Universidad Nacional de General Sarmiento

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución Nº1178/11. Calificación "B".

"Empleo de oligonucleótidos y DNAzimas peroxidasas para biosensado y detección de biomarcadores"

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

Autor: María Gloria Longinotti

Director: Dr. Gabriel Omar Ybarra
Codirector: Dr. Javier Marcelo Montserrat

Consejero de estudios: Dra. Silvana Andrea Ramírez

Lugar de trabajo:
Instituto Nacional de Tecnología Industrial

Fecha: 2020

Universidad Nacional de General Sarmiento

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución Nº1178/11. 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) Liberar el contenido de la tesis para acceso público. **(Elegido)**

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: Empleo de oligonucleótidos y DNAzimas peroxidasas para biosensado y detección de biomarcadores.

b. Presentado por (Apellido/s y Nombres completos del autor): Longinotti, María Gloria.

c. E-mail del autor: mlonginotti@inti.gob.ar

d. Estudiante del Posgrado (consignar el nombre completo del Posgrado): Doctorado en Ciencia y Tecnología UNGS.

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): Dra. en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de General Sarmiento.

a) Grado académico que se obtiene: doctora

b) Nombre del grado académico:

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución Nº1178/11. Calificación “B”.

g. Fecha de la defensa: / / 2020

h. Director de la Tesis (Apellidos y Nombres): Ybarra, Gabriel Omar. Codirector: Montserrat, Javier Marcelo

i. Tutor de la Tesis (Apellidos y Nombres): Ramírez, Silvana.

j. Colaboradores con el trabajo de Tesis: Radrizzani, Martín.

k. Descripción física del trabajo de Tesis (cantidad total de páginas, imágenes, planos, videos, archivos digitales, etc.): 186 páginas, 78 imágenes.

l. Alcance geográfico y/o temporal de la Tesis: libre acceso

m. Temas tratados en la Tesis (palabras claves): ácidos nucleicos, DNAzima peroxidasa, aptámeros, electroquímica, detección de biomarcadores, detección de secuencias complementarias.

n. Resumen en español (hasta 1000 caracteres): El objetivo general de esta tesis es la utilización de ácidos nucleicos como elementos de reconocimiento biológico y amplificación de la señal para su empleo en biosensores y en la detección de biomarcadores. Los lineamientos generales del trabajo se basan en el uso de una secuencia de reconocimiento específico contra una molécula blanco unida a una DNAzima peroxidasa, la cual actúa como generador de una señal óptica o electroquímica. En primer lugar, se estudió la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa y se pusieron a punto las condiciones óptimas para ser usada como elemento amplificador de la señal. En una segunda etapa, se acopló la DNAzima peroxidasa a oligonucleótidos para la detección electroquímica de una secuencia genómica complementaria a un gen

de la toxina Shiga 1 de E. coli verotoxigénica. Finalmente se presentan los resultados del empleo de conjugados de DNAzimas y aptámeros contra el biomarcador tumoral PTEN en secciones histológicas.

o. Resumen en portugués (hasta 1000 caracteres): O objetivo geral desta tese é a utilização de ácidos nucléicos como elementos de reconhecimento biológico e amplificação de sinal para sua utilização em biossensores e na detecção de biomarcadores. As diretrizes gerais do trabalho baseiam-se na utilização de uma sequência de reconhecimento específica contra uma molécula alvo ligada a uma DNAzima peroxidase, que atua como geradora de um sinal óptico ou eletroquímico. Em primeiro lugar, a atividade catalítica da DNAzyme peroxidase foi estudada e as condições ótimas foram estabelecidas para serem usadas como um amplificador de sinal. Em uma segunda etapa, a DNAzyme peroxidase foi acoplada a oligonucleotídeos para a detecção eletroquímica de uma sequência genômica complementar a um gene para a toxina Shiga 1 de E. coli verotoxigênica. Por fim, são apresentados os resultados do uso de conjugados de DNAzimas e aptâmeros contra o biomarcador tumoral PTEN em cortes histológicos.

p. Resumen en inglés (hasta 1000 caracteres): The general objective of this thesis is the use of nucleic acids as elements of biological recognition and signal amplification to be employed in biosensors and in the detection of biomarkers. The general guidelines of the work are based on the use of a specific recognition sequence against a target molecule linked to a DNAzyme peroxidase, which acts as a generator of an optical or an electrochemical

signal. Firstly, the catalytic activity of the DNAzyme peroxidase was studied and the optimal conditions were set up to be used as a signal amplifier. Secondly, the DNAzyme peroxidase was linked to oligonucleotides for the electrochemical detection of a genomic sequence complementary to a gene for Shiga 1 toxin from verotoxigenic E. coli. Finally, the results of the use of conjugates of DNAzymes and aptamers against the tumor biomarker PTEN in histological sections are presented.

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

Firma y aclaración de la firma del Presidente del Jurado:

Firma del autor de la tesis:

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución Nº1178/11. Calificación "B".

Publicaciones realizadas en el período de la tesis

- *"Electrochemical magnetic microbeads-based biosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases".*
  Cortina M.E., Melli, L.J., Roberti, M., Mass, M., Longinotti, G., Tropea, S., Lloret, P., Serantes, D.A.R., Salomón, F., Lloret, M., Caillava, A.J., Restuccia, S., Altcheh, J., Buscaglia, C.A., Malatto, L., Ugalde, J.E., Fraigi, L., Moina, C., Ybarra, G., Ciocchini, A., Comerci, D.J.
  Biosensors and Bioelectronics, 80 (2016) 24-33.
  DOI: 10.1016/j.bios.2016.01.021

- *"Optical and electrochemical detection of a verotoxigenic E. coli gene using DNAzyme-labeled stem-loops".*
  G. Longinotti, G. Ybarra , J. Montserrat.
  Journal of Electrochemical Science and Engineering, 7(4) 2017, 193-200.
  DOI: 10.5599/jese.471.

- *"Waterborne carbon nanotubes ink for the preparation of robust printed electrodes with applications in electrocatalysis and enzymatic biosensing".*
  O. Garate, L. Veiga, G. Longinotti, G. Ybarra, C. Moina, L. Monsalve.
  Materials Research Bulletin, 106 (2018), 137-143.
  DOI: 10.1016/j.materresbull.2018.05.015

Trabajo en preparación

- *"Staining of the PTEN Tumor Suppressor Protein by a dual synthetic aptamer detection system in histological sections".*
  G. Longinotti, G. Ybarra, S. Vighi, C. Perandones, J. Montserrat, S. Yakisich, M. Grasselli, M. Radrizzani.

Trabajos presentados en eventos científicos tecnológicos

- **Concurso INNOVAR 2019,** Usina del Arte. Buenos Aires, 25-27 de septiembre de 2019
  "ONCO-POC Sistema de Diagnóstico Oncológico"
  G. Longinotti, G. Ybarra, D. Viale, D. Otranto, M. Graselli y M. Radrizzani.

- **1st Argentine-German Workshop on Nanotecnology and Nanobiosensors**. INTI, San Martín, Buenos Aires, Argentina, 2017. *"Electrochemical detection of a verotoxigenic E. coli gene with DNAzyme-labeled stem-loops"*
  G. Longinotti, G. Ybarra, J. Montserrat.

- **XVI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados**. FCEyN, UBA, Buenos Aires, Argentina, 2016.
  "Biosensor electroquímico para cuantificar lisozima mediante aptámeros con actividad de peroxidasa"
  G. Longinotti, G. Ybarra, J. Montserrat y M. Radrizzani**.**
  Premio al mejor Poster.

- **12° Jornadas de Desarrollo, Innovación y Transferencia Tecnológica.** INTI**,** San Martín, Buenos Aires, Argentina, 2015.

"DNAzimas: ADN con actividad catalítica para el desarrollo de biosensores"
Longinotti, G, Montserrat J., Ybarra G.

Aportes originales

Este trabajo de tesis se centra en el uso de dos propiedades de los ácidos nucleicos, la capacidad de reconocer moléculas y la de catalizar reacciones químicas. Dado que los ácidos nucleicos se pueden obtener por síntesis química, esto permitió diseñar secuencias que presenten ambas propiedades, lo cual es de gran utilidad en el campo de los biosensores.

En una primera instancia, en el capítulo 3, se trabajó con la DNAzima peroxidasa complejo formado por un oligonucleótido y la porfirina hemina, que presenta actividad catalítica peroxidasa. Se demostró que la DNAzima peroxidasa puede mantener dicha actividad catalítica en distintas condiciones de almacenamiento, siendo esto de gran utilidad en aplicaciones que requieran dispositivos portátiles y mediciones en campo.

En una segunda instancia, se evaluaron dos estrategias para detectar moléculas de interés mediante estas construcciones oligonucleotídicas bifuncionales.

En el capítulo 4, se evaluó el uso de una construcción oligonucleotídica bifuncional, que pudiera reconocer por complementariedad de bases una secuencia de interés y que dicho evento de reconocimiento permita el plegamiento de la secuencia que forma la DNAzima peroxidasa, activando de esta manera su actividad catalítica y permitiendo el desarrollo de una señal. El método de detección elegido fue el electroquímico por su gran sensibilidad y porque la instrumentación que requiere puede miniaturizarse, lo cual redunda en una ventaja si se quiere aplicar este sistema al desarrollo de biosensores.

En el capítulo 5, se planteó el uso de aptámeros como elementos de reconocimiento molecular de biomarcadores acoplado a la DNAzima peroxidasa como marcador en preparados histológicos. El uso de aptámeros acoplados a la DNAzima peroxidasa como marcador se encuentra poco explorado en histoquímica y representa una alternativa frente al uso de marcadores como moléculas fluorescente o enzimas.

Por otra parte, el uso de estas secuencias oligonucleotídicas bifuncionales, se planteó también como una alternativa frente a la imunohistoquímica que utiliza anticuerpos. El uso de estas secuencias oligonucleotídicas bifuncionales además de las ventajas ya mencionadas, presentan un alto nivel de estandarización por ser obtenidos por síntesis química si se comparan con los anticuerpos obtenidos *in vivo*.

A mi familia,

la de sangre y la que la vida me regaló.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi director y codirector de tesis, que han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A mi director, Gabriel Ybarra, por su gran dedicación, entusiasmo, paciencia y por todas las cosas que me ha enseñado; no solo en el transcurso de la esta tesis, sino desde los comienzos de mi carrera laboral en INTI.

A mi codirector, Javier Montserrat, del que he aprendido mucho, por su amabilidad y pensamiento positivo; y por estar siempre dispuesto a colaborar con todos sus conocimientos y recursos necesarios para llevar a cabo la tesis.

A la Universidad de General Sarmiento, por permitirme llevar a cabo el doctorado en la institución.

A INTI por haberme facilitado los medios necesarios para llevar a cabo mis actividades durante el desarrollo de la tesis.

A Martín Radrizzani, por toda su enseñanza, colaboración y aporte de recursos en parte de este trabajo. A todo su equipo por la ayuda y buena onda.

A Carlos Moina, quien me seleccionó para entrar a INTI, por confiar en mí y apoyarme siempre para poder llevar a cabo esta tesis.

A todos los compañeros y compañeras de la Unidad Técnica Nanomateriales Funcionales por su aporte y colaboración en el día a día. Todos y cada uno de ellos han contribuido a esta tesis.

A todos los compañeros y compañeras que hayan pasado por el Centro de

Procesos Superficiales de INTI. Todos han contribuido a esta tesis de alguna manera.

A todos los compañeros y compañeras del Centro de Micro y Nanotecnologías de INTI, por su colaboración y aporte para el desarrollo de esta tesis.

A los integrantes del Instituto de Química de la UNGS, por su colaboración cuando necesité ayuda y capacitación. Especialmente a Helena Ceretti, Ana Janeiro y Belén Ponce.

A Silvina Angeleri de la imprenta del INTI por los esquemas para la tesis.

A Gustavo Giménez por su ayuda con el portugués.

A mis amigas y amigos que me regaló mi paso por la Facultad de Ciencias Exactas de la UBA y el INTI.

A mis familiares, amigas y amigos de Villa Ramallo por estar siempre.

A mis padres por apoyarme para que estudie, lejos de mi pueblo natal.

A mi hermana Mariana por la ayuda en lo personal y por las recomendaciones para la presentación del manuscrito.

A Santiago, que me acompaña en esta tesis desde su nacimiento.

A Leandro por apoyarme siempre, tanto en lo personal como en lo laboral, por su paciencia y compañerismo.

Y por último quiero agradecer a la Argentina, donde la educación pública me ha permitido llegar a este punto, orgullosa de ser primer generación universitaria de mi familia.

Siglas y abreviaturas xvii

Capítulo 1. Introducción 1
1.1. Estructura y función de los ácidos nucleicos 5
1.2. Ácidos nucleicos con actividad catalítica 13
1.2.1. DNAzimas 15
1.2.2. DNAzimas con actividad peroxidasa 16
1.3. Ácidos nucleicos con capacidad de reconocimiento molecular 23
1.4. Uso de ácidos nucleicos en aplicaciones analíticas 28
1.4.1. Detección de una secuencia de ADN: Genosensor 30
1.5. Uso de ácidos nucleicos en la detección de biomarcadores en tejidos 32
1.6. Objetivos de la tesis 34
1.7. Referencias 34

Capítulo 2. Materiales y métodos 47
2.1. Preparación de soluciones 49
2.1.1. Buffers 49
2.1.2. Soluciones para determinar actividad catalítica peroxidasa 52
2.1.3. Solución stock de hemina 53
2.2. Celdas y Electrodos 53
2.3. Preparación de la DNAzima peroxidasa 54
2.4. Optimización de la actividad enzimática de la DNAzima peroxidasa por espectroscopía UV-visible 55
2.5. Detección electroquímica de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa 57
2.5.1. Elección del mediador redox 57
2.5.2. Determinación de la actividad enzimática de la DNAzima peroxidasa en función de la concentración de oligonucleótido 58
2.6. Formación del complejo oligonucleótido-hemina 58
2.6.1. Dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato 58
2.6.2. Cálculo de la constante de disociación de la DNAzima peroxidasa 59
2.7. Estabilidad de la DNAzima peroxidasa 59
2.7.1. Almacenamiento a diferentes temperaturas 59

2.7.2. Liofilización de la DNAzima peroxidasa 60
2.8. Actividad catalítica de la enzima peroxidasa de rábano picante 61
2.9. Detección de una secuencia blanco con horquilla sensora 61
2.9.1. Puesta a punto de las condiciones experimentales 62
2.9.2. Protocolo optimizado para la detección de una secuencia blanco 63
2.9.3. Ensayo de especificidad de la secuencia sensora 65
2.10. Marcación histológica 65
2.10.1. Construcción aptámero PTEN-DNAzima peroxidasa 65
2.10.2 Preparación del tejido incluido en parafina 66
2.10.3. Optimización de la relación ADN:hemina en marcaciones histológicas 67
2.10.4. Marcado de cortes histológicos 68
2.10.5. Revelado 69
2.10.6. Procesamiento del corte para observación por microscopía óptica 69
2.11. Referencias 70

Capítulo 3. Actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa 71
3.1. Introducción 73
3.2. Resultados 77
3.2.1. Cosustrato reductor 77
3.2.2. Efecto del pH y naturaleza del buffer 79
3.2.3. Tiempo necesario para la formación del complejo oligonucleótido:hemina 81
3.2.4. Dependencia de concentración de iones potasio 82
3.2.5. Relación óptima hemina:oligonucleótido 84
3.2.6. Efecto del peróxido de hidrógeno 85
3.2.7. Actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa en las condiciones óptimas 89
3.3. Formación del complejo oligonucleótido-hemina 91
3.3.1. Dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato 91
3.3.2. Cálculo de la constante de disociación de la DNAzima peroxidasa 96
3.4. Medidas electroquímicas de la DNAzima peroxidasa en solución 100
3.4.1. Elección del mediador redox 100
3.4.2. Dependencia de la densidad de corriente con la 103

concentración de $DZ5T_3$
3.4.3. Estabilidad de la DNAzima peroxidasa a distintas temperaturas de almacenamiento 105
3.4.4. Liofilización de la DNAzima peroxidasa 106
3.5. Discusión 108
3.6. Conclusiones 110
3.7. Referencias 114

Capítulo 4. DNAzima como marcador: Detección de *E. coli* verotoxigénica productora de toxina Shiga 1 **119**
4.1. Introducción 121
4.2. Diseño de la secuencia oligonucleotídica sensora 123
4.3. Resultados 127
4.3.1. Resultados preliminares 127
4.3.2. Efecto de la fuerza iónica 130
4.3.3. Respuesta obtenida con las diferentes construcciones 132
4.3.4. Relación hemina: oligonucleótido 135
4.3.5 Optimización del protocolo del ensayo 136
4.3.5.1. Tiempos de incubación 136
4.3.5.2. Puesta a punto del protocolo de ensayo 137
4.3.6. Curva de calibración 140
4.3.7. Cálculo del límite de detección 141
4.3.8. Ensayo de especificidad 142
4.4. Discusión 143
4.5. Conclusiones 144
4.6. Referencias 146

Capítulo 5. DNAzima como marcador: Detección de biomarcadores en preparados histológicos **149**
5.1. Introducción 151
5.2. Proceso histológico 153
5.2.1. Procesamiento del tejido 153
5.2.2. Acondicionamiento de la muestra para el marcado con anticuerpos o aptámeros 155
5.2.3. Marcado con anticuerpos o aptámero-DNAzima 157
5.2.4. Revelado 159
5.2.5. Preparado del tejido para su conservación y observación en 160

microscopio
5.3. Detección de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) 162
5.3.1. Aptámero contra PTEN 164
5.3.2. Detección de PTEN en muestras de endometrio 167
5.3.3. Detección de PTEN en muestras de colon 170
5.4. Discusión 174
5.5. Conclusiones 175
5.6. Referencias 176

Conclusiones y perspectivas futuras 179

Lista de siglas y abreviaturas utilizadas en este trabajo en orden alfabético

ABTS	Acido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico sal diamonio
4AAP	4-Aminoantipirina
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albunmina de suero bovino
BufferTris	Hidroximetil Aminometano
Buffer T	Buffer tris-HCl 25 mM pH 8
Buffer TE	Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM pH8
Buffer TKT	Buffer tris-HCL, KCl 20 mM y tritón X-100 0.05%.
Buffer TKNaT	Buffer tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM, NaCl 200 mM y tritón X-100 0.05%.
C	Citocina
DAEC	*Escherichia coli* difusamente adherente
DEC	*Escherichia coli* productora de diarrea
DMSO	Dimetilsulfóxido
dTTP	Desoxirribosa trifosfato de timina
EAEC	*Escherichia coli* enteroagregativa
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EHEC	*Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC	*Escherichia coli* enteroinvasiva
EPEC	*Escherichia coli* enteropatogénica
ETEC	*Escherichia coli* enterotoxigénica
ExPEC	*Escherichia coli* patogénica extrainstestinal
KDa	Kilo Dalton
K_M	Constante de Michaelis-Menten
G	Guanina
HRP	Peroxidasa de rábano picante
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RMN	Resonancia magnética nuclear
RT-PCR	Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
STEC	*Escherichia coli* productora de toxina Shiga
stx	Toxina Shiga
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
T	Timina
$\mathbf{T_M}$	Temperatura de melting
TMB	3,3´, 5, 5´-Tetrametilbencidina
U	Uracilo
VT	verotina
VTEC	*Escherichia coli* verotoxigénica

1

Introducción

Contenidos del capítulo

1.1 Estructura y función de los ácidos nucleicos 5
1.2 Ácidos nucleicos con actividad catalítica 13
1.2.1 DNAzimas 15
1.2.2 DNAzimas con actividad peroxidasa 16
1.3 Ácidos nucleicos con capacidad de reconocimiento molecular 23
1.4. Uso de ácidos nucleicos en aplicaciones analíticas 28
1.4.1. Detección de una secuencia de ADN: Genosensor 30
1.5 Uso de ácidos nucleicos en la detección de biomarcadores en tejidos 32
1.6 Objetivos de la tesis 34
1.7 Referencias 34

Durante mucho tiempo se pensó que los ácidos nucleicos solo cumplían la función de almacenar la información genética necesaria para el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos. Comparados con otras macromoléculas como las proteínas, los ácidos nucleicos están compuestos por la combinación de cuatro bases nitrogenadas, en tanto que las proteínas están compuestas por la combinación de 20 aminoácidos diferentes. Debido a esta diversidad de composición reducida, durante muchos años los ácidos nucleicos no fueron considerados capaces de catalizar reacciones químicas. Sin embargo, el descubrimiento de las propiedades catalíticas del ARN, a principios de la década de 1980, fue el primer indicio de que los ácidos nucleicos también podían llevar a cabo este tipo de reacciones químicas. Por este descubrimiento Altman y Cech recibieron el Premio Novel de Química en 1989 [1], [2]. El ARN con propiedades catalíticas fue denominado ribozima (contracción de las palabras "ácido ribonucleico" y "enzima"). Por otro lado, gracias a las complejas estructuras tridimensionales que pueden adquirir los ácidos nucleicos se encontró que además poseían propiedades de reconocimiento específico de una gran variedad de moléculas[3]–[5].

