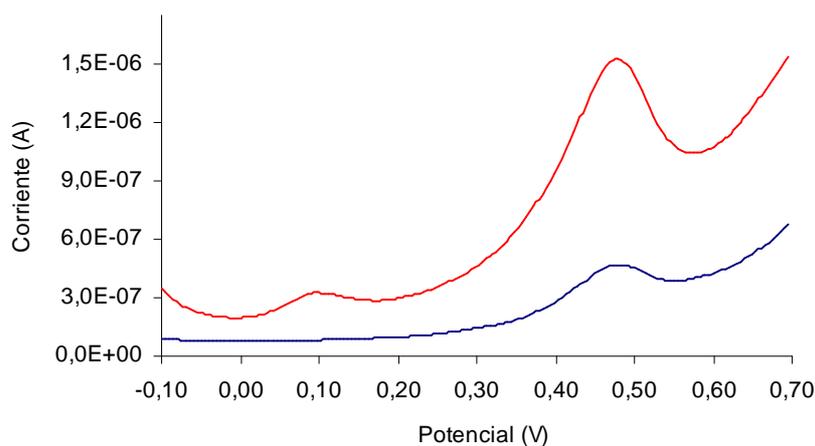


Figura 3-27. VPD en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,8, de las superficies de oro modificadas antes (rojo) y después (azul) del tratamiento con MCH.

Utilizando este sistema modelo se planea evaluar en el futuro el impacto de ciertas variables críticas tanto en la etapa de inmovilización como de introducción del marcador electroactivo en las secuencias aptaméricas.

### 3.4. Estrategia para el desarrollo de señal: estructuras doble cadena de ADN (ADN<sub>ds</sub>)

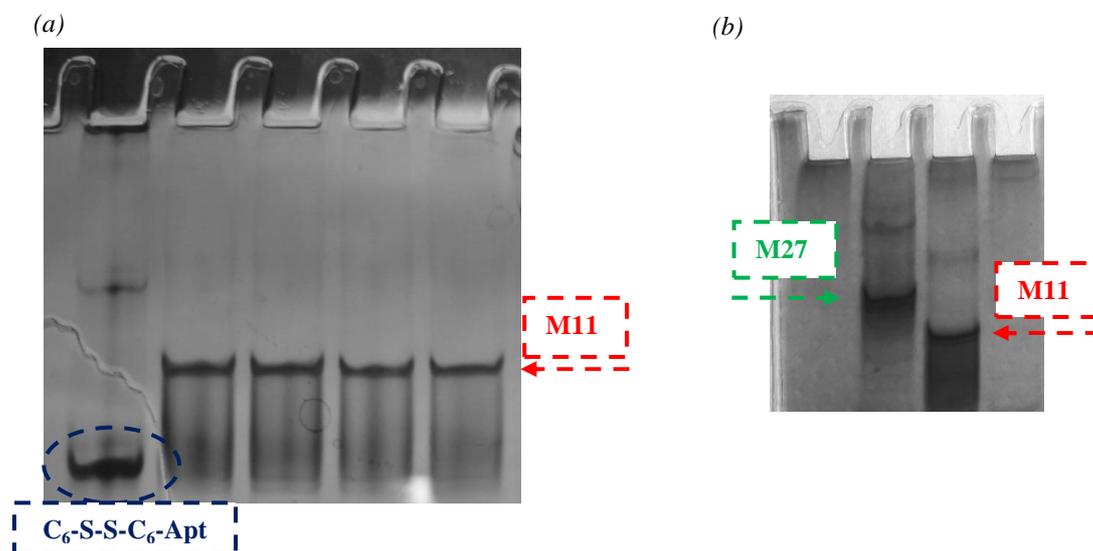
Los aptámeros, al mismo tiempo que son secuencias de ADN con capacidad para reconocer un *target*, conservan su habilidad para unirse a secuencias complementarias de ADN formando estructuras doble cadena (ADN<sub>ds</sub>). La competencia entre el *target* y la secuencia complementaria por parte del aptámero puede explorarse para generar una señal cuantificable y aprovechable para el desarrollo de un sensor (ver **1.4.2.1.1.**)<sup>120,121,171</sup>. Dentro de las variables que afectan dicha competencia se encuentran: la longitud de la secuencia complementaria, la fuerza iónica del medio, la presencia de cationes divalentes (Mg<sup>+2</sup>), el pH, la temperatura de incubación, la relación de concentración *target*-ADN<sub>ds</sub>, etc.

En este sentido, se avanzó en la construcción de dos secuencias de ADN<sub>ds</sub> (hibridización; **M11** y **M27**) utilizando el **C<sub>6</sub>-S-S-C<sub>6</sub>-Apt** y secuencias complementarias de 11 y 27 mer (ver *Figura 3-28*) en el buffer de hibridización. Se sabe que la constante de velocidad para el proceso de hibridización de ADN genómico inmovilizado es similar a aquella en fase homogénea<sup>172</sup>, por lo tanto, se optimizaron las condiciones para dicho proceso en solución, esperando que las mismas sean extrapolables al momento de armado del sensor. Se corroboró la efectiva hibridización por PAGE en condiciones no desnaturalizantes (*Figura 3-29*).



*Figura 3-28.* Secuencia modificada del aptámero **C<sub>6</sub>-S-S-C<sub>6</sub>-Apt** y de las secuencias complementarias **C27** y **C11**. En verde, puente disulfuro; azul, secuencia del **Apt-ATP**; marrón, secuencias complementarias.

Como se puede ver en la *Figura 3-29*, aparece una banda diferente a la correspondiente tanto al  $C_6-S-S-C_6-Apt$ , como a las secuencias complementarias **M11** y **M27**. Dicha banda aparece en una zona de mayor tamaño que el aptámero, lo cual indicaría la formación de la estructura de  $ADN_{ds}$  (**M11**, **M27**).



*Figura 3-29.* PAGE no desnaturizante. Calles de izquierda a derecha: (a)  $C_6-S-S-C_6-Apt$ , **M11** x 4. (b) **M27**, **M11**.

Luego, se ensayó la competencia de **M11** y **M27** frente a adenosina y AMP, ajustando las variables antes mencionadas. La incubación con el *target* (adenosina y/o AMP) libera la secuencia complementaria ya que el aptámero puede unirse fuerte y específicamente al mismo con una constante de afinidad mayor que la correspondiente a la del  $ADN_{ds}^{148}$ , dependiendo naturalmente del largo de la cadena complementaria.

Nuevamente, el seguimiento se hizo por PAGE en condiciones no desnaturizantes<sup>125</sup>. Inicialmente se probó el buffer de incubación, verificando que para el reconocimiento del *target* fue necesaria la presencia de  $MgCl_2$ , ya que en ausencia del mismo, no hubo deshibridización del  $ADN_{ds}$ . Esta condición se utilizó entonces para los experimentos de reconocimiento.

Se probó el reconocimiento a distintas temperaturas, incubando soluciones de **M11** y **M27** (2,75  $\mu M$ ) con soluciones de diferentes concentraciones de AMP por diferentes períodos de tiempo (ver *Tabla 3-9*).

Muestra	Secuencia ADN <sub>ds</sub> (2,75 μM)	T (°C)	[AMP] (mM)	Tiempo (horas)
1	M11	18	5	4
2	M11	37	5	4
3	M11	37	1	18
4	M11	37	5	18
5	M11	37	--	18
6	M27	37	5	4

Tabla 3-9. Condiciones ensayadas para el reconocimiento del *target* en los experimentos con ADN<sub>ds</sub>.

Como se observa en la *Figura 3-30*, fue posible detectar la separación de las estructuras de ADN<sub>ds</sub> de **M11** en presencia de AMP en todas las condiciones ensayadas, lo cual evidencia la captación del *target* por parte del aptámero. Si bien se observa deshibridización en todas las condiciones, la proporción de ADN<sub>ds</sub>:ADN<sub>ss</sub> varía en cada una de ellas. Las mejores condiciones para el reconocimiento resultaron ser la combinación de **M11** + AMP 5 mM a 37°C y por 4 horas, ya que se observa una mayor proporción de ADN<sub>ss</sub> frente al ADN<sub>ds</sub>. En estas condiciones **M27** no evidenció reconocimiento. Esto puede deberse a la mayor longitud de la zona complementaria<sup>108</sup>, la cual podría requerir condiciones más exigentes para el reconocimiento del *target*. También se probó calentar **M11** en ausencia de analito, a 37°C por 18 horas y no se observó deshibridización.

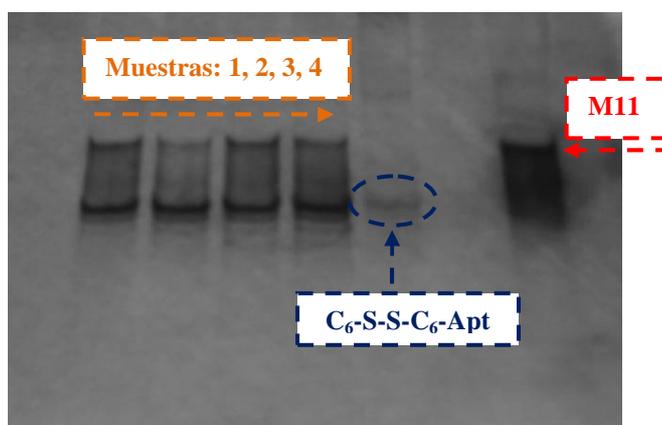


Figura 3-30. PAGE no desnaturalizante. Calles de izquierda a derecha: Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3, Muestra 4, C<sub>6</sub>-S-S-C<sub>6</sub>-Apt, sin siembra, M11 (ver *Tabla 3-9*).

Pensando en la aplicación de estas estructuras de ADN<sub>ds</sub> como capa de reconocimiento de un sensor, el trabajo a 37°C no resulta práctico. Entonces, con el objetivo de evaluar el reconocimiento a una temperatura menor se realizó una “cinética” de reconocimiento de AMP 5mM, a distintas temperaturas (20°C y 37°C) con **M11** (Tabla 3-10).

Tiempo (horas)	Muestras (37°C; 5mM AMP)	Muestras (20°C; 5mM AMP)	Muestras (20°C; 1mM 2-desoxiguanosina)
0,25	7	13	--
0,5	8	14	--
1	9	15	--
2	10	16	--
3	11	17	--
4	12	18	19

Tabla 3-10. Condiciones ensayadas para el reconocimiento del *target* en los experimentos con ADN<sub>ds</sub> a diferentes temperaturas.

Como se observa en la *Figura 3-31a*, a 37°C la condición óptima para el reconocimiento sigue siendo la incubación durante 4 horas, mientras que a 20°C (ver *Figura 3-31b*), cuando se realiza la incubación por 15 minutos, la deshibridización del ADN<sub>ds</sub> es cuantitativa. Como se muestra en el gel, se probó la incubación de **M11** a 20°C y por 4 horas en ausencia del *target* (calle 1, *Figura 3-31b*) sin observar deshibridización del ADN<sub>ds</sub>. Esto muestra que la deshibridización en presencia del *target* corresponde al efectivo reconocimiento del mismo y no a una deshibridización térmica. Por otro lado, también se probó la incubación de **M11** en las mismas condiciones (20°C y 4 horas) con una solución 1 mM de 2-desoxiguanosina (control de especificidad), sin evidenciar reconocimiento del aptámero.

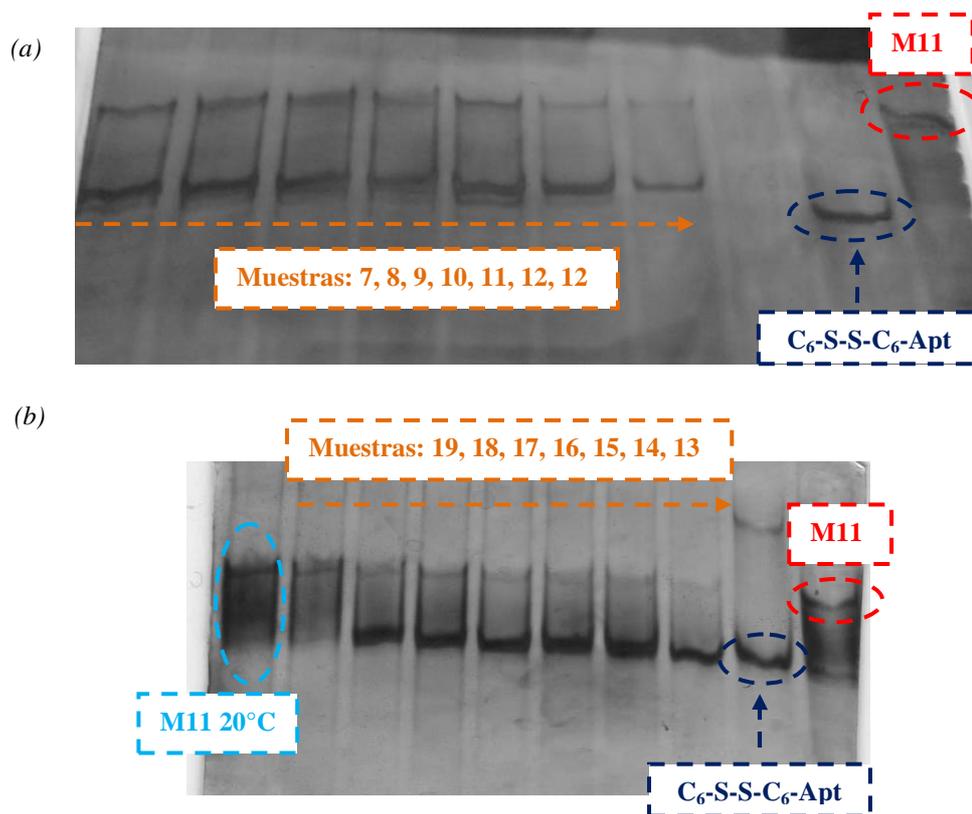


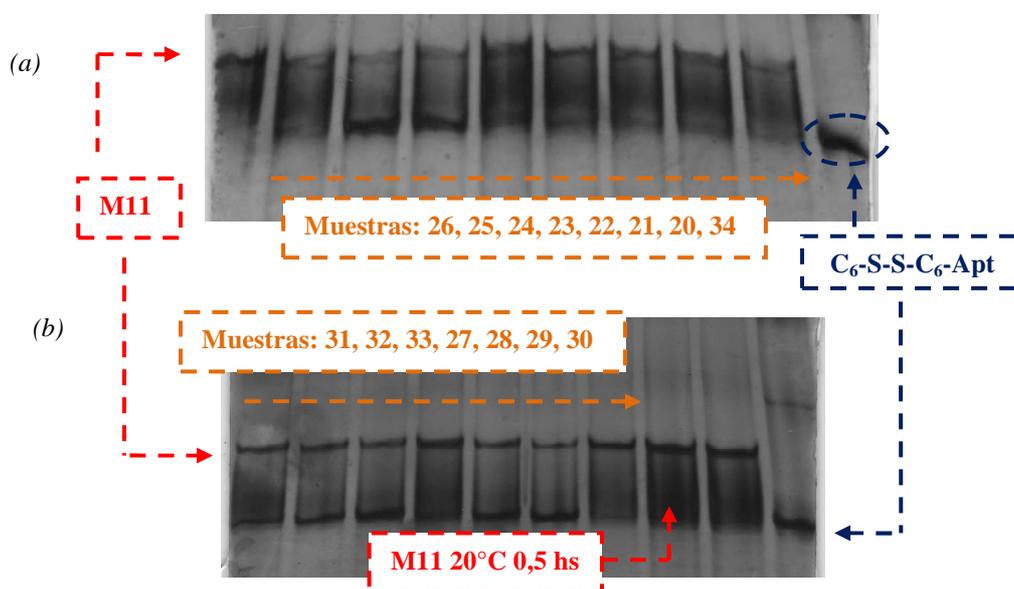
Figura 3-31. PAGE no desnaturizante. Calles de izquierda a derecha: (a) Muestra 7, Muestra 8, Muestra 9, Muestra 10, Muestra 11, (Muestra 12) x2, sin siembra,  $C_6-S-S-C_6-Apt$ , **M11**. (b) **M11** 4 horas 20°C, Muestra 19, Muestra 18, Muestra 17, Muestra 16, Muestra 15, Muestra 14, Muestra 13,  $C_6-S-S-C_6-Apt$ , **M11** (ver Tabla 3-10).

Por último, se realizó un barrido de concentraciones de AMP con **M11**, tanto a 37°C como a 20°C (Tabla 3-11). El objetivo fue evaluar el posible límite de detección del *target* en solución.

[Target] ( $\mu M$ )	Muestras (37°C; 4 horas)	Muestras (20°C; 30 min)	Muestras (20°C; 15 min)
AMP	0,005	34	--
	0,05	20	--
	0,5	21	--
	5	22	--
	50	23	27
	500	24	28
2-desoxiguanosina	5000	25	33
	1000	26	30

Tabla 3-11. Condiciones ensayadas en los experimentos con  $ADN_{ds}$  para diferentes concentraciones de *target*.

Como se observa en la *Figura 3-32* existe una notable diferencia en la respuesta entre 500  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  de AMP. Esto se observa, inclusive incubando a 20°C por 15 minutos. Dichos resultados se correlacionan con valores encontrados en otros trabajos<sup>173</sup>, donde observan una deshibridización del 88% para 500  $\mu\text{M}$ , mientras que cuando incuban con el *target* en una concentración 250  $\mu\text{M}$ , el porcentaje de deshibridización baja al 70%. Existe, claramente una competencia entre el  $\Delta\text{G}$  del proceso de hibridización y el  $\Delta\text{G}$  del proceso de formación del complejo aptámero-*target*. Dicha competencia es función de la concentración del *target*.



*Figura 3-32.* PAGE no desnaturalizante. Calles de izquierda a derecha: (a) M11, Muestra 26, Muestra 25, Muestra 24, Muestra 23, Muestra 22, Muestra 21, Muestra 20, Muestra 34, C<sub>6</sub>-S-S-C<sub>6</sub>-Apt. (b) Muestra 31, Muestra 32, Muestra 33, Muestra 27, Muestra 28, Muestra 29, Muestra 30, M11 20°C 30 minutos, M11, C<sub>6</sub>-S-S-C<sub>6</sub>-Apt (ver *Tabla 3-11*).

### 3.5. Conclusión

Se comparó la densidad superficial trabajando con dos tipos de anclaje a la superficie de oro, Ts y tiol, encontrando que ambos grupos tienen un desempeño similar, pudiendo desarrollarse un aptasensor electroquímico para adenosina utilizando el Ts. El empleo sucesivo de **Apt-Ts** y MCH permitió ajustar la arquitectura de la capa de reconocimiento.

Se logró derivatizar el aptámero con un marcador electroactivo como el Fc, tanto *in situ* como *ex situ*. Se trabajó en la optimización de dicha marcación y se está

avanzando en el grupo de trabajo en la posterior purificación por HPLC del aptámero modificado para su posterior inmovilización sobre la superficie de oro.

Se evidenció la quimisorción del 3-MPA en las condiciones ensayadas sobre láminas de Au policristalino y fue posible introducir el Fc mediante una reacción en fase heterogénea y detectar la señal electroquímica característica.

Por último, se hicieron aportes para la construcción de una capa de reconocimiento basada en estructuras de ADN<sub>ds</sub>, evaluando las mejores condiciones para el reconocimiento del analito en solución.

## *Capítulo 4*

# **Desarrollo de la metodología para la obtención de un aptámero contra deltametrina**

## 4.1. Objetivo

El objetivo de este capítulo es presentar los avances realizados en la obtención de un aptámero contra deltametrina. Los aptámeros son moléculas de ácidos nucleicos que se obtienen a través de un proceso de selección *in vitro* aprovechando la capacidad de amplificación molecular de los ácidos nucleicos (ver *Figura 4-1*). También es conocido como evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX)<sup>28b,c</sup>.

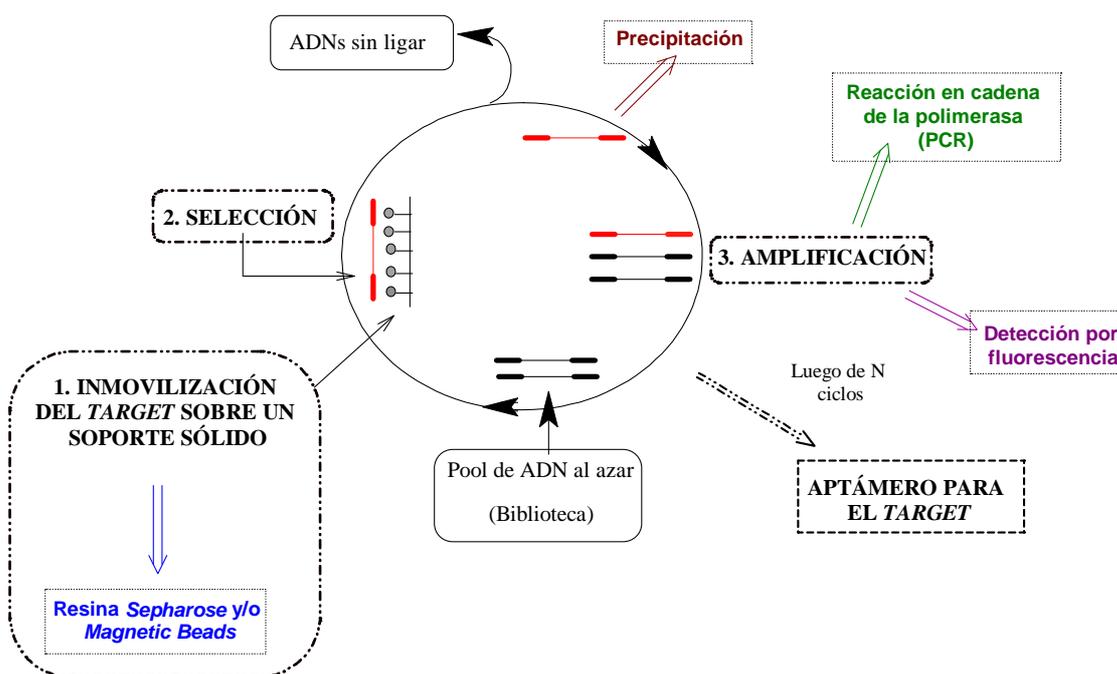


Figura 4-1. Esquema general del proceso de SELEX partiendo de una biblioteca de base ADN.

Como primer paso experimental, se avanzó en el aislamiento del *target* (deltametrina) de su formulación comercial, así como también en la inmovilización de dicha molécula sobre un soporte sólido, primera etapa imprescindible para la realización de los ciclos del proceso de SELEX (ver *Figura 4-1*).

La inmovilización se realizó sobre dos soportes sólidos (Resina *Sepharose* y *Magnetic Beads*) y se corroboró realizando una cuantificación indirecta y una cuantificación directa (*Figura 4-2*). En la primera se cuantificó la concentración del *target* durante la inmovilización, observando el descenso de la concentración del mismo en función del tiempo. En la segunda, se trabajó con el soporte ya modificado, hidrolizando el mismo, y determinando la concentración del *target* en la solución.

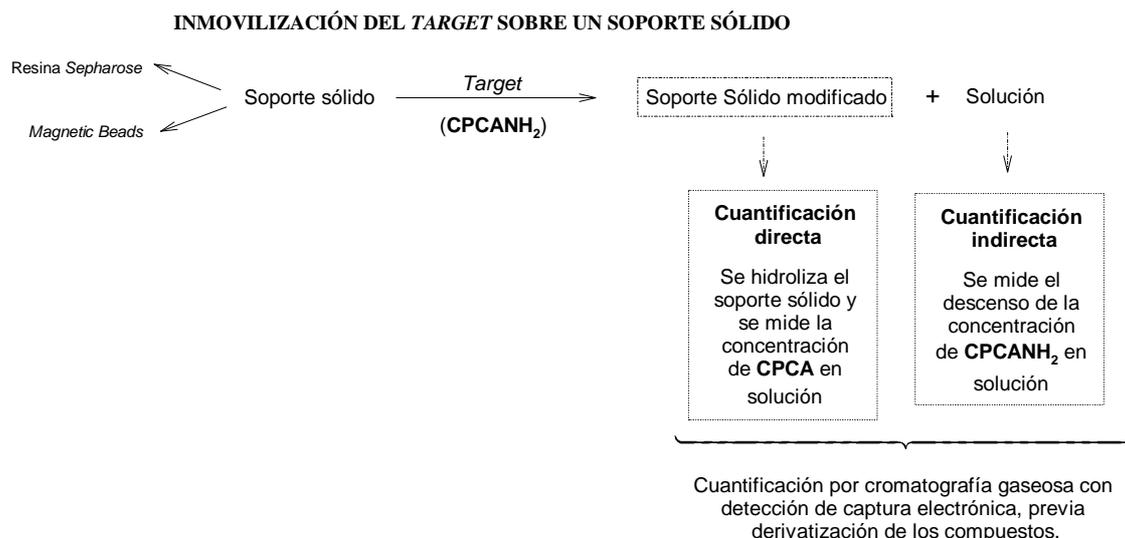


Figura 4-2. Esquema del proceso de inmovilización del *target* sobre un soporte sólido.

La segunda etapa del proceso de SELEX (selección, *Figura 4-1*) implica la incubación del *target* con una colección combinatoria de secuencias de ADN (**BiblioADN<sub>ss</sub>**), sintetizada químicamente, y que consiste en alrededor de entre  $10^{13}$  a  $10^{15}$  secuencias diferentes<sup>29a</sup>. Luego, el complejo del *target* con el ADN ligado se separa del ADN sin ligar. Este es uno de los aspectos más cruciales en el proceso de SELEX y afecta fuertemente a las características de los aptámeros seleccionados<sup>174</sup>. Las secuencias ligadas se eluyen y amplifican utilizando la PCR (*Figura 4-1*, tercera etapa). Por último, el ADN producto de la amplificación, el ADN<sub>ds</sub>, se debe transformar en un nuevo *pool*, separando las secuencias de ADN<sub>ss</sub> relevantes. Este *pool* nuevo y enriquecido se utiliza en el próximo ciclo de SELEX. A través de ciclos iterativos de selección y amplificación, el *pool* inicial se reduce a algunas secuencias con la mayor afinidad y especificidad por el *target*. El número de ciclos depende de diversos parámetros, como las características y concentración del *target*, el diseño de la **BiblioADN<sub>ss</sub>**, las condiciones de selección, la relación *target* a **BiblioADN<sub>ss</sub>** y/o la eficiencia del método de partición (separación del ADN ligado del no ligado)<sup>174</sup>.

El proceso de SELEX para la selección de un aptámero específico para un *target* se caracteriza por la repetición de las etapas antes mencionadas: selección (unión, partición, elución) y amplificación. Si bien es un proceso universal, no existe un protocolo estandarizado para la selección de un aptámero para cualquier *target*. El diseño del proceso de SELEX y las condiciones específicas de selección dependen, por



la selección de las secuencias de ADN con afinidad por el *target* en cuestión y, para ello es necesario que la estructura de dicha molécula (**CPCA**) esté disponible químicamente.

De esta forma, se obtuvo el **CPCA** modificado siguiendo la ruta sintética detallada en la *Figura 4-4*. En primer lugar, se obtuvo el **CPCA** (**5**, *Figura 4-4*) por saponificación directa del correspondiente producto formulado (**Decís Forte**) (**4**, *Figura 4-4*) y posterior purificación por columna de sílica gel. Alternativamente, se intentó extraer la **deltametrina** directamente del **Decís Forte** para su posterior hidrólisis pero dicho procedimiento tuvo rendimientos muy bajos, ya que en el proceso de extracción de la misma a partir del **Decís** se obtiene una emulsión difícil de resolver.