En 1986 Gilbert[6] propuso la hipótesis de que, en el mundo primitivo, el ARN era el biopolímero central y el componente principal de las células primitivas. El ARN era el encargado de almacenar información genética y catalizar las reacciones químicas. Esta hipótesis supone que existió "El mundo del ARN" antes de que las células actuales aparecieran en la tierra. Gilbert se basó en los descubrimientos de dos secuencias de ARN con actividad catalítica[6],[7]. Esto lo llevó a pensar que, si se pudieron encontrar dos actividades enzimáticas asociadas al ARN, entonces deberían existir muchas otras. En el mundo del ARN, éste podía catalizar la síntesis de nuevas moléculas de ARN a partir de precursores y un molde de ARN, con lo cual no habrían sido necesarias las enzimas proteicas en el inicio de la evolución de la vida. Según este modelo, el ARN catalizaría la síntesis de las primeras proteínas, que se volverían más eficientes y rápidas para llevar a cabo ciertas reacciones, llevando esto a un eventual dominio de las proteínas en este aspecto. Finalmente, aparece el ADN copiado por transcripción reversa a partir del ARN. El ADN, con su superior estabilidad química, se convertiría en el encargado de almacenar la información genética más extensa, permitiendo el desarrollo de seres vivos más complejos.

De esta manera, la evolución llevó al ARN a tener un rol de "intermediario". Si esta teoría es correcta, la transición desde "el mundo del ARN" hacia las biomoléculas actuales no fue completa ya que el ARN aun cataliza reacciones fundamentales, por ejemplo, está involucrado en la traducción ARN-proteínas (síntesis de proteínas). La síntesis de proteínas se lleva a cabo en el ribosoma, una maquinaria catalítica compuesta por ARN y proteínas. En el año 2000 la determinación de la conformación estructural tridimensional completa de las subunidades grande y pequeña del ribosoma[9],

confirman que es el ARN, y no las proteínas, el responsable de la actividad catalítica para formar los enlaces peptídicos covalentes. Esto permitió demostrar que el ribosoma es una ribozima[10]. Por su parte las proteínas juegan un papel estructural, y parecería ser que su principal función es estabilizar el núcleo de ARN, permitiendo los cambios de conformación del ARN ribosomal (rRNA) que son necesarias para que el ARN pueda catalizar la síntesis de proteínas.

1.1 Estructura y función de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son macromoléculas de enorme importancia biológica, presentes en todos los organismos vivos. Químicamente son polímeros lineales de nucleótidos unidos covalentemente mediante enlaces fosfodiéster.

Los nucleótidos están formados por tres componentes: una base nitrogenada, una pentofuranosa de cinco carbonos y uno o más grupos fosfatos (Figura 1.1). Las bases nitrogenadas pueden ser pirimidinas o purinas. Las pirimidinas, citosina (C), timina (T) y uracilo (U), son derivadas de un anillo pirimidínico hexagonal. Las purinas, adenina (A) y guanina (G), presentan además un segundo anillo pentagonal unido al anillo hexagonal. Ambas familias de bases tienen carácter aromático.

Los azúcares de cinco carbonos en los nucleótidos pueden ser ribosa (OH- en la posición 2´) o desoxirribosa (H- en la posición 2´). Si el azúcar es ribosa se denomina ácido ribonucleico o ARN, y si el azúcar es desoxirribosa se conoce como ácido desoxirribonucleico o ADN[11]. En el ADN las pirimidinas son timina (T) y citocina (C), y las purinas, adenina (A) y guanina

(G). El ARN contiene uracilo (U) en lugar de timina (T). La base nitrogenada se une en la posición 1´del azúcar y el fosfato en la posición 5´.

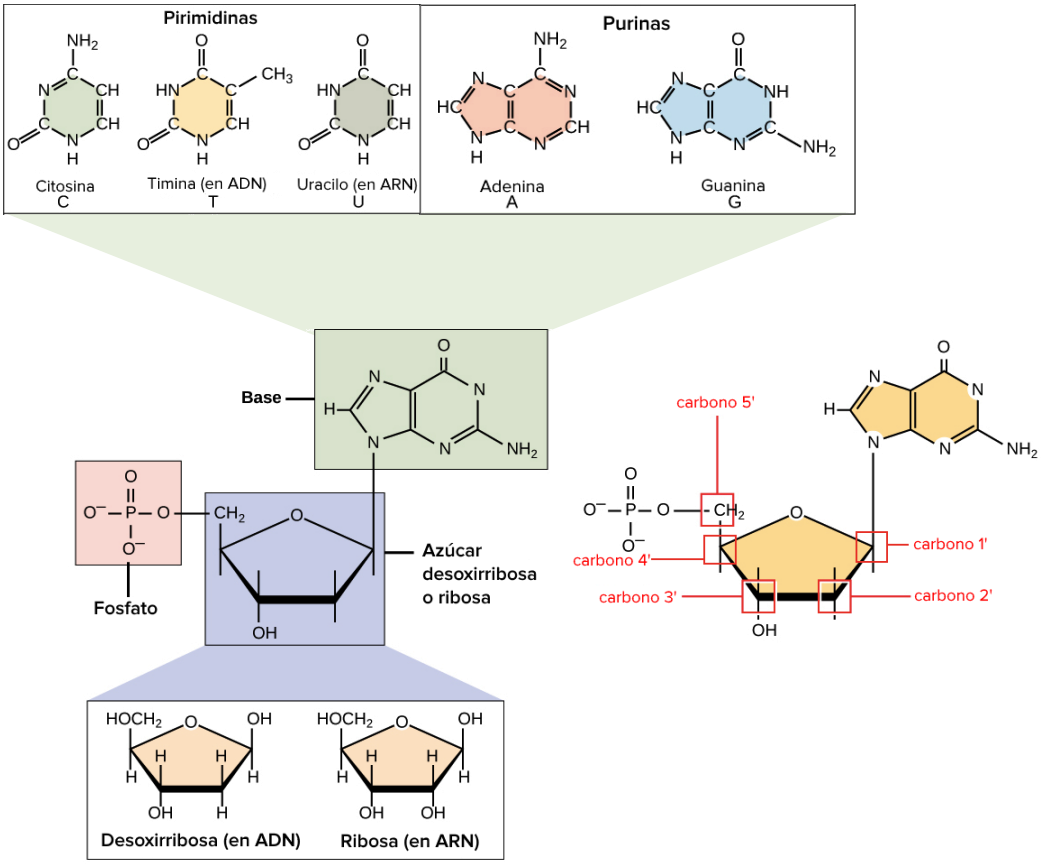


Figura 1.1- Un nucleótido está constituido por tres componentes: una base nitrogenada (verde), un azúcar ribosa o desoxirribosa (violeta) y uno o más grupos fosfatos (rosa). Estos componentes se unen en posiciones determinadas del azúcar, para formar el esqueleto de los ácidos nucleicos. Imagen tomada de *Biology- Openstax College*[12].

La combinación de una base nitrogenada con el azúcar (sin el fosfato) se denomina nucleósido, por ejemplo, adenosina (adenina + pentosa). El nucleótido presenta a su vez una, dos o tres unidades de fosfato, dando lugar a la adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP) y adenosina trifosfato (ATP). Lo mismo para las demás bases nitrogenadas (Figura 1.2).

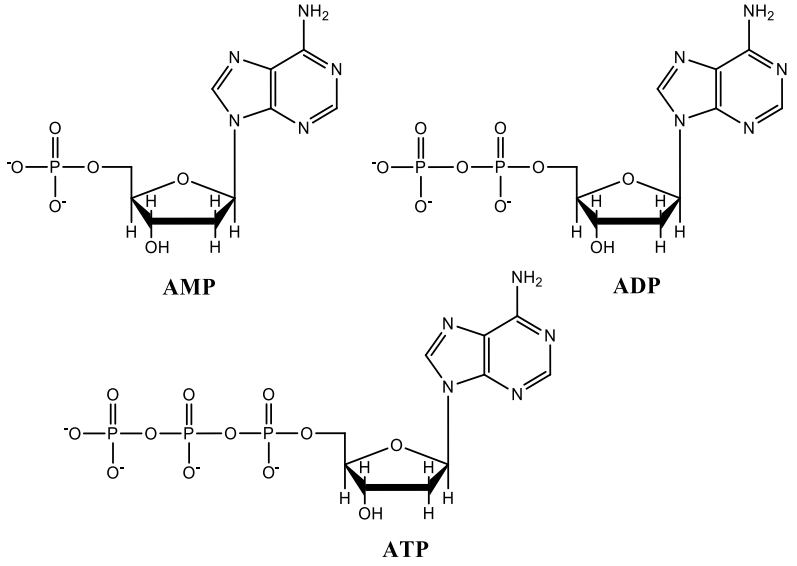


Figura 1.2- Estructura química de desoxirribonucleótidos: desoxiadenosinmonofosfato (AMP), desoxiadenosindifosfato (ADP) y desoxiadenosintrifosfato (ATP).

Las subunidades de nucleótidos se unen entre sí mediante enlaces fosfodiéster entre el grupo fosfato unido al azúcar en posición 5´ y el hidroxilo en posición 3´ del azúcar del siguiente nucleótido, formando de esta manera el esqueleto azúcar-fosfato. La propagación de la cadena del polímero lineal se da en una única dirección 5´a 3´(Figura 1.3). Los grupos fosfatos hacen que esta cadena lineal quede cargada negativamente a lo largo de todo el esqueleto azúcar-fosfato a pH > 3.

Este polímero lineal forma una estructura tridimensional que dependerá de los nucleótidos que la componen y le conferirá sus propiedades macromoleculares. Con ello se plegarán en estructuras secundarias que pueden ser dos cadenas complementarias formando hélices (por apareamiento de bases), u otras estructuras no canónicas como loops (bucles), bulges, pseudoknots y cuartetos, entre otros.

La estructura de doble hélice para el ADN fue propuesta en 1953 por James Watson y Francis Crick, basándose entre otros datos, en los aportes de

Rosalind Franklin y Maurice Wilkins mediante difracción de rayos X de fibras de ADN[13]. Watson y Crick, plantearon que el ADN estaba compuesto por dos cadenas polinucleotídicas que corren en sentido antiparalelo una respecto a la otra, formando una doble hélice en torno a un mismo eje central. Por este descubrimiento, en 1962 Watson, Crick y Wilkins compartieron el Premio Nobel de Medicina (Rosalind Franklin había muerto años antes y no fue reconocida por su aporte).

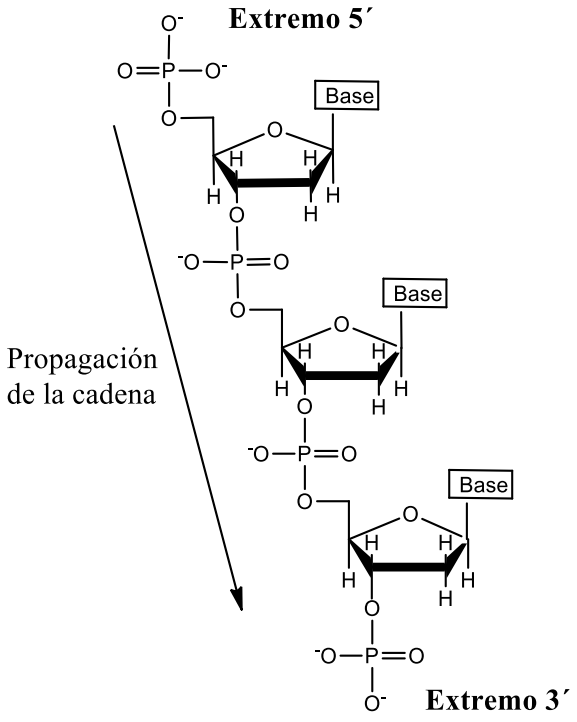


Figura 1.3- Esqueleto azúcar-fosfato para el ADN.

Como se puede ver en la Figura 1.4 en la doble hélice de ADN las bases están situadas en la parte interna casi en ángulo recto con respecto al eje helicoidal. La doble hélice da lugar a dos hendiduras denominadas gruta mayor y gruta menor del ADN. Estas grutas son las cavidades donde se producen por ejemplo las interacciones ADN-proteína mediante puente hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas[14].

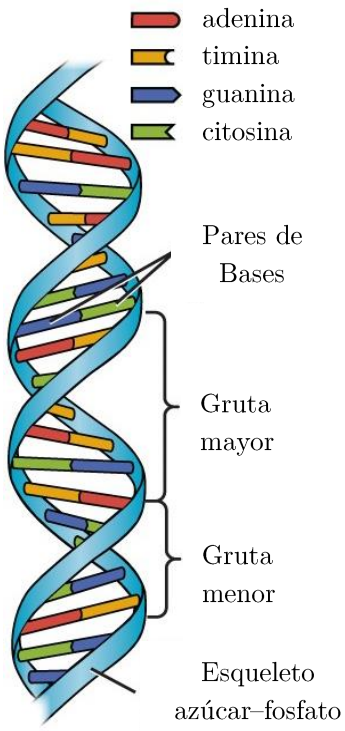


Figura 1.4- Esquema de la doble hélice de ADN. Las cintas representan el esqueleto azúcar-fosfato y las bases se muestran perpendiculares al eje del ADN. También se muestran las grutas mayor y menor.

Estas cadenas se mantienen unidas entre sí mediante enlaces puente hidrógeno entre dos pares de bases de las cadenas antiparalelas y mediante interacciones dipolares entre las bases apiladas en planos paralelos π-*stacking* (Figura 1.5) [15]. Para poder formar las dobles hélices solo pueden interaccionar ciertos pares de bases, A-T, T-A, C-G y G-C. Entre las bases A y T forman dos enlaces puente hidrógeno, mientras que entre C y G forman tres enlaces, lo que conlleva a una mayor estabilidad del par G-C con respecto al A-T.

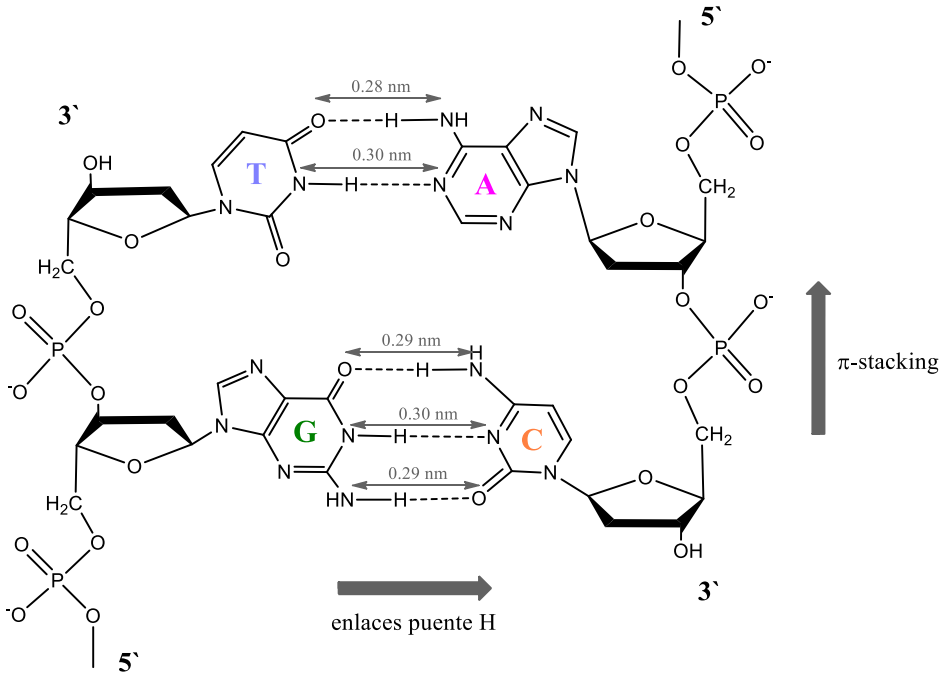


Figura 1.5- Interacciones de pares de bases del ADN por puente hidrógeno e interacciones dipolares entre bases apiladas π-*stacking*, que mantienen unidas las dos hebras antiparalelas.

Diez años después de que Watson y Crick publicaran su modelo de la doble hélice, Karst Hoogsteen[16] encontró que análogos de las bases A y T presentaban interacciones que eran geométricamente diferentes a las descriptas por Watson y Crick[17]. De forma similar también lo encontró en el apareamiento entre las bases G y C. Las interacciones tipo Hoogsteen son enlaces puente de hidrógeno, que se dan posiciones diferentes de la purina si los comparamos con los enlaces puente hidrógeno formados por las interacciones tipo Watson y Crick. En la Figura 1.6 se comparan ambos tipos de enlaces, donde se puede ver que la diferencia se encuentra en que, en las interacciones tipo Watson y Crick, los enlaces puente hidrógeno se dan entre el N1 de la purina y N3 de la pirimidina, mientras que para los pares de Hoogsteen estos se dan en entre la posición N7 de la purina y N3 de la pirimidina.

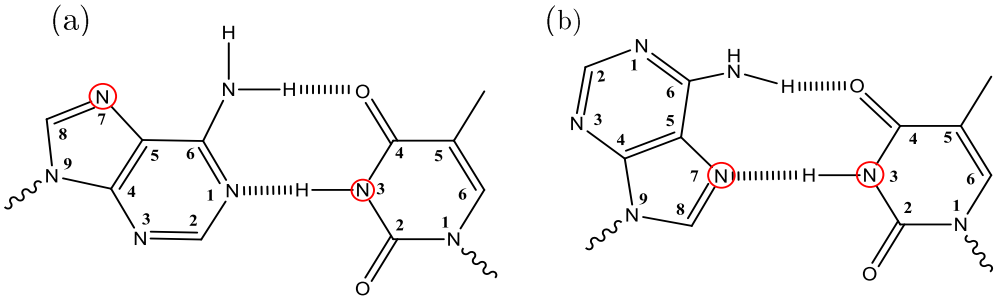


Figura 1.6- Comparación entre interacciones tipo Watson-Crick (a) y Hoogsteen (b).

Mediante las técnicas de difracción de rayos X, RMN de alta resolución y cálculos computacionales, se ha encontrado que el ADN puede adoptar distintas familias de dobles hélices, familia tipo-A, familia tipo-B y familia tipo-Z (Figura 1.7).

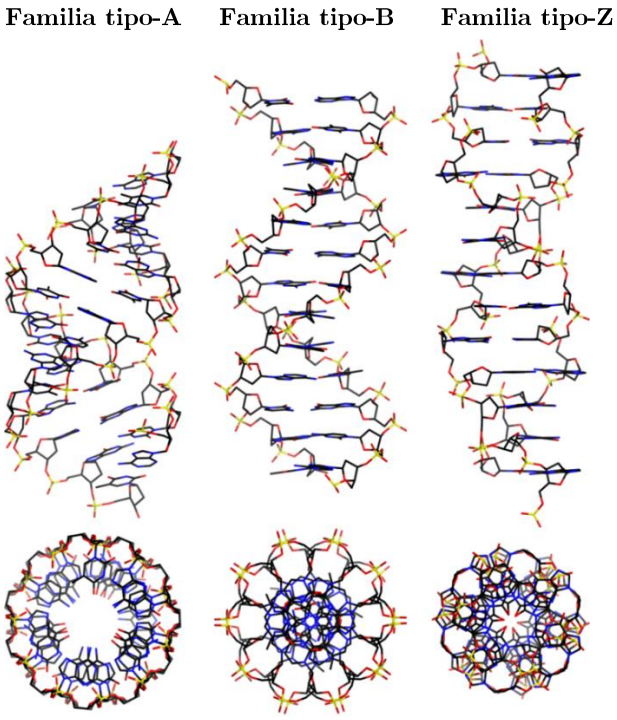


Figura 1.7- Distintas familias de dobles de hélices para el ADN

La doble hélice de la familia ADN-A presenta una gruta menor poco profunda y más amplia que la gruta mayor, que es más profunda. Es una

estructura más compacta y ancha. Las bases nitrogenadas están inclinadas respecto al eje de la hélice, más próximas entre sí y localizadas más simétricamente respecto al centro. La familia ADN-B es la forma predominante en las células y el modelo descripto por Watson y Crick. La doble hélice es más larga y angosta si se compara con el ADN-A. Tanto la gruta mayor como la menor tienen una profundidad similar, pero la gruta mayor es más ancha.

La familia ADN-Z presenta una estructura en zigzag a lo largo de la hélice. La doble hélice es la más estrecha y larga comparada con las otras dos familias descriptas. La gruta mayor no presenta profundidad y la menor es profunda.

Las familias ADN-A y ADN-B son dextrógiras (con giro a la derecha), mientras que la familia ADN-Z es levógira (con giro hacia la izquierda).
La estructura y por lo tanto la función del ADN depende de la secuencia. El ADN-A se forma fácilmente dentro de ciertos tramos de purinas (GAGGGA). El ADN-B es favorecido por ciertas secuencias mixtas. El ADN-Z se ve favorecido por la alternancia entre purinas y pirimidinas (CGCGCG)[18].