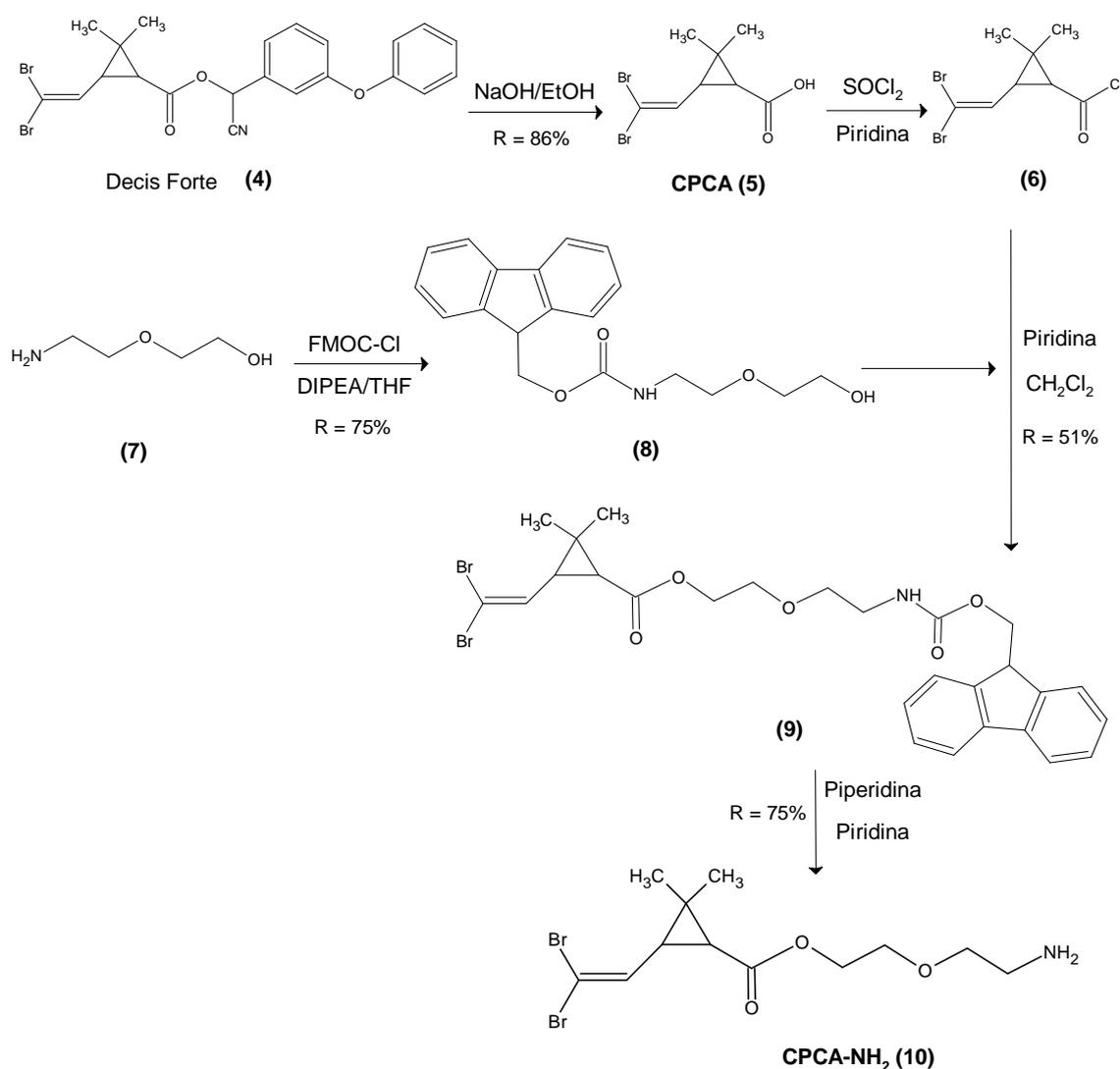


Figura 4-4. Obtención y modificación química del **CPCA**.

Una vez obtenido el **CPCA** se procedió a su activación, con el objetivo de

transformar el grupo carboxílico en un grupo más reactivo para el posterior acoplamiento del *linker*. Se probaron distintas reacciones de activación del **CPCA** (activación con NHS, con DCC y con cloruro de tionilo) resultando la más satisfactoria aquella que involucra la reacción del **CPCA** con cloruro de tionilo, para dar de esta forma el correspondiente cloruro de ácido, el **cloruro de 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanmetanoilo (6, Figura 4-4)**. Como dicho compuesto es muy reactivo, no se purificó y por lo tanto tampoco se pudo calcular el rendimiento de la reacción. El mismo se conservó a -4°C hasta el momento de ser usado.

Por otro lado, se trabajó sobre la estructura del **2-(2-aminoetoxi)etanol (7, Figura 4-4)**, esto es, el *linker* que se desea acoplar al **CPCA**. Se protegió el grupo amino del mismo con Fmoc-Cl, dejando de esta manera libre el grupo hidroxilo, obteniéndose el **9H-fluoren-9-ilmetil[2-(2-hidroximetoxi)etil]carbamato (8, Figura 4-4)**. El grupo protector Fmoc es estable en medio ácido y se libera en medio básico suave, siendo un grupo protector utilizado en la síntesis peptídica en fase sólida. Posteriormente, el *linker* con el grupo amino protegido (**8, Figura 4-4**) se hizo reaccionar con el **cloruro de 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanmetanoilo (6, Figura 4-4)** obteniéndose, a través de una alcoholisis, el éster correspondiente (**CPCA** con el *linker* acoplado), esto es, el **3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-(2-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo]amino}etoxi)etilo (9, Figura 4-4)**.

Finalmente, el grupo Fmoc se removió con piperidina en piridina de forma tal de obtener el derivado de la deltametrina modificado, el **3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-(2-aminoetoxi)etilo (10, CPCA-NH<sub>2</sub>, Figura 4-4)**. Dicho producto fue purificado y caracterizado por RMN (ver *Figura 4-5* y *Figura 4-6*). Resulta crucial en la etapa de selección del proceso de SELEX (ver *Figura 4-1*), la pureza del *target*, de forma tal de minimizar el enriquecimiento de oligonucleótidos inespecíficos y por lo tanto, aumentar la especificidad de la selección.

Se evaluó la estabilidad del **CPCA-NH<sub>2</sub>** en una solución 10 mM de buffer Tris-HCl pH 7,6 por c.c.d., resultando estable por 24 horas. Dicho buffer es el que se utiliza en los ciclos de selección (segunda etapa del proceso de SELEX, ver *Figura 4-1*), por lo tanto resulta importante corroborar que el *target* fuera estable en el mismo.

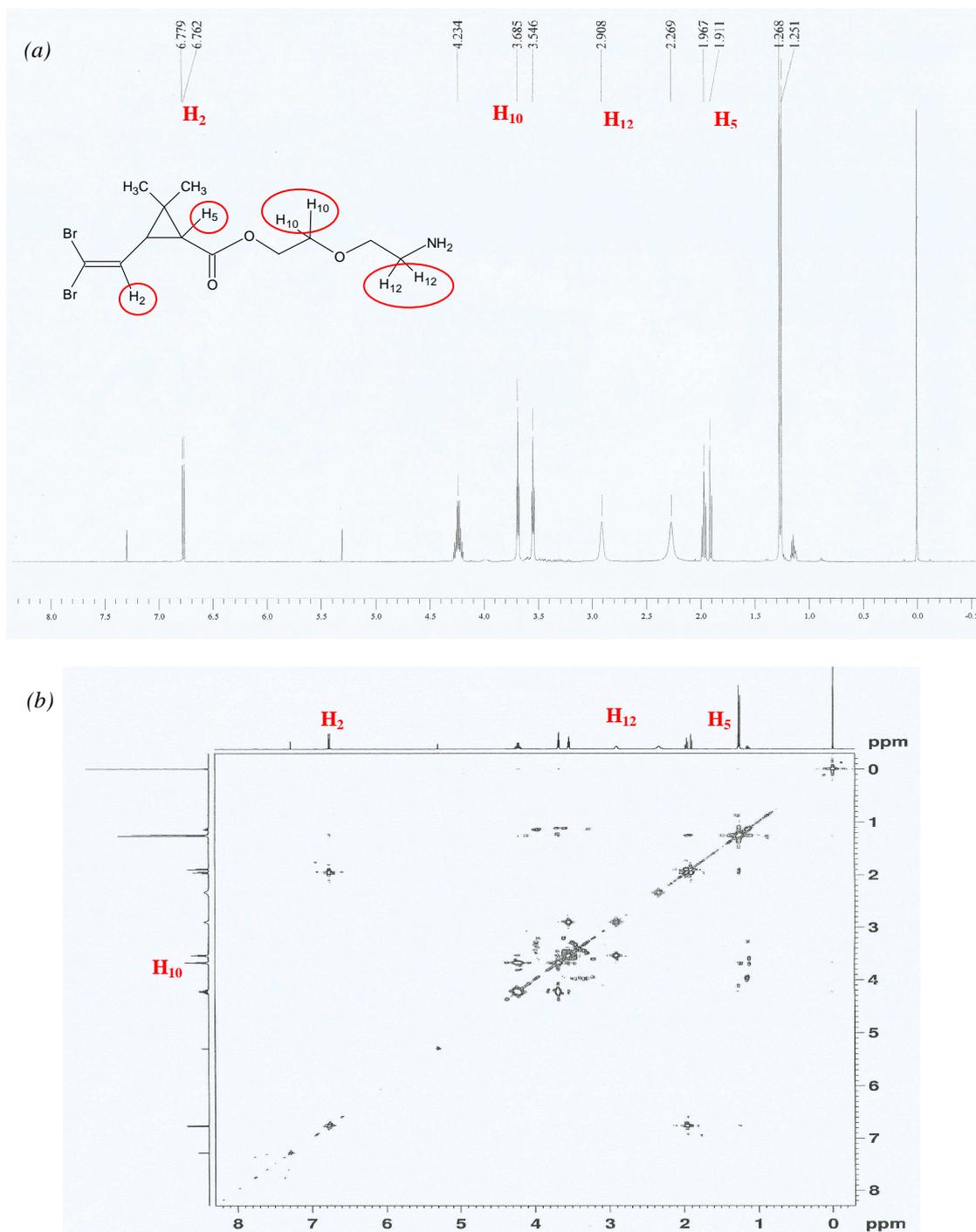


Figura 4-5. CPCA-NH<sub>2</sub> (10, Figura 4-4). (a) RMN <sup>1</sup>H. (b) RMN de correlación homonuclear (COSY).

#### 4.2.2. Inmovilización del *target* sobre un soporte sólido (Primera etapa del proceso de SELEX)

Se trabajó con dos soportes sólidos diferentes, por un lado una resina de agarosa (*Sepharose ECH 4B*), y por otro, con una resina magnética (*BcMag<sup>TM</sup> Carboxy-*

*terminated Magnetic Beads*). Una de las etapas más críticas del proceso de SELEX es la separación del ADN sin ligar de las secuencias con afinidad por el *target* (partición), luego de la etapa de selección (ver *Figura 4-1*). Cualquier método que permita separar las secuencias de ADN del complejo ADN-*target*, puede ser usado en la etapa de selección<sup>37</sup>. La inmovilización del *target* en una matriz particular permite una efectiva separación.

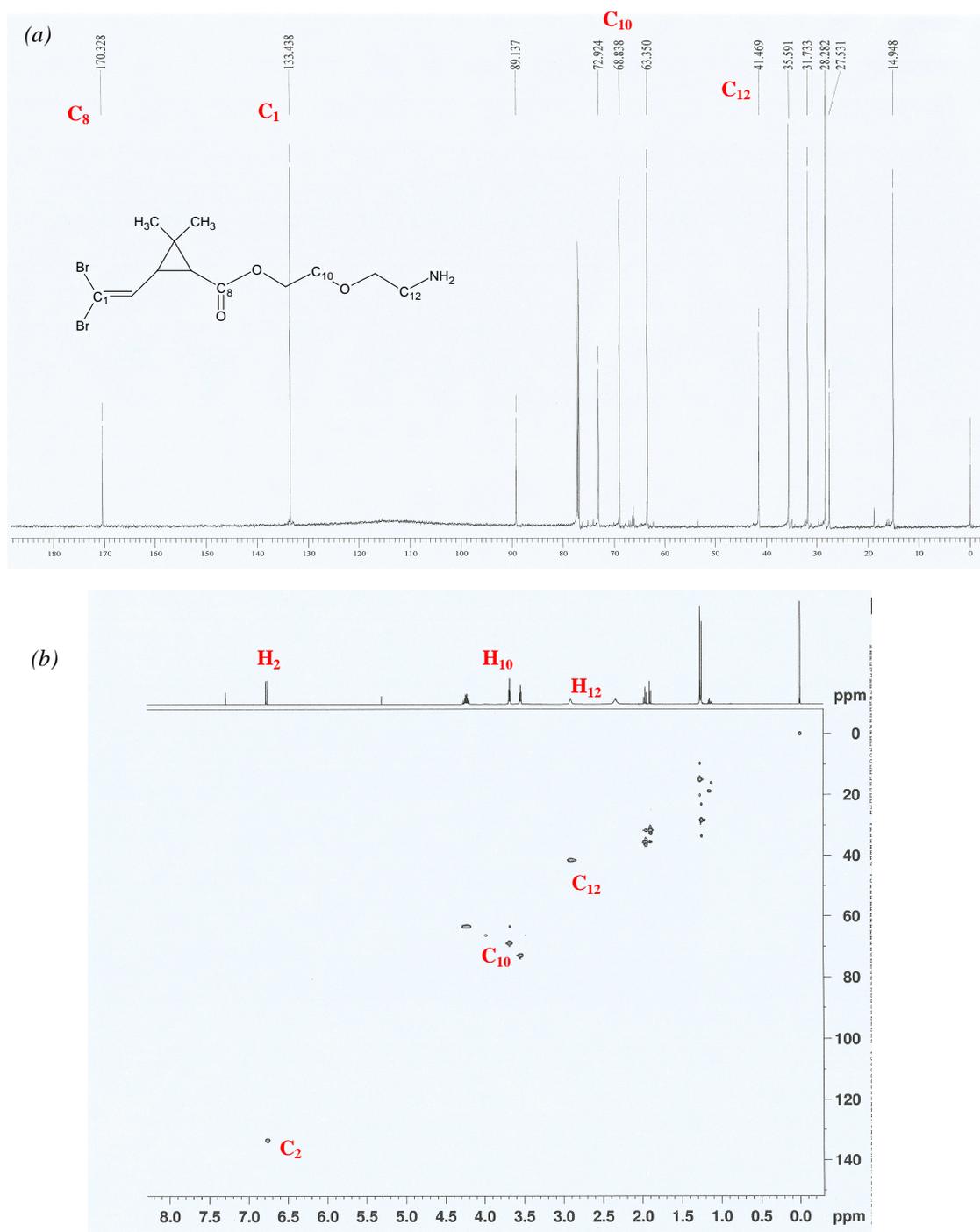
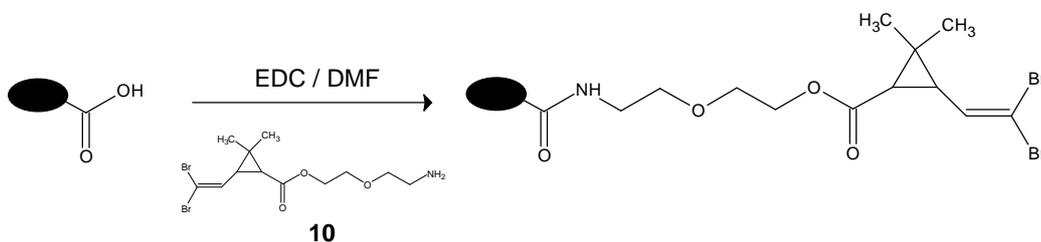


Figura 4-6. CPCA-NH<sub>2</sub> (10, Figura 4-4). (a) RMN <sup>13</sup>C. (b) RMN de correlación heteronuclear (HSQC).

Un método de separación convencional es la cromatografía de afinidad donde el *target* está generalmente inmovilizado en materiales de columna, por ejemplo, agarosa<sup>145,175</sup>, permitiendo la separación de las secuencias no deseadas (ADN sin ligar) con múltiples lavados<sup>176</sup>. Sin embargo, un método más reciente, llamado *FluMag SELEX*<sup>177</sup>, utiliza *beads* magnéticos como matriz sólida<sup>178</sup>. Estos *beads* se pueden funcionalizar superficialmente para permitir el anclaje covalente (inmovilización) del *target*. Como principal ventaja, requieren una menor cantidad de *target* para una conjugación eficiente en comparación con los materiales convencionales. Además, como la separación magnética es rápida, simple y efectiva, el uso de *beads* magnéticos modificados superficialmente es una alternativa superior a la inmovilización convencional en agarosa<sup>176,179</sup>.

En ambos casos los soportes están modificados con grupos carboxílicos. El acoplamiento del **CPCA-NH<sub>2</sub>** (ligando con grupo amino en su estructura química) se realizó mediante la activación del grupo carboxílico del soporte sólido con EDC (*Figura 4-7*)<sup>176</sup>. La efectiva inmovilización del **CPCA-NH<sub>2</sub>** sobre los soportes sólidos se siguió por cromatografía gaseosa utilizando un equipo con un detector de captura electrónica (CG-ECD), por dos vías diferentes.



*Figura 4-7.* Ruta de anclaje del **CPCA-NH<sub>2</sub>** (**10**) al soporte sólido.

Por un lado, se realizó una cuantificación indirecta del **CPCA-NH<sub>2</sub>**, midiendo la disminución de la concentración del mismo en solución en función del tiempo de inmovilización (ver *Figura 4-2*). Por otro lado, una vez finalizada la inmovilización, se hidrolizaron porciones de ambos soportes sólidos (*Figura 4-8*) y se realizó una cuantificación directa, midiendo la concentración de **CPCA** en solución generada luego de la hidrólisis (ver *Figura 4-2*).

La correcta modificación del soporte sólido es un paso crítico para la realización de la segunda etapa del proceso de SELEX (selección, ver *Figura 4-1*), ya que se expondrá el *pool* de secuencias de ADN al azar a dicho soporte modificado. Es por este

motivo que resulta crucial corroborar la efectiva inmovilización del *target* sobre el mismo. Se realizó, entonces, una doble corroboración de dicha modificación. No se han encontrado en la literatura resultados sobre la efectiva caracterización del proceso de inmovilización de un *target* sobre un soporte sólido<sup>180</sup>. En general, se encuentran resultados cualitativos medidos por espectroscopía infrarroja (IR)<sup>145</sup>, UV-visible o ELISA<sup>181</sup> y/o cuantitativos usando un enfoque indirecto, por ejemplo, midiendo la concentración del *target* antes y después del acoplamiento, usando métodos como HPLC<sup>182</sup> o espectroscopía UV-visible<sup>180,183</sup>.

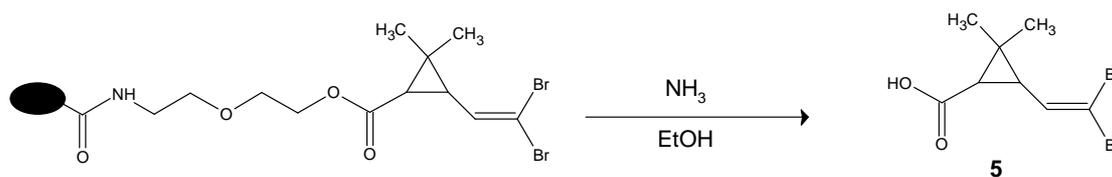


Figura 4-8. Hidrólisis del soporte sólido modificado.

#### 4.2.2.1. Optimización de las condiciones para la cuantificación por CG-ECD de la inmovilización

##### 4.2.2.1.1. Cuantificación indirecta

Inicialmente se trabajó en la puesta a punto de las condiciones para poder cuantificar el **CPCA-NH<sub>2</sub>** por CG-ECD. Como se puede observar en la *Figura 4-9* el **CPCA-NH<sub>2</sub>** presenta una señal a  $t_r = 3,27$  minutos, la cual se diferencia de los picos cromatográficos correspondientes a la deltametrina ( $t_r = 5,10$  minutos,  $t_r = 5,46$  minutos). Por otro lado, el mismo resulta difícilmente cuantificable dada la interacción del grupo amino con la fase fija, generando una disminución en la resolución analítica de la señal (“cola”).

Se procedió, por lo tanto, a derivatizar el **CPCA-NH<sub>2</sub>** con anhídrido trifluoroacético (*Figura 4-10*) de forma tal de transformar el grupo amino terminal en una amida y por lo tanto, eliminar la “cola” del pico y además aumentar la sensibilidad al incorporar los sustituyentes fluorados<sup>184</sup>. El producto obtenido, el **3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-{[(trifluoroacetil)amino]etoxi}etilo (11, CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>)** se purificó por columna de sílica gel y se caracterizó por RMN.

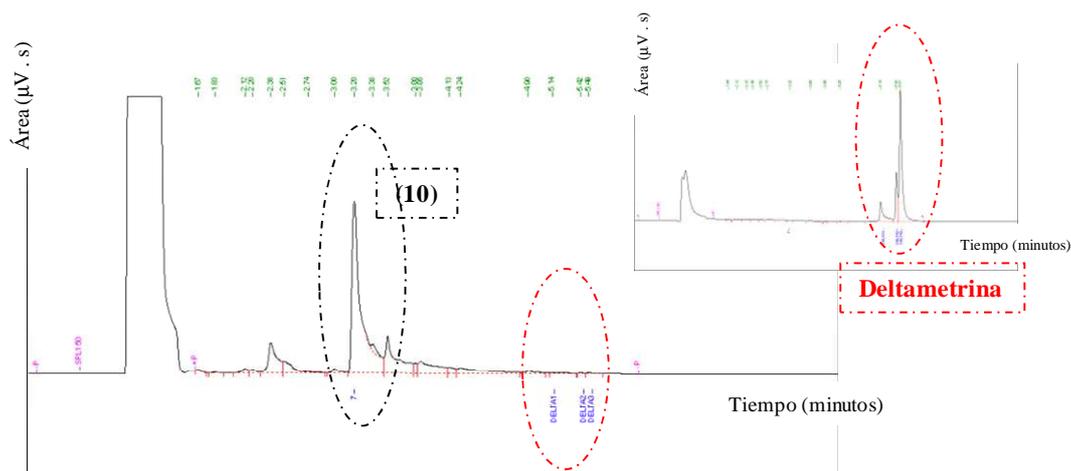


Figura 4-9. Cromatograma obtenido por CG-ECD de una solución 5,00 ppm de **CPCA-NH<sub>2</sub>** (**10**) en tolueno. Inserto: Cromatograma obtenido por CG-ECD de una solución 1,55 ppm de **Deltametrina** en tolueno.

Se preparó una solución patrón 0,980 ppm de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** en tolueno y se analizó por CG-ECD. Como muestra la *Figura 4-11* se observa una mejora notable en el aspecto del pico cromatográfico y en la sensibilidad del método, obteniéndose una señal cuantificable a un  $t_r = 3.60$  minutos.

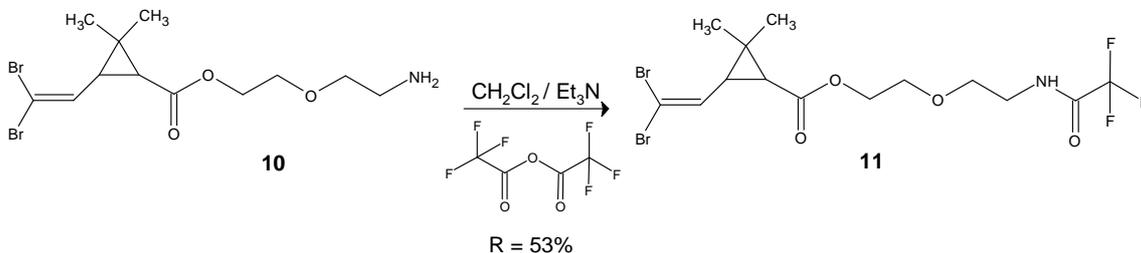


Figura 4-10. Reacción de obtención del **3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2-[(2-(trifluoroacetil)amino)etoxi]etilo** (**11**).

Se utilizó, entonces, dicha derivatización para la cuantificación indirecta del **CPCA-NH<sub>2</sub>** durante la inmovilización sobre el soporte sólido. Para ello se optimizaron las condiciones de derivatización del **CPCA-NH<sub>2</sub>** en la mezcla de reacción para cuantificar en el CG-ECD las alícuotas que se fueran tomando durante la inmovilización sobre el soporte sólido. Lo que se buscó fue corroborar que los reactivos en exceso y posibles productos secundarios no afectarían la cuantificación del producto en cuestión.

Basados en las condiciones para la inmovilización del *target* sobre el soporte sólido (primera etapa del proceso SELEX, *Figura 4-1*), se optimizaron las condiciones de tratamiento de la muestra, como así también las condiciones del método

cromatográfico (relación de *split*, atenuación, etc.), de forma tal de obtener una señal cuantificable.

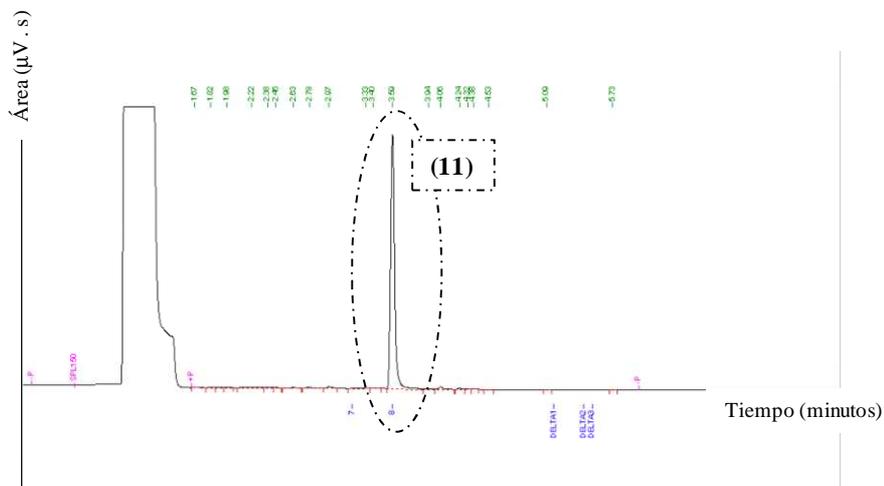


Figura 4-11. Cromatograma obtenido por CG-ECD de una solución 0,980 ppm de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** (11) en tolueno.

#### 4.2.2.1.2. Cuantificación directa

Primero se pusieron a punto las condiciones de derivatización del **CPCA**, como así también las condiciones de corrida del producto derivatizado en el CG-ECD, de forma tal de transformar el grupo carboxílico en un grupo éster fluorado, aumentando así la sensibilidad del método<sup>130</sup>.

Se procedió entonces a activar el **CPCA** con DIC y luego se derivatizó con HFP (Figura 4-12). El producto obtenido, el **3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2,2,2-trifluoro-1-(trifluorometil)etilo (12, CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)** se purificó por columna de sílica gel y se caracterizó por RMN.

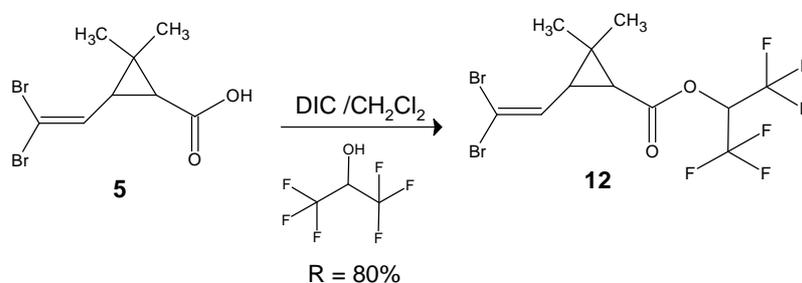
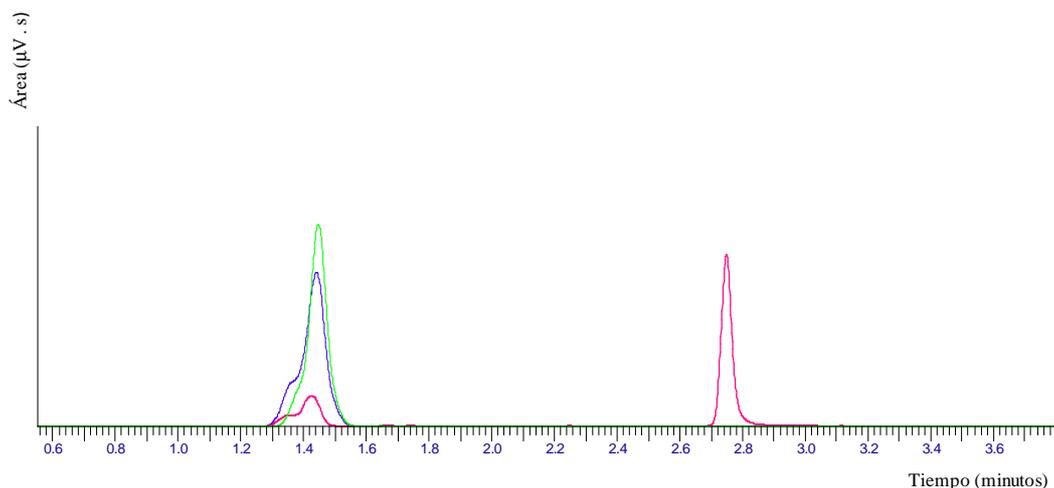


Figura 4-12. Reacción de obtención del **3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2,2,2-trifluoro-1-(trifluorometil)etilo (12)**.

Se preparó una solución 0,770 ppm de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** en tolueno y se analizó por CG-ECD. Como muestra la *Figura 4-13* se observa una señal cromatográfica cuantificable a un  $t_r = 2.74$  minutos que no se superpone con los picos correspondientes a los reactivos (DIC y HFP). Si bien en el proceso de derivatización quedan reactivos en exceso, no afectan la cuantificación de la señal correspondiente al producto.