La estructura del ARN es semejante a la del ADN, excepto por la presencia de ribosa en lugar de desoxirribosa y de uracilo en lugar de timina como ya se mencionó. En las moléculas de ARN suelen existir zonas de complementariedad de bases, lo que da lugar a la formación de enlaces puente hidrógeno, entre varias regiones distantes de la misma molécula. En estos casos suele formarse una estructura helicoidal semejante a la del ADN-A. Las dobles hélices del ARN pueden encontrarse en dos formas, tipo A (11 nucleótidos por vuelta) y tipo A´(12 nucleótidos por vuelta). Estas son

conformaciones estructuralmente similares, dependiendo de la concentración de sales del medio. A baja fuerza iónica el ARN-A es predominante, mientras que a altas fuerzas iónicas predomina el ARN-A´[19] [20].

Las doble hélices son las estructuras más comunes en el ADN y el ARN, pero también pueden formarse otras estructuras secundarias intra o intermoleculares. Estas estructuras combinan zonas doble cadenas con zonas simple cadena, para formar horquillas (*hairpins*), protuberancias (*bulges*), loops internos, junturas (*junctions*) como se puede ver en la Figura 1.8.

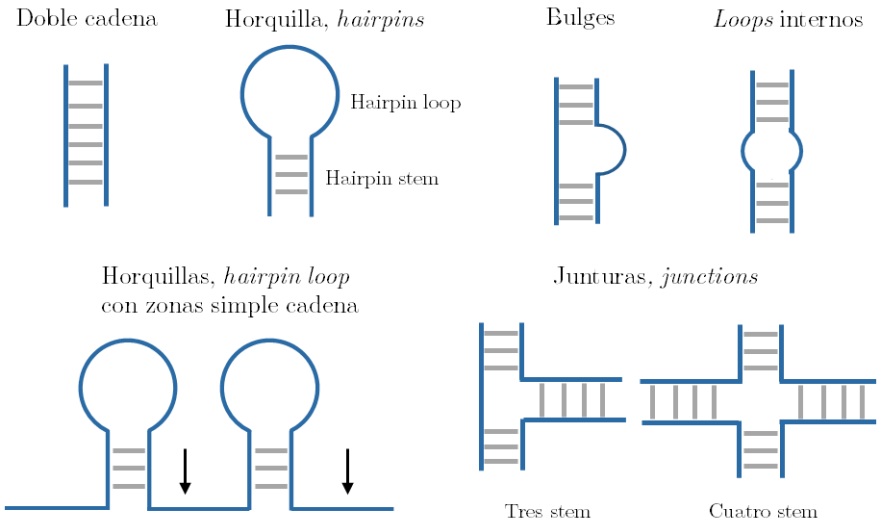


Figura 1.8- Estructuras secundarias de los ácidos nucleicos.

1.2 Ácidos nucleicos con actividad catalítica

Como se mencionó anteriormente en la naturaleza existen ácidos nucleicos con actividad catalítica, como las denominadas ribozimas. Las ribozimas presentan actividad catalítica intrínseca y pueden catalizar reacciones químicas, muchas de ellas sin requerir cofactores [21]–[23]. La actividad catalítica de las primeras ribozimas descubiertas, combinaban

transesterificación e hidrólisis de un enlace fosfodiéster del esqueleto del ARN (Figura 1.9). Por otro lado, la ribozima se une al *target* (una molécula de ARN) por complementariedad de bases, lo cual permite suponer que hay zonas altamente conservadas que funcionarían como sitio catalítico.

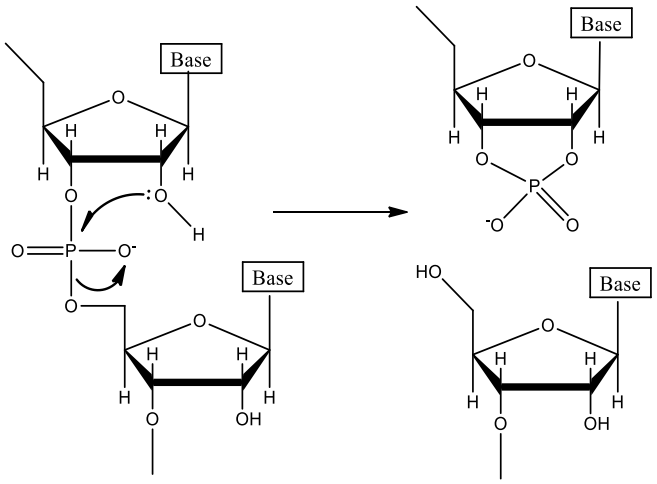


Figura 1.9- Mecanismo de hidrólisis del enlace fosfodiéster por las ribozimas. El grupo OH- de la posición 2´del azúcar realiza un ataque nucleofílico al fosfato y cede un protón al oxígeno saliente.

Un ejemplo muy difundido de ARN con actividad catalítica en la naturaleza es la ribozima cabeza de martillo aislada originalmente de virus que infectan plantas. La ribozima cabeza de martillo cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster en un sitio específico de su propia secuencia[24], [25].

El conocimiento de la actividad catalítica de las ribozimas abrió un camino para sintetizar moléculas de ARN donde se combina la actividad catalítica con la especificidad provista por la complementariedad de bases, como potencial vehículo para la inhibición de la expresión de determinados genes. Por ejemplo, se sintetizó un fragmento de la ribozima cabeza de martillo que hidroliza el ARN mensajero (mARN) que codifica para una proteína

regulatoria expresada en pacientes con cáncer de mama. Otras ribozimas han sido usadas para cortar ARN mensajeros del virus de HIV y el virus de la hepatitis C[26], [27].

Con el descubrimiento de las ribozimas, surgió la pregunta acerca de si el ADN podría también catalizar reacciones, dada la similitud química del ADN con el ARN. Esto llevó a que en la década de 1990 se desarrollaron las primeras ribozimas sintéticas basadas en ADN, las deoxirribozimas o DNAzimas, como se las llamó posteriormente.

Las deoxirribozimas no se han encontrado en la naturaleza, pero se han obtenido por selección en vitro una gran variedad de ellas. Y a la hora de utilizarlas en aplicaciones extracelulares para catalizar reacciones químicas resultaron ser más ventajosas que las ribozimas por la mayor estabilidad que presenta el ADN por sobre el ARN.

1.2.1 DNAzimas

Las DNAzimas son moléculas de ADN sintéticas simple cadena que exhiben actividad catalítica.

En 1994 Breaker y Joyce[28] fueron los primeros en reportar la selección *in vitro*, de una secuencia específica de ADN con actividad catalítica dependiente de Pb^{+2} y que era capaz de hidrolizar un enlace fosfodiéster de ARN. Esta selección la llevaron a cabo mediante la técnica denominada SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) o selección molecular *in vitro* a partir de una biblioteca de ácidos nucleicos (véase sección 1.4). Después de este primer reporte, se sintetizaron una gran cantidad de desoxirribozimas que catalizan una gran variedad de reacciones, como ruptura, ligación, hidrólisis de ARN o ADN, formación de enlace C-C

mediante una reacción de Diels-Alder, metalación de porfirinas con incorporación de Cu^{+2} o Zn^{+2}, etc. En la tabla 1.1 se muestran algunos ejemplos de distintas reacciones catalizadas por DNAzimas, en las cuales se requieren cationes metálicos monovalentes o divalentes como cofactor.

Estas capacidades catalíticas de las DNAzimas han permitido que éstas sean utilizadas en aplicaciones muy variadas que van desde actuar como agentes terapéuticos para destruir un *target* de mARN hasta su aplicación en ensayos analíticos para determinar ciertos iones metálicos[29].

Tabla 1.1- Ejemplos de algunas DNAzimas.

Actividad catalítica de la DNAzima	**Cofactor metálico**	**Ref.**
Ruptura de enlaces en ARN	$Pb^{+2}/Zn^{+2}/Ca^{+2}/Mg^{+2}$	[26], [29]–[32]
Ruptura de enlaces en ADN	$Cu^{+2}/Mn^{+2}/Zn^{+2}$	[34]–[36]
ADN ligasa	$Zn^{+2}/Cu^{+2}/ Mn^{+2}$	[37], [38]
ARN ligasa	Zn^{+2}/Mg^{+2}	[39], [40]
Diels-Alder	Ca^{+2}	[41]
Metalación de porfirinas	Zn^{+2}/Cu^{+2}	[42]
Peroxidasa	K^{+}	[43]

1.2.2 DNAzimas con actividad peroxidasa

Las DNAzimas con actividad peroxidasa imitan la actividad catalítica de las enzimas peroxidasas (de ahí el término en inglés "peroxidase-mimicking DNAzyme").

Las DNAzimas con actividad peroxidasa tienen la particularidad de ser secuencias de ADN ricas en guaninas, que forman estructuras denominadas cuartetos de guaninas (G). Los cuartetos de G que forman las DNAzimas son análogos a los cuartetos de G que se encuentran en los extremos de los cromosomas de células eucariotas, que son secuencias de ADN no codificantes, altamente repetitivas llamadas telómeros[44], [45].

Los cuartetos de G están constituidos por apilamientos de al menos dos tétradas de guaninas, formadas por la asociación de 4 guaninas en un mismo

plano (Figura 1.10 der.). Los factores que contribuyen a la estabilización de los cuartetos de G son los enlaces puente hidrógeno entre las guaninas de un mismo plano, el *stacking* entre los distintos planos, la solvatación y la coordinación con cationes metálicos (como por ej. K^+)[46]. Cada base del cuarteto es tanto donante como aceptora de dos puentes de hidrógeno de una base vecina, con lo cual la tétrada forma ocho enlaces puente hidrógeno. Las guaninas en los cuartetos de G interaccionan mediante enlaces tipo Hoogsteen y se encuentran estabilizados por cationes metálicos monovalentes o divalentes (Figura 1.10 izq.).

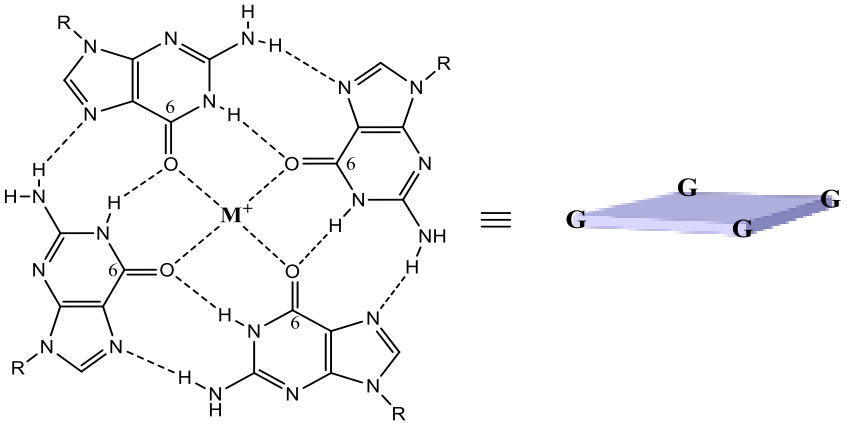


Figura 1.10- Enlaces tipo Hoogsteen entre guaninas e interacciones del cuarteto de G con un metal (izquierda). Las 4 guaninas quedan en un mismo plano (derecha).

Esta estabilización, por coordinación de iones metálicos, se produce vía coordinación con los oxígenos de las guaninas (O6), que forman un bolsillo negativo. Esto hace que esta estructura interaccione fuertemente con el catión en el centro del cuarteto de guaninas[47]–[49]. En general, el catión preferido es el potasio (K^+(r_{ion}:130 pm) > Ca^{2+}(r_{ion}:99 pm) > Na^+(r_{ion}:96 pm) > Mg^{+2}(r_{ion}:65 pm) > Li^+(r_{ion}:60 pm)). La razón de esta preferencia podría ser la cavidad que forma el cuarteto de G en cuanto a tamaño y geometría correcta para la quelación, y el radio iónico de cada metal[50].

Los cuartetos de guaninas pueden exhibir diferentes topologías, formando estructuras tridimensionales complejas[51], que dependerá de cuántas hebras independientes de ADN participen (una, dos o cuatro), como se puede ver en la Figura 1.11.

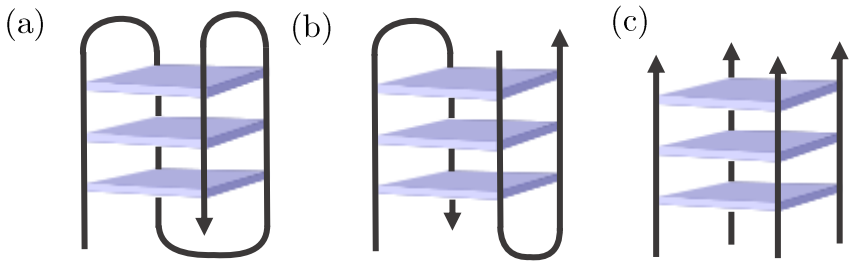


Figura 1.11- Representación esquemática de las estructuras de los cuartetos de G. (a) monómero, (b) dímero y (c) tetrámero de ADN.

Los cationes metálicos que estabilizan estas estructuras se colocaran en el mismo plano que las guaninas o entre los planos dependiendo de su radio iónico. En el caso de los cationes de mayor radio iónico se colocan entre los planos de los cuartetos (caso del K^+) mientras que los de menor radio se colocan en el mismo plano que las guaninas (caso del Na^+)[46].

Las hebras pueden presentar orientaciones relativas paralelas o antiparalelas (Figura 1.12).

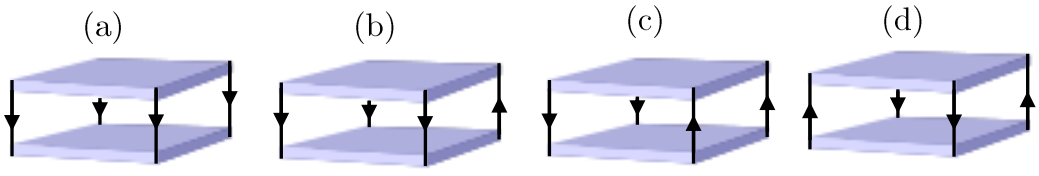


Figura 1.12- Representación de cuatro tipos de núcleos de cuartetos de G. (a) paralelo, (b) (3+1), (c) antiparalelo (arriba-arriba-abajo-abajo) y (d) antiparalelo (arriba-abajo-arriba-abajo).

A su vez las guaninas de la tétrada pueden tomar conformaciones glicosídicas *syn* (base nitrogenada dirigida hacia el azúcar) y *anti* (base

nitrogenada más alejada del azúcar) como se puede ver en la Figura 1.13. La direccionalidad del enlace de hidrógeno de un cuarteto de G en el núcleo puede ser en sentido horario o antihorario, y esto está directamente relacionado con las conformaciones glicosídicas de las guaninas para cada tipo de orientaciones de hebra. Los patrones de apilamiento entre los cuartetos de G adyacentes de la misma direccionalidad de enlace de hidrógeno difieren de aquellos que se dan entre cuartertos de G adyacentes que presentan direccionalidades de enlace de hidrógeno opuestas[47].

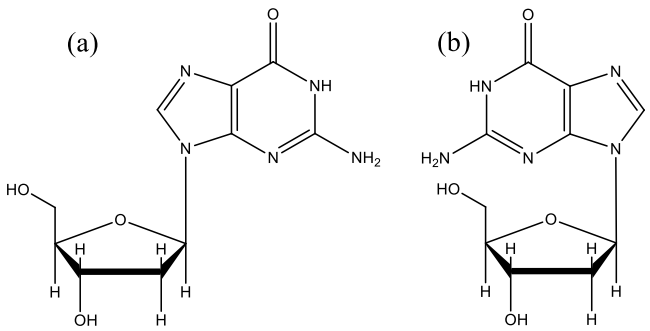


Figura 1.13- Conformación del enlace N-glicosídico *anti* (a) y *syn* (b).

En cuanto a los bucles, existen tres tipos principales (Figura 1.14): (a) bucle diagonal que conecta dos hebras antiparalelas opuestas a través de la diagonal, (b) bucle lateral que conecta dos hebras antiparalelas adyacentes, (c) bucle de inversión de doble cadena (también llamado bucle de hélice o bucle lateral) que conecta dos hebras paralelas adyacentes.

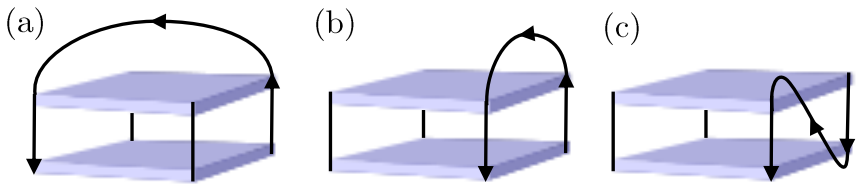


Figura 1.14- Tres tipos de bucles: (a) bucle diagonal, (b) bucle lateral y (c) bucle doble cadena inversa. Las flechas indican la orientación de 5´a 3´. Adaptado de Phan et.al[47].

La estructura de los cuartetos de G se ha determinado por varios métodos como la espectroscopia de RMN, cristalografía de rayos X y el modelado molecular. Para determinar las orientaciones de las hebras, la coordinación de los cationes y los tamaños moleculares, se utilizan otros métodos como espectroscopía de dicroísmo circular electrónico, espectrometría de masas nativa, espectroscopía de absorción UV, electroforesis y cromatografía[46]. Como cada una de estas técnicas proporciona diferentes tipos de información, se deben combinar varias de ellas para sacar conclusiones.

La actividad peroxidasa de estas DNAzimas viene dada por el complejo que forman con la protoporfirina IX (hemina). Las primeras DNAzimas peroxidasas fueron obtenidas mediante la técnica de SELEX por Travascio y Sen[43] a finales de la década de 1990, y fueron denominas PS5.M y PS2.M. Las DNAzimas reportadas por Travascio y Sen estaban compuestas por una sola hebra de ADN[52]–[54]. Hay reportes de DNAzimas peroxidasas bicatenarias y tetracatenarias pero son menos comunes [55], [56],[57].
En la tabla 1.2 se muestra un resumen de otros oligonucleótidos ricos en guaninas que unen hemina y forman DNAzimas con actividad peroxidasa[58].

Tabla 1.2- Ejemplos de algunas DNAzimas con actividad peroxidasa.

Oligonucleótido	**Secuencia de ADN (5´a 3´)**	Hebra de ADN	**Ref.**
PS5.M	GTGGGGCATTGTGGGTGGGTGTGG	monómero	[43]
PS2.M	GTGGGTAGGGCGGGTTGG	monómero	[43]
AGRO 100	GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG	dímero	[55]
T30695	GGGTGGGTGGGTGGGT	monómero	[59]
PW17	GGGTAGGGCGGGTTGGG	monómero	[60]
T4G4	TTTTGGGG	tetrámero	[61]

Dentro de las protoporfirinas, protoporfirina IX es la más abundante y fisiológicamente importante ya que se encuentra en la hemoglobina, mioglobina y en la mayor parte de los citocromos. Las protoporfirinas son el grupo prostético de grandes familias de proteínas que cumplen diversas funciones, que incluyen la transferencia de electrones, el transporte de gases diatómicos y diversos tipos de catálisis oxidativa[62]. En particular la hemina cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno con lo cual presenta actividad peroxidasa.

Estructuralmente, las porfirinas son compuestos macrocíclicos que contienen cuatro anillos de pirrol unidos a través de puentes de metino. El núcleo de porfirina es un ligando tetradentado que tiene en el centro un espacio donde se puede coordinar un metal. En la hemina, el metal es hierro y se encuentra en estado de oxidación hierro (III), con lo cual presenta una carga positiva residual que es neutralizada por un cloruro (Figura 1.15).

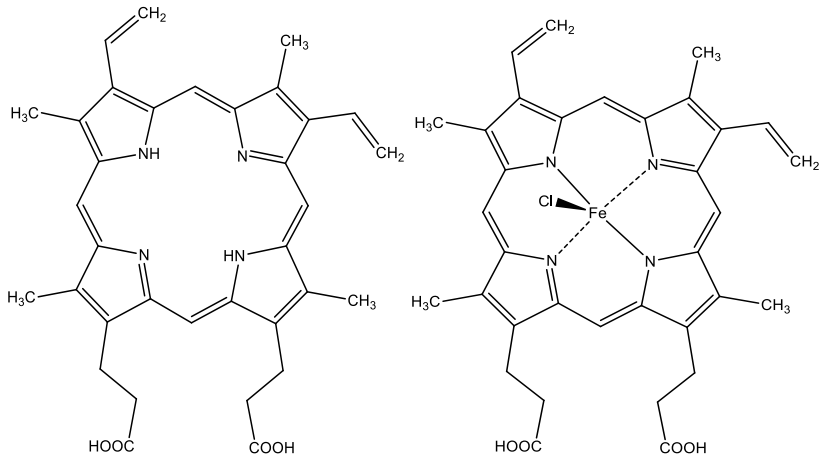


Figura 1.15- Estructura de la protoporfirina IX (izquierda) y hemina (derecha).

Los cuartetos de G pueden unir porfirinas mediante interacciones tipo π-π y electrostáticas con los fosfatos[63]. Generalmente la interacción electrostática con el esqueleto de fosfatos genera interacciones no específicas.

El oligonucleótido de ADN obtenido por Travascio y Sen fue denominado PS5.M (5´-GTGGGGCATTGTGGGTGGGTGTGG-3´). Luego sintetizaron otro oligonucleótido con 6 nucleótidos menos, al cual llamaron PS2.M[64] (5'-GTGGGTAGGGCGGGTTGG-3'), que presentaba una actividad catalítica aun superior a la de la PS5.M obtenida previamente. Travascio y Sen, encontraron que estos complejos oligonucleótido-hemina no solo presentaban actividad catalítica peroxidasa, sino que a su vez la constante de velocidad del complejo era dos órdenes de magnitud mayor a la de la hemina libre ($k_{PS2.M}$= 1.10^4 $M^{-1}s^{-1}$ y k_{hemina}= 1.10^2 $M^{-1}s^{-1}$)[50]. Estos resultados los llevaron a concluir que este tipo de moléculas de ADN ricas en guanina juegan un papel importante en la catálisis. A su vez, estas DNAzimas con actividad peroxidasas estaban estabilizadas por cationes monovalentes como K^+, Li^+ y Na^+, siendo el K^+ con el que se obtuvo una mayor estabilización[65].

En trabajos posteriores Willner y colaboradores[66] encontraron que modificando la secuencia de la PS2.M, en particular eliminando dos bases del extremo 5´ (GT) y agregando una base en el extremo 3´(G), se obtenía un incremento de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa, quedando un oligonucleótido de 17-*mer* (5'-GGGTAGGGCGGGTTGGG-3').

Más tarde, Zhou y col.[67] estudiaron cómo se modificaba la capacidad catalítica de la DNAzima peroxidasa al agregar desoxirribosa trifosfato de timina (dTTP) en los extremos 3´y/o 5´, partiendo de la secuencia de 17-*mer*. Estas modificaciones en uno o ambos extremos incluyeron $dTTP_n$ con n=1 a 6. Calcularon para todas las combinaciones de secuencias estudiadas la constante de Michaelis-Menten (K_M), que representa la constante de disociación del complejo enzima-sustrato. Un valor bajo de K_M indica una gran afinidad de la enzima por el sustrato lo que trae aparejado un aumento de la

actividad catalítica.

Por otro lado, realizaron experimentos de temperatura de *melting* (T_M) o fusión para el oligonucleótido y el complejo oligonucleótido-hemina (DNAzima) en cada caso. Esto les permitió estimar la estabilidad de los cuartetos de G formados con las distintas secuencias estudiadas.

Con estos dos experimentos encontraron que estas modificaciones afectaban la estabilidad del complejo entre el oligonucleótido y la hemina, lo cual estaba directamente relacionado con la actividad peroxidasa que finalmente presentaría el complejo. Concluyeron que agregar $dTTP_n$ en el extremo 5´producía un incremento en la habilidad del oligonucleótido para unir hemina, mientras que el agregado de $dTTP_n$ en el extremo 3´ producía una disminución de dicha habilidad. Particularmente, con la modificación $dTTP_4$ en el extremo 5´, se obtuvo el valor más bajo de K_M. Con los experimentos de T_M, encontraron una mayor estabilización del cuarteto de G cuando incorporaron $dTTP_3$ y $dTTP_4$ en el extremo 5´. Estas secuencias fueron denominadas $DZ5T_3$ de 20-mer (5'-TTTGGGTAGGGCGGGTTGGG-3') y $DZ5T_4$ de 21-mer (5'-TTTTGGGTAGGGCGGGTTGGG-3').

1.3 Ácidos nucleicos con capacidad de reconocimiento molecular

Los ácidos nucleicos que tienen capacidad de reconocimiento molecular se denominan aptámeros. Estos son secuencias cortas de ADN o ARN simple cadena, obtenidas por la técnica de selección molecular *in vitro* o SELEX, y tienen la propiedad de unirse una molécula blanco o *target* con alta afinidad y selectividad. Los aptámeros también son denominados "anticuerpos artificiales". Los oligonucleótidos descriptos en la sección anterior, como la

secuencia PS2.M, $DZ5T_3$ y las mencionadas en la tabla 1.2, que presentan actividad peroxidasa en presencia de hemina, son en realidad aptámeros de hemina, aunque algunos de ellos también unen otras moléculas.

Los aptámeros presentan estructuras secundarias variadas caracterizadas por zonas tanto doble cadena como simple cadena y horquillas (*hairpin loops)*, cuartetos de guaninas, junturas, *bulges*, tripletes, etc, como se puede observar en la Figura 1.16. A su vez, las estructuras tridimensionales que pueden tomar los ácidos nucleicos, hacen que los aptámeros pueden funcionar como receptores, uniendo una gran variedad de ligandos que van desde iones metálicos hasta células, con alta afinidad y especificidad[68], [69].

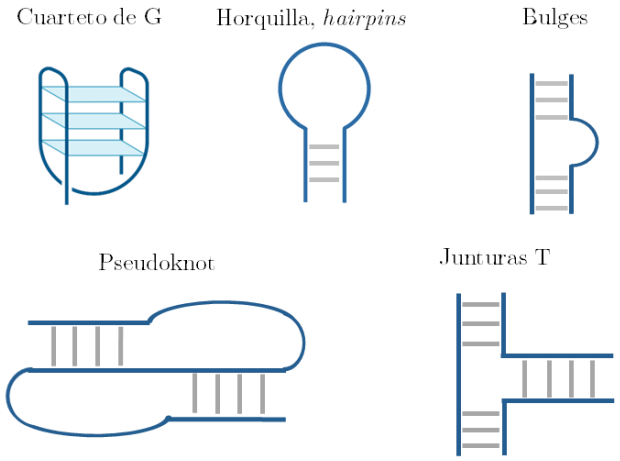


Figura 1.16- Ejemplos de estructuras secundarias que adoptan los aptámeros para unirse a sus moléculas *target*. Adaptado de "*DNA conjugates and Sensors*"[70].

Los primeros aptámeros seleccionados fueron publicados en 1990 por Ellington y Szoztak[3]. Eran oligonucleótidos de ARN que se unían a una variedad de colorantes orgánicos. Ese mismo año también Tuerk y Gold publicaron la puesta a punto de la técnica de selección *in vitro* (a la que luego Tuerk denominaría SELEX por *Sistematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), obteniendo el aptámero contra la T4 ADN polimerasa de un bacteriófago[4].

Luego de esto, se seleccionaron una gran cantidad de aptámeros contra distintos *targets*. Algunos ejemplos relevantes son los siguientes: aptámeros contra proteínas como la trombina[71]–[73], inmunoglobulina IgE[74], streptoavidina[75], derivados de ácidos nucleicos como AMP[76], ATP[77], moléculas orgánicas pequeñas como dopamina[78], cocaína[53], hemina[43], iones inorgánicos como Zn^{+2}[79], Ni^{+2}[80], etc.

La técnica de selección *in vitro* SELEX se inicia con una biblioteca de ácidos nucleicos simple cadena (ADN, ARN o ácidos nucleicos modificados). Esta biblioteca es un pool que consiste en aproximadamente 10^{15} secuencias aleatorias que presentan 30 a 100 nucleótidos y serán ser incubadas con la molécula *target* o blanco.

La SELEX consiste en la repetición sucesiva de un ciclo compuesto por varios pasos: unión, partición, elución, disociación y amplificación[81], tal como se puede ver en la Figura 1.17.

En el primer ciclo de SELEX la biblioteca y el *target* (proteína, moléculas orgánicas pequeñas, hidratos de carbono, antibióticos, etc) son incubados para permitir la formación del complejo oligonucleótido:*target*. La inmovilización del *target* en una matriz adecuada permite la eficaz separación o elución de los oligonucleótidos que no interaccionaron con este por sucesivos lavados. Hay una gran variedad de soportes sólidos utilizados para llevar a cabo la partición, como columnas de afinidad (sefarosa, agarosa), partículas magnéticas, membranas de nitrocelulosa, etc.

Luego se lleva cabo la disociación del complejo oligonucleótido:*target*, para posteriormente amplificar estos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para oligonucleótidos de ADN o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) para oligonucleótidos de

ARN. El producto de PCR doble cadena debe acondicionarse de manera de obtener un *pool* de oligonucleótidos simple cadena. Este pool de oligonucleótidos es usado para una nueva ronda de SELEX.

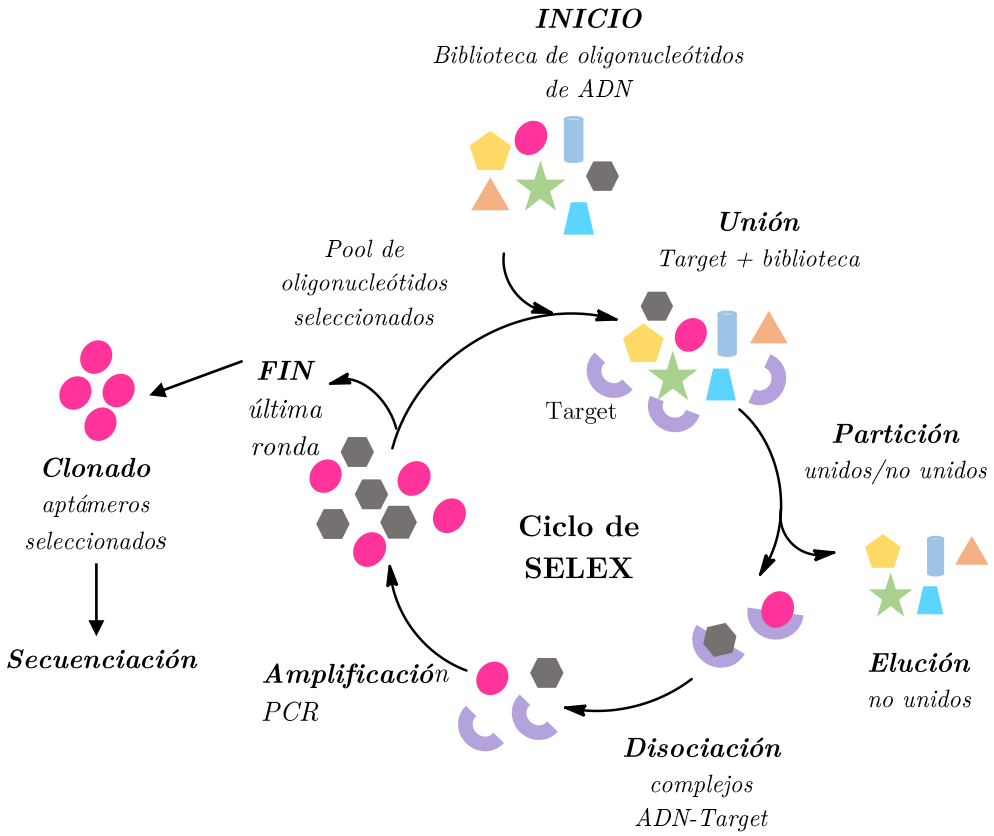


Figura 1.17- Selección *in vitro* de aptámeros de ADN mediante SELEX.

Mediante los sucesivos de ciclos de selección y amplificación, el *pool* de oligonucleótidos inicial se reduce a unas pocas secuencias que presentan alta afinidad y especificidad por el *target*. La cantidad de ciclos depende de varios factores, como las características y concentración del *target*, la calidad de la biblioteca de partida, las condiciones de selección, la eficiencia de la partición, etc. En general se requieren entre 6 a 20 rondas de SELEX.

Una vez finalizada la SELEX, los aptámeros seleccionados son purificados y secuenciados. Muchas veces es necesario realizar modificaciones

químicas a los aptámeros obtenidos para mejorar su capacidad de unión al *target* y/o aumentar su estabilidad biológica.

El uso de aptámeros para reconocimiento molecular presenta ventajas frente al uso de anticuerpos (proteínas). En particular los aptámeros de ADN que presentan una mayor estabilidad química y biológica que los aptámeros de ARN. Algunas de las ventajas del uso de aptámeros de ADN frente a los anticuerpos son[82], [83]:

- Se obtienen por síntesis química lo cual resulta en una gran homogeneidad de lotes de producción y a bajo costo.
- Se pueden desarrollar contra blancos tóxicos o no inmunogénicos.
- Sus secuencias se pueden desnaturalizar y renaturalizar rápidamente.
- Son estables por largos períodos de tiempo en condiciones normales de almacenamiento.
- Se evita el uso de compuestos radiactivos y animales de laboratorio.
- Además, al ser secuencias de ADN, pueden diseñarse de manera de obtener construcciones en las cuales el aptámero se encuentre inserto en una misma secuencia junto con otro bloque que cumpla una función específica. Por ejemplo, estar acoplado a una secuencia que presente una capacidad catalítica o una molécula que actúe como marcador.

Las limitaciones que presentan los aptámeros frente a los anticuerpos radica en que aún no se cuenta con una gran variedad de aptámeros contra blancos moleculares, como sí es el caso de los anticuerpos. De todas maneras, cabe destacar que los anticuerpos cuentan con miles de años de evolución y son generados por la compleja maquinaria que es el sistema inmunológico. Los

aptámeros, por su parte, son obtenidos sintéticamente desde 1990, con lo cual aún hay mucho para trabajar sobre ellos.

1.4. Uso de ácidos nucleicos en aplicaciones analíticas

La detección de moléculas pequeñas, proteínas, iones metálicos, material genético de bacterias y virus, toxinas, etc, en matrices complejas como pueden ser fluidos corporales, agua, suelo, se llevan a cabo por una gran variedad de métodos instrumentales. Entre ellos, los más utilizados son la cromatografía gaseosa, la cromatografía líquida y la electroforesis capilar acopladas a espectrometría de masas (GC-MS, LC-MS y CE-MS respectivamente), inmunoensayos o técnicas de biología molecular como la PCR y la secuenciación oligonucleotídica y peptídica.

La ventaja del uso de ácidos nucleicos para la detección de estos blancos mencionados radica en que se puede sintetizar una molécula de ADN bifuncional, que contenga un elemento de reconocimiento del *target* y otro que genere una señal al producirse dicho evento. Este elemento de reconocimiento de la molécula blanco puede ser un aptámero o una secuencia complementaria a una región específica del genoma cuando el blanco es el material genético de un virus, una bacteria, etc, mientras que el dominio que genera la señal puede ser un ácido nucleico con actividad catalítica.

Los aptámeros suelen utilizarse acoplados a marcadores, como moléculas fluorescentes por unión covalente, o enzimas conjugadas con avidina mediante el uso de aptámeros biotinilados, pero esto implica más pasos de preparación y un mayor costo.

Cuando el elemento de reconocimiento es un aptámero que está conjugado con un ácido nucleico con actividad catalítica, se lo suele denominar

aptazima[84]. Sin embargo, como este término surge de las ribozimas alostéricas que tienen dos dominios, una secuencia complementaria a un sector de la secuencia *target* y la ribozima, existe una definición más restrictiva del término aptazima. Esta definición indica que las aptazimas están compuestas por una ribozimas o desoxirribozima (DNAzima) cuya actividad catalítica puede regularse por el estado de unión a un *target* del dominio aptamérico adjunto[85]. Es decir, existe un efecto alostérico, donde la actividad catalítica de la ribozima o desoxirribozima se ve alterada drásticamente por la presencia de un *target* efector. Los primeros en plantear este tipo de arreglos fueron Breaker y colaboradores, los cuales sintetizaron una aptazima de ARN, es decir un aptámero de ARN contra ATP unido a la ribozima cabeza de martillo. La interacción del ATP con el dominio aptamérico causaba la inhibición de la actividad catalítica de la ribozima[68], [86].

Luego Sen y colaboradores sintetizaron la primera aptazima de ADN, la cual estaba compuesta por un aptámero de ADN contra ATP y la DNAzima 10-23, que presenta actividad hidrolítica de ARN[87]. También Ellington sintetizó una aptazima de ADN compuesta por el mismo aptámero de ATP y pero con una DNAzima con actividad ADN ligasa[88]. En estos casos la presencia de ATP activa la catálisis de cada una de las DNAzimas.

Se han desarrollado también una gran variedad de aptazimas, donde el dominio catalítico es la DNAzima con actividad peroxidasa acoplada a aptámeros para detección de AMP[54], ATP[77], cocaína[53] y lisozima[89].

En la mayoría de estos casos, el ADN y el *target* se encuentran en solución y el método de detección elegido es el óptico[65],[82]. También se han desarrollado ejemplos de detección electroquímica, pero en estos casos se trabajó, en general, con secuencias de ADN inmovilizadas sobre

electrodos[76],[91],[92], no siendo tan común el uso de secuencias en solución[53] para este tipo de método de detección.

1.4.1. Detección de una secuencia de ADN: Genosensor

La detección del material genético correspondiente a bacterias, virus, marcadores transgénicos, regiones que codifican para factores de virulencia o toxinas en muestras complejas, habitualmente se lleva a cabo por técnicas de biología molecular como PCR y secuenciación.

El desarrollo de métodos analíticos rápidos y simples que permitan identificar este tipo de *target* o blanco tiene gran utilidad en el campo de los biosensores.

La identificación de secuencias conservadas del genoma (por ejemplo, de una cepa bacteriana específica) permite el uso de secuencias de captura que por complementariedad de bases interaccionen con ella. A su vez estas secuencias de captura pueden acoplarse a marcadores para llevar a cabo la detección. Entre los marcadores más utilizados se encuentran moléculas con propiedades redox como el ferroceno[93], el azul de metileno[94], [95], el ácido carmínico [96] o moléculas fluorescentes como fluoresceína[97], Cy3[98]. En estos casos los marcadores se activan o se desactivan cuando la secuencia de captura interactúa con su secuencia *target* (complementaria).

Una estructura muy versátil para este tipo de construcciones de ácidos nucleicos es la estructura tipo horquilla o *hairpin-loop*. Como se puede ver en la Figura 1.18, una horquilla es una secuencia de ADN monocatenaria que presenta una zona de hibridación intramolecular, llevando esto a la formación de un "bucle" y un "tallo"[99]. Esta estructura es altamente frecuente en moléculas de ARN.

Figura 1.18- Estructura de horquilla o *hairpin-loop*

Cuando el marcador es una molécula fluorescente las estructuras más reportadas son las denominadas balizas moleculares o *molecular beacons*[97], [98], [100], [101]. Estas están compuestas por una horquilla que presenta en su extremo 5´ una molécula fluorescente y en el extremo 3´ una molécula que inhibe la fluorescencia (*quencher*). En presencia de la secuencia *target*, la horquilla se abre y el *quencher* se aleja del fluoróforo permitiendo de esta manera la fluorescencia de esta molécula (Figura 1.19).

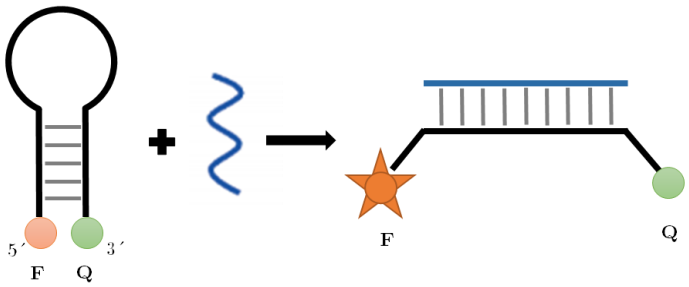


Figura 1.19- Representación esquemática de una baliza molecular.

Por otro lado, se ha reportado el uso de la DNAzima peroxidasa como marcador acoplada a secuencias de captura, como por ejemplo para la detección de células HeLa (una de las células humanas más usadas cultivo celular *in vitro*)[66] o de una secuencia de ADN modelo [91].

1.5 Uso de ácidos nucleicos en la detección de biomarcadores en tejidos

La detección de biomarcadores en secciones histológicas permite poner en manifiesto una molécula o grupo de moléculas y estudiar su distribución tisular *in situ*. Los biomarcadores en muestras de tejidos son indicadores de un proceso biológico normal o patogénico, lo cual es de gran utilidad en el diagnóstico histopatológico, seguimiento y tratamiento de un proceso cancerígeno. A pesar de los avances en las últimas décadas de la genética y la biología molecular, la histopatología sigue utilizándose junto a estas para el diagnóstico de cáncer.

En particular, la inmunohistoquímica (IHQ) es un método de inmunolocalización que permite detectar una gran variedad de antígenos celulares y tisulares, en base a la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a sus antígenos correspondientes. Este método permite la identificación de numerosos biomarcadores que constituyen blancos terapéuticos de diferentes patologías, facilitando su estudio, localización histológica y su correlación con parámetros morfológicos.

La IHQ requiere el uso de anticuerpos acoplados a marcadores para poder detectar el evento de reconocimiento antígeno-anticuerpo. Como se puede observar en la Figura 1.20, en un método directo de inmuhistoquímica se requiere de un anticuerpo acoplado a un marcador (fluoróforo, enzima, Qdot, etc), mientras que en un método indirecto se utilizan un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario acoplado a un marcador.