*Figura 4-13.* Cromatogramas obtenido por CG-ECD de una solución 0,770 ppm de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** (**12**) en tolueno (rosa), 0,680 ppm de HFP en tolueno (azul) y 0,840 ppm de DIC en tolueno (verde).

#### 4.2.2.2. Inmovilización del CPCA-NH<sub>2</sub> sobre soportes sólidos

Una vez puestas a punto las condiciones para el seguimiento de la inmovilización, se activó el grupo carboxílico de ambos soportes con EDC en DMF para luego incubarlo junto con el **CPCA-NH<sub>2</sub>** (ver *Figura 4-7*). En ambos casos, la reacción de acoplamiento se siguió por CG-ECD, derivatizando las alícuotas del sobrenadante con anhídrido trifluoroacético (ver *Figura 4-10*).

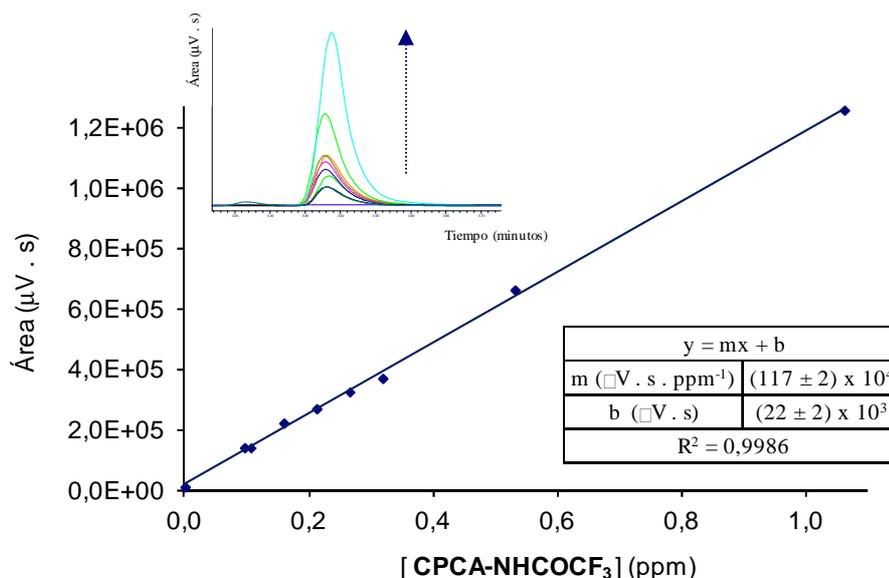
Cuando el acoplamiento concluyó, se hidrolizó una porción de ambos soportes sólidos con NH<sub>3</sub>(c) en etanol (ver *Figura 4-8*). El **CPCA** obtenido se activó con DIC y se esterificó con HFP para obtener el éster correspondiente (ver *Figura 4-12*). De esta manera se confirmó la efectiva inmovilización y la carga del soporte sólido por dos vías diferentes.

##### 4.2.2.2.1. Soporte sólido: *ECH Sepharose 4B*

La *ECH Sepharose 4B* consiste en una matriz de agarosa modificada con el ácido

6-aminohexanoico, por lo tanto, contiene grupos carboxílicos libres (12-16  $\mu$ moles de grupos carboxílicos/mL de gel seco).

Se preparó una solución madre 520 ppm del **CPCA-NH<sub>2</sub>** en tolueno. La misma se derivatizó con anhídrido trifluoroacético y considerando una conversión cuantitativa, se obtuvo una solución 3,18 ppm de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>**. Se construyó una curva de calibrado (0 ppm – 1,30 ppm), cuantificando por CG-ECD (*Figura 4-14*).



*Figura 4-14.* Curva de calibrado del **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>**. *Inserto:* Cromatogramas obtenidos por CG-ECD del **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** (11).

Para el acoplamiento del *target*, se trabajó con la resina en DMF por duplicado; por un lado se activó la misma con EDC (C/EDC) y por otro lado, se trabajó con la resina sin activar (S/EDC), como experimento control. El objetivo del experimento control es evaluar la posible interacción inespecífica entre el soporte sólido y el *target*. Dicha interacción resultaría desfavorable ya que estaría comprometiendo la estructura del *target*, evitando su disponibilidad para la interacción con las secuencias de ADN en la etapa de selección.

Se agregó, en ambos casos, el **CPCA-NH<sub>2</sub>** disuelto en DMF. Se agitó a 25°C durante 48 horas, tomando alícuotas de 5  $\mu$ L. Las mismas se derivatizaron siguiendo el protocolo antes mencionado (ver *Figura 4-10*) y se analizaron por CG-ECD.

A partir de la curva de calibrado se calculó la concentración de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** en las alícuotas en función del tiempo. Como muestra la *Figura 4-15*, se observa una disminución de la concentración de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>**, luego de 48 horas

de inmovilización.

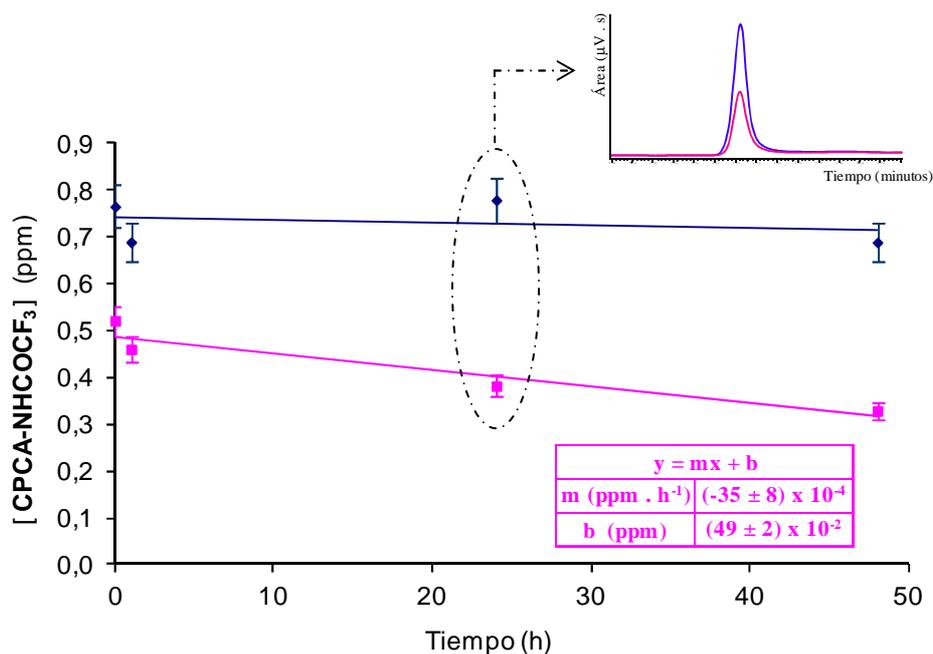


Figura 4-15. Valores de concentración de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** en función del tiempo para las diferentes alícuotas durante la inmovilización del **CPCA-NH<sub>2</sub>** sobre la *ECH Sepharose 4B C/EDC* (rosa) y *S/EDC* (azul). *Inserto*: Cromatogramas por CG-ECD de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** para las alícuotas tomadas a las 24 horas de inmovilización.

Se realizó, entonces, un balance de masa (*Figura 4-16*) de forma tal de corroborar la coherencia de los resultados obtenidos, esto es, verificar que la disminución de la concentración de **CPCA-NH<sub>2</sub>** en función del tiempo se debe a un efectivo acoplamiento de dicha molécula a la resina. Además, considerando los resultados de la inmovilización sin activación (control, *S/EDC*), se puede evaluar la especificidad del mismo.

Como se puede ver en la *Figura 4-16*, existe una interacción inespecífica entre el **CPCA-NH<sub>2</sub>** y la resina, ya que el número de moles inmovilizados en el experimento con activación (*C/EDC*;  $3,36 \times 10^{-5}$  moles) supera al número de moles de grupos carboxílicos disponibles para dicho anclaje ( $1,39 \times 10^{-5}$  moles). Es más, el número de moles inmovilizados en el experimento sin activación (*S/EDC*) es comparable al número de moles en el experimento con activación.

Se procedió a continuación, a verificar por cuantificación directa, la inmovilización sobre dicha resina. Para ello, se tomó una porción de cada una de las resinas (*S/EDC* y *C/EDC*) y se hidrolizaron con  $\text{NH}_3(\text{c})$ , de forma tal de obtener el **CPCA** en solución (ver *Figura 4-8*). Luego, se derivatizaron las muestras con **DIC** y **HFP** (ver *Figura 4-12*) para obtener el **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** y cuantificarlo por CG-ECD

(Figura 4-17).

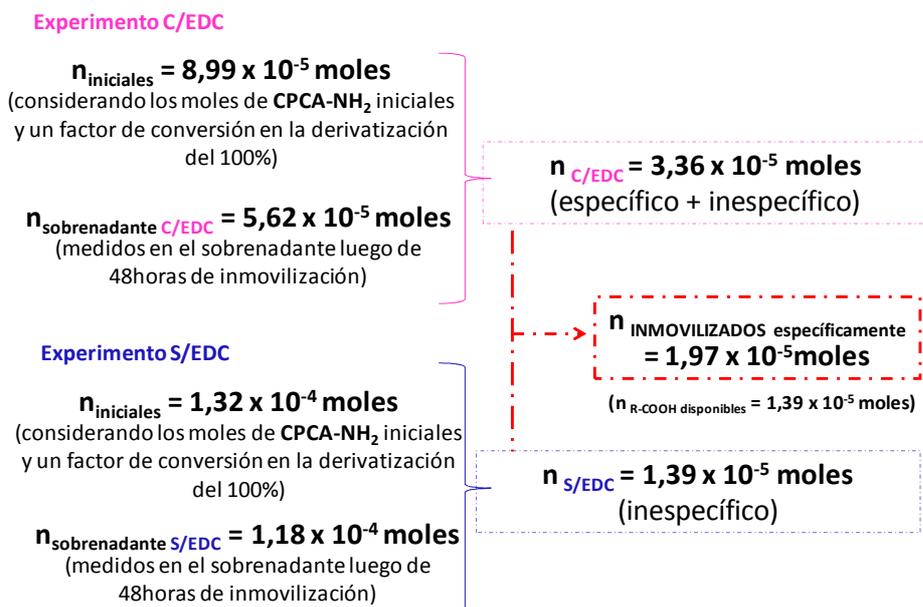


Figura 4-16. Esquema del balance de masa para la inmovilización del **CPCA-NH<sub>2</sub>** sobre la *ECH* *Sepharose 4B* ( $n = 5$ ), luego de 48 horas.

Como una primera aproximación y como muestra la *Tabla 4-1*, se observó una relación de área de la señal cromatográfica de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** S/EDC : C/EDC de 1 : 2,2. Si bien se observa una mayor derivatización del soporte activado frente al que no fue activado, estos resultados no se correlacionan con los obtenidos en la cuantificación indirecta, donde la relación de modificación S/EDC : C/EDC fue de 1 : 1,4.

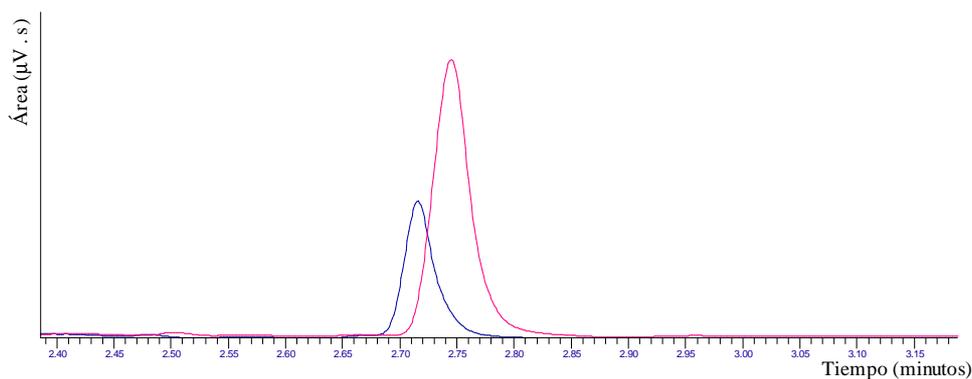


Figura 4-17. Cromatogramas por CG-ECD correspondientes al pico de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** en las muestras S/EDC (azul) y C/EDC (rosa) de *ECH Sepharose 4B*.

En función de estos resultados, se trabajó en la puesta a punto de las condiciones de lavado de la resina luego de la derivatización, encontrando mejores resultados luego

de realizar cuatro lavados sucesivos previos a la hidrólisis de la resina (dos lavados con NaOH 5% m/V; seguidos de un lavado con agua MilliQ y finalmente, un lavado con EtOH 96%). El objetivo es eliminar por lavados la interacción inespecífica entre el *target* y la resina.

	$t_r$ (min)	Área promedio ( $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ ) ( $n = 4$ )
S/EDC	2.72	$(29 \pm 2) \times 10^4$
C/EDC	2.75	$(63 \pm 2) \times 10^4$

Tabla 4-1. Resultados de la integración del pico correspondiente al **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** en las muestras S/EDC y C/EDC de *ECH Sepharose 4B*.

Se preparó una solución madre  $1,01 \times 10^4$  ppm de **CPCA** en tolueno. La misma se derivatizó con HFP y DIC y considerando una conversión cuantitativa, se obtuvo una solución 1,48 ppm de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**. Se prepararon diluciones sucesivas de la misma y se construyó una curva de calibrado para correlacionar el área medida en el CG-ECD con la concentración de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** (Figura 4-18).

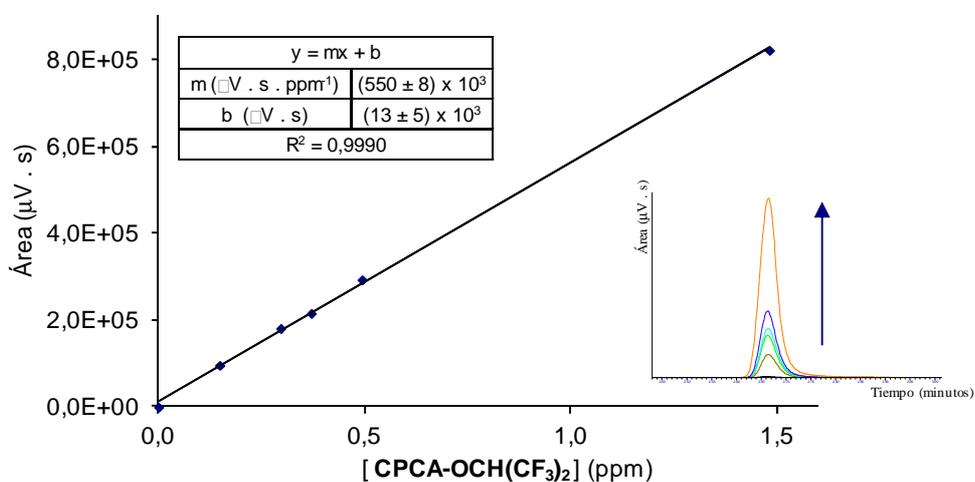


Figura 4-18. Curva de calibrado del **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**. Inserto: Cromatogramas obtenidos por CG-ECD de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** (9).

Nuevamente, se tomó una porción de cada una de las resinas (S/EDC y C/EDC), se hidrolizaron y se derivatizaron como se mencionó anteriormente. Se observó una relación de concentración de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** S/EDC : C/EDC 1 : 2,6 (Tabla 4-2), la cual se correlaciona con los resultados obtenidos anteriormente pero continúa siendo

mayor que en el caso de la cuantificación indirecta.

	$t_r$ (min)	$[\text{CPCA-OCH}(\text{CF}_3)_2]_{\text{promedio}}$ (ppm) (n = 4)
S/EDC	2,62	$0,097 \pm 0,008$
C/EDC	2,62	$0,25 \pm 0,03$

Tabla 4-2. Valores de concentración de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** en ppm, calculados a partir de la integración del pico correspondiente al **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** en las muestras S/EDC y C/EDC de *ECH Sepharose 4B* en el CG-ECD.

Considerando la carga de la resina y el número de moles utilizados, se calculó el número de moles de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** que se hubiese esperado obtener si la resina hubiese sido modificada cuantitativamente. Se observa que el porcentaje de resina derivatizada es menor al 1%, lo cual no se correlaciona con los resultados obtenidos en la cuantificación indirecta.

Con dichos resultados, no se puede concluir una efectiva inmovilización de la resina *ECH Sepharose 4B*. Esto se puede deber a la dificultad que se presenta al manipular porciones pequeñas de dicha resina, lo cual lleva a una ineficiente separación de los sobrenadantes, y consecuentemente, a resultados poco concluyentes sobre la modificación del soporte sólido. Como consecuencia de estos resultados se decidió explorar la utilización de otros soportes sólidos.

#### 4.2.2.2.2. Soporte sólido: *BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads*

Los *BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads* son partículas magnéticas de óxido de hierro recubiertas de sílice de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro con una alta densidad de grupos carboxílicos superficiales (aproximadamente 200  $\mu\text{moles}$  de  $\text{COOH/g}$  de *beads*). Debido a las propiedades magnéticas de las mismas, su manipulación resulta mucho más fácil y por lo tanto, más eficiente que en el caso de la resina *ECH Sepharose 4B*.

Se trabajó de forma similar al caso del anterior soporte sólido. Brevemente, se preparó una solución madre 520 ppm del **CPCA-NH<sub>2</sub>** en tolueno. La misma se derivatizó con anhídrido trifluoroacético y considerando una conversión cuantitativa, se obtuvo una solución 3,24 ppm de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>**. Se construyó una curva de

calibrado (0 ppm – 1,10 ppm), cuantificando por CG-ECD (Figura 4-19).

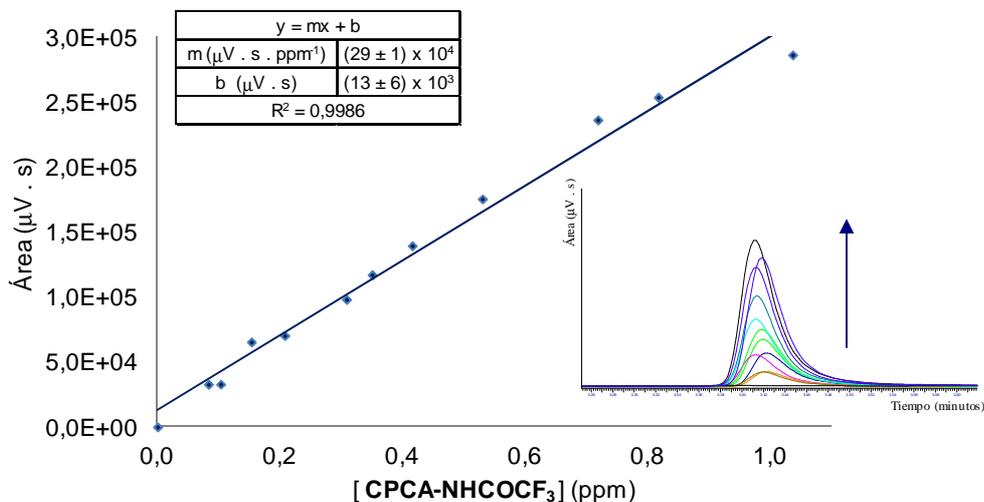


Figura 4-19. Curva de calibrado del **CPCA-NHCOF<sub>3</sub>**. Inserto: Cromatogramas obtenidos por CG-ECD de **CPCA-NHCOF<sub>3</sub>** (8).

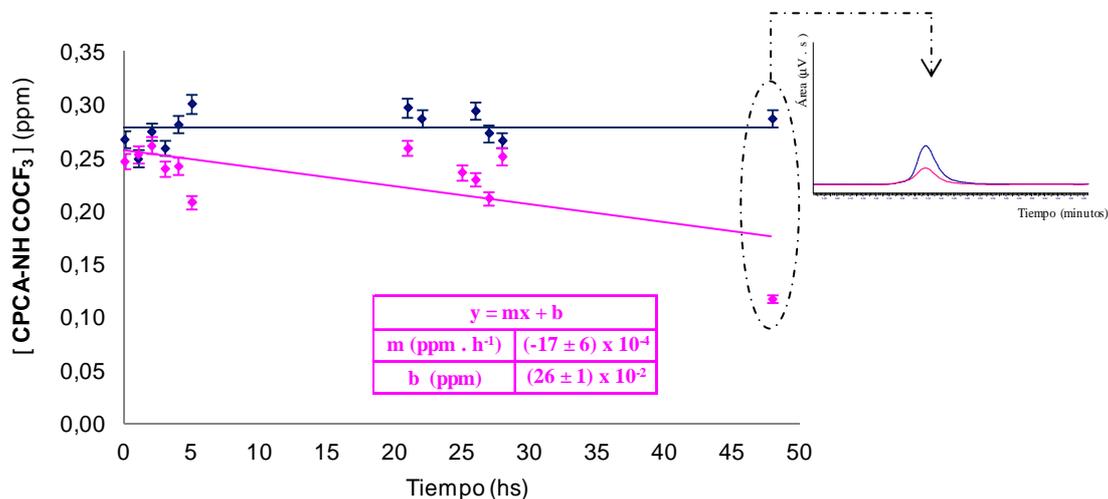
Para la inmovilización, se utilizaron 0,5 mL de la resina ( $2 \times 10^{-6}$  moles de COOH) en DMF por duplicado (S/EDC y C/EDC). Se activó la misma con EDC (C/EDC) y luego se agregó, en ambos experimentos, el **CPCA-NH<sub>2</sub>** disuelto en DMF. Se agitó a 25°C durante 48 horas, tomando alícuotas de 5 µL. Las alícuotas se derivatizaron siguiendo el protocolo antes mencionado (ver Figura 4-10) y se analizaron por CG-ECD.

A partir de la curva de calibrado se calculó la concentración de **CPCA-NHCOF<sub>3</sub>** en las alícuotas en función del tiempo. Como muestra la Figura 4-20, en el caso del soporte activado (C/EDC), se observa una disminución en la concentración de **CPCA-NHCOF<sub>3</sub>** en solución, luego de 48 horas de inmovilización, de aproximadamente el 50%, mientras que en el caso del experimento control (S/EDC), la concentración prácticamente no se modificó a lo largo del tiempo.

Se realizó un balance de masa en el cual se puede observar, nuevamente, una interacción inespecífica con la resina, la cual no fue posible cuantificar ya que no se observó un claro descenso de la concentración de **CPCA-NHCOF<sub>3</sub>** en el control (S/EDC).

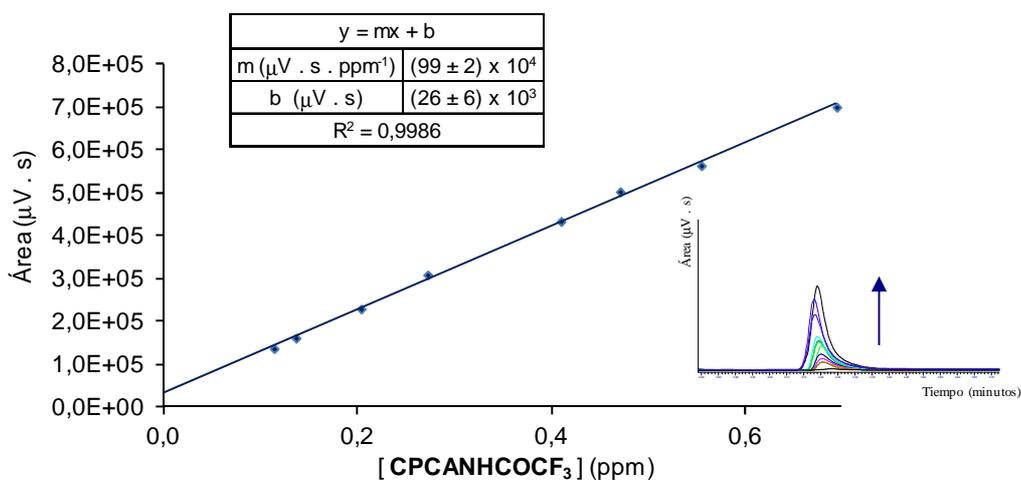
Al no ser muy concluyentes estos resultados, se repitió la inmovilización pero dejándolo 120 horas en lugar de 48 horas. Se preparó una solución madre 760 ppm de

**CPCA-NH<sub>2</sub>** en tolueno. La misma se derivatizó con anhídrido trifluoroacético y considerando una conversión cuantitativa, se obtuvo una solución 4,32 ppm de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>**. Se construyó una curva de calibrado (0 ppm – 1,00 ppm), cuantificando por CG-ECD (*Figura 4-21*).



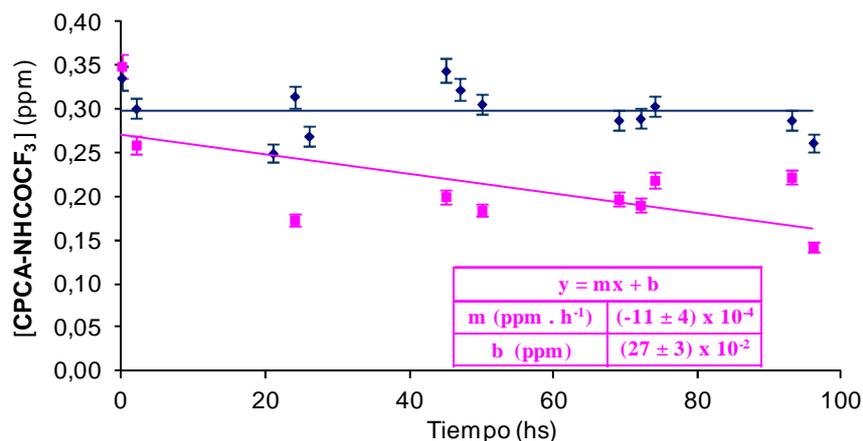
*Figura 4-20.* Valores de concentración de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** en función del tiempo para las diferentes alícuotas durante la inmovilización del **CPCA-NH<sub>2</sub>** sobre los *BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads S/EDC* (azul) y *C/EDC* (rosa). *Inserto:* Cromatogramas por CG-ECD de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** para las alícuotas tomadas a las 48 horas de inmovilización.

Para la inmovilización, se procedió de forma similar a la mencionada anteriormente, tomando muestras de 5 µL a lo largo de 120 horas, derivatizándolas según el procedimiento antes mencionado (ver *Figura 4-10*) y analizándolas por CG-ECD.



*Figura 4-21.* Curva de calibrado del **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>**. *Inserto:* Cromatogramas por CG-ECD de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** (8).

A partir de la curva de calibrado se calculó la concentración de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** en las alícuotas en función del tiempo. Como muestra la *Figura 4-22*, en el caso del soporte activado (C/EDC), se observa una disminución en la concentración de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** en solución, luego de 120 horas de inmovilización, de aproximadamente el 60%, mientras que en el caso del control (S/EDC), la concentración disminuye aproximadamente un 20%.



*Figura 4-22.* Valores de concentración de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** en función del tiempo para las diferentes alícuotas durante la inmovilización del **CPCA-NH<sub>2</sub>** sobre *los BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads S/EDC* (azul) y *C/EDC* (rosa).

Una vez transcurridas las 120 horas, se separaron los sobrenadantes de las resinas y se derivatizaron siguiendo el mismo protocolo antes mencionado, se lavaron las resinas con DMF por triplicado y luego, con EtOH 96%. Los sobrenadante de los lavados también se derivatizaron y todas las muestras se analizaron por CG-ECD. Como se puede observar en la *Tabla 4-3*, existe una diferencia entre los valores medidos de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** en el control (S/EDC) frente al experimento con activación (C/EDC), consistente con los valores medidos durante la inmovilización. Por otro lado, sólo se observa presencia de **CPCA-NHCOCF<sub>3</sub>** en el primer lavado de las resinas con DMF.

Se realizó un balance de masa (*Figura 4-23*) en el cual se pudo observar, nuevamente, una interacción inespecífica con la resina, ya que el número de moles inmovilizados ( $6,41 \times 10^{-6}$  moles) es mayor al número de moles de grupos carboxílicos disponibles ( $2,00 \times 10^{-6}$  moles). Considerando la inmovilización en el control (S/EDC), se pudo estimar el número de moles de analito inmovilizados específicamente sobre la

resina ( $3,62 \times 10^{-6}$  moles), valor que resulta coherente con el número de moles de grupos carboxílicos disponibles.

	[CPCA-NHCOCF <sub>3</sub> ] <sub>promedio</sub> (ppm) (n = 3)				
	Sobrenadante	1° Lavado DMF	2° Lavado DMF	3° Lavado DMF	EtOH 96%
S/EDC	0,22 ± 0,03	0,046 ± 0,005	ND	ND	ND
C/EDC	0,12 ± 0,01	0,006 ± 0,001	ND	ND	ND

Tabla 4-3. Valores de concentración de CPCA-NHCOCF<sub>3</sub> en ppm, calculados a partir de la integración del pico correspondiente al CPCA-NHCOCF<sub>3</sub> en el sobrenadante y los lavados de las muestras S/EDC y C/EDC de BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads en el CG-ECD. ND: no detectable.

Se trabajó con la inmovilización de 120 horas y se procedió a realizar una cuantificación directa. Se llevó a sequedad la resina modificada (S/EDC y C/EDC) y se resuspendió en 0,5 mL de EtOH. Se tomaron 0,070 mL de la suspensión ( $2,80 \times 10^{-7}$  moles de COOH) y se hidrolizaron con NH<sub>3</sub>(c), de forma tal de obtener el CPCA en solución.

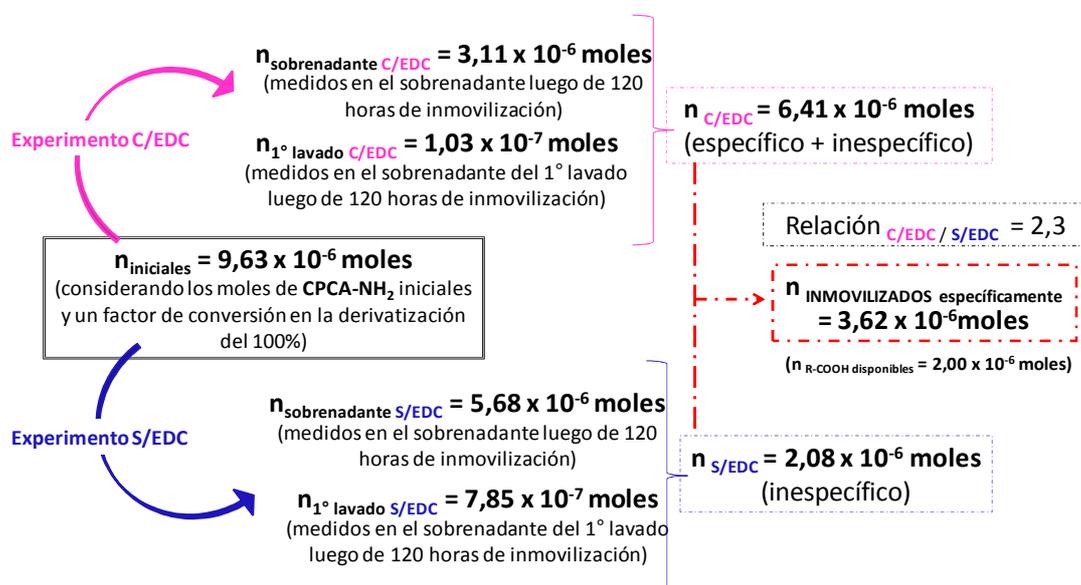


Figura 4-23. Esquema del balance de masa para la inmovilización del CPCA-NH<sub>2</sub> sobre la BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads, luego de 120 horas (n = 5).

Luego, se derivatizaron las muestras con DIC y HFP (ver Figura 4-12) para

obtener el **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** que se cuantificó por CG-ECD (Figura 4-24).

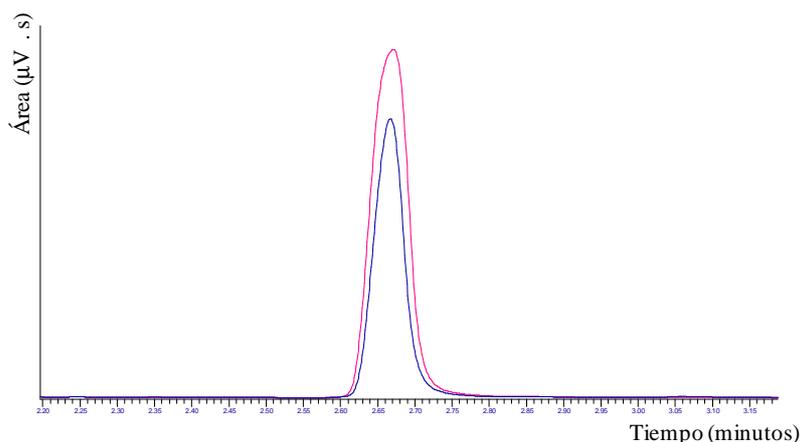


Figura 4-24. Cromatogramas obtenidos por CG-ECD correspondiente al pico de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** en las muestras S/EDC (azul) y C/EDC (rosa) de *BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads*.

Como una primera aproximación y como muestra la *Tabla 4-4*, se observa una relación de área de pico de **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** S/EDC : C/EDC de 1 : 1,6, resultado comparable con el obtenido por cuantificación directa que resultó de 1 : 2,3. De esta manera, se confirma la efectiva modificación de los *BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads* con el target de interés (**CPCA-NH<sub>2</sub>**).

	$t_r$ (min)	Área promedio ( $\mu\text{V s}$ ) (n = 5)
S/EDC	2,67	$(1,70 \pm 0,04) \times 10^6$
C/EDC	2,67	$(2,64 \pm 0,02) \times 10^6$

Tabla 4-4. Resultados de la integración del pico correspondiente al **CPCA-OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** en las muestras S/EDC y C/EDC de *BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads*.

### 4.3. Preparación de la pre-columna de selección (SELEX-Negativa)

El proceso de SELEX-Negativa<sup>174</sup> permite descontar las secuencias de oligonucleótidos que pudiesen presentar afinidad por el soporte sólido, o por el *linker*, y no por el **CPCA-NH<sub>2</sub>**. Para ello se preparó una pre-columna con los *BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads* en las mismas condiciones que se mencionaron anteriormente (120 horas) pero que no contiene el **CPCA-NH<sub>2</sub>** sino el *linker* (**4, 2-(2-aminoetoxi)etanol**) inmovilizado en el soporte.

Cuando se lleva a cabo el proceso de SELEX con el *target* inmovilizado sobre un soporte sólido, es extremadamente importante asegurarse de eliminar cualquier secuencia que presente afinidad por el soporte, como así también por el *linker*<sup>176</sup>. Una vez obtenidos los aptámeros, son generalmente usados para cuantificar al *target* libre en solución, por lo tanto cualquier afinidad del aptámero por el soporte sólido reducirá la funcionalidad del mismo.

#### 4.4. Diseño del proceso de SELEX

Una vez inmovilizado el **CPCA-NH<sub>2</sub>** y preparada la columna para la SELEX-Negativa, se procedió a llevar adelante el diseño del proceso de SELEX.

##### 4.4.1. Pool de ADN inicial

El *pool* de ADN al azar (ver *Figura 4-1*) consistió en una biblioteca de ADN (**BiblioADN<sub>ss</sub>**) con una zona aleatoria de 60 bases. La zona aleatoria representa una zona degenerada, donde en cada una de las posiciones hay cantidades equimolares de cada una de las cuatro bases (A, C, T y G).

Se requiere un mínimo de 25 nucleótidos para tener una diversidad de 10<sup>15</sup> secuencias diferentes<sup>176</sup>. Comúnmente, se utilizan bibliotecas con zonas aleatorias de entre 20 a 80 nucleótidos<sup>174</sup>. Un gran número de aptámeros seleccionados fueron truncados a una secuencia mínima funcional después del proceso de SELEX<sup>68</sup>. Esto sugiere que las bibliotecas con regiones aleatorias más cortas son suficientes para una selección exitosa de los aptámeros. Las bibliotecas más cortas son más fáciles de manipular y menos costosas. Además, la selección de aptámeros más cortos puede resultar útil para numerosas aplicaciones. Sin embargo, al aumentar la longitud de la zona aleatoria, aumenta la complejidad estructural de la biblioteca y consecuentemente, las estructuras complejas con aptámeros con alta afinidad por el *target*<sup>185</sup>. Al trabajar con una biblioteca de 60 nucleótidos aleatorios, se buscó, por lo tanto, una situación de compromiso entre ambos factores.

La zona aleatoria está flanqueada por dos secuencias de 18 nucleótidos complementarias a *primers* para la PCR, de forma tal que la **BiblioADN<sub>ss</sub>** tiene una longitud total de 96 nucleótidos<sup>145</sup> (*Figura 4-25*).

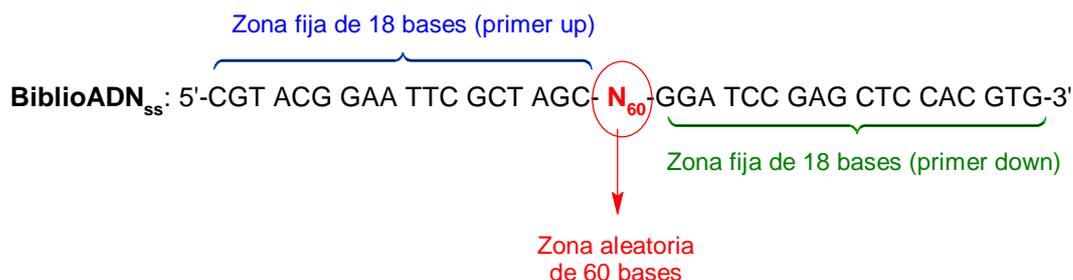


Figura 4-25. Secuencia de la biblioteca de ADN simple cadena (**BiblioADN<sub>ss</sub>**).

#### 4.4.2. Detección de pequeñas cantidades de ADN<sub>ss</sub> por electroforesis planar

Durante todo el proceso de SELEX, resulta necesario detectar y corroborar, tanto la integridad de los oligonucleótidos usados como así también el tamaño de dichas secuencias. Por dicho motivo, utilizando diferentes secuencias de ADN<sub>ss</sub> se buscaron las condiciones óptimas de corrida electroforética en geles planos. Dichas técnicas permiten separar, al aplicar una diferencia de potencial eléctrico, diversas macromoléculas (ADN, proteínas) basándose en propiedades como el tamaño, la forma o el punto isoelectrónico.

La matriz utilizada, “el gel”, es un polímero entrelazado de porosidad controlable, pudiendo estar compuesto por diferentes concentraciones de acrilamida/bisacrilamida y un iniciador de la polimerización para producir redes de diferentes tamaños (PAGE, para proteínas y ADNs pequeños) o agarosa purificada (para ADNs grandes).

Se ensayaron diversas condiciones de trabajo, tanto para PAGE como para agarosa, a saber:

- ⇒ % de acrilamida/bisacrilamida
- ⇒ % de agarosa
- ⇒ Condiciones de corrida: voltaje, tiempo, etc.
- ⇒ Tinción de los geles: tinción con AgNO<sub>3</sub>, *Sybr Safe*, etc.

Como se observa en la *Figura 4-26*, se obtuvo una mejor resolución con PAGE que con agarosa, al lograr separar más eficientemente la **BiblioADN<sub>ss</sub>** de secuencias más cortas (18 mer), de longitud similar a los *primers* utilizados en la PCR.

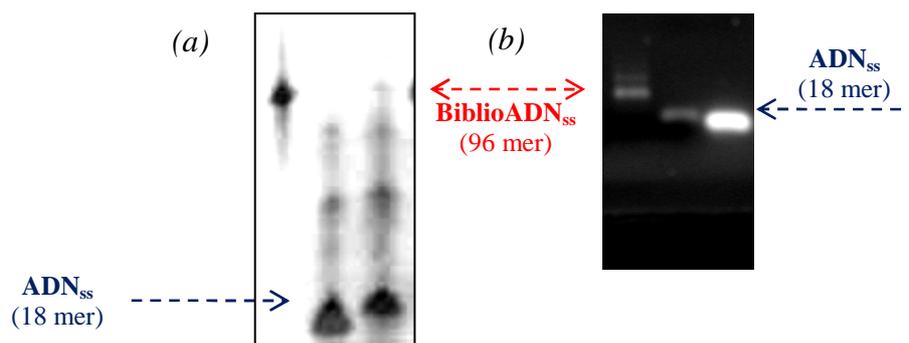


Figura 4-26. (a) PAGE 20% desnaturalizante (tinción con  $\text{AgNO}_3$ ). Calles de izquierda a derecha: **BiblioADN<sub>ss</sub>** (96 mer), **ADN<sub>ss</sub> 18 mer**, **ADN<sub>ss</sub> 18 mer**. (b) Gel de agarosa (tinción con *Sybr Safe*). Calles de izquierda a derecha: **BiblioADN<sub>ss</sub>**, **ADN<sub>ss</sub> 18 mer**, **ADN<sub>ss</sub> 18 mer** marcado con fluoresceína.

Se realizó también una curva de calibrado en PAGE (Figura 4-27) con el fin de determinar el límite de detección de la tinción de nitrato de plata. Para ello se trabajó con una secuencia de **ADN<sub>ss</sub> de 27 mer**, logrando detectar hasta  $0,22 \mu\text{g}$  de ADN<sub>ss</sub>.

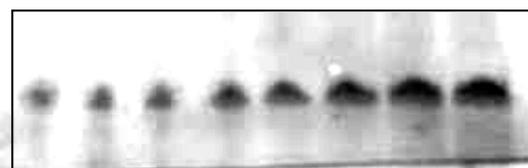


Figura 4-27. PAGE 20% desnaturalizante (tinción con  $\text{AgNO}_3$ ). **ADN<sub>ss</sub> 27 mer** ( $\mu\text{g}$ ). Calles de izquierda a derecha: 0,22; 0,34; 0,43; 0,86; 1,3; 1,7; 2,2; 2,6.

#### 4.4.3. Purificación de las secuencias de ADN<sub>ss</sub>

Como se trabajó con secuencias de ADN<sub>ss</sub> de a lo sumo 96 nucleótidos, resultó crucial poner a punto las condiciones de purificación de las mismas. Esto es necesario en varias etapas del proceso de SELEX, por ejemplo, siempre que haya un cambio de buffer en el proceso. Con esa finalidad se trabajó en dos protocolos diferentes:

##### 4.4.3.1. Precipitación con *Glycogen*

Una técnica ampliamente utilizada para la purificación de ADN consiste en hacerlo precipitar en presencia de etanol a baja temperatura<sup>180</sup>. En este caso, como se utilizan secuencias cortas de ADN<sub>ss</sub>, se evaluó la utilización de *Glycogen* como *carrier* para la precipitación del mismo<sup>182,183</sup>. Para ello, se trabajó con diferentes cantidades de **BiblioADN<sub>ss</sub>**. Se probaron diferentes alcoholes (etanol, isopropanol), tiempos (24 y 48

horas) y cantidades de *Glycogen* 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (1 y 5  $\mu\text{L}$ ), estando este último siempre en exceso con respecto a las secuencias a precipitar. Para poder cuantificar la precipitación, se construyó una curva de calibrado, estimando la concentración de la **BiblioADN<sub>ss</sub>** por absorbancia a 232 nm (Figura 4-28).

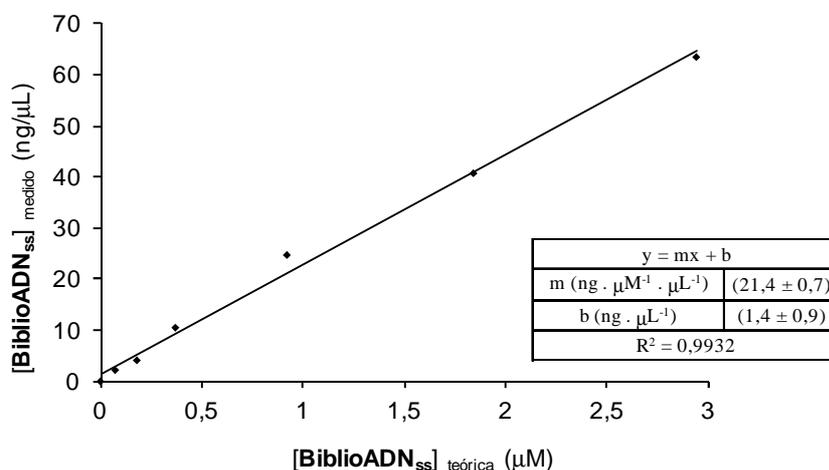


Figura 4-28. Curva de calibrado de la **BiblioADN<sub>ss</sub>** por absorbancia a 232 nm.

En el caso de la precipitación sólo con etanol no se observó recuperación de las secuencias de **BiblioADN<sub>ss</sub>**. Cuando se trabajó con isopropanol, se lograron diferentes porcentajes de recuperación de las secuencias de interés dependiendo de la masa inicial utilizada (Tabla 4-5), resultando del 77% cuando se trabajó en un entorno de 1  $\mu\text{M}$  de muestra a precipitar. Los mejores resultados se obtuvieron dejando la mezcla (**BiblioADN<sub>ss</sub>** + 5  $\mu\text{L}$  de *glycogen* 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  + isopropanol) por 48 horas a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

[ <b>BiblioADN<sub>ss</sub></b> ] teórica ( $\mu\text{M}$ )	[ <b>BiblioADN<sub>ss</sub></b> ] calculada ( $\mu\text{M}$ )	% recuperación
0,073	0,029	39
0,73	0,56	77
2,9	0,83	28
3,7	0,96	26

Tabla 4-5. Resultados obtenidos para la precipitación de la **BiblioADN<sub>ss</sub>** en presencia de *Glycogen* e isopropanol por 48 horas a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4.3.2. Purificación con Kit comercial

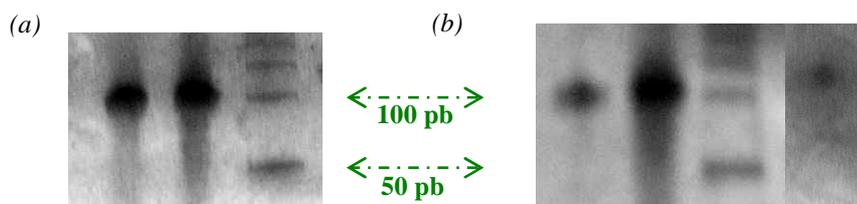
El *DNA Clean & Concentrador*<sup>TM</sup>-5 es un kit de purificación para ADN de entre 75 bp y 23 kb. Se puede recuperar hasta 5 µg de ADN por columna. Para ADN de entre 75 bp hasta 10 kb, el porcentaje de recuperación es de entre 70-90%.

Se pusieron a punto las condiciones de la purificación utilizando el kit, corroborando que servía para la longitud de las secuencias de la **BiblioADN<sub>ss</sub>**. Se probaron diferentes cantidades iniciales de muestra (ver *Tabla 4-6*). Se siguió el protocolo del fabricante, eluyendo en todos los casos con 6 µL de agua MilliQ estéril. Se cuantificó la recuperación de las secuencias correspondientes por absorbancia (230 nm) y se corroboró la integridad de las mismas por PAGE con tinción con AgNO<sub>3</sub>.

Muestra	[ <b>BiblioADN<sub>ss</sub></b> ] teórica (µM)	m <sub>inicial</sub> <b>BiblioADN<sub>ss</sub></b> (ng)	m <sub>medida</sub> (ng)	% recuperación
<b>1</b>	0,37	270	208	77
<b>2</b>	0,71	523	199	38
<b>3</b>	2,5	727	323	44

*Tabla 4-6.* Resultados obtenidos para la purificación de la **BiblioADN<sub>ss</sub>** con el *DNA Clean & Concentrador*<sup>TM</sup>-5.

Como se observa en la *Tabla 4-6*, la recuperación también depende de la cantidad inicial de muestra, siendo más eficiente el Kit cuando se trabaja con menor cantidad de ADN<sub>ss</sub>. La *Figura 4-29* muestra que se obtuvieron las secuencias del tamaño correspondiente (**BiblioADN<sub>ss</sub>**; 96 mer), ya que se obtuvo una única banda para las muestras y la misma coincide con la banda de 100 pb del marcador de peso molecular.



*Figura 4-29.* PAGE 20% desnaturizante (tinción con AgNO<sub>3</sub>). Calles de izquierda a derecha: (a) **Muestra 2**; 540 ng **BiblioADN<sub>ss</sub>**; *Ladder* 50 pb. (b) 216 ng **BiblioADN<sub>ss</sub>**; 324 ng **BiblioADN<sub>ss</sub>**; *Ladder* 50 pb; **Muestra 1**. *Ladder* 50 pb: 50, 100, 150, 200, 150, 300, 250, 400, 450, 500, 750, 1000 pb.

Teniendo en cuentas ambos resultados y las dificultades para realizar cada uno de los protocolos, se optará por uno u otro método dependiendo de la cantidad de muestra a purificar.

#### 4.4.4. Amplificación por PCR simétrica

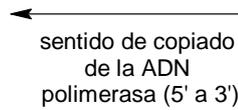
La idea central de la “evolución molecular” es ir obteniendo “nuevas generaciones de secuencias oligonucleotídicas” con mayores constantes de afinidad luego de cada etapa de selección. Para ello es necesario amplificar la cantidad de secuencias exitosas (tercera etapa del proceso de SELEX, ver *Figura 4-1*). Además del objetivo de enriquecer el *pool* de aptámeros seleccionados, también es posible incorporar modificaciones usando *primers* especiales durante la amplificación.

La PCR se basa en la propiedad natural de las enzimas ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual, los reactivos necesarios son<sup>186</sup>:

- ❖ Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs): monómeros que constituyen el ADN.
- ❖ *Primers*: secuencias cortas complementarias a cada una de las dos hebras del ADN que delimitan la zona a amplificar. En este caso se trabajó con dos secuencias de *primers* (**Primer down** y **Primer up**) de 18 mer cada uno. El **Primer down** es complementario a la zona fija cercana al extremo 3' de la **BiblioADN<sub>ss</sub>**, mientras que el **Primer up** es complementario a la zona fija cercana al extremo 5' de la secuencia complementaria a la **BiblioADN<sub>ss</sub>** (ver *Figura 4-30*).
- ❖ ADN polimerasa: se utilizan enzimas termoestables extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas (por ejemplo, *Thermus aquaticus*). Se probaron diversas polimerasas; una tradicional, como la Taq polimerasa y otras, de segunda generación (robusta y rápida).
- ❖ Buffer de PCR: regula el pH y además aporta cationes monovalente, como cationes  $K^+$ <sub>(ac)</sub>. El mismo se provee junto con la enzima.
- ❖ Cationes divalentes: normalmente se usa  $MgCl_2$ , que aporta cationes  $Mg^{+2}$ <sub>(ac)</sub>, los cuales actúan como cofactor de la polimerasa.
- ❖ Molde de ADN: Se trabajó con la **BiblioADN<sub>ss</sub>** como molde a copiar.

**BiblioADN<sub>ss</sub>**: 5'-CGT ACG GAA TTC GCT AGC- N<sub>60</sub>-GGA TCC GAG CTC CAC GTG-3'

**Primer down**: 3'-CCT AGG CTC GAG GTG CAC-5'



**Primer up**: 5'-CGT ACG GAA TTC GCT AGC-3'

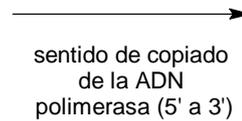


Figura 4-30. Secuencias del **Primer down** y del **Primer up** utilizados en la PCR.

La replicación se lleva a cabo realizando ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas (ver Figura 4-31). Inicialmente, se lleva la reacción hasta una temperatura de 94-96°C que se mantiene durante algunos minutos. Luego, se realizan una serie de ciclos (entre 20-30, normalmente), donde cada ciclo consta de tres etapas:

1. Desnaturalización: se calienta la mezcla entre 94-95 °C. La temperatura de dicho proceso depende, por ejemplo, de la proporción de G+C que tenga la secuencia, como también del largo de la misma

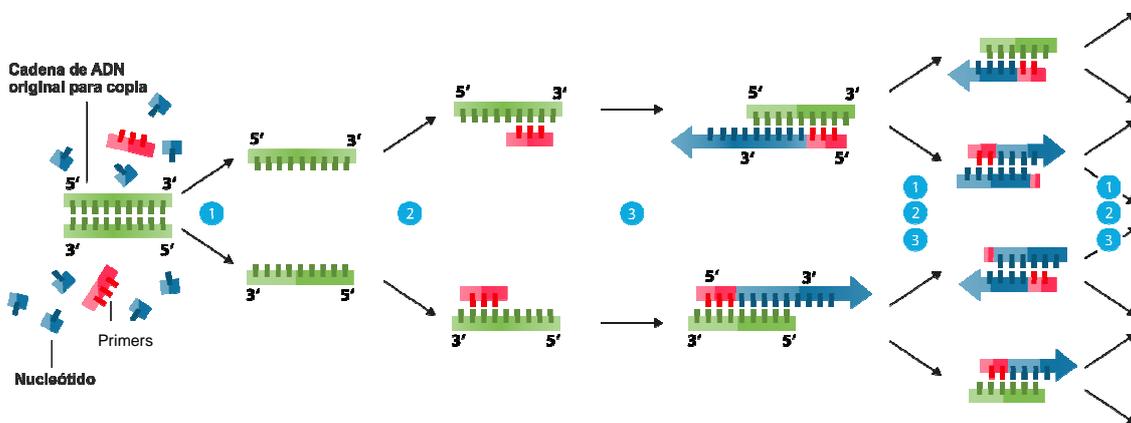


Figura 4-31. Esquema general de la PCR.

2. *Annealing* de los *primers*: ocurre la hibridización del **Primer down** a su secuencia complementaria en el molde de ADN. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante algunos segundos (según el caso), permitiendo así el *annealing*.

3. Elongación de la cadena: la ADN polimerasa, partiendo del **Primer down** como soporte inicial comienza a sintetizar el ADN. La enzima sintetiza una nueva hebra

de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTPs complementarios en dirección 5'→3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTPs con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la enzima, siendo comúnmente 72 °C. El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. Generalmente se considera que en su temperatura óptima, la ADN polimerasa sintetiza mil bases en un minuto.

Finalmente, se realiza una etapa de elongación, que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos, donde se asegura la replicación completa del molde.

Entonces, utilizando la **BiblioADN<sub>ss</sub>** se optimizaron las condiciones para realizar las PCRs simétricas, tercera etapa del proceso de SELEX (ver *Figura 4-1*). Se ensayaron diversas condiciones de trabajo, a saber:

- ⇒ Temperatura de *annealing*.
- ⇒ Cantidad inicial de molde.
- ⇒ Tiempos de desnaturalización inicial, de *annealing* y de extensión, probando diferentes tipos de enzimas.

En todos los casos, se trabajó con PCRs del tipo *hot start*, que minimiza la amplificación inespecífica durante las etapas iniciales, asegurándose que la enzima no está activa durante dicho calentamiento<sup>187</sup>.

Se evaluaron diferentes temperaturas de *annealing* para los *primers*. En general se puede estimar la temperatura de *annealing* como 5°C menor que la temperatura de *melting* ( $T_m$ ). La  $T_m$  de un *primer* unido a su molde se define como la temperatura a la cual el 50% de los *primers* están unidos y el 50% están en solución. Dicha temperatura depende de la concentración de *primer*, de la composición del molde y de la composición del buffer. Existen en la literatura numerosos métodos para calcular la  $T_m$ . El método más simple y más ampliamente utilizado se basa en asignar 2°C por cada A o T y 4°C por cada G o C. Se estimó la  $T_m$  para los *primers* utilizados, resultando un valor de 56°C. Se probaron, entonces, como temperatura de *annealing*, 55°C y 52,2°C. En el primer caso, no se observó amplificación, por lo tanto se optimizaron las otras condiciones trabajando con una temperatura de *annealing* de 52,2°C.

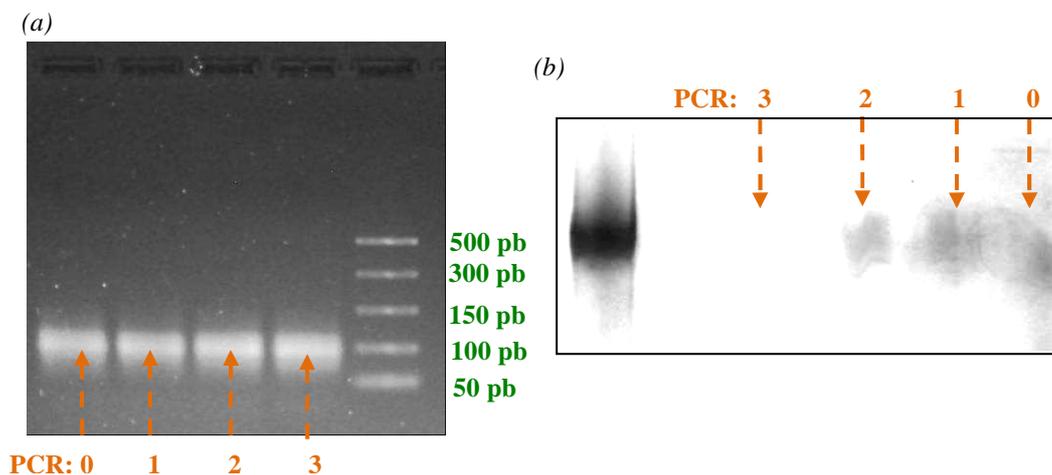
Se evaluó la sensibilidad de la PCR, esto es, la cantidad mínima de ADN necesario para que se produzca la amplificación. Para ello, se realizaron 4 PCRs (*Master Mix A*; programa Belen2, ver **2.14.3.**) con diferente cantidad inicial de molde

(Tabla 4-8). Una vez finalizadas las mismas, se corrieron geles sembrando 5  $\mu$ L de los productos de PCR.