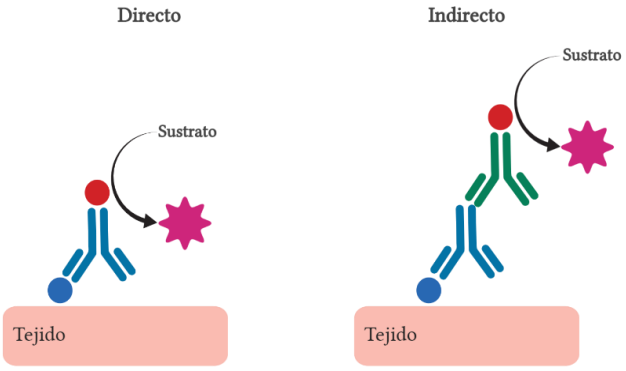


Figura 1.20– Representación esquemática del método directo e indirecto de inmunohistoquímica.

Como ya se mencionó el uso de aptámeros es una alternativa válida frente al uso de anticuerpos[83]. Por esto los aptámeros han sido estudiados para su uso en histoquímica, acoplados a moléculas marcadoras como enzimas (HRP) o fluoróforos (Cy3, FITC, TAMRA)[102]–[106]. Para ello, es necesario incorporar grupos funcionales a los aptámeros para poder anclar estos marcadores, lo cual como ya se mencionó, implica más pasos de preparación y costo. Por otro lado, cuando se utilizan moléculas fluorescentes como marcadores, es necesario el uso de microscopios de fluorescencia o confocal.

Se ha reportado el uso de la DNAzima peroxidasa como marcador en inmunohistoquímica, anclada a un anticuerpo secundario en reemplazo de la enzima HRP[107].

1.6 Objetivos de la tesis

El objetivo general de esta tesis es la utilización de ácidos nucleicos como elementos de reconocimiento biológico y amplificación de la señal para su empleo en biosensores y en la detección de biomarcadores

Entre los objetivos específicos se encuentran:

-Estudio y optimización de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa (Capítulo 3).

-Uso de la DNAzima peroxidasa como marcador combinado con una secuencia de ADN complementaria a una región específica de un gen de *Escherichia coli* verotoxigénica (Capítulo 4).

-Uso de la DNAzima peroxidasa acoplada a aptámeros, para la detección de biomarcadores de procesos cancerígenos en muestras de tejidos (Capítulo 5).

1.7 Referencias

[1] T. R. Cech, "The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes," *Science*, vol. 236, no. 4808, 1987.

[2] S. Altman, "Enzymatic Cleavage of RNA by RNA (Nobel Lecture)," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 29, no. 7, pp. 749–758, 1990.

[3] A. D. Ellington and J. W. Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands," *Nature*, vol. 346, 1990.

[4] C. Tuerk and L. Gold, "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment : RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase," *Science Research Articles*, vol. 249, no. 4968, pp. 505–510, 1990.

[5] D. L. Robertson and G. F. Joyce, "Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA," *Nature*, vol. 344, 1990.

[6] W. Gilbert, "The RNA world," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 319, no. 20, p. 618,

1986.

[7] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, and S. Altman, "The RNA Moiety of Ribonuclease P is the Catalytic Subunit of the Enzyme," *Cell*, vol. 35, pp. 849–857, 1983.

[8] F. H. Westheimer, "Polyribonucleic acids as enzymes," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 319, no. 13, pp. 534–536, 1986.

[9] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz, "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution," *Science (80-.).*, vol. 289, no. 5481, pp. 905–920, 2000.

[10] T. R. Cech, "The ribosome is a ribozyme," *Science (80-.).*, vol. 289, no. 5481, pp. 878–879, 2000.

[11] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the cell*, 5th ed. Ediciones Omega, 2008.

[12] Rice, Ed., *Biology*. Openstax COLLEGE, 2013.

[13] J. D. Watson and H. C. Crick, "Molecular Structure of Nucleic Acid," *Nature*, vol. 171, no. 4356, pp. 737–738, 1953.

[14] E. M. De Robertis and J. Hib, *Biología Celular Molecular*, 16th ed. Promed, 2012.

[15] J. D. Watson, A. GANN, T. . BAKER, M. LEVINE, S. P. BELL, and R. LOSICK, *Molecular Biology of the gene*, 7th ed. New York: Pearson, 2014.

[16] K. Hoogsteen, "The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine," *Acta Crystallogr.*, vol. 16, no. 9, pp. 907–916, 1963.

[17] S. R. Mcnutt and A. V. Observatory, "Flipping Watson and Crick," *Holocene*, pp. 2–3, 2011.

[18] D. W. Ussery, "DNA Structure: A- , B- and Z-DNA Helix Families," *Encyclopedia of life sciencies*, no. 1998. 2002.

[19] M. Conformations and C. Helices, "Molecular Conformations and Structure Transitions of RNA Complementary Helices and Their Possible Biological Significance," *Nature*, vol. 220, 1968.

[20] Y. Tanaka *et al.*, "A'-form RNA double helix in the single crystal structure of r(UGAGCUUCGGCUC).," *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, no. 4, pp. 949–55, Feb. 1999.

[21] K. Kruger, P. J. Grabowski, J. Sands, D. E. Gottschling, and T. R. Cech, "Self-Splicing RNA: Autoexcision and Autocyclization of the Ribosomal RNA Intervening Sequence of Tetrahymena," *Cell*, vol. 31, pp. 147–157, 1982.

[22] C. Guerrier-takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, and S. Altman, "The RNA Moiety of Ribonuclease Catalytic Subunit of the Enzyme," *Cell*, vol. 35, no. Part2, pp. 849–857, 1983.

[23] J. a Doudna and T. R. Cech, "The chemical repertoire of natural ribozymes," *Nature*, vol. 418, no. 6894, pp. 222–228, 2002.

[24] R. H. Symons, "Reviews replication of small pathogens of plants and animals," *Science (80-.).*, no. November, pp. 445–450, 1989.

[25] K. J. Hertel *et al.*, "Numbering system for the hammerhead," *Nucleic Acids Res.*, vol. 20, no. 12, p. 3252, 1992.

[26] J. Haseloff and W. L. Gerlach, "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities.," *Nature*, vol. 334, pp. 585–591, 1988.

[27] S. W. Santoro and G. F. Joyce, "A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 9, pp. 4262–4266,

1997.

[28] R. R. Breaker and G. F. Joyce, "A DNA enzyme that cleaves RNA," *Chem. Biol.*, vol. 1, no. 4, pp. 223–229, 1994.

[29] J. Kosman and B. Juskowiak, "Peroxidase-mimicking DNAzymes for biosensing applications: a review.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 707, no. 1–2, pp. 7–17, Nov. 2011.

[30] a R. Feldman and D. Sen, "A new and efficient DNA enzyme for the sequence-specific cleavage of RNA.," *J. Mol. Biol.*, vol. 313, no. 2, pp. 283–294, 2001.

[31] J. Li, W. Zheng, A. H. Kwon, and Y. Lu, "In vitro selection and characterization of a highly efficient Zn (II) -dependent RNA-cleaving deoxyribozyme," vol. 28, no. 2, pp. 481–488, 2000.

[32] D. Faulhammer and M. Famulok, "The Ca2+ Ion as a Cofactor for a Novel RNA-Cleaving Deoxyribozyme," *Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 35, no. 23, pp. 2837–2841, 1996.

[33] L. Robaldo and A. M. Iribarren, "Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters in the catalytic core," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 20, no. 15, pp. 4367–4370, 2010.

[34] N. Carmi, L. A. Shultz, and R. R. Breaker, "In vitro selection of self-cleaving DNAs," *Chem. Biol.*, vol. 3, no. 12, pp. 1039–1046, 1996.

[35] N. Carmi and R. R. Breaker, "Characterization of a DNA-Cleaving Deoxyribozyme," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 9, pp. 2589–2600, 2001.

[36] M. Chandra, A. Sachdeva, and S. K. Silverman, "DNA-catalyzed sequence-specific hydrolysis of DNA," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 10, pp. 718–720, 2010.

[37] B. Cuenoud and J. W. Szostak, "A DNA metalloenzyme with DNA

ligase activity," *Nature*, vol. 375, 1995.

[38] A. Sreedhara, Y. Li, and R. R. Breaker, "Ligating DNA with DNA," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 11, pp. 3454–3460, 2004.

[39] A. Flynn-Charlebois *et al.*, "Deoxyribozymes with 2 '-5 ' RNA ligase activity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 9, pp. 2444–2454, 2003.

[40] W. E. Purtha, R. L. Coppins, M. K. Smalley, and S. K. Silverman, "General Deoxyribozyme-Catalyzed Synthesis of Native 3 ′ - 5 ′ RNA Linkages," *JACS*, pp. 13124–13125, 2005.

[41] M. Chandra and S. K. Silverman, "DNA and RNA Can Be Equally Efficient Catalysts for Carbon - Carbon Bond Formation," pp. 2936–2937, 2008.

[42] Y. Li and D. Sen, "Toward an efficient DNAzyme," *Biochemistry*, vol. 36, no. 18, pp. 5589–5599, 1997.

[43] P. Travascio, Y. Li, and D. Sen, "DNA-enhanced complex peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin," *Chem. Biol.*, vol. 5, no. 9, pp. 505–517, 1998.

[44] E. H. Blackburn, "Switching and signaling at the telomere," *Cell*, vol. 106, no. 6, pp. 661–673, 2001.

[45] E. H. Blackburn, C. W. Greider, and J. W. Szostak, "The Nobel Prize in Physiology or Medicine," vol. 1, no. 12, 2009.

[46] E. Largy *et al.*, "Role of Alkali Metal Ions in G-Quadruplex Nucleic Acid Structure and Stability," in *The Alkali Metal Ions: Their Role for Life*, R. K. O. S. A. Sigel, H. Sigel, Ed. Springer International Publishing, 2016, pp. 203–258.

[47] A. T. Phan, "Human telomeric G-quadruplex: structures of DNA and RNA sequences," *FEBS J.*, vol. 277, no. 5, pp. 1107–1117, 2010.

[48] H. Liu and J. W. Gauld, "Protonation of guanine quartets and quartet stacks: insights from DFT studies.," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 11, no. 2, pp. 278–87, 2009.

[49] J. R. Williamson, "G-Quartet Structures In Telomeric DNA," *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Sruct*, vol. 23, pp. 703–730, 1994.

[50] P. Travascio, "DNA and RNA catalysts with peroxidase activity: an invetigation into structure and mechanism," *Biochemistry*, no. May, 2000.

[51] R. R. Breaker, "DNA enzymes," *Nat. Biotechnol.*, vol. 16, pp. 427–431, 1997.

[52] Q. Guo, Y. Bao, X. Yang, K. Wang, Q. Wang, and Y. Tan, "Amplified electrochemical DNA sensor using peroxidase-like DNAzyme.," *Talanta*, vol. 83, no. 2, pp. 500–4, Dec. 2010.

[53] D. Zhang, J. Nie, F.-T. Zhang, L. Xu, Y.-L. Zhou, and X.-X. Zhang, "Novel homogeneous label-free electrochemical aptasensor based on functional DNA hairpin for target detection.," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 19, pp. 9378–82, Oct. 2013.

[54] D. Li, B. Shlyahovsky, J. Elbaz, and I. Willner, "Amplified analysis of low-molecular-weight substrates or proteins by the self-assembly of DNAzyme-aptamer conjugates," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 18, pp. 5804–5805, 2007.

[55] A. C. Girvan *et al.*, "AGRO100 inhibits activation of nuclear factor- K B (NF- K B) by forming a complex with NF- K B essential modulator (NEMO) and nucleolin," pp. 1790–1800, 2006.

[56] Y. Seok, J. Y. Byun, W. B. Shim, and M. G. Kim, "A structure-switchable aptasensor for aflatoxin B1 detection based on assembly of

an aptamer/split DNAzyme," *Anal. Chim. Acta*, vol. 886, pp. 182–187, 2015.

[57] Y. Guo, J. Chen, M. Cheng, D. Monchaud, J. Zhou, and H. Ju, "A Thermophilic Tetramolecular G-Quadruplex / Hemin DNAz," *Angew. Chemie*, vol. 129, pp. 16863–16867, 2017.

[58] X. Cheng, X. Liu, T. Bing, Z. Cao, and D. Shangguan, "General peroxidase activity of G-quadruplex-hemin complexes and its application in ligand screening," *Biochemistry*, vol. 48, no. 33, pp. 7817–7823, 2009.

[59] N. Jing and M. E. Hogan, "Structure-Activity of Tetrad-forming Oligonucleotides as a Potent Anti-HIV Therapeutic Drug *," vol. 273, no. 52, pp. 34992–34999, 1998.

[60] T. Li, E. Wang, and S. Dong, "Potassium-lead-switched G-quadruplexes: A new class of DNA logic gates," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 42, pp. 15082–15083, 2009.

[61] H. Peng, A. M. Newbigging, Z. Wang, W. Deng, and X. C. Le, "DNAzyme-Mediated Assays for Amplifed Detection of Nucleic Acids and Proteins," *Anal. Chem.*, no. 90, pp. 190–207, 2018.

[62] Y. Li, C. R. Geyer, and D. Sen, "Recognition of anionic porphyrins by DNA aptamers," *Biochemistry*, vol. 35, no. 21, pp. 6911–6922, 1996.

[63] S. Nakayama, J. Wang, and H. O. Sintim, "DNA-based peroxidation catalyst-what is the exact role of topology on catalysis and is there a special binding site for catalysis?," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 17, no. 20, pp. 5691–5698, 2011.

[64] P. Travascio, a J. Bennet, D. Y. Wang, and D. Sen, "A ribozyme and a catalytic DNA with peroxidase activity: active sites versus cofactor-

binding sites.," *Chem. Biol.*, vol. 6, no. 11, pp. 779–787, Nov. 1999.

[65] C. R. Geyer and D. Sen, "Evidence for the metal-cofactor independence of an RNA phosphodiester-cleaving DNA enzyme.," *Chem. Biol.*, vol. 4, no. 8, pp. 579–593, 1997.

[66] Y. Xiao, V. Pavlov, T. Niazov, A. Dishon, M. Kotler, and I. Willner, "Catalytic beacons for the detection of DNA and telomerase activity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 24, pp. 7430–7431, 2004.

[67] Z. Ming *et al.*, "Studies of the Activity of Peroxidase-Like DNAzyme by Modifying 3 ' - or 5 ' -End of Aptamers," *Chem. Biodivers.*, vol. 9, pp. 170–180, 2012.

[68] J. Tang and R. R. Breaker, "Rational design of allosteric ribozymes," *Chem. Biol.*, vol. 4, no. 6, pp. 453–459, 1997.

[69] P. M. Dihua Shangguan, Ying Li, Zhiwen Tang, Zehui Charles Cao, Hui William Chen and and W. T. Kwame Sefah, Chaoyong James Yang, "Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study," 2006.

[70] T. Brown, *DNA Conjugates and Sensors*. RSCPublishing, 2012.

[71] U. Ci and T. Qu, "Aptasensores impedimétricos para la detección de trombina," 2011.

[72] V. Pavlov, Y. Xiao, B. Shlyahovsky, and I. Willner, "Aptamer-functionalized Au nanoparticles for the amplified optical detection of thrombin.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 38, pp. 11768–9, Sep. 2004.

[73] L. Wang, R. Ma, L. Jiang, L. Jia, W. Jia, and H. Wang, "A novel " signal-on/off " sensing platform for selective detection of thrombin based on target-induced ratiometric electrochemical biosensing and bio-

bar-coded nanoprobe amplification strategy," *Biosens. Bioelectron.*, no. October, pp. 0–1, 2017.

[74] Y. H. Kim, J. P. Kim, S. J. Han, and S. J. Sim, "Aptamer biosensor for lable-free detection of human immunoglobulin E based on surface plasmon resonance," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 139, no. 2, pp. 471–475, Jun. 2009.

[75] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, "FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection," *Anal Bioanal Chem*, vol. 383, pp. 83–91, 2005.

[76] G. Pelossof, R. Tel-Vered, J. Elbaz, and I. Willner, "Amplified biosensing using the horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme as an electrocatalyst.," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 11, pp. 4396–402, Jun. 2010.

[77] F. Liu, J. Zhang, R. Chen, L. Chen, and L. Deng, "Highly effective colorimetric and visual detection of ATP by a DNAzyme-aptamer sensor," *Chem. Biodivers.*, vol. 8, no. 2, pp. 311–316, 2011.

[78] C. Mannironi, A. Di Nardo, and P. Fruscoloni, "In Vitro Selection of Dopamine RNA Ligands," *biochemestry*, vol. 36, no. 32, pp. 9726–9734, 1997.

[79] J. Ciesiolka, J. Gorski, and M. Yarus, "Selection of an RNA domain that binds Zn2+," *RNA*, vol. 1, pp. 538–550, 1995.

[80] H. P. Hofmann, S. Limmer, V. Hornung, and M. Sprinzl, "Ni2 + -binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair," *RNA*, vol. 3, pp. 1289–1300, 1997.

[81] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, "SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands.," *Biomol. Eng.*, vol. 24, no. 4, pp. 381–403, Oct. 2007.

[82] S. Tarun Kumar Sharma, Ravi, "Nucleic Acid Aptamers as an Emerging Diagnostic Tool for Animal Pathogens," vol. 2, no. 1, pp. 50–55, 2014.

[83] S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini, "Analytical applications of aptamers," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, pp. 2424–2434, 2005.

[84] T. Hermann and D. J. Patel, "Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers," vol. 287, no. February, 2000.

[85] M. P. Robertson and A. D. Ellington, "In vitro selection of an allosteric ribozyme that transduces analytes to amplicons," *Nat. Biotechnol.*, vol. 17, no. 1, pp. 62–66, 1999.

[86] J. Tang and R. R. Breaker, "Mechanism for allosteric inhibition of an ATP-sensitive ribozyme," *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, no. 18, pp. 4214–4221, 1998.

[87] D. Y. Wang, B. H. Y. Lai, and D. Sen, "A General Strategy for Effector-mediated Control of RNA-cleaving Ribozymes and DNA Enzymes," *J. Mol. Biol.*, vol. 318, no. 02, pp. 33–43, 2002.

[88] M. Levy and A. D. Ellington, "ATP-Dependent Allosteric DNA Enzymes University of Texas at Austin," *Chem. Biol.*, vol. 9, no. 02, pp. 417–426, 2002.

[89] D. Li, B. Shlyahovsky, J. Elbaz, and I. Willner, "Amplified Analysis of Low-Molecular-Weight Substrates or Proteins by the Self-Assembly of DNAzyme - Aptamer Conjugates," pp. 5804–5805, 2007.

[90] G. Adornetto, A. Porchetta, G. Palleschi, K. W. Plaxco, and F. Ricci, "A general approach to the design of allosteric, transcription factor-regulated DNAzymes," *Chem. Sci.*, vol. 6, no. 7, pp. 3692–3696, 2015.

[91] Q. Guo, Y. Bao, X. Yang, K. Wang, Q. Wang, and Y. Tan, "Amplified

electrochemical DNA sensor using peroxidase-like DNAzyme," *Talanta*, vol. 83, no. 2, pp. 500–504, 2010.

[92] F. Li, L. Yang, M. Chen, Y. Qian, and B. Tang, "A novel and versatile sensing platform based on HRP-mimicking DNAzyme-catalyzed template-guided deposition of polyaniline.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 41, pp. 903–6, Mar. 2013.

[93] C. Fan, K. W. Plaxco, and A. J. Heeger, "Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 16, pp. 9134–9137, 2003.

[94] Y. Xiao, A. A. Lubin, B. R. Baker, K. W. Plaxco, and A. J. Heeger, "Single-step electronic detection of femtomolar DNA by target-induced strand displacement in an electrode-bound duplex," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 45, pp. 16677–16680, 2006.

[95] F. Ricci and K. W. Plaxco, "E-DNA sensors for convenient, label-free electrochemical detection of hybridization," *Microchim. Acta*, vol. 163, no. 3–4, pp. 149–155, 2008.

[96] J. Wu, C. Huang, G. Cheng, F. Zhang, P. He, and Y. Fang, "Electrochemically active-inactive switching molecular beacon for direct detection of DNA in homogenous solution," *Electrochem. commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 177–180, 2009.

[97] N. Y. Fortin, a Mulchandani, and W. Chen, "Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of Escherichia coli O157:H7.," *Anal. Biochem.*, vol. 289, no. 2, pp. 281–8, Feb. 2001.

[98] A. Tsourkas, M. A. Behlke, S. D. Rose, and G. Bao, "Hybridization

kinetics and thermodynamics of molecular beacons," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 4, pp. 1319–1330, 2003.

[99] J. D. Watson, A. Gann, T. . Baker, M. Levine, S. P. Bell, and R. Losick, *Molecular Biology of the gene*, 7th ed. New York: Pearson, 2014.

[100] A. Tsourkas, M. a Behlke, and G. Bao, "Structure-function relationships of shared-stem and conventional molecular beacons.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 19, pp. 4208–15, Oct. 2002.

[101] J. Huang, J. Wu, and Z. Li, "Biosensing using hairpin DNA probes," *Rev. Anal. Chem.*, vol. 34, no. 1–2, pp. 1–27, 2015.

[102] M. Bauer, J. Macdonald, and J. Henri, "The application of Aptamers for Immunohstochemistry," *Nucleic Acid Ther.*, vol. 26, no. 3, pp. 120–126, 2016.

[103] G. S. Zamay *et al.*, "DNA Aptamers for the Characterization of Histological Structure of Lung Adenocarcinoma," *Mol. Ther. Nucleic Acid*, vol. 6, no. March, pp. 150–162, 2017.

[104] Youli Zu, "Using oligonucleotide aptamer probes for immunostainning of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues," vol. 23, no. 12, pp. 1553–1558, 2011.

[105] B. A. Bukari, M. Citartan, and E. Seng, "Aptahistochemistry in diagnostic pathology : technical scrutiny and feasibility," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 0, no. 0, p. 0, 2017.

[106] H. Liu and W. Tan, "Using DNA Aptamer Probe for Immunostaining of Cancer Frozen Tissues," 2014.

[107] D. Thirstrup and G. S. Baird, "Histochemical Application Of A Peroxidase DNAzyme with a Covalently Attached Hemin Cofactor," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 6, pp. 2498–2504, 2010.

2

Materiales y Métodos

Contenidos del capítulo

2.1. Preparación de soluciones 49
2.1.1. Buffers 49
2.1.2. Soluciones para determinar actividad catalítica peroxidasa 52
2.1.3 Solución stock de hemina 53
2.2. Celdas y Electrodos 53
2.3. Preparación de la DNAzima peroxidasa 54
2.4. Optimización de la actividad enzimática de la DNAzima peroxidasa por espectroscopía UV-visible 55
2.5. Detección electroquímica de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa 57
2.5.1. Elección del mediador redox 57
2.5.2. Determinación de la actividad enzimática de la DNAzima peroxidasa en función de la concentración de oligonucleótido 58
2.6. Formación del complejo oligonucleótido-hemina 58
2.6.1. Dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato 58
2.6.2. Cálculo de la constante de disociación de la DNAzima peroxidasa 59
2.7. Estabilidad de la DNAzima peroxidasa 59
2.7.1. Almacenamiento a diferentes temperaturas 59
2.7.2. Liofilización de la DNAzima peroxidasa 60
2.8. Actividad catalítica de la enzima peroxidasa de rábano picante 61
2.9. Detección de una secuencia blanco con horquilla sensora 61
2.9.1 Puesta a punto de las condiciones experimentales 62
2.9.2 Protocolo optimizado para la detección de una secuencia blanco 63
2.9.3. Ensayo de especificidad de la secuencia sensora 65
2.10. Marcación histológica 65
2.10.1. Construcción aptámero PTEN-DNAzima peroxidasa 65
2.10.2 Preparación del tejido incluido en parafina 66
2.10.3. Optimización de la relación DNA: hemina en marcaciones histológicas 67
2.10.4. Marcado de cortes histológicos 68
2.10.5. Revelado 69
2.10.6. Procesamiento del corte para observación por microscopía óptica 69
2.11 Referencias 70

2.1. Preparación de soluciones

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron obtenidos de *Sigma-Aldrich* y *Macrogen*. Todas las drogas utilizadas fueron obtenidas comercialmente y de grado analítico.

Las soluciones se prepararon utilizando agua ultrapura (miliQ) obtenida con el equipo *Ultra Clear TWF Siemens* (18 MΩ.cm).

2.1.1. Buffers

El pH de todos los buffers se verificó con pHmetro *Sanxin MP 512.*

Buffer tris-HCl 1M pH 8

Se pesaron 12.11 g tris buffer (Biopack), los cuales se disolvieron en agua miliQ y se agregaron 4 mL de HCl concentrado (Cicarrelli), finalmente se llevó a un volumen 100 mL con agua miliQ.

Buffer Tris- EDTA (TE) pH 8

El buffer TE se utiliza para conservar ADN o ARN. El tris le da la capacidad amortiguadora, siendo el pH óptimo para RNA de 7.5 mientras que para el DNA es de 8.0. El EDTA (ácido etilendiamino tetracético) actúa como quelante de Mg^{+2}, Ca^{+2} y de otros metales divalentes. Esto permite proteger a los ácidos nucleicos inactivando a las DNAsas o RNAsas, porque estos cationes divalentes son indispensables para el funcionamiento de dichas enzimas. El buffer TE está compuesto por tris 10mM y EDTA 0.1mM. Este se preparó con 1mL de tris-HCl 1M pH 8, 200 µL EDTA (Anedra) 0.05 M y se llevó a 100 mL con agua miliQ.

Buffer Tris-potasio-tritón (TKT) 25 mM pH 8

Se preparó con buffer tris-HCl 25 mM pH 8, KCl (Biopack) 20 mM y tritón X-100 (Biopack) 0.05%.

Buffer Tris-potasio-sodio-tritón (TKNaT) 25 mM pH 8

Se preparó con buffer tris-HCl 25 mM pH 8, KCl (Biopack) 20 mM, NaCl (Biopack) 200 mM y tritón X-100 (Biopack) 0.05%.

Buffer fosfato 0.1M pH 7

Se preparó con 50 mL de KH_2PO_4 (Biopack) 0.1M, 20.9 mL NaOH (Biopack) 0.1M y se llevó a 100 mL con agua miliQ.

Buffer fosfato 0.1M pH 7.5

Se preparó con 50 mL de KH_2PO_4 (Biopack) 0.1M, 40.9 mL NaOH (Biopack) 0.1M y se llevó a 100 mL con agua miliQ.

Buffer PBS 10 mM pH 7.5

Se preparó a partir de buffer fosfato 10 mM pH 7.5 conteniendo NaCl (Biopack) 137 mM, KCl (Biopack) 3 mM.

Buffer PBS-T 10 mM pH 7.5

Se preparó a partir de buffer PBS 10 mM pH 7.5 conteniendo tween 20 (Aldrich) 0.1%.

Buffer ftalato pH 5

Se preparó con 50 mL de biftalato de potasio (Biopack) 0.1 M, 22.6 mL de NaOH (Biopack) 0.1M y se llevó a 100 mL con agua miliQ.

Buffer acetato pH 5.5

Se preparó con 41.2 mL de acetato de sodio (Anedra) 0.2 M, 8.8 mL de ácido acético (Merck) 0.2 M y se llevó a 100 mL con agua miliQ.

Solución stock de Oligonucleótidos

Todas las soluciones de oligonucleótidos fueron preparadas a partir del producto comercial liofilizado (Sigma-Aldrich o Macrogen). Para evitar pérdida de material, se centrifugó el tubo (spin) antes de abrirse.

Se prepararon soluciones stock de todos los oligonucleótidos de concentración 100 µM en buffer TE pH 8. Estas soluciones se conservaron a -20^{0}C. La concentración de las soluciones stock se verificó midiendo la absorbancia a 260 nm con espectrofotómetro *Nanodrop 2000 ThermoFisher* (Figura 2.1)[1].

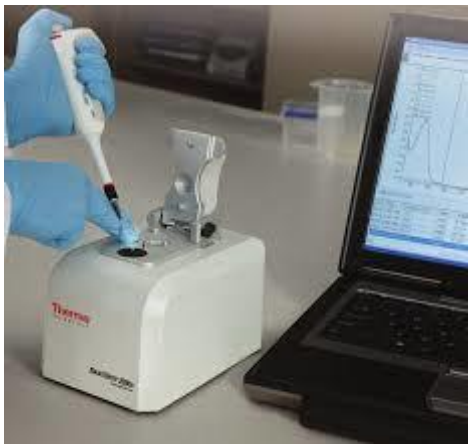


Figura 2.1- Espectrofotómetro *Nanodrop 2000 Thermo Scientific.*

El espectrofotómetro *Nanodrop* permite medir la absorbancia de una solución en el rango 200-800 nm utilizando un volumen muestra de 1.5-2 µL. El modo "*ácidos nucleicos*" estima la concentración de estos utilizando la Ley de Lambert-Beer. Este mide la absorbancia a 260 nm (con corrección de línea de base a 340 nm), paso óptico 1 mm y tomando como absortividad molar 50 $(\text{ng cm}/\mu\text{L})^{-1}$ para el ADN doble cadena o 33 $(\text{ng cm}/\mu\text{L})^{-1}$ para el ADN simple cadena.

2.1.2. Soluciones para determinar actividad catalítica peroxidasa

Reactivo A

Se preparó a partir de 4-aminoantipirina (4-AAP, Mallinckrodt) 1.2 mM, fenol (Biopack) 42.5 mM, KCl (Biopack) 40 mM en buffer tris-HCl 0.1M pH 7.5. Este reactivo fue usado en el día.

Solución de Acido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico sal diamonio (ABTS)

Las soluciones de ABTS 50 mM se prepararon a partir de ABTS (Sigma Aldrich) en agua mili-Q. La solución fue conservada en heladera.

Solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Las soluciones de peróxido de hidrógeno se prepararon en el momento de ser usadas en buffer TKT y TKNaT a partir de agua oxigenada (H_2O_2, *Biopack*) 30% p/v (100 vol) conservado en heladera.

2.1.3 Solución stock de hemina

Se preparó una solución stock de hemina (*Sigma Aldrich*) en dimetilsulfóxido (DMSO, *Biopack*) 1 mg/mL. Esta solución se conservó a -20ºC por un período de 30 días. A partir de esta solución stock de hemina se prepararon en el día diluciones en buffer TKT pH 8 o TKNaT pH 8, dependiendo de la determinación a realizar.

2.2. Celdas y Electrodos

Para las medidas electroquímicas se utilizaron cartuchos que contienen 8 celdas electroquímicas (Figura 2.2, izquierda). Estos cartuchos fueron desarrollados y fabricados en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) en los sectores de "Micro y Nanoelectrónica" y "Procesos Superficiales" en el marco del Proyecto FSNANO 05 Nanopoc[2].

Cada celda electroquímica constó de tres electrodos (Figura 2.2, derecha), un electrodo de trabajo (A=0.0158 cm^2), un contraelectrodo de carbón y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. La fabricación de los electrodos se llevó a cabo mediante serigrafía utilizando tintas comerciales marca *Gwent*. Como sustrato, material sobre el cual se serigrafiaron los electrodos, se utilizó *Valox*. Sobre dicho sustrato se colocó una tapa de acrílico quedando de esta manera un celda con un volumen máximo de 35 µL. El arreglo de las 8 celdas fue

diseñado de manera que se pueda utilizar una pipeta de 8 canales para dispensar las soluciones.

Figura 2.2- Cartucho de 8 celdas electroquímicas (izq.) y arreglo de tres electrodos (der.)

2.3. Preparación de la DNAzima peroxidasa

Para preparar la DNAzima peroxidasa se partió de la solución stock 100 µM del oligonucleótido $DZ5T_3$ (5´-TTTGGGTAGGGCGGGTTGGG-3´, PM: 6316) obtenido comercialmente. Esta solución se calentó a 95°C durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se diluyó hasta la concentración deseada en buffer según el caso, siendo el buffer para las condiciones optimizadas TKT 25 mM pH 8.

Por otro lado, a partir de la solución stock de hemina 1 mg/mL en DMSO se preparó una solución de hemina en el mismo buffer en que se diluyó el oligonucleótido. Se mezclaron volúmenes de oligonucleótido y hemina de manera que su relación molar sea 1:2[3] a menos que se indique otra. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente (20°C) para permitir la formación de la DNAzima durante 30 minutos (tiempo de incubación optimizado).

Para medir la señal de fondo, generada por la actividad catalítica propia de la hemina, se preparó una solución de hemina de la misma concentración utilizada para formar la DNAzima. Dependiendo las medidas a realizar la concentración final de oligonucleótido fue de 1-4 µM.

2.4. Optimización de la actividad enzimática de la DNAzima peroxidasa por espectroscopía UV-visible

Se llevaron a cabo experimentos para estudiar los efectos en la actividad catalítica de la DNAzima del cosustrato reductor, el pH y la composición del buffer, la concentración de sales y la relación hemina: oligonucleótido.

En todos los casos la DNAzima fue preparada según el punto 2.3. En la Tabla 2.1 se muestran las variables estudias y las condiciones experimentales utilizadas en cada caso. La reacción catalítica se inició con H_2O_2 y se midió la absorbancia a la longitud de onda máxima del cosustrato reductor en estado oxidado (4-amina antipirina:510 nm o ABTS: 420 nm).

Las determinaciones por espectroscopia UV-VIS se llevaron a cabo con espectrofotómetro UV-1800 S*himadzu* (cubeta de 700 µL, paso óptico 1 cm) o espectrofotómetro nanodrop (2 µL muestra, paso óptico 0.1 cm). Los valores de absorbancia obtenidos fueron normalizados a un valor de camino óptico de 1 cm.

2.4.1 Determinación de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa en función de la concentración de oligonucleótido

La DNAzima peroxidasa fue preparada según se describió en el punto 2.3 pero utilizando concentraciones de oligonucleótido de 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 µM y manteniendo una relación oligonucleótido:hemina 1:2. La concentración final de ABTS fue de 3.4 mM y de H_2O_2 1 mM.

Se midió la absorbancia a 420 nm a los 3 minutos de reacción. El volumen de muestra en el espectrómetro fue de 2 µL.

Tabla 2.1- Resumen de condiciones en la puesta a punto de las condiciones óptimas para medir la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa

Variable	[Oligonucleótido]	[Hemina]	Buffer	pH	[KCl]	tritón X-100	[Mediador]	[H_2O_2]	Tiempo de incubación
Cosustrato reductor	0.5 µM	1 µM	Fosfato 0.1M	7.5	20 mM	-	4-AAP 1.2 mM, fenol 42.5 mM	1 mM	60 min
	0.5 µM	1 µM	Tris-HCl 25 mM	7.5	20 mM	0.05%	ABTS 50 µM	1 mM	60 min
pH y buffer	0.5 µM	1 µM	-Ftalato -Acetato, -Fosfato -Tris-HCl (todos 25 mM)	5-9	20 mM	0.05 %	ABTS 50 µM	1 mM	60 min.
Tiempo de incubación	1 µM	2 µM	Tris-HCL 25 mM	8	20 mM	0.05%	ABTS 50 µM	0.5 mM	15,30,60,90 min.
Relación Hemina:Oligonucleótido	1 µM	0-3 µM	Tris-HCL 25 mM	8	20 mM	0.05%	ABTS 3.4 mM	0.5 mM	30 min.
Peróxido de hidrógeno	1 µM	2 µM	Tris-HCL 25 mM	8	20 mM	0.05%	ABTS 3.4 mM	0 a 3 mM	30 min.

2.5. Detección electroquímica de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa

Para determinar la actividad catalítica de DNAzima peroxidasa electroquímicamente se llevaron a cabo experimentos de cronoamperometría.

Las medidas electroquímicas se realizaron con un potenciostato *Gamry Interface 1000* (Figura 2.3). Se utilizaron las celdas y electrodos descriptos en el punto 2.2, que contienen 8 celdas electroquímicas. Para conectar este cartucho al potenciostato se utilizó un conector de borde de 30 vías en dos hileras (una arriba y otra abajo).

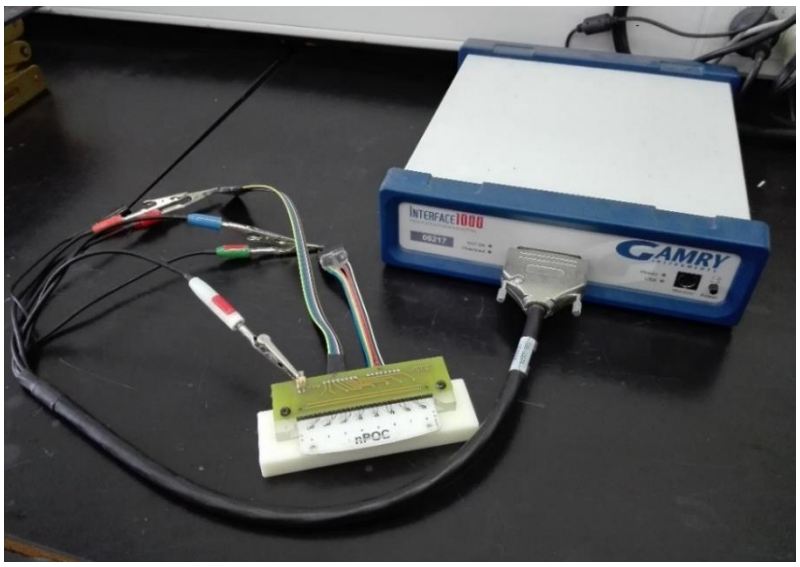


Figura 2.3- Potenciostato *Gamry*, celdas electroquímicas y conectores utilizados para llevar a cabo las medidas electroquímicas

2.5.1. Elección del mediador redox

La DNAzima peroxidasa se preparó según el punto 2.3. Se tomaron 18 µL de la solución de DNAzima (conc. final=1 µM), se le agregaron 2 µL del mediador redox 46 mM (conc. final=3.4 mM) y se inició la reacción con 10 µL de H_2O_2 2.8 mM (conc. final=1 mM). Se realizó la medida electroquímica a los 3 minutos de iniciada la reacción.

La medición se llevó a cabo mediante cronoamperometría al potencial de cada mediador redox, ABTS (0 mV), hidroquinona (-230 mV) y TMB (100 mV). Se midió durante 30 segundos.

El volumen total de muestra en la celda electroquímica fue de 30 µL.

2.5.2. Determinación de la actividad enzimática de la DNAzima peroxidasa en función de la concentración de oligonucleótido

La DNAzima peroxidasa fue preparada según se describió en el punto 2.3 pero utilizando concentraciones de oligonucleótido en el rango de 0-2.5 µM. La concentración final de ABTS fue de 3.4 mM y se inició la reacción con H_2O_2 1 mM. Se esperó 3 minutos y se llevó a cabo la medida por cronoamperometría. Se midió a 0 mV (ABTS) durante 30 segundos.

2.6. Formación del complejo oligonucleótido-hemina

2.6.1. Dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato

Se preparó una solución de DNAzima peroxidasa 1.7 µM en buffer TKT 25 mM pH 8, según el punto 2.3.

Para la medición se utilizaron 6 µL de DNAzima (Cf[1]=1µM), 2 µL de ABTS 17 mM (Cf=3.4 mM) y se inició la reacción con 2 µL de H_2O_2 en el rango de 0.75-2 mM (Cf=0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 mM). Para determinar el punto a tiempo cero se reemplazaron los 2 µL de H_2O_2 por buffer TKT 25 mM pH 8.

Se midió la absorbancia a 420 nm por 300 segundos, se utilizaron 2 µL de muestra para medir.

[1]Cf: concentración final

Para calcular la velocidad se utilizó el método de las velocidades iniciales. Para ello se tomó la pendiente la curva absorbancia vs tiempo (0-60 segundos) para cada concentración de H_2O_2.

2.6.2. Cálculo de la constante de disociación de la DNAzima peroxidasa

Se prepararon varias soluciones de hemina 4 µM conteniendo oligonucleótido $DZ5T_3$ de concentraciones entre 1 a 6 µM. Además, se preparó una muestra con hemina 4 µM sin oligonucleótido para observar banda de Soret de la porfirina 398 nm. Todas las soluciones se calentaron en tubos a 95ºC durante 5 minutos y se dejaron en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir que se forme el complejo hemina-oligonucleótido. Transcurrido ese tiempo se determinó el espectro de absorción de cada muestra en el rango 300-500 nm. Se utilizaron 2 µL de muestra para medir.

2.7. Estabilidad de la DNAzima peroxidasa

2.7.1. Almacenamiento a diferentes temperaturas

Se prepararon 800 µL de DNAzima peroxidasa 1 µM según el punto 2.3 y 800 µL de hemina 2 µM (control de señal de fondo). Las soluciones de DNAzima y hemina se dividieron en varios tubos conteniendo 50 µL cada uno. Este volumen permitió realizar 5 determinaciones por triplicado en cada condición de almacenamiento.

Se midió la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa y la hemina (señal de fondo) a tiempo cero. Luego se almacenaron 5 tubos de DNAzima y

hemina a cada temperatura: -20º (freezer), 8ºC (heladera) y 20ºC (temperatura ambiente controlada).

Se llevaron a cabo medidas electroquímicas de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa y la hemina, midiendo por cronoamperometría a 0 mV el producto de oxidación del ABTS 3,4 mM a los 3 minutos de iniciada la reacción con H_2O_2 1 mM. Las medidas se llevaron a cabo a tiempo de almacenamiento de 0, 5 ,10, 30 y 50-55 días.

2.7.2. Liofilización de la DNAzima peroxidasa

Se prepararon 120 µL DNAzima peroxidasa con oligonucleótido $DZ5T_3$ 1 µM y hemina 2 µM y otros 120 µL hemina 2 µM según el punto 2.3. Cada solución se separó en dos alícuotas para ser liofilizada por duplicado. Todos los tubos se congelaron a -20ºC, luego fueron sometidos a un proceso de liofilización en el equipo marca *Virtis SP Scientific* (Figura 2.4).