PCR	Cantidad inicial de molde ( <b>BiblioADN<sub>ss</sub></b> ) (ng)
<b>0</b>	109
<b>1</b>	10,9
<b>2</b>	1,09
<b>3</b>	0,109

Tabla 4-8. Cantidad de molde (**BiblioADN<sub>ss</sub>**) inicial en las PCRs.

Como se observa en la *Figura 4-32a*, se obtuvo una banda intensa para todas las PCRs realizadas, aún cuando se partió de 0,109 ng de molde. Al correr en paralelo un marcador de peso molecular, se pudo observar que la banda obtenida en todas las PCRs se ubica entre las bandas de 50 y 150 pb del mismo. Esto nos estaría indicando que el programa de PCR utilizado resultó el adecuado para la correcta amplificación de la secuencia de interés (**BiblioADN<sub>ss</sub>**), con una sensibilidad mucho menor de la necesaria en los ciclos del proceso de SELEX.



*Figura 4-32.* (a) Agarosa 2% (tinción con bromuro de etidio). Producto de PCRs (5  $\mu$ L). Calles de izquierda a derecha: **PCR 0**; **PCR 1**; **PCR 2**; **PCR 3**, *PCR Marker*. (b) PAGE 20% (tinción con AgNO<sub>3</sub>). Calles de izquierda a derecha: **BiblioADN<sub>ss</sub>**; sin siembra; **PCR 3**; **PCR 2**; **PCR 1**; **PCR 0**.

*PCR Marker*: 50, 150, 300, 500, 766 bp.

Por otro lado, si bien con la tinción de bromuro de etidio en agarosa (*Figura 4-32a*) se logró una buena detección y observación de las bandas, la idea fue evitar el trabajo con dicho reactivo por ser una sustancia mutagénica. Se probó la tinción de la misma corrida electroforética en agarosa con *Sybr Safe* y no se observaron bandas para ninguna de las PCRs. Se procedió, entonces, a correr PAGE de dichos productos de PCR, con una posterior tinción con  $\text{AgNO}_3$ . Como se observa en la *Figura 4-32b*, se lograron detectar todos los productos de PCR, aunque la tinción fue menos sensible que con bromuro de etidio.

Posteriormente, se probó el uso de dos ADN polimerasas de segunda generación. Por un lado, se realizó el mismo programa de PCR utilizado anteriormente (*Master Mix A*; programa *Belen2*, ver **2.14.3.**) con una ADN polimerasa robusta del tipo *hot start*. Dicha enzima se utiliza en aplicaciones donde se necesita un alto rendimiento por unidad de enzima.

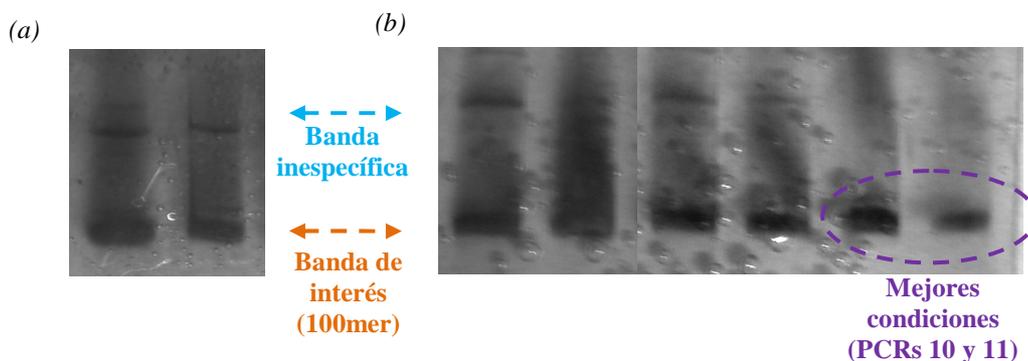
Por otro lado se utilizó una ADN polimerasa rápida del tipo *hot start*<sup>188</sup>. Dicha enzima, según el fabricante, permite acortar considerablemente los tiempos de desnaturalización inicial (de 1 minuto a 10 segundos), de *annealing* (de 1 minuto a 10 segundos) y de extensión (de 30 segundos a 2 segundos), reduciendo el tiempo total de las PCR en un 70% sin comprometer la performance de las mismas.

En todos los casos se trabajó con 108 ng de molde (**BiblioADN<sub>ss</sub>**). Además de probar las dos Taq, se probaron diferentes concentraciones de *primers* (*Master Mix A* y *B*, ver **2.14.3.**) y diferentes tiempos de elongación (programa *Belen4* y *Belen5*, ver **2.14.3.**). Se realizaron las PCRs por duplicado en cada caso (ver *Tabla 4-9*), y al finalizar las mismas se sembraron 5  $\mu\text{L}$  de los productos de PCR y se corrieron en PAGE con tinción de  $\text{AgNO}_3$ .

PCR	[ <i>Primers</i> ] ( $\mu\text{M}$ )	Tiempo de elongación (seg)	ADN Polimerasa
<b>4/5</b>	0,2	30	Robusta
<b>6/7</b>	0,2	4	Rápida
<b>8/9</b>	0,5	4	Rápida
<b>10/11</b>	0,2	2	Rápida

*Tabla 4-9.* Condiciones de PCRs ensayadas.

Como se observa en la *Figura 4-33a*, en el caso de las PCR con la polimerasa robusta se obtuvieron bandas inespecíficas de mayor tamaño. En el caso de la polimerasa rápida y con un mayor tiempo de elongación (4 segundos) también se observaron bandas inespecíficas de mayor tamaño, tanto para una concentración de *primers* de 0,2  $\mu\text{M}$  como de 0,5  $\mu\text{M}$ . (ver *Figura 4-33b*). Las mejores condiciones de amplificación se obtuvieron con la polimerasa rápida, a baja concentración de *primers* (0,2  $\mu\text{M}$ ) y menor tiempo de elongación (2 segundos). Se decidió, entonces, trabajar con estas condiciones de PCR ya que los tiempos con respecto a la polimerasa tradicional se acortan considerablemente, pasando de 81 minutos a 24 minutos totales.



*Figura 4-33.* PAGE 20% (tinción con  $\text{AgNO}_3$ ). Producto de PCRs (5 $\mu\text{L}$ ). (a) Calles de izquierda a derecha: **PCR 4**, **PCR 5**. (b) Calles de izquierda a derecha: **PCR 9**; **PCR 8**; **PCR 7**; **PCR 6**; **PCR 11**; **PCR 10**.

Si bien se observó amplificación partiendo de 0,109 ng de molde (ver *Figura 4-32a*), se realizaron una serie de PCRs (*Master Mix A*, programa Belen4, ver 2.14.3.) partiendo de diferente cantidad de molde inicial (ver *Tabla 4-10*) y se cuantificó por absorbancia el producto luego de purificarlo con el Kit de purificación (ver 2.14.2.2.).

PCR	$m_{\text{inicial}}$ BiblioADNsc (ng)	[Producto] (ng/ $\mu\text{L}$ )	$m_{\text{final}}$ (ng)	Relación $m_{\text{final/inicial}}$
<b>12</b>	148	12,2	1830	12
<b>13</b>	14,8	9,2	1380	93
<b>14</b>	1,48	7,3	1095	740
<b>15</b>	0,148	3,1	465	3142

*Tabla 4-10.* Resultados obtenidos por absorbancia para una serie de PCRs (*Master Mix A*, programa Belen4, ver 2.14.3.) partiendo de diferente cantidad de molde inicial.

Como se observa en la *Tabla 4-10*, hubo amplificación aún partiendo de 0,148 ng de molde, lo cual es consistente con los resultados obtenidos anteriormente. Al cuantificar dichos productos de PCR, se observó que la eficiencia de la PCR aumenta al disminuir la masa de molde inicial. Esto es, se obtuvo en las mismas condiciones, una mejor amplificación al trabajar con menor cantidad de molde inicial.

Por otro lado, se encuentra reportado en la bibliografía<sup>177</sup> que el rendimiento de la amplificación en paralelo, esto es, dividiendo la cantidad de *pool* de ADN<sub>ss</sub> que se obtiene luego de la etapa de selección, es mayor que si se hiciera un único *pool* de amplificación. Con esta idea, se compararon, por un lado una única PCR partiendo de 7,5 ng de molde inicial (**PCR 16**) y por otro lado, 15 PCRs en paralelo partiendo cada una de 0,5 ng de molde inicial (PCRs **17 a 31**, masa total inicial 7,5 ng). Las PCRs se realizaron en las condiciones puestas a punto anteriormente (*Master Mix A*, programa *Belen4*, ver **2.14.3.**). En el caso de las 15 PCRs en paralelo, se juntaron las mismas y se purificaron con el kit de purificación, al igual que la PCR única (**16**). Se cuantificó por absorbancia (*Tabla 4-11*) y se desarrollaron los productos de PCR (5 µL) en PAGE con tinción con AgNO<sub>3</sub>, observándose en ambos casos una única banda en la zona de la **BiblioADN<sub>ss</sub>**.

PCR	m <sub>inicial</sub> BiblioADN <sub>ss</sub> (ng)	[Producto] (ng/µL)	m <sub>final</sub> (ng)	Relación m <sub>final</sub> /inicial
<b>16</b>	7,5	43,9	263,4	35
<b>17 a 31</b>	0,5 c/u (7,5 total)	118,8	712,8	95

*Tabla 4-11.* Resultados obtenidos por absorbancia.

Como se puede observar en la *Tabla 4-11*, se obtuvo amplificación en ambos casos, resultando más eficiente en el caso de dividir la masa inicial en 15 PCRs que usándola en su totalidad como molde para una única PCR.

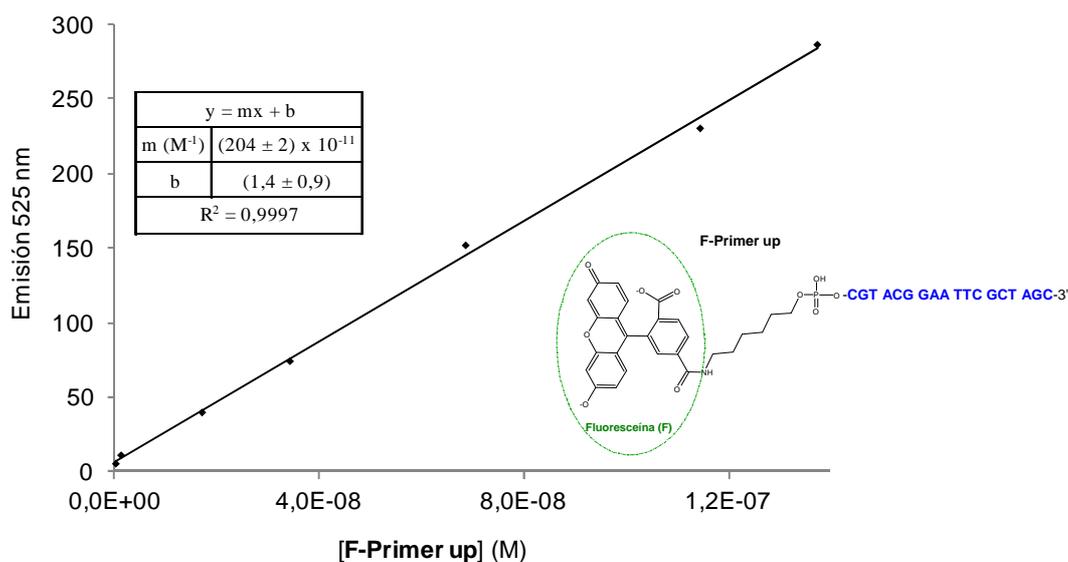
#### 4.4.5. Marcación de la BiblioADN<sub>ss</sub>

Durante el proceso de SELEX, resulta necesario evaluar cuantitativamente la cantidad relativa de secuencias ligadas sobre el **CPCA-NH<sub>2</sub>** inmovilizado (ver *Figura 4-1*). Usualmente se utiliza marcación radioactiva con <sup>32</sup>P para cuantificar las secuencias

con afinidad por el *target*<sup>31,145,189</sup>. Este es un método bastante sensible, que permite la detección de bajas concentraciones de ADN. La desventaja es que requiere el uso de un laboratorio isotópico para llevar a cabo todo el proceso de SELEX. Por lo tanto, el método resulta costoso y ambientalmente no recomendable. Como alternativa, se puede usar la marca fluorescente para dicha cuantificación<sup>177,182a</sup>.

Se exploró un protocolo de marcado de las secuencias de la **BiblioADN<sub>ss</sub>**, utilizando marca fluorescente sobre uno de los primers de la PCR simétrica (**F-Primer up**, *Inserto Figura 4-34*). De esta manera, al realizar la amplificación se incorpora la marca fluorescente en el *pool* de **BiblioADN<sub>ss</sub>**, y posteriormente se cuantifica por fluorescencia.

Resultó necesario, entonces, corroborar si la sensibilidad del método por fluorescencia es adecuada para las determinaciones cuantitativas. Para ello, se prepararon una serie de diluciones de **F-Primer up** y se midió la emisión a 525 nm (*Figura 4-34*).



*Figura 4-34.* Curva de calibrado del **F-Primer up** por fluorescencia. *Inserto:* Secuencia modificada del **F-Primer up**.

Como se observa en la *Figura 4-34*, se logró cuantificar por fluorescencia al **F-Primer up** en el rango de concentraciones esperado en los diversos ciclos del proceso de SELEX. Se decidió entonces, utilizar dicho método de cuantificación.

#### 4.4.6. Acondicionamiento de los productos de PCR

El paso de acondicionamiento es necesario para preparar el *pool* de oligonucleótidos amplificado para el siguiente ciclo del proceso de SELEX. Los productos que se obtienen luego de realizar las PCRs simétricas son secuencias de ADN<sub>ds</sub>, mientras que el *pool* que se utiliza en cada uno de los ciclos del proceso de SELEX está formado por secuencias de ADN<sub>ss</sub>, debido a la diversidad estructural necesaria de los aptámeros y a que las secuencias de ADN<sub>ss</sub> tienen una mayor capacidad de plegarse en estructuras complejas que las secuencias de ADN<sub>ds</sub><sup>190</sup>. Resulta necesario entonces seleccionar selectivamente las secuencias de interés que formarán el próximo *pool* de **BiblioADN<sub>ss</sub>** (Figura 4-35).

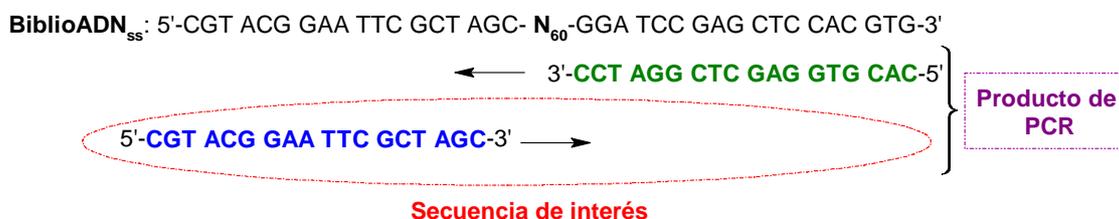


Figura 4-35. Secuencias de los productos de PCR.

Una alternativa utilizada en estos casos, es realizar una PCR asimétrica<sup>31,190</sup>, luego de la PCR simétrica. En las PCRs asimétricas, se utilizan sólo uno o una cantidad mucho mayor de uno de los *primers*, de forma tal de amplificar preferentemente una cadena del ADN original con respecto a la otra. Se probaron diversas condiciones de PCRs asimétricas, variando la cantidad relativa de *primers*, sin obtenerse una amplificación cuantificable.

Otra alternativa es el uso del sistema estreptavidina/biotina. En ese caso, se utilizó un primer biotilado en la PCR simétrica (**B-Primer down**, ver Figura 4-36) para la síntesis de secuencias de ADN<sub>ds</sub> con biotina. Se acoplaron las secuencias del ADN<sub>ds</sub> biotilado a un soporte sólido modificado con estreptavidina<sup>144,145,180</sup> y posteriormente, se realizó un tratamiento en medio alcalino y/o agua a alta temperatura de forma tal de deshibridizar las secuencias de ADN<sub>ds</sub>, sin romper el complejo biotina-estreptavidina<sup>191</sup>. La secuencia de interés se eluye del soporte sólido dejando su secuencia complementaria anclada a los mismos (ver Figura 4-37).

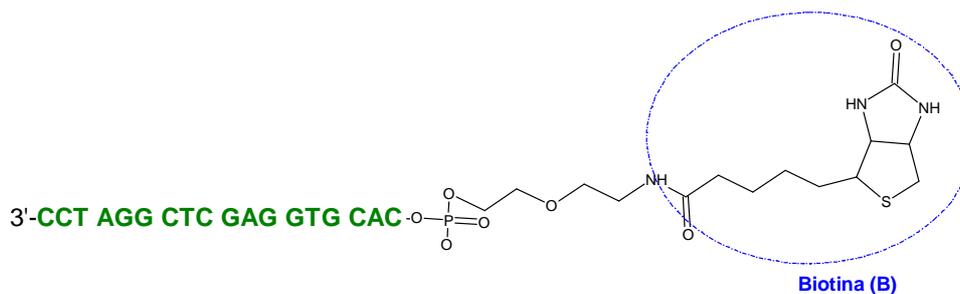


Figura 4-36. Secuencia modificada del **B-Primer down**.

Se probaron dos soportes sólidos (*beads* magnéticos) modificados con estreptavidina. En primer lugar se trabajó con las *Streptavidin Magnosphere Paramagnetic Particles* (SA-PMPs, Promega). Se procedió según lo indicado por el proveedor y se realizaron diversos protocolos para la deshibridización de las secuencias de ADN<sub>ds</sub> (ver 2.14.5.2.1.). No se logró la recuperación de la secuencia de interés, aun cuando se realizó un tratamiento de los *beads* con una solución 0,15M de NaOH a 90°C. Cabe destacar, que luego del tratamiento con NaOH, se observó un residuo de color naranja en los eluidos, lo cual podría estar asociado a alguna reacción de degradación de los *beads*.

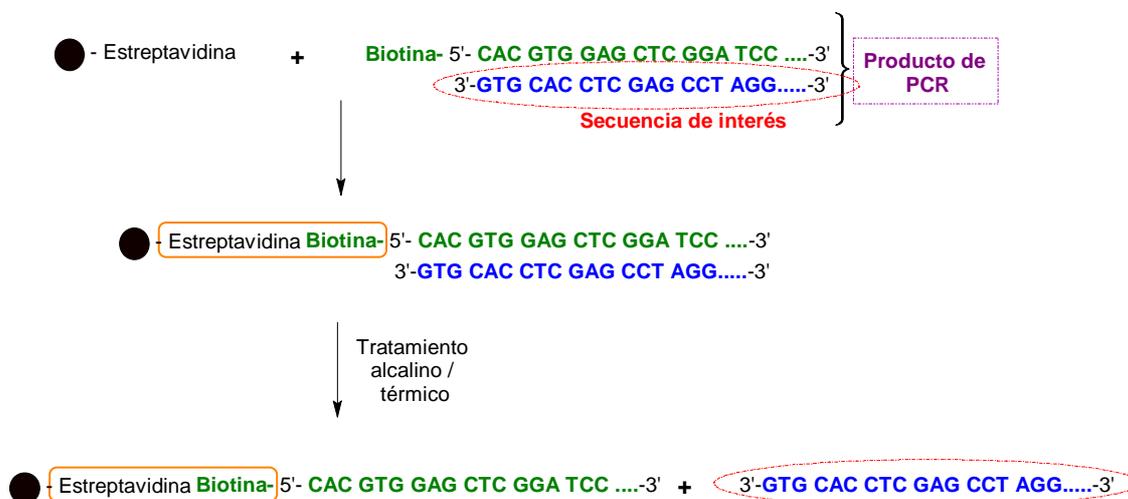


Figura 4-37. Esquema del anclaje de los productos de PCR biotinilados al soporte sólido modificado con estreptavidina y posterior elución de la secuencia de interés.

Se trabajó posteriormente con otro soporte sólido magnético, los *Dynabeads M-280 Streptavidin* (DB-MS, Invitrogen). En un principio se trató de evitar el uso de éstos por su elevado costo a diferencia de los *beads* de Promega.

En una primera prueba se usaron el **B-Primer down** (con biotina) y el **Primer down** (sin biotina, control), ambas secuencias de ADN<sub>ss</sub> de 18 mer. La idea fue corroborar el anclaje inicial de la secuencia biotinilada a los *beads*. Se trabajó con 500 µL de *beads*, y considerando la capacidad de unión de los mismos, con la cantidad de ADN correspondiente. Se procedió según lo indicado por el proveedor (ver 2.14.5.2.2.). Se llevaron a sequedad todas las muestras (sobrenadante luego de la incubación y lavados) y se re-suspendieron en 300 µL de agua MilliQ estéril. Se cuantificó la cantidad de ADN<sub>ss</sub> por absorbancia (Tabla 4-12).

Muestra	[B-Primer down] (ng/µL)	[Primer down] (ng/µL)
Inicial	13	23
Sobrenadante	5,2	18
1 <sup>r</sup> Lavado	1,6	0,70
2 <sup>do</sup> Lavado	0,90	0,30
3 <sup>r</sup> Lavado	0,20	0,20

Tabla 4-12. Resultados medidos por absorbancia para la incubación del **B-Primer down** y del **Primer down** con los *Dynabeads M-280 Streptavidin*.

Como se observa en la Tabla 4-12, existe un acoplamiento del **B-Primer down** a los *beads* con estreptavidina de aproximadamente el 60%. Dicho acoplamiento resulta mucho menor en el caso del primer sin biotina (**Primer down**), donde la interacción inespecífica resultó ser de aproximadamente un 20%.

En una segunda etapa, se trabajó con dos productos de PCR diferentes: uno en el cual se utilizó el **B-Primer down (PCR-biotina)** y otro control, donde se utilizó el **Primer down (PCR-control)**. En ambos casos, se utilizaron los protocolos antes mencionados (*Master Mix A*, programa *Belen4*, ver 2.14.3.). Se purifican ambos productos de PCR con el kit comercial, según el protocolo puesto a punto anteriormente. Se cuantificó por absorbancia ambos productos de PCR, como estimación de la cantidad de ADN<sub>ds</sub> inicial, y a partir de ahí se estimó la cantidad de *beads* a utilizar. Se usó en ambos casos un exceso de *beads*.

Se procedió según lo indicado por el proveedor (ver 2.14.5.2.2.). Se procedió a la elución de la secuencia de interés (deshibridización) por incubación de los *beads* en agua MilliQ estéril a 20 y 90°C, por 15 minutos. Se llevaron a sequedad todas las

muestras (sobrenadantes de deshibridización) y se resuspendieron en 400  $\mu$ L de agua MilliQ estéril. Se cuantificó la cantidad de ADN<sub>ss</sub> por absorbancia (Tabla 4-13).

Muestra	m <sub>ADN</sub> (ng)	
	PCR-biotina	PCR-control
Inicial	1740 (ADN <sub>ds</sub> )	2040 (ADN <sub>ds</sub> )
Agua 20°C	ND	ND
Agua 90°C	868 (ADN <sub>ss</sub> )	238 (ADN <sub>ss</sub> )

Tabla 4-13. Resultados medidos por absorbancia para la incubación de **PCR-biotina** y del **PCR-control** con los *Dynabeads M-280 Streptavidin*. ND: No detectable.

Como se observa en la Tabla 4-13, no se observó recuperación de las muestras al incubar los *beads* en agua MilliQ estéril a 20°C. En el caso de la incubación de la **PCR-biotina** (ADN<sub>ds</sub>) con los *Dynabeads M-280 Streptavidin* en agua MilliQ estéril a 90°C, se observó una recuperación de casi el 100% de muestra (ADN<sub>ss</sub>). Esto no ocurre en el caso de la **PCR-control**, donde se utilizó un *primer* sin biotina, y por lo tanto, la unión a los *beads* se debería haber dado únicamente de forma inespecífica. En ese caso, la cantidad de ADN<sub>ss</sub> obtenido, luego de la incubación a 90°C, es mucho menor (aproximadamente 20%). Aún considerando dicha interacción inespecífica, en el caso de la PCR-biotina, se obtuvo una efectiva recuperación de la secuencia de interés. De esta manera, se corroboró la eficiencia de los *Dynabeads M-280 Streptavidin*, para la selección de una única hebra en los productos de PCR.

#### 4.5. Desarrollo de los ciclos de selección-amplificación (SELEX)

Una vez optimizado el diseño del proceso de SELEX, se llevó a cabo el primer ciclo de selección. El proceso debe repetirse para disminuir la diversidad poblacional de los aptámeros y obtener, finalmente, un número discreto de candidatos. Si bien no puede establecerse *a priori* un número exacto de ciclos para alcanzar dicho valor de corte, resultados bibliográficos previos indican que en general son suficientes alrededor de diez ciclos de selección. Se seguirá la fracción de ADN<sub>ss</sub> ligada en la fase sólida por fluorescencia y cuando dicha fracción haya alcanzado un estado estacionario, se tomará ese evento como criterio de corte<sup>192</sup>.

De forma tal de eliminar del *pool* inicial de ADN (**BiblioADN<sub>ss</sub>**), las secuencias con afinidad por el soporte sólido y/o *linker* inmovilizado sobre el mismo, los primeros dos ciclos de selección (**Ciclo 1** y **Ciclo 2**) fueron realizados con la pre-columna de selección (ver 4.3., SELEX-Negativa)<sup>144,180</sup>.

#### 4.5.1. Ciclo 1: SELEX-Negativa

Para el proceso de SELEX-Negativa se trabajó con los *BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads* modificados con el *linker* (4, 2-(2-aminoetoxi)etanol). Un esquema del protocolo general seguido para el proceso se muestra en la *Figura 4-38*.

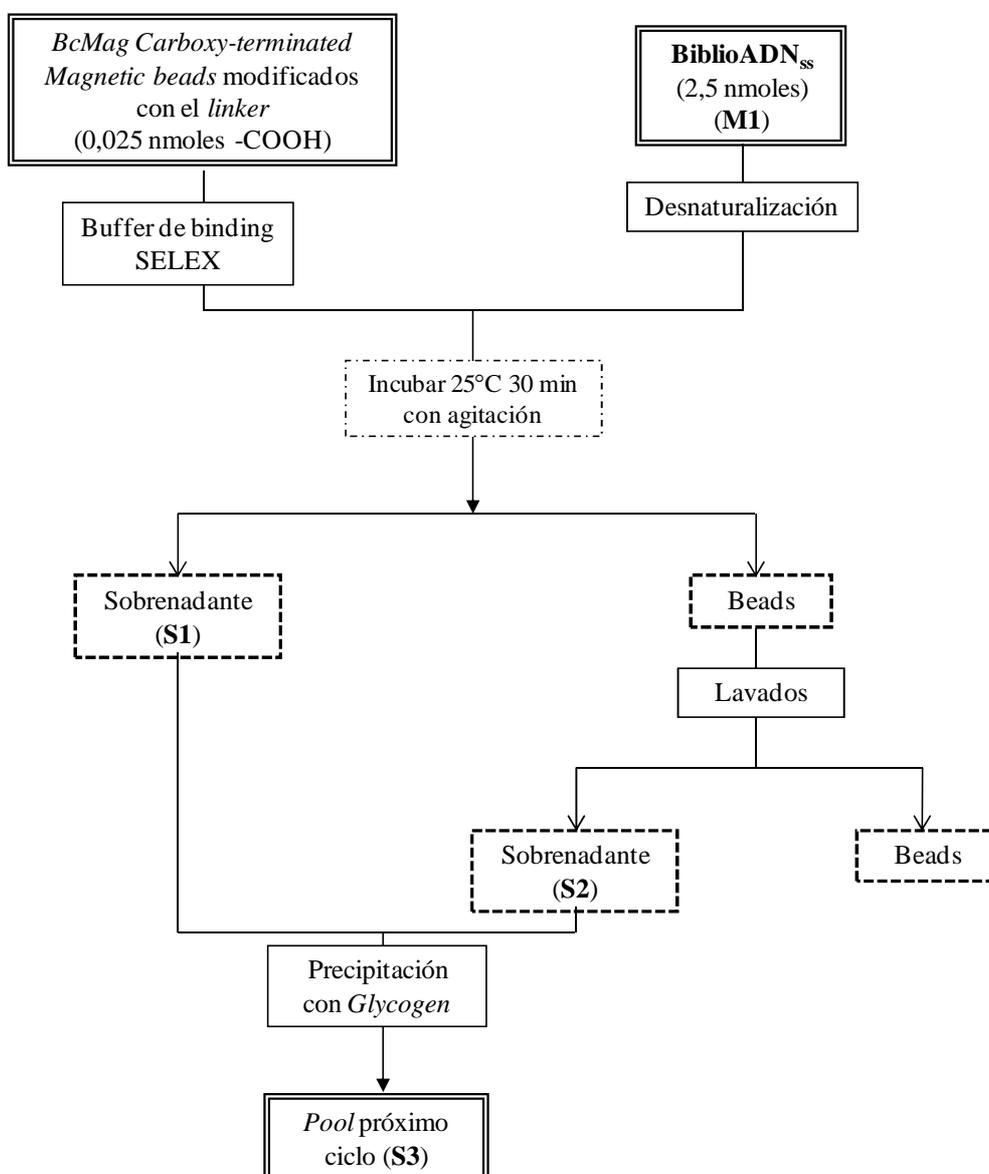


Figura 4-38. Esquema general de SELEX-Negativa.

Se partió de 2,5 nmoles de **BiblioADN<sub>ss</sub>**<sup>181</sup>, los cuales se sometieron a un tratamiento térmico inicial. Esta desnaturalización y re-naturalización del ADN<sub>ss</sub> permite que al ponerse en contacto con el *target*, se pueda formar una estructura tridimensional estable (ver **1.4.3.1.**)<sup>183</sup>.

Se debe tener cuidado al elegir el buffer de selección para el experimento<sup>176</sup>. Como el esqueleto del ADN es polianiónico, la repulsión de cargas puede inhibir la formación de estructuras complejas en ausencia de contraiones como por ejemplo, el catión Na<sup>+</sup>. Los cationes divalentes en particular, como el Mg<sup>+2</sup>, forman pares iónicos más cerrados que permiten que el esqueleto se pliegue de forma más rígida. Se sabe que los aptámeros con mayor constante de afinidad presentan una menor dependencia de la concentración de iones Mg<sup>+2</sup> que los aptámeros cuya constante de afinidad es menor<sup>193</sup>. Por lo tanto, llevar adelante el proceso de SELEX con una concentración baja de magnesio, como las condiciones fisiológicas (entre 1 y 2,5 mM), puede aumentar la exigencia de las condiciones de selección, permitiendo la obtención de aptámeros con alta afinidad por sus *targets*. Se utilizó, por lo tanto, un buffer de selección (Buffer de *binding* SELEX, ver **2.1.8.12.**) acorde a estas necesidades.

Dicho *pool* de ADN<sub>ss</sub> (**M1**) se incubó con los *beads*, de forma tal de tener dos órdenes de exceso de moles de ADN con respecto a la cantidad de moles de grupos carboxílicos en los *beads* (0,025 nmoles de –COOH). Se separó el sobrenadante magnéticamente (**S1**) y se juntó con el sobrenadante obtenido luego del lavado de los *beads* (**S2**). Se precipitó la muestra obtenida (**S1 + S2**) con *Glycogen* (ver **2.14.2.1.**) y se resuspendió para obtener el nuevo *pool* (**S3**) a ser utilizado en el próximo ciclo de SELEX-Negativa (**Ciclo 2**). Se cuantificaron por absorbancia todas las muestras de forma tal de corroborar la recuperación del ADN (*Tabla 4-14*).

Muestra	Volumen (µL)	[ADN <sub>ss</sub> ] (ng/µL)	Masa (ng)
<b>M1</b>	500	152	76000
<b>S1</b>	500	149	74500
<b>S2</b>	100	15	1500
<b>S3</b>	400	160	64000

*Tabla 4-14.* Resultados obtenidos por absorbancia de las muestras del **Ciclo 1** del proceso de SELEX.

Como se observa en la Tabla 4-14, existe una mínima interacción inespecífica entre la **BiblioADN<sub>ss</sub>** y los beads modificados con el linker. Esto se evidencia al cuantificar la masa de **ADN<sub>ss</sub>** presente en el sobrenadante luego de la incubación (**S1**), la cual es prácticamente similar a la masa inicial incubada (**M1**). Por otro lado, se observa una recuperación, luego de la precipitación con *glycogen*, de aproximadamente el 86% (**S1** y **S3**). Debido a la elevada masa obtenida luego de la precipitación, no se consideró necesario realizar una amplificación de la misma y se utilizó directamente dicha muestra como *pool* para el próximo ciclo.

#### 4.5.2. Ciclo 2: SELEX-Negativa

Se prosiguió, entonces, con la muestra **S3**, la cual se evaporó a sequedad y el pellet se resuspendió en el Buffer de *binding* SELEX (**M2**, ver 2.15.), para ser utilizado como *pool* inicial en el segundo ciclo de selección, dónde también se realizó una SELEX-Negativa.

Dicho *pool* de **ADN<sub>ss</sub>** (**M2**) se incubó con una porción nueva de *beads* modificados con el *linker* (ver Figura 4-38). Se separó el sobrenadante magnéticamente (**S4**) y se juntó con el sobrenadante obtenido luego del lavado de los *beads* (**S5**). Se precipitó la muestra obtenida (**S4** + **S5**) con *glycogen* y se resuspendió para obtener el nuevo *pool* (**S6**) a ser utilizado en el próximo ciclo de SELEX (**Ciclo 3**). Se cuantificaron por absorbancia todas las muestras de forma tal de corroborar la recuperación del ADN (Tabla 4-15).

Muestra	Volumen (μL)	[ADN <sub>ss</sub> ] (ng/μL)	Masa (ng)
<b>M2</b>	500	120	60000
<b>S4</b>	500	130	55000
<b>S5</b>	100	1,5	150
<b>S6</b>	400	88	35200

Tabla 4-15. Resultados obtenidos por absorbancia de las muestras del **Ciclo 2** del proceso de SELEX.

Como se observa en la Tabla 4-15, al igual que en el caso del **Ciclo 1**, la interacción inespecífica entre la **BiblioADN<sub>ss</sub>** y los beads modificados con el linker es mínima. En este caso, la recuperación de la **BiblioADN<sub>ss</sub>** luego del lavado de los beads

resultó un orden menor que en el caso del **Ciclo 1 (S2 vs. S5)**. Finalmente, la recuperación, luego de la precipitación con *glycogen*, resultó también menor en este segundo ciclo (65%). Aún así, nuevamente no se consideró necesario realizar una amplificación de la misma y se dejó dicha muestra como *pool* para el próximo ciclo.

#### 4.6. Conclusión

Se sintetizó el *target*, **CPCA-NH<sub>2</sub>**, partiendo del formulado comercial de la **deltametrina** e incorporándole el *linker*.

Se pusieron a punto las condiciones de derivatización, tanto del **CPCA-NH<sub>2</sub>** como del **CPCA**, de forma tal de poder cuantificar ambos compuestos durante la inmovilización sobre el soporte sólido.

Se corroboró la efectiva inmovilización del **CPCA-NH<sub>2</sub>** sobre los *BcMag Carboxy-terminated Magnetic beads* (soporte sólido) para ser usados en la primera etapa del proceso de SELEX.

Se trabajó sobre el diseño del proceso de SELEX, teniendo en cuenta todas las etapas que involucra, como así también, las diferentes técnicas, tanto de control, como de cuantificación y de purificación del *pool* de ADN que se utiliza en los ciclos.

Se llevaron a cabo los dos primeros ciclos del proceso de SELEX diseñado, descontándose del *pool* inicial de ADN (**BiblioADN<sub>ss</sub>**) las secuencias que presentan afinidad tanto por el soporte sólido como por el *linker* (SELEX-Negativa), y obteniéndose el *pool* inicial para el tercer ciclo del proceso.

## *Capítulo 5*

**Conclusiones Generales**

**Proyecciones a futuro**

### 5.1. Sistema modelo: adenosina

Se desarrolló un aptasensor electroquímico (E-AB) para adenosina del tipo *target-induced structure switching* (TISS), usando como anclaje a la superficie del electrodo (oro) un grupo fosfortioato (Ts). Previamente, se caracterizó dicho anclaje por técnicas radioquímicas y electroquímicas, obteniéndose valores de densidad superficial y de porcentaje de remoción térmica (estabilidad) comparables a los obtenidos en las mismas condiciones para el anclaje tradicional vía tiol. Para la detección electroquímica se introdujo en la secuencia aptamérica un grupo ferroceno (Fc) como marcador electroactivo en fase heterogénea, previa inmovilización del aptámero a la superficie del electrodo. La señal de Fc originada por exposición a adenosina de la capa de biorreconocimiento fue medida por voltametría de onda cuadrada, obteniéndose una respuesta lineal en el rango de concentraciones de 4  $\mu\text{M}$  – 20  $\mu\text{M}$ .

Si bien se logró cuantificar a la adenosina, el desafío en la detección de moléculas orgánicas pequeñas radica en potenciar el cambio conformacional que ocurre cuando el aptámero reconoce al *target*, de forma tal de disminuir los límites de detección obtenidos. En ese sentido, se hicieron aportes para el armado de un aptasensor de tipo *target-responsive electrochemical aptamer switch* (TREAS). Se evaluaron, en solución, las condiciones de armado de las secuencias de ADN<sub>ds</sub> (aptámero + secuencia complementaria) y de reconocimiento de la adenosina.

### 5.2. Producto fitosanitario de interés ambiental: deltametrina

Se avanzó en el diseño del proceso de FluMagSELEX para la obtención de un aptámero contra deltametrina, optimizando las diferentes etapas del proceso para el *target* en cuestión. Dichas etapas involucraron aspectos relacionados tanto con la inmovilización del *target* como con diversas técnicas de biología molecular y de control como también de cuantificación de las secuencias de ADN (electroforesis planar, precipitación, amplificación, deshibridización selectiva). Al trabajar con una molécula pequeña, se comenzó inmovilizando la misma sobre los *BcMag Carboxy-terminated Magnetic Beads*. Se corroboró dicha inmovilización por CG-ECD. Se realizaron los primeros ciclos del proceso (SELEX-Negativa) de forma tal de descontar las secuencias con afinidad por el *linker* y/o el soporte sólido.

### 5.3. Proyecciones a futuro

Se planea terminar con el proceso de SELEX para deltametrina de forma de obtener un aptámero para dicho *target*. Las secuencias resultantes del último ciclo de selección se deben amplificar y clonar para poder ser secuenciadas. De esta forma se obtendría la secuencia consenso para el aptámero contra deltametrina. Una vez conocida la secuencia, se debe sintetizar la misma químicamente y determinar la constante de disociación ( $K_D$ ) aptámero-deltametrina. Para ello, se puede utilizar el protocolo de determinación de la curva de saturación y extraer el valor de  $K_D$  utilizando una regresión no lineal.

Una vez finalizado el desarrollo del aptámero de deltametrina se procederá a aplicar sobre dicha secuencia los resultados obtenidos en el estudio de las estrategias de inmovilización desarrollados en forma paralela con el sistema modelo. Asimismo, se aplicará sobre la secuencia consenso del aptámero de deltametrina los mejores resultados sobre la exploración de distintas arquitecturas de electrodo. Se debe evaluar, también, la estabilidad del aptámero frente a diferentes matrices ambientales

Si bien esta propuesta de trabajo se centra en la aplicación de los aptámeros en torno al problema de la contaminación ambiental, la puesta a punto de todas las técnicas antes mencionadas, tanto para obtener el aptámero, como para su inmovilización sobre una superficie conductora y la optimización de las estrategias de desarrollo de señal, contribuyen al conocimiento que luego podrá aplicarse a otro tipo de contaminantes ambientales y otros campos de interés, como por ejemplo el de la determinación de trazadores bioquímicos en fluidos biológicos, o la determinación de sustancias de uso restringido (drogas o precursores).

## Bibliografía

---

- (1) T. Dyson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 5929-5936.
- (2) *GEO América Latina y el Caribe. Perspectivas del medio ambiente*, ISBN: 92-807-2295-6, **2003**.
- (3) publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/cdsMCS/05/pub.msan/base\_agenda.pdf
- (4) *Contaminación de suelos y aguas por agroquímicos en sistemas de cultivo intensivos de diferentes regiones del país. Proyecto INTA-Castelar*, **2003**.
- (5) (a) J. Angerer, A. Riter. *J. Chromatogr. B*, **1997**, 695, 217-226. (b) X.-H. Wang, S. Wang. *Sensors*, **2008**, 8, 6045-6054. (c) D. Lu, D. Wang, C. Feng, Y'e. Jin, Z. Zhou, C. Wu, Y. Lin, G. Wang. *Environ. International*, **2013**, 60, 137-144.
- (6) G. Leng, K.-H. Kühn, A. Leng, W. Gries, J. Lewalter, H. Idel. *Chromatographia*, **1997**, 46, 265-274.
- (7) J. Wu, Y. Lin, J. Lu, C. Wilson. *Science Total Environ.*, **2011**, 409, 3482-3491.
- (8) *La investigación científica y tecnológica en Argentina. Diagnóstico e identificación de áreas de vacancia. Secretaría de Ciencia y Tecnología. Ministerio de Cultura y Educación. República Argentina*, **1999**, 118-119.
- (9) J.-G. Walter, A. Heilkenbrinker, J. Austerjost, S. Timur, F. Stahl, T. Scheper. *Z. Naturforsch.*, **2012**, 67b, 976-986.
- (10) A. Hulanicki, S. Geab, F. Ingman. *Chemical Sensors. Definitions and classification in Analytical Chemistry Division, Commission on General Aspects of Analytical Chemistry*, IUPAC, **1991**.
- (11) B. Van Dorst, J. Mehta, K. Bekaert, E. Rouah-Martin, W. De Coen, P. Dubruel, R. Blust, J. Robbens. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 26, 1178-1194.
- (12) L. S. Cock, A. M. Z. Arenas, A. A. Aponte. *Chilean J. Agric. Res.*, **2009**, 69, 270-280.
- (13) (a) G. Palleschi, M. Bernabei, C. Cremisini, M. Mascini. *Sens. Actuat. B.*, **1992**, 7, 513-517. (b) S. Andreescu, J.-L. Marty. *Biomol. Eng.*, **2006**, 23, 1-15.
- (14) D. M. Close, S. Ripp, G. S. Saylor. *Sensors*, **2009**, 9, 9147-9174.
- (15) S. T. Chang, H. J. Lee, M. B. Gu. *Sens. Actuat. B*, **2004**, 97, 272-276.
- (16) S. Leth, S. Maltoni, R. Simkus, B. Mattiasson, P. Corbisier, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, E. Csöregi. *Electroanalysis*, **2002**, 14, 35-42.

- (17) (a) R. J. Schneider. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 375, 44-46. (b) B. Byrne, E. Stack, N. Gilmartin, R. O’Kennedy. *Sensors*, **2009**, 9, 4407-4445.
- (18) (a) S. J. Daly, P. P. Dillon, B. M. Manning, L. Dunne, A. Killard, R.O’Kennedy. *Food Agricul. Immunol.*, **2002**, 14, 255-274. (b) M. Cerruti, J. Jaworski, D. Raorane, C. Zueger, J. Varadarajan, C. Carraro, S.-W. Lee, R. Maboudian, A. Majumdar. *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 4192-4199.
- (19) E. Pardieu, H. Cheap, C. Vedrine, M. Lazerges, Y. Lattach, F. Garnier, S. Remita, C. Pernelle. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 649, 236-245.
- (20) (a) M. Egli, W. Saenger. *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, **1984**. (b) V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco, J. E. Hearst, D. E. Wemmer, P. A. Killman, D. H. Turner. *Nucleic Acids: Structure, properties and functions*, University Science Books, **2000**.
- (21) (a) S. L. Beaucage, M. H. Caruthers. *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 1859-1862. (b) S. L. Beaucage, M. H. Caruthers. *Curr. Protocols Nucleic Acid Chem.*, **2000**, 3.3.1-3.3.20.
- (22) J. D. Watson, F. H. C. Crick. *Nature*, **1953**, 171, 737-738.
- (23) K. Hoogsteen. *Acta Cryst.*, **1963**, 16, 907-916.
- (24) F. H. C. Crick. *J. Mol. Biol.*, **1966**, 19, 548-555.
- (25) B. Tian, P. C. Bevilacqua, A. Diegelman-Parente, M. B. Mathews. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2004**, 5, 1013-1023.
- (26) P. Yakovchuk, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 564-574.
- (27) H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 235-242.
- (28) (a) D. L. Robertson, G. F. Joyce. *Nature*, **1990**, 344, 467-468. (b) A. D. Ellington, J. W. Szostak. *Nature*, **1990**, 346, 818-822. (c) C. Tuerk, L. Gold. *Science*, **1990** 249, 505-510.
- (29) (a) W. James. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, **2000**, 4848-4871. (b) S. Klussmnan, *The Aptamer Handbook: Functional oligonucleotides and their applications*. Wiley-VCH, **2007**.
- (30) M. Famulok. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **1999**, 9, 324-329.
- (31) D. E. Huizenga, J. W. Szostak. *Biochem.*, **1995**, 34, 656-665.
- (32) L. R. Paborsky, S. N. McCurdy, L. C. Griffin, J. J. Toole, L. L. K. Leung. *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 20808-20811.

- (33) (a) D. A. Daniels, H. Chen, B. J. Hicke, K. M. Swiderek, L. Gold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 15416-15421. (b) L. Cerchia, V. de Franciscis. *Trends Biotechnol.*, **2010**, 28, 517-525.
- (34) (a) C. K. O'Sullivan. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 372, 44-48. (b) K. M. You, S. H. Lee, A. Im, S. B. Lee. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **2003**, 8, 64-75.
- (35) G. Mayer. *Angew. Chem. In. Ed. Engl.*, **2009**, 48, 2672-2689.
- (36) J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, O. C. Uhlenbeck. *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 8783-8798.
- (37) S. C. B. Gopinath. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 387, 171-182.
- (38) R. B. Tracy, S. C. Kowalczykowski. *Genes Dev.*, **1996**, 10, 1890-1903.
- (39) P. K. R. Kumar, S. C. B. Gopinath, T. Misono, K. Kawasaki. *Japanese patent*, **2004**, JP2004-293679.
- (40) S. D. Jayasena. *Clin. Chem.*, **1999**, 45, 1628-1650.
- (41) J. C. Cox, P. Rudolph, A. D. Ellington. *Biotechnol. Prog.*, **1998**, 14, 845-850.
- (42) R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky. *Science*, **1994**, 263, 1425-1429.
- (43) X. Lou, J. Qian, Y. Xiao, L. Viel, A. E. Gerdon, E. T. Lagally, P. Atzberger, T. M. Tarasow, A. J. Heeger, H. T. Soh. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2009**, 106, 2989-2994.
- (44) M. Berezovski, A. Drabovich, S. M. Krylova, M. Musheev, V. Okhonin, A. Petrov, S. N. Krylov. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 3165-3171.
- (45) A. D. Kent, N. G. Spiropulos, J. M. Heemstra. *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 9916-9923.
- (46) D. S. Wilson, J. W. Szostak. *Annu. Rev. Biochem.*, **1999**, 68, 611-647.
- (47) S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini. *Biomol. Eng.*, **2007**, 24, 191-200.
- (48) G. Bonner, A. M. Klibanov. *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, 68, 339-344.
- (49) E. Torres-Chavolla, E. C. Alocilja. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 3175-3182.
- (50) A. A. Haller, P. Sarnow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 8521-8526.
- (51) C. Mannironi, A. D. Nardo, P. Fruscoloni, G. P. Tocchini-Valentini. *Biochem.*, **1997**, 36, 9726-9734.
- (52) *Enzyme linked oligonucleotide assays (ELONAs)*, **USP 5,789,163**.
- (53) D. Proske, M. Blank, R. Buhmann, A. Resch. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2005**, 69, 367-374.
- (54) M. Famulok, G. Mayer, M. Blind. *Acc. Chem. Res.*, **2000**, 33, 591-599.
- (55) E. Uhlmann, A. Peyman, A. Rytte, A. Schmidt, E. Buddecke. *Methods Enzymol.*, **2000**, 313, 268-284.

- (56) A. Adler, N. Forster, M. Homann, H. U. Göringer. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, **2008**, 11, 16-23.
- (57) A. D. Keefe, S. T. Cload. *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2008**, 12, 448-456.
- (58) Y. Huang, F. Eckstein, R. Padilla, R. Sousa. *Biochem.*, **1997**, 36, 8231-8242.
- (59) J. Chelliserrykattil, A. D. Ellington. *Nat. Biotechnol.*, **2004**, 22, 1155-1160.
- (60) Y. Lin, Q. Qiu, S. C. Gill, S. D. Jayasena. *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 5229-5234.
- (61) D. Jellinek, L. S. Green, C. Bell, C. K. Lynott, N. Gill, C. Vargeese, G. Kirschenheuter, D. P. C. McGee, P. Abesinghe, W. A. Pieken, R. Shapiro, D. B. Rifkin, D. Moscatelli, N. Janjić. *Biochem.*, **1995**, 34, 11363-11372.
- (62) U. Chakravarthy, A. P. Adamis, E. T. Cunningham Jr., M. Goldbaum, D. R. Guyer, B. Katz, M. Patel. *Ophthalmology*, **2006**, 113, e1501-1525.
- (63) P. E. Burmeister, S. D. Lewis, R. F. Silva, J. R. Preiss, L. R. Horwitz, P. S. Pendergrast, T. G. McCauley, J. C. Kurz, D. M. Epstein, C. Wilson, A. D. Keefe. *Chem. Biol.*, **2005**, 12, 25-33.
- (64) P. E. Burmeister, C. Wang, J. R. Killough, S. D. Lewis, L. R. Horwitz, A. Ferguson, K. M. Thompson, P. S. Pendergrast, T. G. McCauley, M. Kurz, J. Diener, S. T. Cload, C. Wilson, A. D. Keefe. *Oligonucleotides*, **2006**, 16, 337-351.
- (65) K. W. Porter, J. D. Briley, B. R. Shaw. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25, 1611-1617.
- (66) S. M. Lato, N. D. S. Ozerova, K. He, Z. Sergueeva, B. R. Shaw, D. H. Burke. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 1401-1407.
- (67) J. A. Latham, R. Johnson, J. J. Toole. *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 2817-2822.
- (68) L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole. *Nature*, **1992**, 355, 564-566.
- (69) N. K. Vaish, R. Larralde, A. W. Fraley, J. W. Szostak, L. W. McLaughlin. *Biochem.*, **2003**, 42, 8842-8851.
- (70) Y. Kato, N. Minakawa, Y. Komatsu, H. Kamiya, N. Ogawa, H. Harashima, A. Matsuda. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 2942-2951.
- (71) J. Kang, M. S. Lee, S. J. Watowich, D. G. Gorenstein. *FEBS Lett.*, **2007**, 581, 2497-2502.
- (72) (a) C. A. Stein. *Chem. Biol.*, **1996**, 3, 319-323. (b) C. A. Stein. *Trends Biotechnol.*, **1996**, 14, 147-149.
- (73) A. Nolte, S. Klußmann, R. Bald, V. A. Erdmann, J. P. Fürste. *Nat. Biotechnol.*, **1996**, 14, 1116-1119.

- (74) S. Klußmann, A. Nolte, R. Bald, V. A. Erdmann, J. P. Fürste. *Nat. Biotechnol.*, **1996**, 14, 1112-1115.
- (75) D. Eulberg, S. Klusmann. *ChemBiochem*, **2003**, 4, 979-983.
- (76) E. Luzi, M. Minunni, S. Tombelli, M. Mascini. *Trends Anal. Chem.*, **2003**, 22, 810-818.
- (77) (a) S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 8735-8738. (b) S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J. Andoh, K. Morio, T. Doi, T. Imanishi. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 5401-5404. (c) S. K. Singh, P. Nielsen, A. A. Koshkin, J. Wengel. *Chem. Commun.*, **1998**, 455-456.
- (78) (a) Y. Mitsuoka, T. Kodama, R. Ohnishi, Y. Hari, T. Imanishi, S. Obika. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, 37, 1225-1238. (b) K. R. Ito, T. Kodama, M. Tomizu, Y. Negoro, A. Orita, T. Osaki, N. Hosoki, T. Tanaka, T. Imanishi, S. Obika. *Nucleic Acids Res.*, **2010**, 38, 7332-7342.
- (79) Y. Kasahara, Y. Irisawa, H. Ozaki, S. Obika, M. Kuwahara. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 1288-1292.
- (80) S. Balamurugan, A. Obubuafo, S. A. Soper, D. A. Spivak. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 390, 1009-1021.
- (81) Y. C. Lim, A. Z. Kouzani, W. Duan. *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2010**, 6, 93-105.
- (82) M. Liss, B. Peterson, H. Wolf, E. Prohaska. *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 4488-4495.
- (83) L. Shen, Z. Chen, Y. Li, P. Jing, S. Xie, S. He, P. He, Y. Shao. *Chem. Commun.*, **2007**, 2169-2171.
- (84) J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides. *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1103-1169.
- (85) (a) T. M. Herne, M. J. Tarlov. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 8916-8920. (b) R. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov, S. K. Satija. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 9787-9792. (c) A. B. Steel, R. L. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov. *Biophys. J.*, **2000**, 79, 975-981.
- (86) (a) C.-Y. Lee, P. Gong, G. M. Harbers, D.W. Grainger, D. G. Castner, L. J. Gamble. *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 3316-3325. (b) P. Gong, C.-H. Lee, L. J. Gamble, D. G. Castner, D.W. Grainger. *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 3326-3334.
- (87) R. Campos, A. Kotlyar, E. E. Ferapontova. *Langmuir*, **2014**, 30, 11853-11857.
- (88) R. P. Iyer, W. Eagan, J. B. Reagan, S. L. Beaucage. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1253-1254.
- (89) F. Wei, C.-M. Ho. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 393, 1943-1948.

- (90) C. Yao, T. Zhu, Y. Qi, Y. Zhao, H. Xia, W. Fu. *Sensors*, **2010**, 10, 5859-5871.
- (91) K Maehashi, T. Katsura, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto, E. Tamiya. *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 782-787.
- (92) P. Kara, A. de la Escosura-Muñiz, M. Maltez-da Costa, M. Guix, M. Ozsoz, A. Merkoçi. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 26, 1715–1718.
- (93) R. A. Potyrailo, R. C. Conrad, A. D. Ellington, G. M. Hieftje. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3419-3425.
- (94) D. Ho, K. Falter, P. Severin, H. E. Gaub. *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 3159-3164.
- (95) C. H. Lin, D. J. Patel. *Chem. Biol.*, **1997**, 4, 817-832.
- (96) M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 4928-4931.
- (97) G. R. Zimmermann, R. D. Jenison, C. L. Wick, J.-P. Simorre, A. Pardi. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **1997**, 4, 644-649.
- (98) K. Han, Z. Liang, N. Zhou. *Sensors*, **2010**, 10, 4541-4557.
- (99) A.-E. Radi, J. L. A. Sánchez, E. Baldrich, C. K. O’Sullivan. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 117-124.
- (100) X. Zuo, S. Song, J. Zhang, D. Pan, L. Wang, C. Fan. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 1042-1043.
- (101) A. Chen, S. Chatterjee. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 5425-5438.
- (102) Y. Li, H. Qi, Y. Peng, J. Yang, C. Zhang. *Electrochem. Commun.*, **2007**, 9, 2571-2575.
- (103) E. E. Ferapontova, E. M. Olsen, K. V. Gothelf. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 4256-4258.
- (104) L. Fan, G. Zhao, H. Shi, M. Liu, Z. Li. *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 63, 12-18.
- (105) Y. Xiao, A. A. Lubin, A. J. Heeger, K. W. Plaxco. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 5456-5459.
- (106) R. Nutiu, Y. Li. *Methods*, **2005**, 37, 16-25.
- (107) R. Yamamoto, P. K. R. Kumar. *Genes Cells*, **2000**, 5, 389-396.
- (108) R. Nutiu, Y. Li. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4771-4778.
- (109) W. Wang, C. Chen, M. X. Qian, X. S. Zhao. *Sens. Actuat. B.*, **2008**, 129, 211-217.
- (110) J. Chen, Z. Fang, J. Liu, L. Zeng. *Food Control*, **2012**, 25, 555-560.
- (111) J. Wang, L. Wang, X. Liu, Z. Liang, S. Song, W. Li, G. Li, C. Fan. *Adv. Mater.*, **2007**, 19, 3943-3946.
- (112) H. Shi, G. Zhao, M. Liu, L. Fan, T. Cao. *J. Hazar. Mat.*, **2013**, 260, 754-761.