Las muestras liofilizadas se rehidrataron con 60 µL agua miliQ. Luego se llevaron a cabo medidas electroquímicas, utilizando ABTS 3,4 mM. Se midió por cronoamperometría 0 mV el producto de oxidación del ABTS a los 3 minutos de iniciada la reacción catalítica con H_2O_2 1 mM.

Programa de liofilización

-Temperatura del condensador: -50ºC

-Vacío: 50 mTorr

-Tiempo: 20 horas

Figura 2.4- Liofilizador *Virtis SP Scientific*

2.8. Actividad catalítica de la enzima peroxidasa de rábano picante

Se utilizó la enzima HRP "peroxidase from horseradish- Type I, PM: 44 KDa" (*Sigma*). Se preparó una solución 1.7 µM en buffer PBS 10 mM pH 7,5.

Para la medición se utilizaron 6 µL de la solución de HRP (Cf=1µM), 2 µL de ABTS 17 mM (Cf=3.4 mM) y se inició la reacción con 2 µL de H_2O_2 5 mM (Cf=1 mM). Para determinar el punto a tiempo cero se reemplazaron los 2 µL de H_2O_2 por buffer PBS 10 mM pH 7,5.

Se midió la absorbancia a 420 nm por 300 segundos en espectrofotómetro Nanodrop 2000, se utilizaron 2 µL de muestra para medir.

2.9. Detección de una secuencia blanco con horquilla sensora

En la Tabla 2.2 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos diseñados denominadas H-I, H-II, H-III y H-IV, donde H indica horquilla.

Tabla 2.2-Secuencias de oligonucleótidos utilizados en las distintas construcciones.

Construcción	Secuencia (5´ a 3´)
H-I	**TTTGGGTAGGGC**GGGTTGGGTTTTTTAGAACGCCCACGAGA TCATCCAGTGTTGTCCCAACCC
H-II	TACCCAAAAGAACGCCCACTGAGATCATCCAGTGTTGTT**TTTG GGTA**GGGCGGGTTGGG
H-III	CCCAACCCAGAACGCCCACTGAGATCATCCAGTGTTGTT**TTTG GGTAGGGCGGGTTGGG**
H-IV	CCGCCCTAAGAACGCCCACTGAGATCATCCAGTGTTGTT**TTTG GGTAGGGCGGGTTGGG**

Negrita: secuencia de $DZ5T_3$; Gris: secuencia complementaria al blanco; Subrayado: secuencia que bloquea la $DZ5T_3$.

Como secuencia blanco, se utilizó una región específica de un gen de *E. coli* verotoxigénica productora de toxina Shiga I, obtenida de bibliografía[4]: 5´-ACAACACTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCT-3´.

2.9.1 Puesta a punto de las condiciones experimentales

Se estudiaron el efecto de la fuerza iónica, la relación hemina: oligonucleótido y los tiempos de incubación entre la horquilla y la secuencia blanco. En la Tabla 2.2, se muestra un resumen de las condiciones experimentales utilizadas en cada caso.

Se partió de soluciones stock de cada construcción oligonucleotídica y la secuencia blanco a detectar todas 100 µM en buffer TE, conservadas a -20°C.

Estas soluciones stock fueron calentadas a 95ºC durante 5 minutos para permitir la desnaturalización de las secuencias y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo diluciones de las soluciones stock en buffer TKT 25 mM pH 8. Se mezclaron cantidades necesarias de las secuencias oligonucleotídicas (ver concentraciones finales en Tabla 2.3). Luego se incubó a 57ºC para permitir la hibridización de las cadenas complementarias (ver tiempos de incubación en Tabla 2.3). Finalmente se agregó un volumen de la solución de hemina (ver concentraciones finales en Tabla 2.2) y se incubó por 30 minutos a 25ºC.

Tabla 2.3- Puesta a punto de las condiciones experimentales para la sonda sensora

Variable	[Horquilla] (µM)	[Hemina] (µM)	[sec. blanco] (µM)	[NaCl] (mM)	Tiempo de incubación (min.)
Fuerza iónica	0.5	1	0.5	0-200	90
hemina:oligonucleótido	0.5	0.25, 0.5, 1.0,1.25 1.5	0.5	200	90
Tiempo de incubación	0.5	1	0.5	200	15,30,60,90

2.9.2 Protocolo optimizado para la detección de una secuencia blanco

Se partió de soluciones stock de las construcciones H-I, H-II, H-III, H-IV y la secuencia blanco a detectar todas 100 µM en buffer TE, conservadas a -20 ºC. Estas soluciones stock fueron calentadas a 95ºC durante 5 minutos para permitir la desnaturalización de las secuencias y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Se llevaron a cabo diluciones de las soluciones stock en buffer TKNaT 25 mM pH 8. Se mezclaron cantidades necesarias de oligonucleótidos de manera que la concentración final de horquilla sea 0.5 µM y de la secuencia blanco en el rango 0-0.75 µM. Luego se incubó a 57ºC durante 30 minutos para permitir la hibridación de las cadenas complementarias. Finalmente se agregó un volumen de la solución de hemina de manera que su concentración final sea de 1 µM (relación hemina: oligonucleótido: hemina 2:1) y se incubó por otros 30 minutos a 25ºC.

En la Figura 2.5 se muestra el esquema de realización del ensayo, con las distintas rampas de temperatura. Se puede observar que el tiempo hasta llegar a la formación de la DNAzima es de aproximadamente 80 minutos.

Finalmente se llevó a cabo la medición de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa de cada construcción. Se realizaron medidas ópticas por espectroscopia UV-Visible y electroquímicas por cronoamperometría.

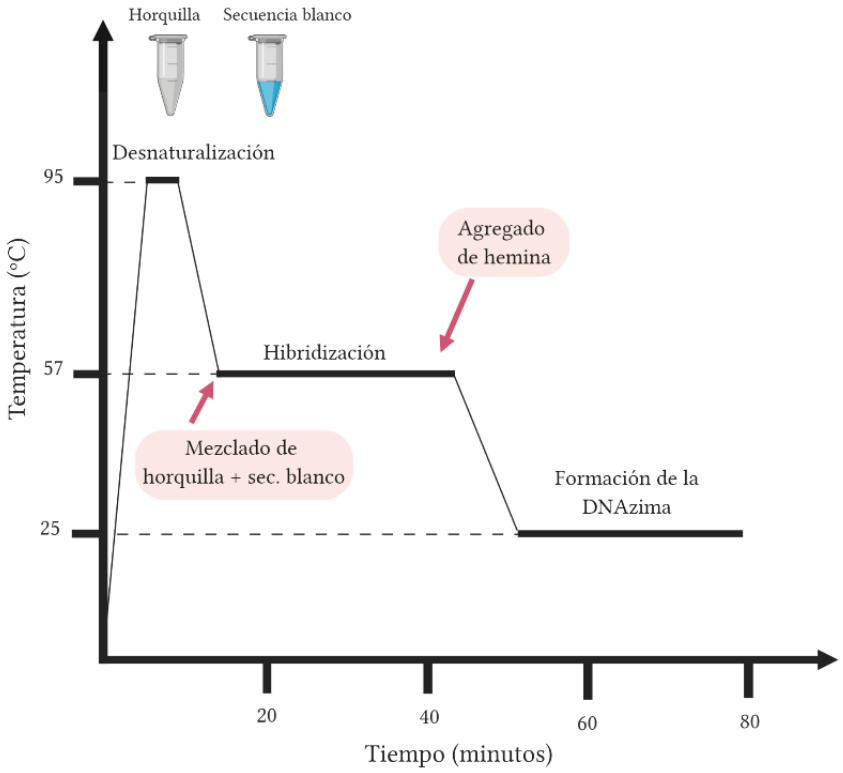


Figura 2.5- Esquema de realización del ensayo optimizado.

Medida óptica

Se midió la absorbancia a 420 nm generada por el producto de oxidación del ABTS de concentración 3.4 mM a los 3 minutos de iniciada la reacción catalítica con H_2O_2 0.5 mM. El volumen de muestra en el espectrómetro *Nanodrop 2000* fue de 2 µL.

Medida electroquímica

Para la medida por cronoamperometría se utilizó ABTS como mediador redox 3.4 mM en buffer TKT 25 mM pH 8. A los 3 minutos de iniciada la reacción con H_2O_2 0.5 mM, se llevó a cabo la medida por cronoamperometría. Se midió a 0 mV (ABTS) durante 30 segundos. El volumen de muestra en la celda electroquímica fue de 30 µL.

2.9.3. Ensayo de especificidad de la secuencia sensora

Se llevaron a cabo determinaciones electroquímicas según el procedimiento descripto en el punto 2.9.2.

Se trabajó con la construcción H-IV y utilizando como secuencia blanco otros patógenos de *E. coli* diferentes a *E. coli verotoxigénica* productora de toxina shiga I. Las secuencias de estos patógenos se describen en la Tabla 2.4. La concentración de todas las secuencias oligonucleotídicas fue de 0.5 µM.

Tabla 2.4- Secuencias de patógenos de *E. coli* utilizadas en el ensayo de especificidad.

Patógenos	*Secuencia (5'→3')*
STXII	GCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAG
IT	AGCGGCGCAACATTTCAGGTCGAAGTCC
ST	ATCAGAAAATATGAACAACACATTTTACTGCTGTGAAC
EAF	CGGCGCTGGTGATTTCGGGTTCGTCA
IAL	CTTATGTTCAAGGAAATAATTGTTGGCCTCCTTCTC

2.10. Marcación histológica

Para llevar a cabo las marcaciones histológicas se partió de muestras de tejidos incluidos en parafina ya fijados en portaobjetos, correspondientes a pacientes con diferentes patologías.

2.10.1. Construcción aptámero PTEN-DNAzima peroxidasa

La secuencia conformada por el aptámero de PTEN y la secuencia que formará la DNAzima peroxidasa fue obtenida comercialmente (*Macrogen*).

La secuencia del aptámero PTEN-PS2.M se muestra a continuación, donde las bases subrayadas indican la secuencia PS2.M:

5´-<u>GTGGGTAGGGCGGGTTGG</u>CGGTCATACCGCGCCTATCGAACTCCCACTCGC

GTGCAGCTCTGTGTAGGT-3´

Preparación de la construcción aptámero PTEN-DNAzima peroxidasa

Se preparó una solución de aptámero PTEN-oligonucleótido PS2.M 5 µM en buffer TKNaT. Se preparó con una relación hemina: oligonucleótido 2:1 y 20:1. Se calentaron las soluciones a 95ºC durante 5 minutos para desnaturalizar el ADN y finalizado ese tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se mantuvo en agitación por 30 minutos para que se forme la DNAzima peroxidasa.

2.10.2 Preparación del tejido incluido en parafina

Desparafinado

El desparafinado de la muestra se realizó en dos pasos, primero manteniendo el portaobjeto en estufa a 62ºC durante 40 minutos y por último se sumergió en dos cubas conteniendo xileno durante 10 minutos en cada uno de ellos.

Hidratación del tejido

La hidratación se llevó a cabo sumergiendo sucesivamente el portaobjetos en cubas con etanol 100%, 90% y 70%, durante 10 minutos cada una. Luego se sumergió en agua destilada por otros 10 minutos.

Recuperación de antigénica

La recuperación de antígenos se llevó a cabo incubando los portaobjetos durante 20 minutos a 90-95°C en buffer citrato pH 6 conteniendo 0.05% de tween-20.

Bloqueo de actividad peroxidasa endógena

La actividad peroxidasa endógena se bloqueó incubando los tejidos en solución de H_2O_2 3% durante 20 minutos.

Bloqueo

Para bloquear el tejido se utilizó una solución de albúmina de suero bovino (BSA) 2% en PBS 10 mM pH 7.5. Se agregó un volumen de dicha solución sobre el tejido y se incubó por durante 30 minutos en cámara húmeda. Una vez finalizado ese tiempo se lavó dos veces con buffer. Para la marcación con anticuerpos se utilizó buffer PBS 10 mM pH 7.5 y cuando se utilizaron aptámeros se utilizó buffer TKT 25 mM pH 8.

2.10.3. Optimización de la relación DNA: hemina en marcaciones histológicas

Se llevaron a cabo tinciones histológicas preparando la construcción aptámeroPTEN-PS2.M utilizando dos relaciones DNA:hemina, 1:2 y 1:20.

Se prepararon dos soluciones de aptámero PTEN-PS2.M 5 µM en buffer TKNaT una conteniendo hemina 10 µM y la otra hemina 100 µM. Se calentaron a 95ºC durante 5 minutos para desnaturalizar el ADN y se mantuvieron por 30 minutos en agitación para permitir que se forme la DNAzima peroxidasa. Transcurrido ese tiempo se agregaron 100 µL de cada preparado sobre dos cortes y se dejó reaccionar durante toda la noche a temperatura ambiente (20ºC).

2.10.4. Marcado de cortes histológicos

Para llevar a cabo la marcación histológica con anticuerpos, se requiere colocar un volumen de solución sobre el tejido e incubar durante períodos de tiempo que van desde 1 hora a temperatura ambiente hasta toda la noche (ON) a 4ºC, dependiendo del anticuerpo a utilizar.

Este procedimiento requiere de mucho cuidado para evitar derrames del anticuerpo, lo cual se traduce en una marcación despareja o deficiente. Es común que en un portaobjetos se fijen varios cortes, para llevar a cabo distintas tinciones, marcaciones y controles, por ello se debe evitar el derrame o mezclado de las distintas soluciones. Un mezclado de las distintas soluciones lleva a tener que descartar todo el preparado.

Marcado de tejidos con construcción aptámero PTEN-DNAzima

Se colocó un volumen de la construcción aptámero PTEN-DNAzima sobre el tejido de manera que lo cubra por completo (este volumen dependerá del tamaño del tejido, pero en general va entre 50 a 100 µL). El preparado se incubó durante toda la noche (ON) a temperatura ambiente 20ºC en cámara húmeda.

Marcado con anticuerpos

Se preparó una dilución 1:100 del anticuerpo monoclonal de conejo IgG contra PTEN (*Promega*) en PBS 10 mM pH 7.5 y se agregó un volumen sobre el tejido de manera que quede todo cubierto de líquido (en general 50-100 µL). Se incubó durante toda la noche (ON) a 4ºC. Luego de la incubación se realizaron dos lavados con PBS–T 10 mM pH 7. Finalmente se agregó una dilución 1:200 del anticuerpo secundario de cabra anti conejo IgG conjugado

con HRP (*Promega*) en buffer PBS 10 mM pH 7,5 y se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

2.10.5. Revelado

Las muestras marcadas tanto con la construcción aptámero PTEN-DNAzima como con anticuerpo se revelaron con diaminobenzidina (DAB). El producto de oxidación del DAB por las peroxidasas en presencia de H_2O_2 genera un precipitado de color marrón.

Para llevar a cabo el revelado, previamente se lavaron los tejidos con buffer TKT 25 mM pH 8 (para el marcado con construcción aptámero PTEN-DNAzima) y con buffer PBS 10 mM pH 7.5 (para el marcado con anticuerpo). Luego se agregó un volumen de DAB 1X conteniendo H_2O_2 9 mM en buffer TKT 25 mM pH 8. Se dejó reaccionar por 25 minutos en oscuridad.

2.10.6. Procesamiento del corte para observación por microscopía óptica

Deshidratación

La deshidratación se realizó sumergiendo la muestra en cubas con etanol 70%, 90% y 100%, durante 5 minutos en cada una.

Aclarado

El aclarado se realizó sumergiendo la muestra por 5 minutos dos veces en xileno.

Montado

Se agregó una gota de bálsamo sintético sobre el cubreobjetos y se colocó sobre el portaobjetos recién sacado del xileno. Mediante una leve presión se esparció el bálsamo sobre toda la muestra, evitando que queden burbujas de aire. Las muestras fueron observadas en microscopio óptico marca *Leica* DM 2500 (Figura 2.6).

Figura 2.6-Microscopio Leica DM 2500.

2.11 Referencias

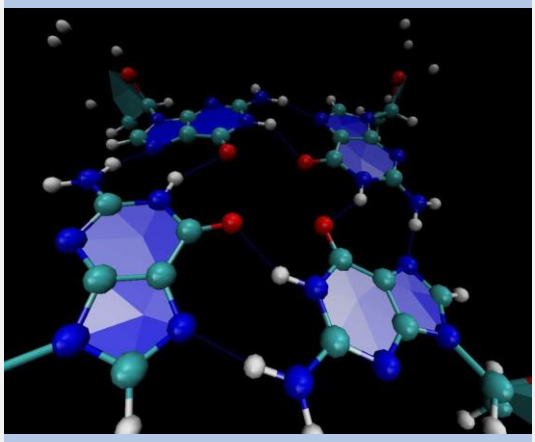
[1] Thermo Scientific, "NanoDrop- Guía de usuario," *NanoDrop One*. 2016.

[2] M. E. Cortina *et al.*, "Electrochemical magnetic microbeads-based biosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 80, pp. 24–33, 2016.

[3] P. Travascio, Y. Li, and D. Sen, "DNA-enhanced complex peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin," *Chem. Biol.*, vol. 5, no. 9, pp. 505–517, 1998.

[4] L. Watterworth, E. Topp, H. Schraft, and K. T. Leung, "Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic Escherichia coli.," *J. Microbiol. Methods*, vol. 60, no. 1, pp. 93–105, Jan. 2005.

3



Actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa

Contenidos del capítulo

3.1. Introducción 73
3.2. Resultados 77
3.2.1. Cosustrato reductor 77
3.2.2. Efecto del pH y naturaleza del buffer 79
3.2.3. Tiempo necesario para la formación del complejo oligonucleótido-hemina 81
3.2.4. Dependencia de concentración de iones potasio 82
3.2.5. Relación óptima hemina:oligonucleótido 84
3.2.6. Efecto del peróxido de hidrógeno 85
3.2.7. Actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa en las condiciones óptimas 89
3.3. Formación del complejo oligonucleótido-hemina 91
3.3.1. Dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato 91
3.3.2. Cálculo de la constante de disociación de la DNAzima peroxidasa 96
3.4. Medidas electroquímicas de la DNAzima peroxidasa en solución 100
3.4.1. Elección del mediador redox 100
3.4.2. Dependencia de la densidad de corriente con la concentración de $DZ5T_3$ 103
3.4.3. Estabilidad de la DNAzima peroxidasa a distintas temperaturas de almacenamiento 105
3.4.4. Liofilización de la DNAzima peroxidasa 106
3.5. Discusión 108
3.6. Conclusiones 110
3.7 Referencias 114

3.1. Introducción

En este capítulo estudiaremos la actividad catalítica de las DNAzimas. En particular, nos centraremos en el estudio de la DNAzima con actividad catalítica peroxidasa formada por el oligonucleótido denominado $DZ5T_3$ (5´-TTTGGGTAGGGCGGGTTGGG-3')[1] y la hemina como grupo prostético. En la Figura 3.1 se muestra una representación esquemática de la formación del complejo entre el oligonucleótido y la hemina para formar la DNAzima. El oligonucleótido $DZ5T_3$ adquiere una estructura terciaria tipo cuarteto de guaninas (cuarteto de Gs), con la participación de iones potasio en el canal central de los cuartetos.

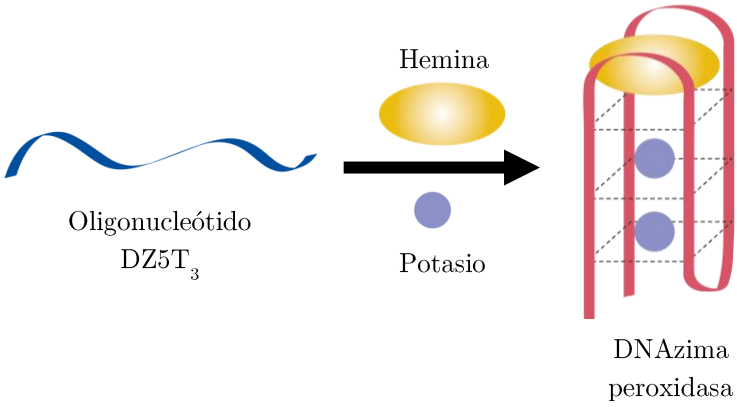


Figura 3.1- Representación esquemática de la posible estructura de la DNAzima peroxidasa.

De acuerdo con Travascio[2], los factores más relevantes que afectan la capacidad catalítica de la DNAzima peroxidasa son: el cosustrato reductor

(mediador redox), el pH, la naturaleza del buffer, la concentración de sales (cationes), la presencia de surfactantes y la relación molar entre la hemina y el oligonucleótido.

En una reacción catalizada enzimáticamente, donde ocurre una reacción de oxidación o reducción de un sustrato, es necesario que los electrones almacenados en el grupo prostético de la enzima sean transferidos a un cosustrato adecuado o éste le ceda electrones a la enzima.