- (113) T. M. A. Gronewold, S. Glass, E. Quandt, M. Famulok. *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20, 2044-2052.
- (114) J. Wang, H. S. Zhou. *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 7174-7178.
- (115) L. M. Furtado, H. Su, M. Thompson. *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 1167-1175.
- (116) K. Min, M. Cho, S.-Y. Han, Y.-B. Shim, J. Ku, C. Ban. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 23, 1819-1824.
- (117) J. Wang, W. Meng, Z. Zheng, S. Liu, G. Li. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24, 1598-1602.
- (118) X. Zuo, Y. Xiao, K. W. Plaxco. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 6944-6945.
- (119) Y. Lu, X. Li, L. Zhang, P. Yu, L. Su, L. Mao. *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 1883-1890.
- (120) K. Feng, C. Sun, Y. Kang, J. Chen, J.-H. Jiang, G.-L. Shen, R.-Q. Yu. *Electrochem. Commun.*, **2008**, 10, 531-535.
- (121) Z.-S. Wu, M.-M. Guo, S.-B. Zhang, C.-R. Chen, J.-H. Jiang, G.-L. Shen, R.-Q. Yu. *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 2933-2939.
- (122) K. Han, L. Chen, Z. Lin, G. Li. *Electrochem. Commun.*, **2009**, 11, 157-160.
- (123) N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 3808-3809.
- (124) A. Bini, M. Minunni, S. Tombelli, S. Centi, M. Mascini. *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 3016-3019.
- (125) E. Baldrich, A. Restrepo, C. K. O'Sullivan. *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 7053-7063.
- (126) T. Hianik, V. Ostatná, M. Sonlajtnerova, I. Grman. *Bioelectrochem.*, **2007**, 70, 127-133.
- (127) Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Archivo: *Structural basis or DNA folding and recognition in AMP/DNA aptamer complex, NMR, 7 structures* (1aw4).
- (128) R. C. Gilden, K. Huffling, B. Sattler. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.*, **2010**, 39, 103-110.
- (129) T. J. Class, J. Kintrup. *Anal. Chem.*, **1991**, 340, 446-453.
- (130) F. J. Arrebola, J. L. Martínez-Vidal, A. Fernández-Gutiérrez, M. H. Akhtar. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 401, 45-54.
- (131) J. Miyamoto, H. Kaneko, R. Tsuji, Y. Okuno. *Toxicol. Lett.*, **1995**, 82/83, 933-940.
- (132) K. Velíšek, J. Jurčíková, R. Dobšíková, Z. Svobodová, V. Piačová, J. Máchová, L. Novotný. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2007**, 23, 297-301.

- (133) J. J. Jiménez, J. L. Bernal, M. J. del Nozal, J. Bernal, L. Toribio. *Food Chem.*, **2007**, 104, 216-223.
- (134) H. Bouwman, B. Sereda, H. M. Meinhardt. *Environ. Pollut.*, **2006**, 144, 902-917.
- (135) S. M. Barlow, F. M. Sullivan, J. Lines. *Food Chem. Toxicol.*, **2001**, 39, 407-422.
- (136) (a) M. D. Ortiz-Pérez, A. Torre-Dosal, L. E. Batres, O. D. López-Guzmán, M. Grimaldo, C. Carranza, I. N. Pérez-Maldonado, F. Martínez, J. Pérez-Urizar, F. Díaz-Barriga. *Environ. Health Perspect.* **2005**, 113, 782-786. (b) N. S. Tulve, P. A. Jones, M. G. Nishioka, R. C. Fortmann, C. W. Croghan, J. Y. Zhou, A. Fraser, C. Cave, W. Friedman. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 6269-6274.
- (137) F. A. Esteve-Turrillas, A. Pastor, M. de la Guardia. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 553, 50-57.
- (138) P. P. Vázquez, A. R. Mughari, M. M. Galera. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 607, 74-82.
- (139) C. Ferrer, M. J. Gomez, J. F. Garcia-Reyes, I. Ferrer, E. M. Thurman, A. R. F. Alba. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1069, 183-194.
- (140) H.-J. Lee, G. Shan, T. Watanabe, D. W. Stoutamire, S. J. Gee, B. D. Hammock. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 5526-5532.
- (141) S. Ge, C. Zhang, F. Yu, M. Yan, J. Yu. *Sens. Actuat. B*, **2011**, 156, 222-227.
- (142) L. M. G. Abegão, J. H. F. Ribeiro, P. A. Ribeiro, M. Raposo. *Sensors*, **2013**, 13, 10167-10176.
- (143) J. He, Y. Liu, M. Fan, X. Liu. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59, 1582-1586.
- (144) J. Mehta, E. Rouah-Martin, B. Van Dorst, B. Maes, W. Herrebout, M.-L. Scippo, F. Dardenne, R. Blust, J. Robbens. *Anal. Chem.*, **2012**, 84, 1669-1676.
- (145) E. Vianini, M. Palumbo, B. Gatto. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 2543-2548.
- (146) A. J. Bard, L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, 2<sup>nd</sup> Edición; Wiley: New York, **2000**.
- (147) (a) I. Biaggioni, T. J. Killian, R. Mosqueda-Garcia, R. M. Robertson, D. Robertson. *Circulation*, **1991**, 83, 1668-1675. (b) J. C. Shryock, L. Belardinelli. *Am. J. Cardiol.*, **1997**, 79, 2-10.
- (148) C. Yang, Q. Wang, Y. Xiang, R. Yuan, Y. Chai. *Sens. Actuat. B*, **2014**, 197, 149-154.
- (149) A. S. Peinetti, H. Ceretti, M. Mizrahi, G. A. González, S. A. Ramírez, F. G. Requejo, J. M. Montserrat, F. Battaglini. *Nanoscale*, **2015**, 7, 7763-7769.

- (150) (a) C. Fan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, 100, 9134-9137. (b) R. Y. Lai, E. T. Lagally, S.-H. Lee, H. T. Soh, K. W. Plaxco, A. J. Heeger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, 103, 4017-4021.
- (151) B. R. Baker, R. Y. Lai, McC. S. Wood, E. H. Doctor, A. J. Heeger, K. W. Plaxco. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 3138-3139
- (152) Y. Xiao, B. D. Piorek, K. W. Plaxco, A. J. Heeger. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 17990-17991.
- (153) A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 4670-4677.
- (154) (a) M. Nakayama, T. Ihara, K. Nakano, M. Maeda. *Talanta*, **2002**, 56, 857-866. (b) T. Ihara, M. Nakayama, M. Murata, K. Nakano, M. Maeda. *Chem. Commun.*, **1997**, 1609-1610. (c) H. Brisset, A.-E. Navarro, N. Spinelli, C. Chaix, B. Mandrand. *Biotechnol. J.*, **2006**, 1, 95-98.
- (155) (a) L. M. Demers, M. Östblom, H. Zhang, N.-H. Jang, B. Liedberg, C. A. Mirkin. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 11248-11249. (b) H. Kimura-Suda, D. Y. Petrovykh, M. J. Tarlov, L. J. Whitman. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 9014-9015.
- (156) Tesis de DCyT-UNGS de la Mg. Helena Ceretti.
- (157) R. Lao, S. Song, H. Wu, L. Wang, Z. Zhang, L. He, C. Fan. *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 6475-6480.
- (158) A. J. Bard, L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, 2<sup>nd</sup> ed.; Wiley: New York, **2000**, 14-15.
- (159) P. S. Ho, C. A. Frederick, D. Saal, A. H.-J. Wang, A. Rich. *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **1987**, 4, 521-534.
- (160) A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov. *Bioconjugate Chem.*, **1999**, 10, 419-423.
- (161) U. T. Rüegg, J. Rudinger. *Methods Enzimol.*, **1977**, 47, 111-126.
- (162) E. B. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke, P. R. Selvin. *Anal. Biochem.*, **1999**, 273, 73-80.
- (163) (a) Z. Li, L. Zhang, H. Mo, Y. Peng, H. Zhang, Z. Xu, C. Zheng, Z. Lu. *Analyst*, **2014**, 139, 3137-3145. (b) A. Ferrario, M. Scaramuzza, E. Pasqualotto, A. De Toni, A. Paccagnella. *J. Electroanal. Chem.*, **2013**, 689, 57-62.
- (164) L. Jiang, H. Zhang, J. Zhuang, B. Yang, W. Yang, T. Li, C. Sun. *Adv. Mater.*, **2005**, 17, 2066-2070.
- (165) R. J. White, N. Phares, A. A. Lubin, Y. Xiao, K. W. Plaxco. *Langmuir*, **2008**, 24, 10513-10518.

- (166) F. Ricci, R. Y. Lai, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, J. J. Summer. *Langmuir*, **2007**, 23, 6827-6834.
- (167) H. Ceretti, B. Ponce, S. A. Ramírez, J. M. Montserrat. *Electroanalysis*, **2010**, 22, 147 – 150.
- (168) T. Ihara, Y. Maruo, S. Takenaka, M. Takagi. *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 4273-4280.
- (169) S. Takenaka, Y. Uto, H. Kondo, T. Ihara, M. Takagi. *Anal. Biochemistry*, **1994**, 218, 436-443.
- (170) G. Priano, G. González, M. Günther, F. Battaglini. *Electroanalysis*, **2008**, 1, 91-97.
- (171) M. Zayats, Y. Huang, R. Gill, C.-an Ma, I. Willner. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 13666-13667.
- (172) R. B. Towery, N. C. Fawcett, P. Zhang, J. A. Evans. *Biosens. Bioelectron.*, **2001**, 16, 1-8.
- (173) B. Chakraborty, Z. Jiang, Y. Li, H.-Z. Yu., *J. Electroanal. Chem.*, **2009**, 635, 75-82.
- (174) R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz. *Biomol. Eng.*, **2007**, 24, 381-403.
- (175) S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini. *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20, 2424-2434.
- (176) M. McKeague, C. R. Bradley, A. De Girolamo, A. Visconti, J. D. Miller, M. C. DeRosa. *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, 11, 4864-4881.
- (177) R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 383, 83-91.
- (178) (a) S. E. Lupold, B. J. Hicke, Y. Lin, D. S. Coffey. *Cancer Res.*, **2002**, 62, 4029-4033. (b) M. B. Murphy, S. T. Fuller, P. M. Richardson, S. A. Doyle. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, e110.
- (179) (a) D. Mann, C. Reinemann, R. Stoltenburg, B. Strehlitz. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, 338, 1928-1934. (b) J. G. Bruno, J. L. Kiel. *BioTechniques*, **2002**, 32, 178-183.
- (180) J. Mehta, B. Van Dorst, E. Rouah-Martin, W. Herrebout, M.-L. Scippo, R. Blust, J. Robbens. *J. Biotechnol.*, **2011**, 155, 361-369.
- (181) S. Eissa, A. Ng, M. Siaj, A. C. Tavares, M. Zourob. *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 11794-11801.

- (182) (a) J. H. Niazi, S. J. Lee, M. B. Gu. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 7245-6253. (b) Y. S. Kim, C. J. Hyun, I. A. Kim, M. B. Gu. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18, 3467-3473. (c) J. H. Niazi, S. J. Lee, Y. S. Kim, M. B. Gu. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 1254-1261.
- (183) C. B. Joeng, J. H. Niazi, S. J. Lee, M. B. Gu. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 5380-5387.
- (184) H. Kataoka. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 733, 19-34.
- (185) X. Luo, M. McKeague, S. Pitre, M. Dumontier, J. Green, A. Golshani, M. C. DeRosa, F. Dehne. *RNA*, **2010**, 16, 2252-2262.
- (186) J. Sambrook, D. W. Russel. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed. edición). **2001**. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (187) M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky. *PCR Applications. Protocols for functional Genomics*. 4-6.
- (188) Multiplex PCR for specific recommendations on Fast Multiplex PCR using KAPA2G Fast. Biosystems.
- (189) R. Beinoravičiūtė-Kellner, G. Lipps, G. Krauss. *FEBS Lett.*, **2005**, 4535-4549.
- (190) A. D. Ellington, J. W. Szostak. *Nature*, **1992**, 355, 850-852.
- (191) D. J. Schneider, J. Feigon, Z. Hostomsky, L. Gold. *Biochem.*, 1995, 34, 9599-9610.
- (192) D. Grate, C. Wilson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 6131-6136.
- (193) J. M. Carothers, J. A. Goler, Y. Kapoor, L. Lara, J. D. Keasling. *Nucleic Acids Res.*, **2010**, 38, 2736-2747.

## Anexo

---

### Abreviaturas

3-MPA	3-mercaptopropiónico
A	Adenina
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosín monofosfato
Apt-ATP	Aptámero para ATP
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
AuNPS	Nanopartículas de oro
C	Citosina
c.c.d.	Cromatografía en capa delgada
C <sub>d</sub>	Capacidad
CG-EM	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa
CL-EM	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa
CPCA	Ácido 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanoico
CronoQ	Cronocoulombimetría
DB-MS	<i>Dynabeads M-280 Streptavidin</i>
DCC	<i>N,N'</i> -d ciclohexilcarbodiimida
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIPEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT <sub>r</sub>	Dimetóxitritilo
ds	Doble cadena
ECD	Detector de captura de electrones
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
ELISA	Ensayos inmunoquímicos acoplados a enzimas
EtOH	Etanol
eT	Transferencia de carga

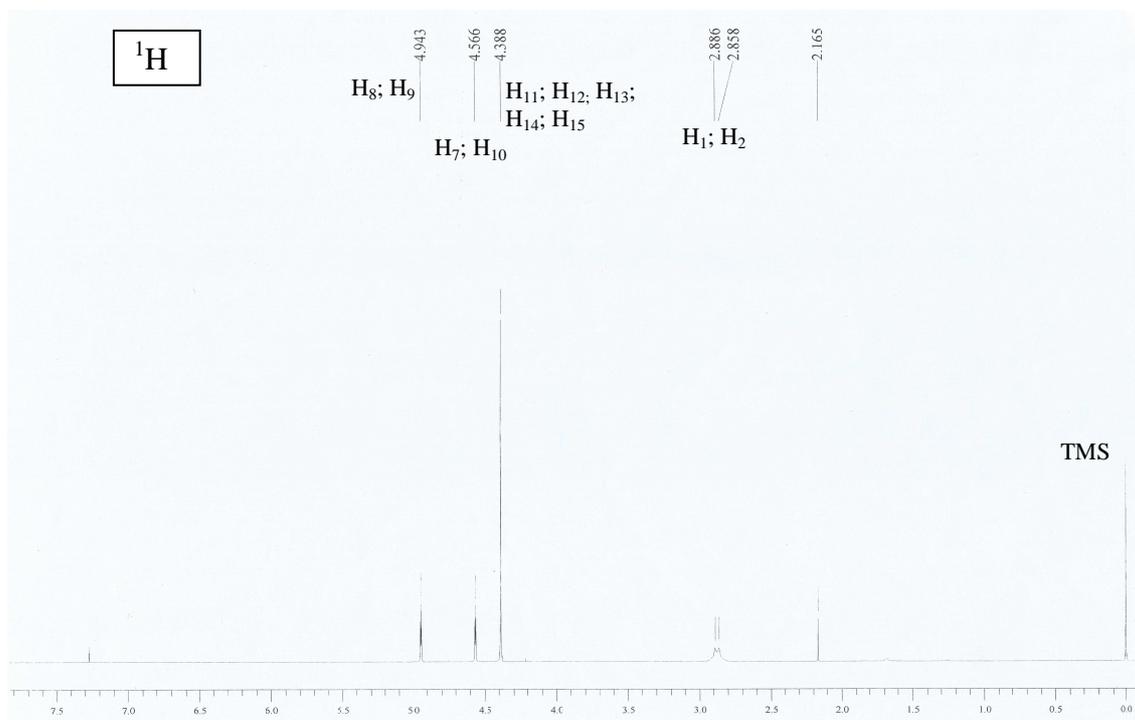
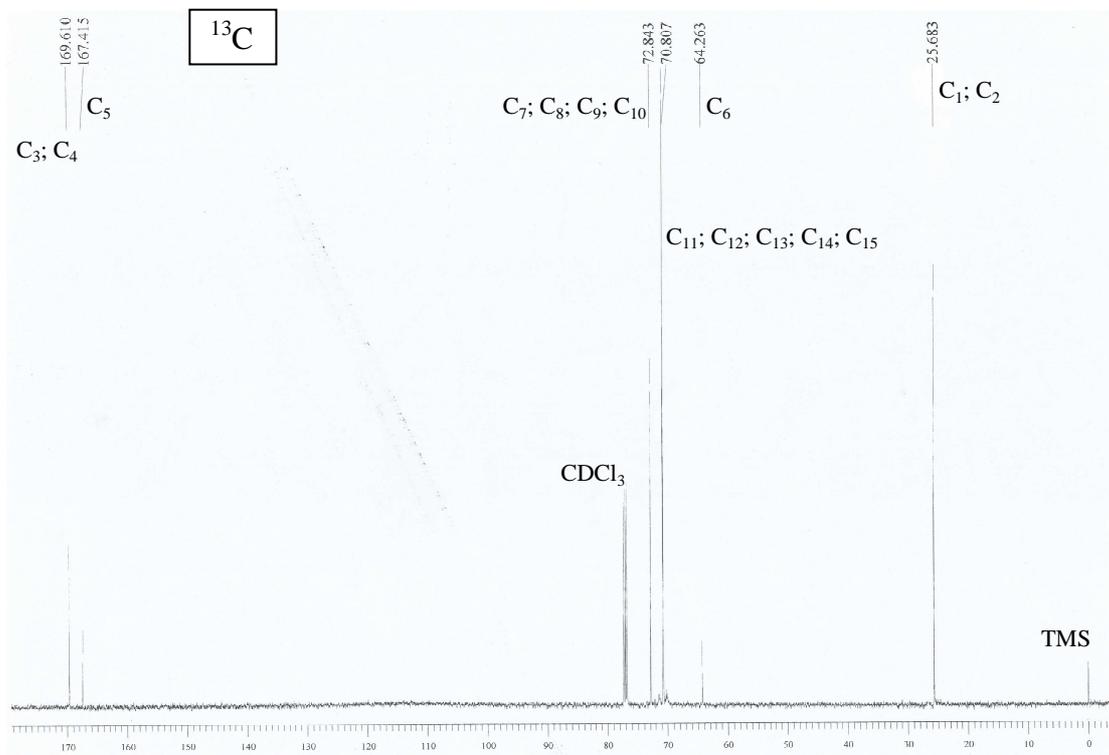
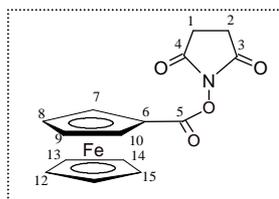
F	Fluoróforo
Fc	Ferroceno
FcCOOH	Ácido carboxiferroceno
FcNHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimidilcarboxiferroceno
Fmoc-Cl	9-fluorenilmetil-cloroformato
G	Guanina
HAcO	Ácido acético
HEPES	<i>N</i> -(2-hidroxietyl)-piperazina- <i>N'</i> -(2-etanosulfonato) de sodio
HFP	1,1,1,3,3,3-hexafluoropropanol
K <sub>A</sub>	Constante de afinidad
K <sub>D</sub>	Constante de disociación
LNA	<i>Lock Nucleic Acids</i>
MB	Azul de metileno
MCH	6-mercaptohexanol
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-( <i>N</i> -morfolino)etanosulfónico
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NTC	Nanotubos de carbono
PAGE	Geles de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Q	<i>Quencher</i>
QCM	Microbalanza de cuarzo
R <sub>et</sub>	Resistencia a la transferencia de carga
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
RuHex	[Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>+3</sup>
SAMs	Monocapas autoensambladas de alcanotioles
SA-PMPs	<i>Streptavidin Magnosphere Paramagnetic Particles</i>
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
Sensor E-AB	Aptasensor electroquímico
SPR	Resonancia de plasmón superficial
ss	Simple cadena
T	Timina
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamino
THF	Tetrahidrofurano

TID	<i>Target-induced dissociation o displacement</i>
TISS	<i>Target-induced structure switching</i>
TREAS	<i>Target-responsive electrochemical aptamer switch</i>
Tris-HCl	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
Ts	Fosforotioato
U	Uracilo
VC	Voltametría Cíclica
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VOC	Voltametría de onda cuadrada
VPD	Voltametría de pulso diferencial
TCEP	Clorhidrato de tris-(2-carboxietil)fosfina

### **Espectros de RMN**

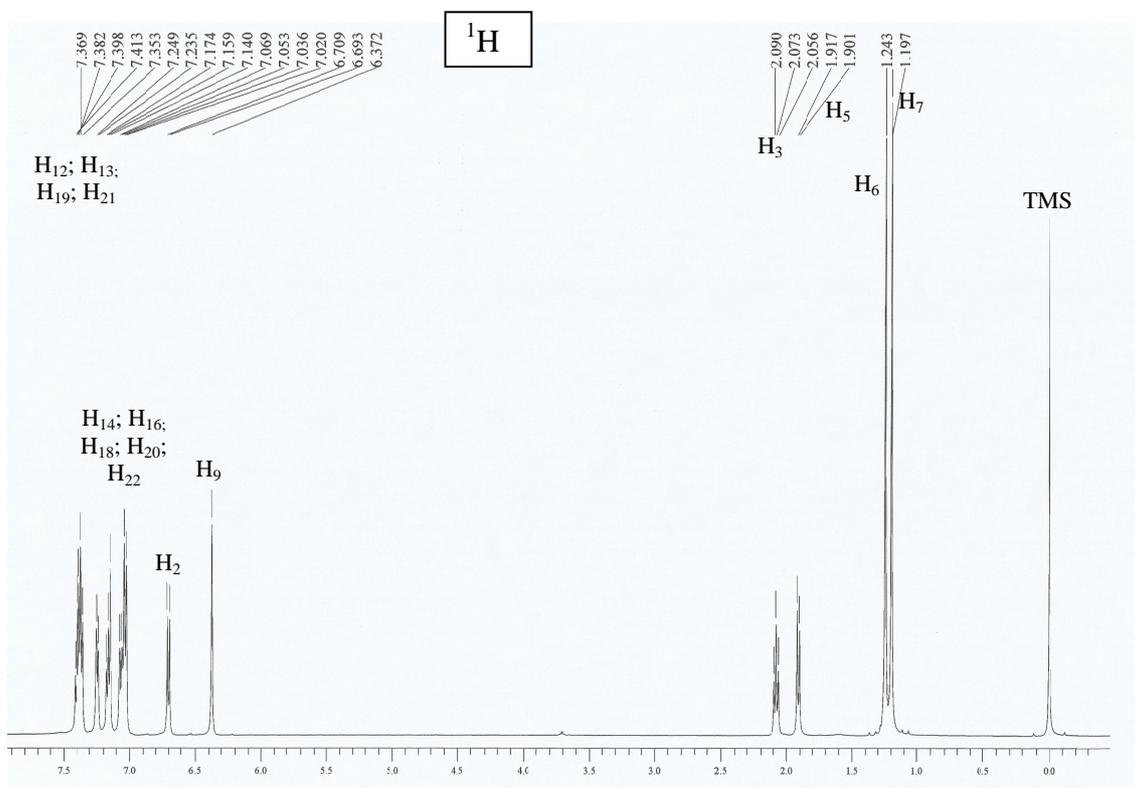
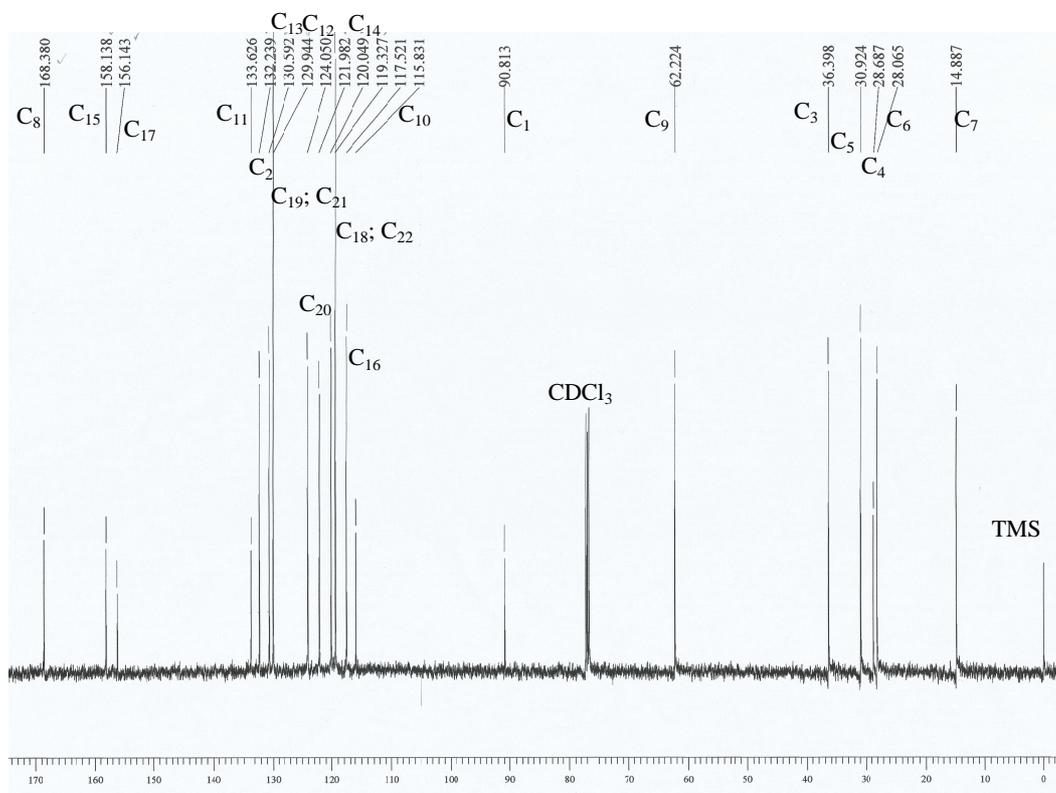
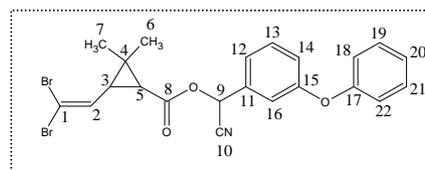
A continuación se listan los espectros de RMN-500MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de todos los compuestos sintetizados en este trabajo de tesis. Para todos los casos, el solvente utilizado es cloroformo deuterado con tetrametilsilano (TMS) como referencia. En algunos casos se distinguen trazas de los diferentes solventes utilizados en las etapas de purificación.

***N*-hidroxisuccinimidilcarboxiferroceno (FcNHS, 2)**

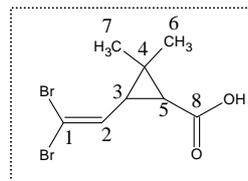


### Deltametrina (4)

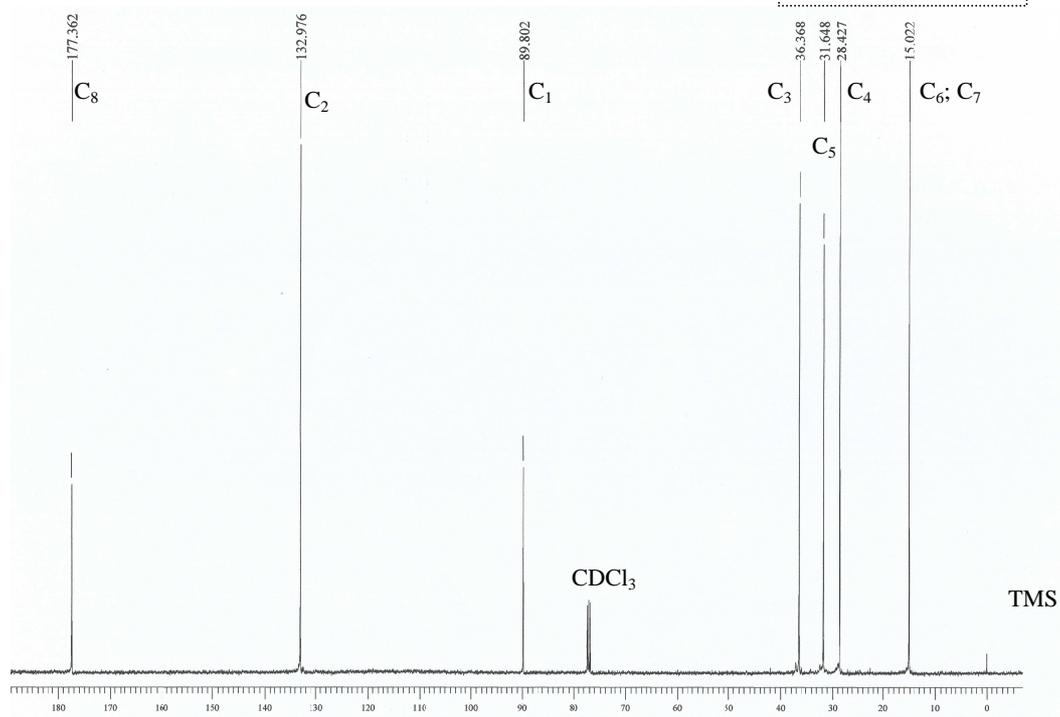
$^{13}\text{C}$



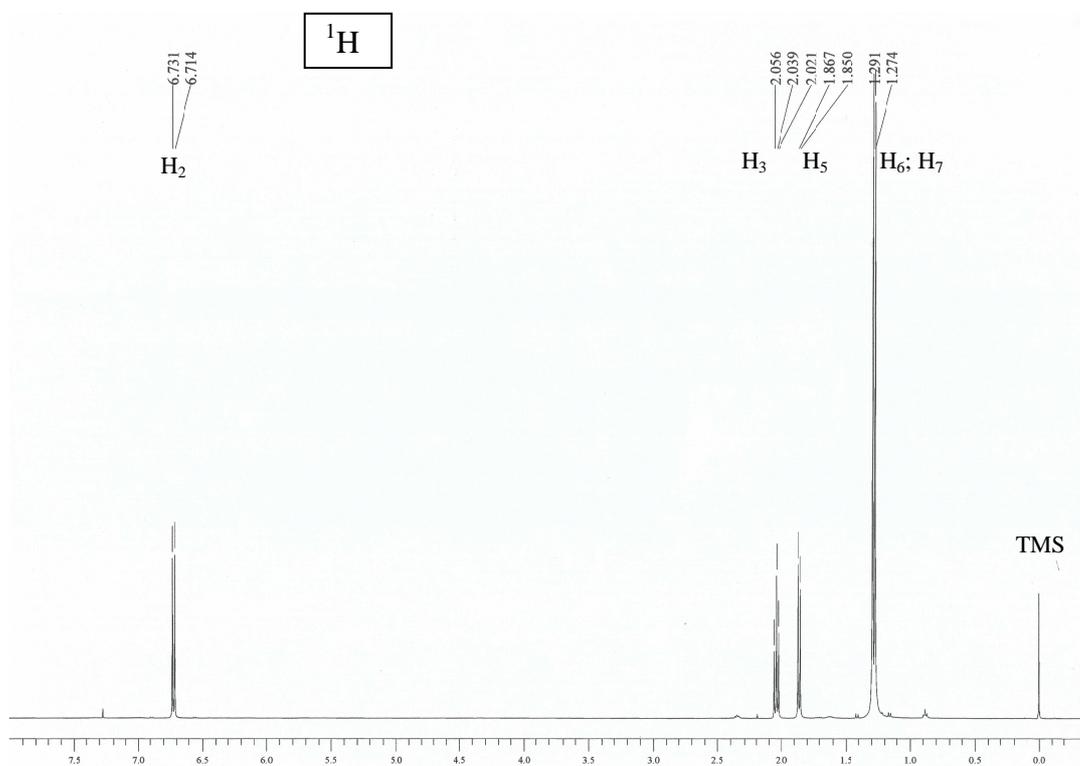
**Ácido dibromovinil-2,2-dimetilciclopropanoico (CPCA, 5)**



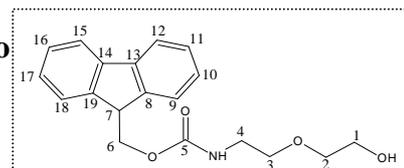
$^{13}\text{C}$



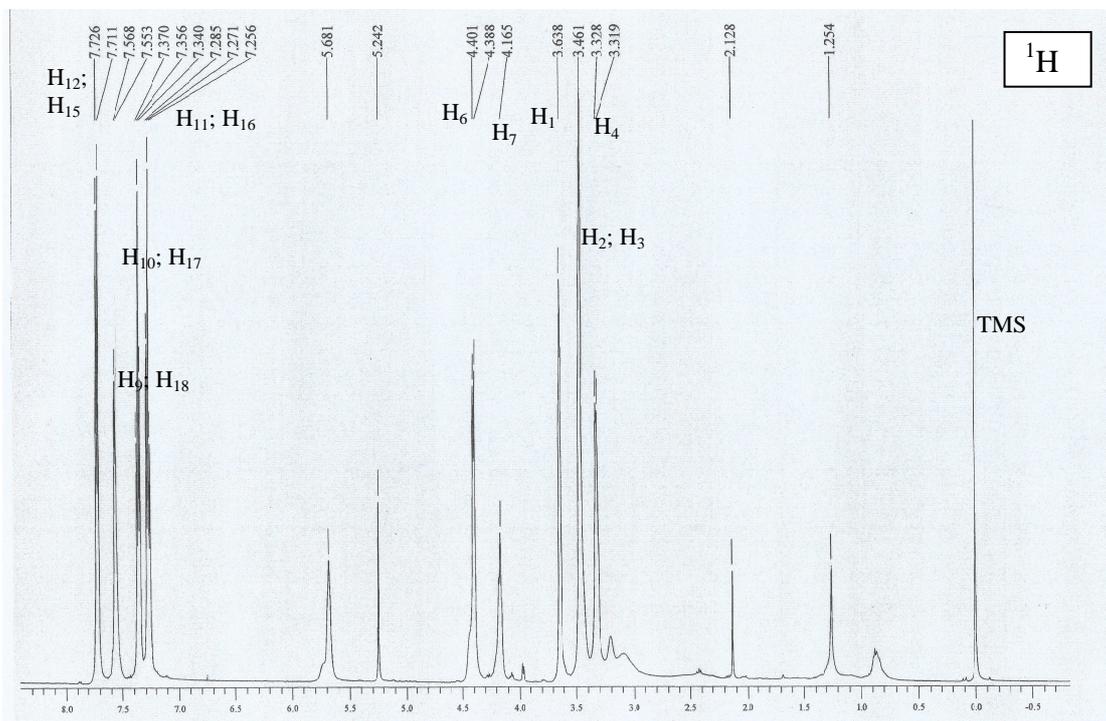
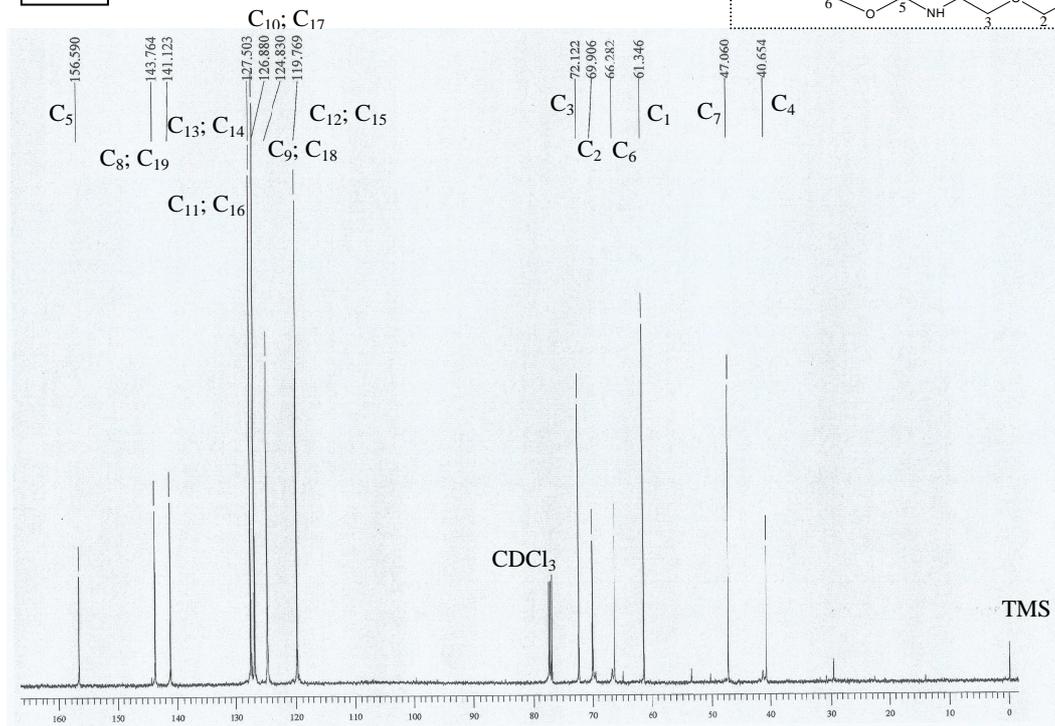
$^1\text{H}$



**9H-fluoren-9-ilmetil[2-(2-hidroximetoxi)etil]carbamato**

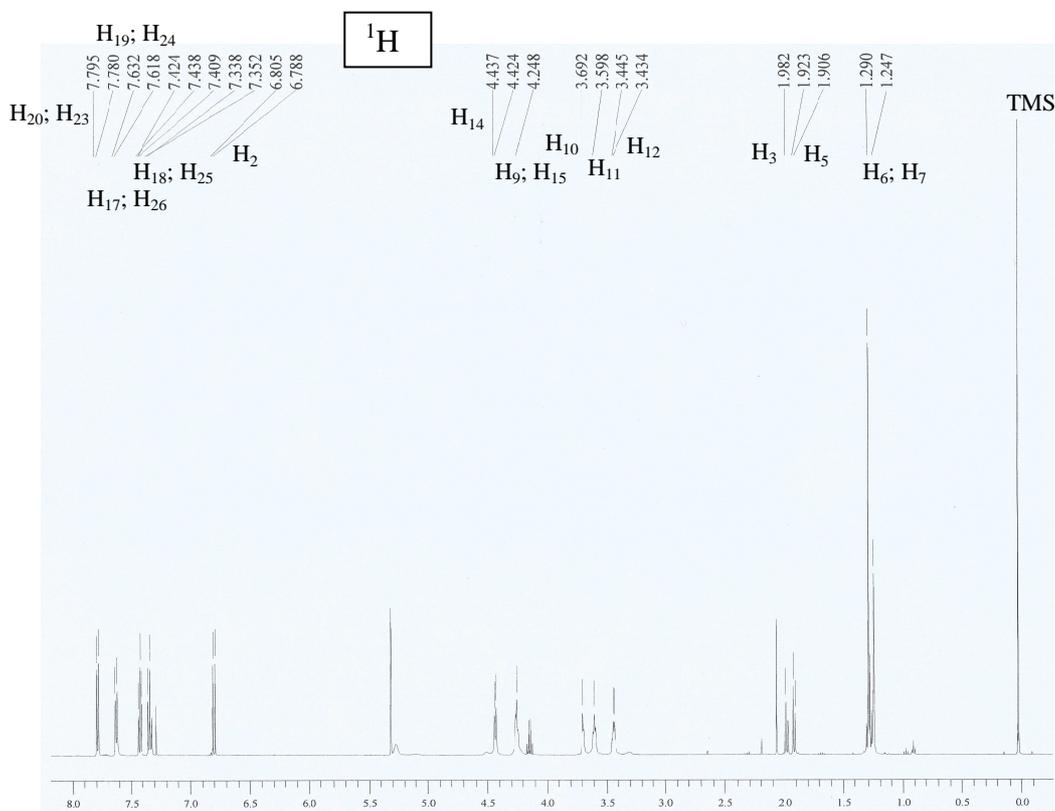
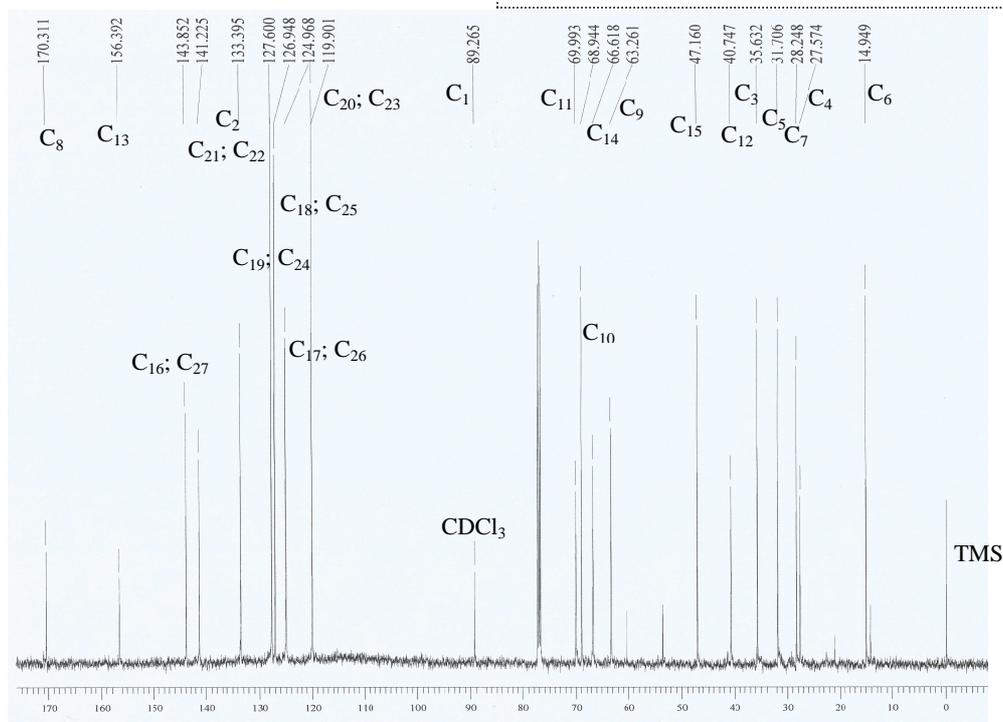
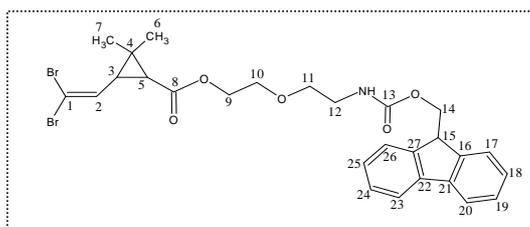


(8)  $^{13}\text{C}$



**3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato de 2-(2-[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonilo]amino}eto)etilo (9)**

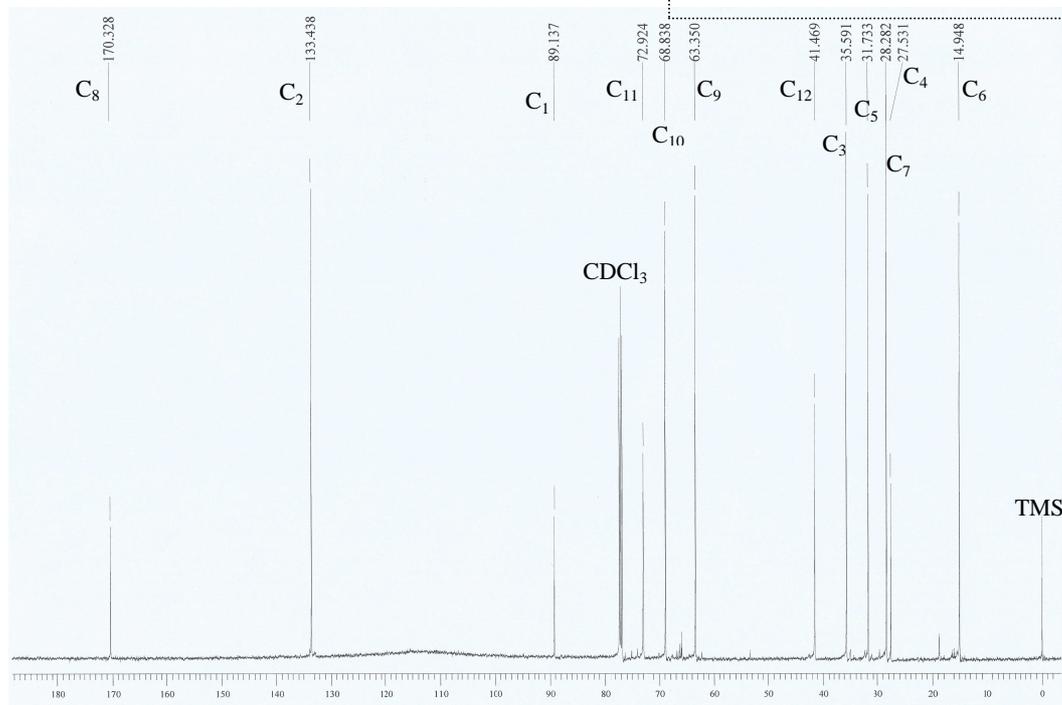
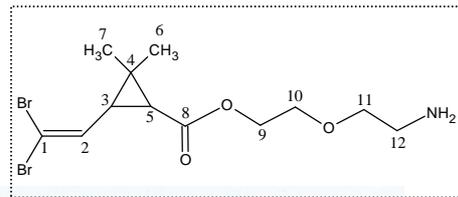
$^{13}\text{C}$



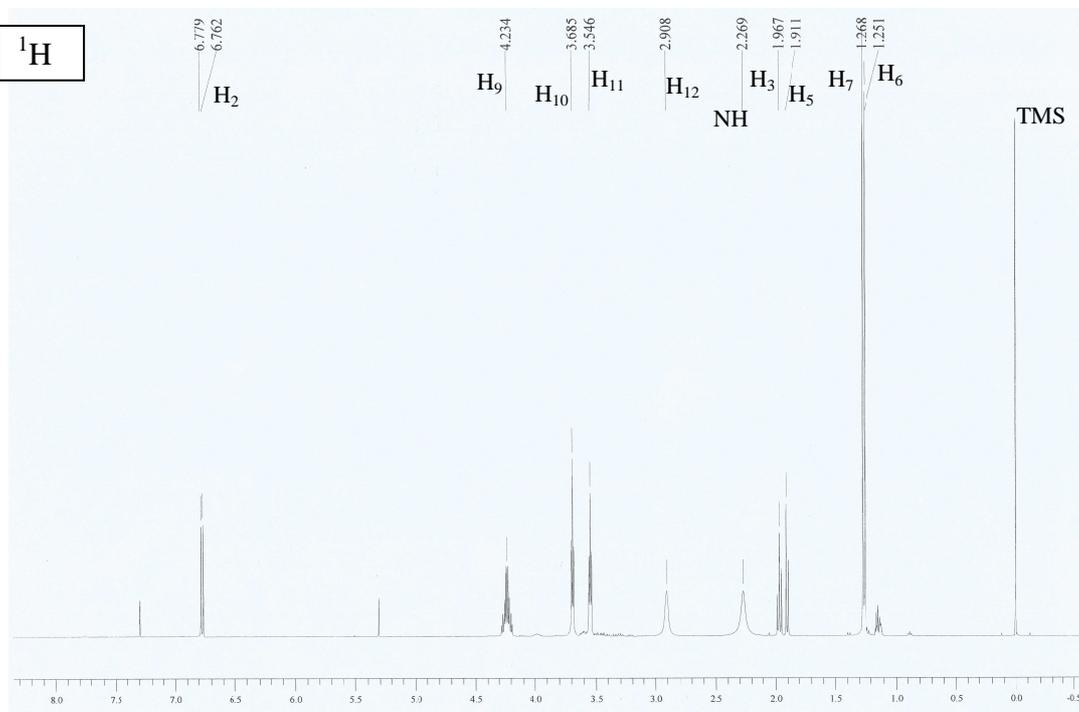
**3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato**

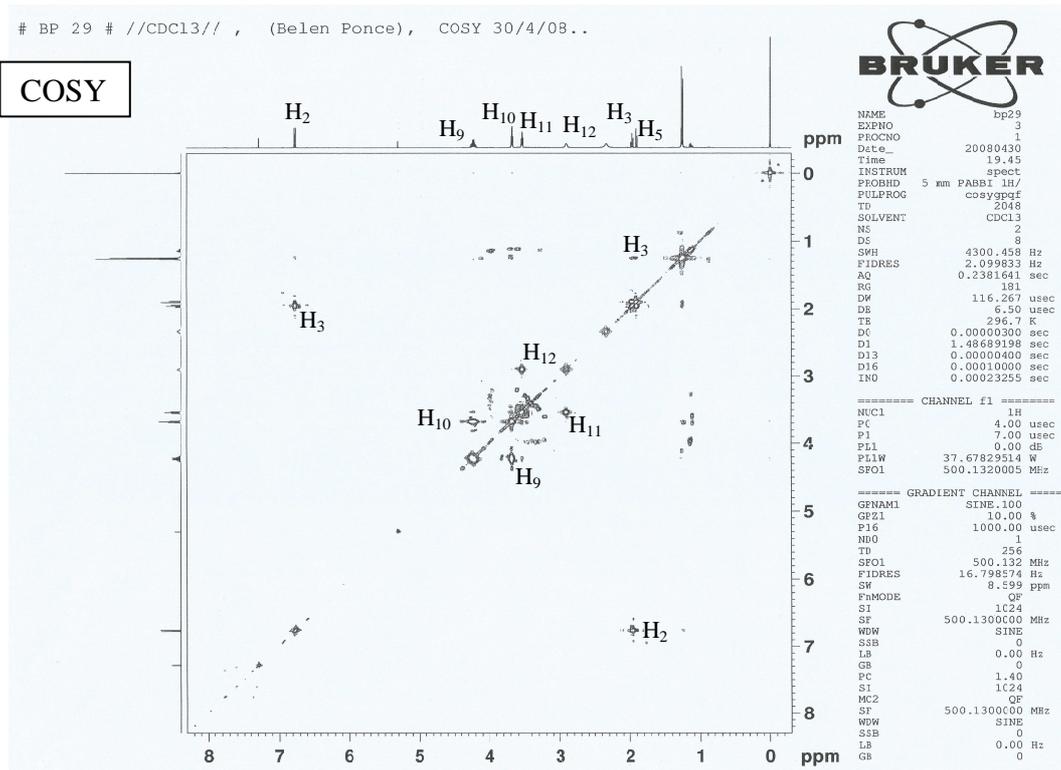
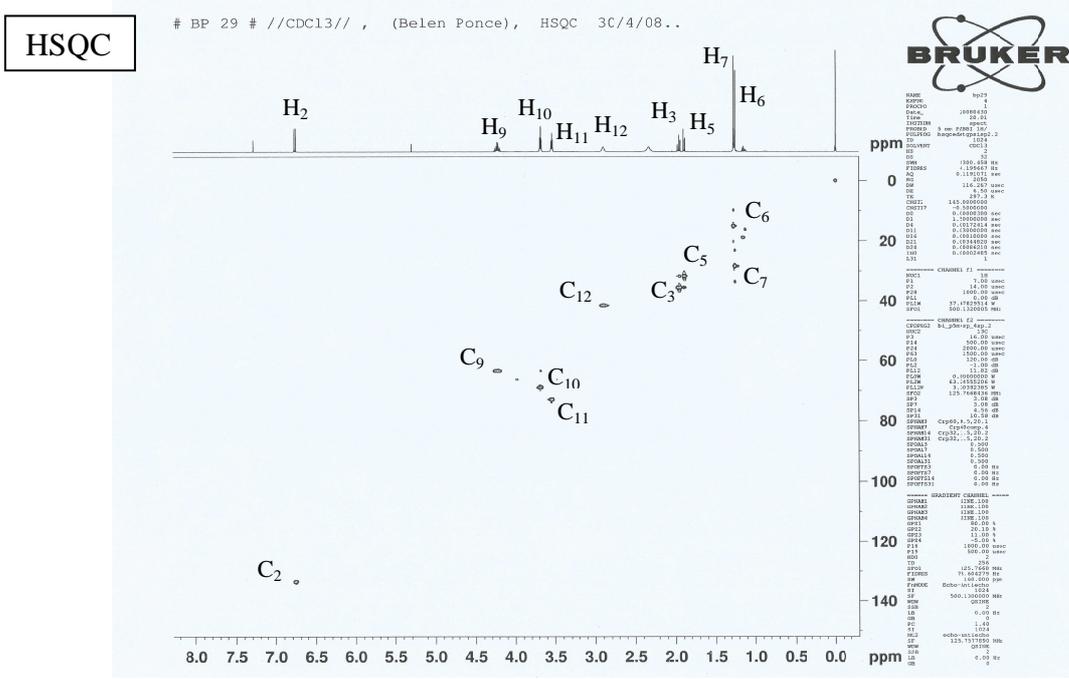
**de 2-(2-amino)etoxi)etilo (10)**

$^{13}\text{C}$



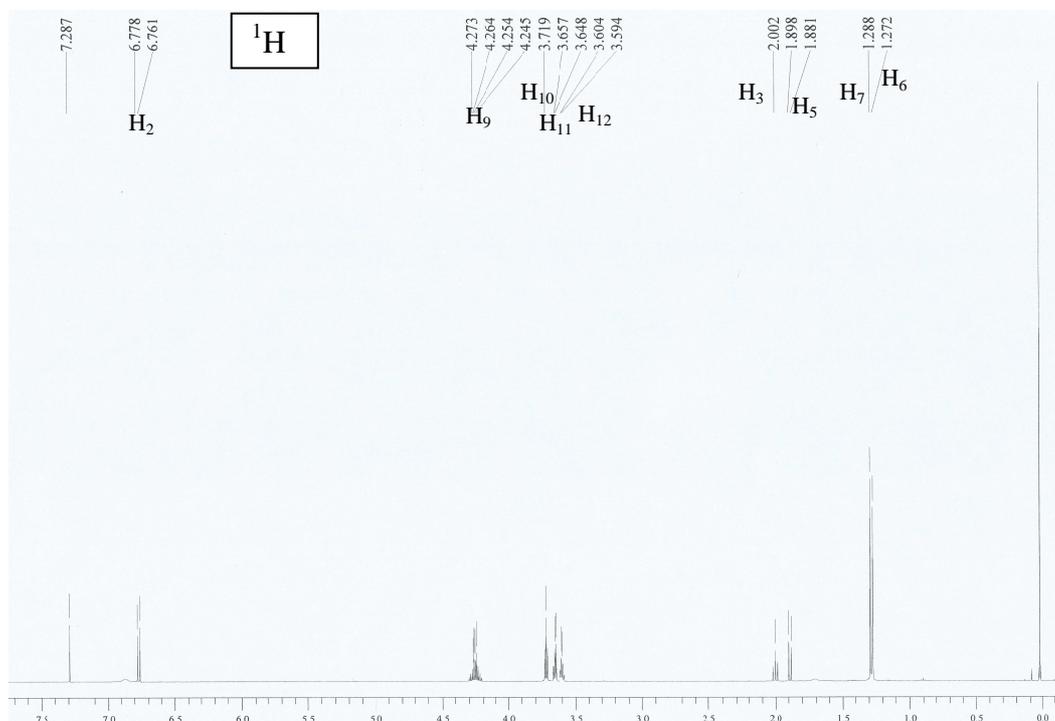
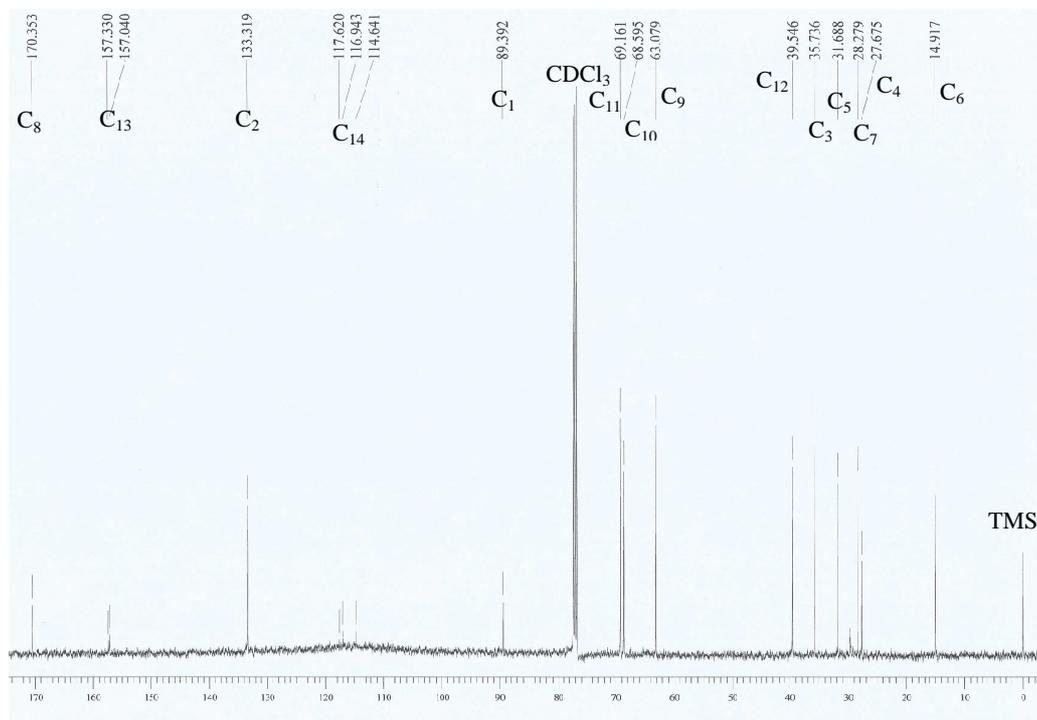
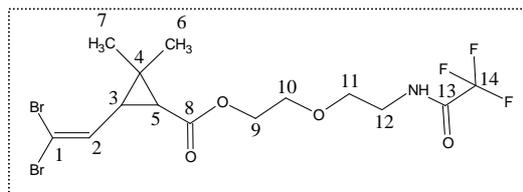
$^1\text{H}$





**3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2{2[(trifluoroacetil)amino]etoxi}etilo (11)**

$^{13}\text{C}$



**3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2,2,2-trifluoro-1-(trifluorometil)etilo (12)**

$^{13}\text{C}$