En el caso particular de la DNAzima peroxidasa, este concepto se puede aplicar de la misma manera. Como ya se mencionó en la introducción de la tesis, es la hemina la que le confiere actividad catalítica peroxidasa al complejo hemina-ADN que forma esta DNAzima.

La DNAzima peroxidasa cataliza la reducción del H_2O_2 y en presencia de un cosustrato reductor (dador de electrones), éste será oxidado por la DNAzima (Figura 3.2). Se trata de una reacción en dos etapas: primero la DNAzima reduce el H_2O_2 a H_2O y en la segunda etapa la DNAzima recibe los electrones de un dador de electrones, el cosustrato reductor.

Figura 3.2- Representación esquemática de la reacción catalítica de la DNAzima peroxidasa.

La reacción global puede expresarse como:

$$Cosustrato_{red} + H_2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{DNAzima} Cosustrato_{ox} + 2H_2O \qquad \text{ecuación 1}$$

La elección del cosustrato reductor adecuado que medie la transferencia de electrones entre la DNAzima y el H_2O_2, es de suma importancia. Éste cederá electrones a la DNAzima y podremos seguir la reacción midiendo su producto de oxidación.

Idealmente, el mediador redox debe ser estable tanto en su forma oxidada como reducida en las condiciones de trabajo, debe tener una alta capacidad de transferencia de electrones, no debe participar en la reacción secundaria y debe exhibir una cinética electroquímicamente reversible[3].

El pH y la naturaleza del buffer influyen en la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa. Se debe tener en cuenta que la determinación de la dependencia de la actividad catalítica de la DNAzima con el pH presenta una dificultad intrínseca, ya que no es posible emplear un mismo tipo de buffer para regular en un amplio rango de pH. Al cambiar el rango de pH, necesariamente debemos cambiar la composición del mismo. Sin embargo, como veremos, el empleo de diferentes buffers permite extraer conclusiones de interés respecto a la influencia del pH en la actividad catalítica. En este análisis debemos ser cuidadosos para poder discernir el efecto causado por el pH y el causado por el par ácido/base conjugado empleado en la regulación del pH.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que la hemina presenta actividad catalítica por sí misma, con lo cual es de suma importancia poder encontrar las condiciones experimentales para las cuales la DNAzima (complejo hemina-ADN) presente una actividad catalítica considerablemente mayor a la que presenta la hemina por sí sola, en las mismas condiciones (habitualmente la actividad de la hemina sola es considerada como un blanco de señal). Por otra parte, un problema adicional es que la hemina tiende a agregarse y formar

dímeros. Con el fin de evitar o minimizar la dimerización de la hemina, se suelen agregar surfactantes[4]. La hemina en estado monomérico presenta mayor afinidad por la estructura de cuartetos de Gs que cuando forma los dímeros[5], razón por la cual es importante controlar este aspecto.

En un oligonucleótido unimolecular, la hemina interacciona con las guaninas de los cuartetos de Gs externos (5' ó 3' con afinidades diferentes) a través de interacciones *stacking* π–π [6]. Según fuentes bibliográficas, la relación estequiométrica entre la hemina y el oligonucleótido para distintas DNAzimas peroxidasas es 1:1 [6]–[10].

Los oligonucleótidos ricos en G requieren cationes para plegarse formando una estructura de cuartetos de Gs. La presencia de cationes, en particular de iones potasio, influye en la capacidad catalítica de la DNAzima peroxidasa, ya que estos juegan un rol fundamental en la estabilidad estructural de este tipo de estructuras oligonucleotídicas[11].

Por todo lo descripto, en una primera instancia se estudiarán los factores mencionados que influyen en la capacidad catalítica de la DNAzima peroxidasa, para entender cómo afectan a dicha capacidad y luego poder maximizarla. Todos estos factores serán estudiados mediante espectroscopía UV-vis para luego, una vez encontradas las condiciones óptimas, realizar las medidas electroquímicas. Utilizaremos primero el método óptico porque resulta más sencillo de implementar a la hora de comenzar a trabajar con un sistema nuevo. Se espera que la puesta a punto de las condiciones experimentales redunde en una mayor sensibilidad para los posteriores ensayos en biosensores en los que se usan DNAzimas como generadores de señal.

3.2. Resultados

3.2.1. Cosustrato reductor

Como cosustratos reductores se probaron, el denominado reactivo A compuesto por 4-aminoantipirina (4AAP) y fenol, y el ácido 2,2′-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS). Ambos son comúnmente utilizados para medir la actividad catalítica de enzimas con actividad peroxidasa mediante espectroscopia UV-vis, ya que generan un producto oxidado coloreado.

La 4AAP es oxidada por las enzimas peroxidasas en presencia de peróxido de hidrógeno y fenol a quinoneimina (Figura 3.3, izquierda)[12]. La quinoneimina es un compuesto rojo que presenta un máximo de absorbancia entre 500 y 520 nm, siendo la absortividad molar a 510 nm ε_{510}: 6580 $M^{-1}cm^{-1}$. En la Figura 3.3 derecha, se observa el espectro de absorción de la 4AAP y de su producto de oxidación.

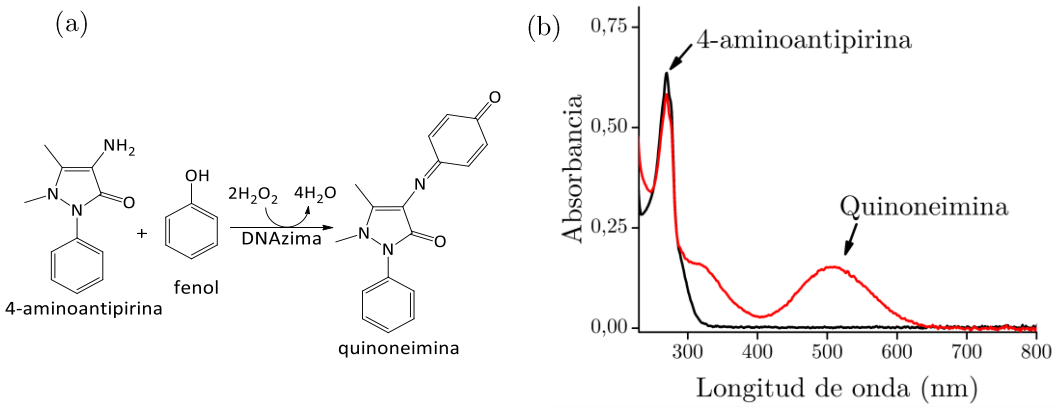


Figura 3.3- Reacción de oxidación de la 4AAP en presencia de fenol y H_2O_2 (a). Espectro de absorción de la 4AAP y quinoneimina (b).

En cuanto al ABTS, las enzimas peroxidasas catalizan la oxidación de uno de los electrones del ABTS en presencia de H_2O_2, generando el radical $ABTS^{+\bullet}$. Este radical es un compuesto verde/azulado que tiene un máximo

de absorbancia a 420 nm ($\varepsilon_{420\ nm}$ = 36000 $M^{-1}cm^{-1}$) y otras bandas menores a 645, 728 y 810 nm[13]–[15]. En la Figura 3.4, se muestra la reacción de oxidación de un electrón del ABTS y el espectro de absorción del ABTS y $ABTS^{+\bullet}$.

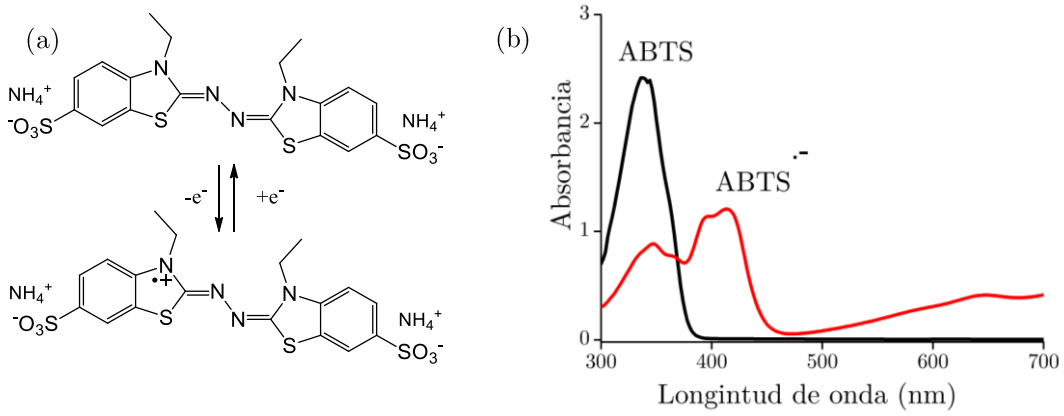


Figura 3.4- Reacción de oxidación de ABTS [15] (a) y espectro de absorción del ABTS y $ABTS^{+\bullet}$ (b).

Se llevaron a cabo medidas de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa (oligonucleótido 0.5 µM/hemina 1 µM) y hemina libre 1 µM, utilizando como cosustrato reductor 4AAP/fenol o ABTS, ambos en buffer PBS 0.1M pH 7.5, KCl 20 mM y H_2O_2 1 mM como sustrato.

Se pudo observar una mayor actividad catalítica de la hemina cuando está formando el complejo con el ácido nucleico (DNAzima) comparada con la actividad catalítica de la hemina libre, tanto con el cosustrato reductor 4AAP/fenol como con el ABTS (figura 3.5).

Con 4AAP/fenol se observó un aumento de la señal de la hemina y de la DNAzima en función del tiempo, obteniéndose una relación de $A_{DNAzima}/A_{Hemina}$~ 4, a los 100 segundos de reacción. En cambio, con el ABTS la señal de la hemina libre prácticamente no varió con el tiempo y la señal de la DNAzima en cambio aumentó considerablemente hasta los 100 segundos,

tiempo al cual se llegó a una meseta. A los 100 segundos se obtuvo una relación $A_{DNAzima}/A_{Hemina}$~ 12.

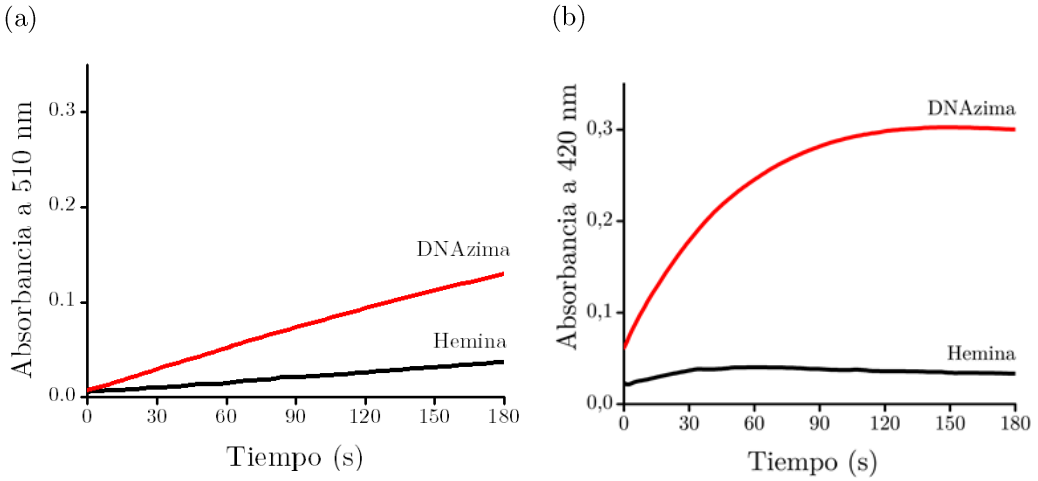


Figura 3.5- Actividad catalítica de la DNAzima 0.5 µM (rojo) y hemina 1 µM (negro), utilizando 4AAP 1.2 mM/fenol 42.5mM (a) y ABTS 50 µM (b) como cosustrato reductor, en ambos casos se inició la reacción catalítica con H_2O_2 1mM.

A raíz de estos resultados se decidió emplear en lo sucesivo ABTS como cosustrato reductor ya que con este se observó una mejor relación señal:blanco y descartar 4AAP/fenol. Además, el ABTS presenta ventajas frente al reactivo 4AAP/fenol, como la gran estabilidad química tanto del sólido como en solución acuosa, el alto coeficiente de absortividad molar de su producto de oxidación y que no es tóxico.

Por su parte el reactivo 4AAP/fenol, una vez preparado no puede almacenarse por mucho tiempo y tanto la 4AAP como el fenol son tóxicos, siendo fenol además corrosivo y mutagénico.

3.2.2. Efecto del pH y naturaleza del buffer

Para este estudio se seleccionaron los siguientes buffers de concentración 25 mM: ftalato a pH 5, acetato a pH 5.5, fosfato a pH 7 y 7.5 y Tris-HCl a pH 7, 7.5, 8, 8.5 y 9, conteniendo las mezclas en forma adicional 0.05% de

Tritón X-100 y KCl 20 mM en todos los casos[4]. Se utilizó ABTS 50 µM como cosustrato reductor y se midió la absorbancia a 420 nm debida al producto de oxidación del ABTS, a los 3 minutos de iniciada la reacción con H_2O_2 1 mM. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-1800 *Shimadzu*, con cubeta de paso óptico 1 cm.

Como se puede ver en la Figura 3.6, a valores de pH cercanos a 8 se observó el máximo valor de absorbancia, debido al producto de oxidación del ABTS por la DNAzima, utilizando buffer Tris-HCl. Cuando se utilizó buffer fosfato se observó un máximo de absorbancia a pH 7.5, siendo la actividad catalítica de la DNAzima menor que la obtenida cuando se utilizó buffer Tris-HCl. A pH menores a 7, la actividad catalítica de la DNAzima fue muy baja y casi indistinguible de la generada por la hemina libre.

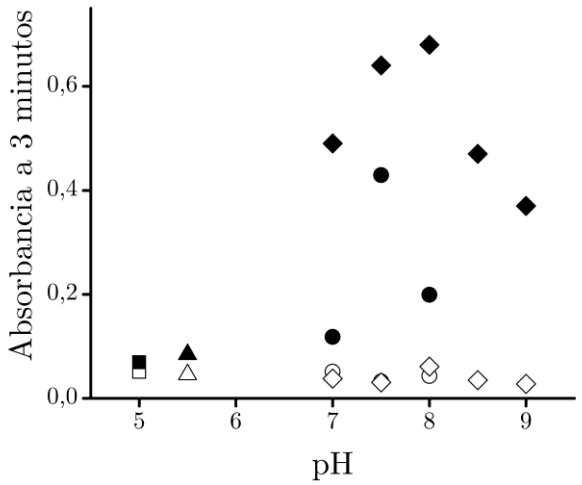


Figura 3.6– Dependencia de la actividad catalítica de la DNAzima 0.5 µM (lleno) y hemina 1 µM (vacío) con el pH, determinado midiendo la absorbancia a 420 nm, desarrollada por la oxidación de ABTS 50 µM a los 3 minutos de iniciada la reacción con H_2O_2 1 mM, en buffer 25 mM: ftalato a pH 5 (■), acetato a pH 5.5 (▲), fosfato a pH 7, 7.5 y 8 (●), y Tris-HCl a pH 7, 7.5, 8 , 8.5 y 9 (♦). Todos conteniendo KCl 20mM y Tritón X-100 0.05%.

Teniendo en cuenta que la absorbancia generada por la hemina libre representa la línea de base de estas medidas, se obtendrá una mayor

sensibilidad cuanto mayor sea el aumento relativo de absorbancia entre la hemina y la DNAzima.

Cuando se empleó buffer Tris-HCl, el valor de absorbancia desarrollado a los 3 minutos presentó un máximo a pH 8, obteniéndose una absorbancia de la DNAzima 11 veces mayor a la obtenida con la hemina libre. A ese mismo pH cuando se utilizó buffer fosfato esa relación fue de 4 veces mayor la absorbancia de la DNAzima que la de la hemina libre.

Para el buffer fosfato la máxima diferencia de absorbancia entre estas dos especies se obtuvo a pH 7.5, donde la absorbancia de la DNAzima fue 13 veces mayor a la obtenida con la hemina libre. De todas maneras, los valores de absorbancia obtenidos con el buffer Tris-HCl a pH 8 fueron un 40% mayores que con el buffer fosfato a pH 7.5.

En base a estos resultados, se concluyó que la mayor sensibilidad se obtuvo empleando con el buffer Tris-HCl a pH 8, por lo que se mantuvieron esas condiciones para las mediciones sucesivas.

3.2.3. Tiempo necesario para la formación del complejo oligonucleótido-hemina

Para determinar el tiempo necesario para que se forme el complejo oligonucleótido-hemina, se realizaron determinaciones espectrofotométricas a distintos tiempos de incubación.

Se midió la actividad catalítica de distintas alícuotas de DNAzima peroxidasa (oligonucleótido 1 µM y hemina 2 µM), incubadas entre 0 y 90 minutos. Para cada tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 420 nm del producto de oxidación del ABTS 50 µM a los 3 minutos de iniciada la

reacción con H_2O_2 0.5 mM en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM y Tritón X-100 0.05%.

Como se puede ver en la Figura 3.7, a los 30 minutos de incubación se obtuvo la máxima absorbancia, y ésta se mantuvo en los mismos niveles a tiempo de incubación mayores.

Con lo cual este tiempo de incubación del oligonucleótido y la hemina es suficiente para que se forme la DNAzima peroxidasa.

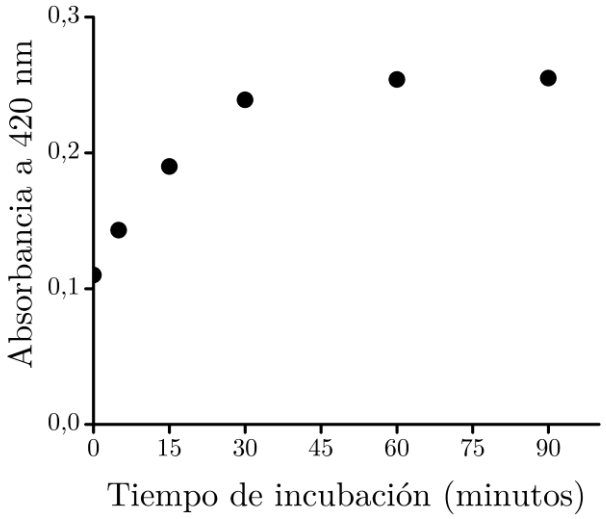


Figura 3.7- Dependencia de la actividad catalítica para distintos tiempos de incubación, con oligonucleótido 1 µM, hemina 2 µM, ABTS 50 µM y H_2O_2 0.5 mM, midiendo la absorbancia a 420 nm a los 3 minutos de iniciada la reacción en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM y Tritón X-100 0.05%.

.

3.2.4. Dependencia de concentración de iones potasio

Hasta el momento se utilizó una concentración de KCl reportada como óptima en bibliografía para la DNAzima formada por el oligonucleótido PS2.M[9][4]. Como las condiciones experimentales no son las mismas, se decidió evaluar cuál era la concentración óptima de KCl y cómo afecta ésta a

la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa formada por el oligonucleótido $DZ5T_3$.

Para ello, se preparó la DNAzima en buffer Tris-HCl pH 8 25 mM (conteniendo 0.05 % de Tritón X-100) en ausencia y presencia de distintas concentraciones de KCl en el rango 1-100 mM. Se midió la absorbancia a 420 nm del producto de oxidación del ABTS 50 µM a los 3 minutos de iniciada la reacción con H_2O_2 1 mM de forma de tener condiciones comparativas para evaluar el efecto del ión potasio.

Como se puede observar en la Figura 3.8, en ausencia de KCl la DNAzima presentó cierta actividad catalítica, pero ésta fue mucho menor a la observada cuando se agregaron concentraciones superiores a 1 mM. Este resultado parece contradecir los reportes previos acerca de la necesidad de cierto contenido de iones potasio en la solución para estabilizar la formación de la DNAzima.

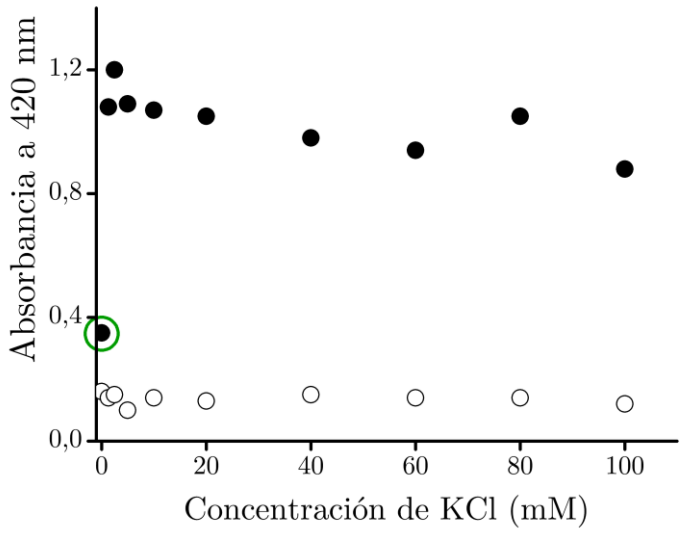


Figura 3.8– Absorbancia a 420 nm en función de la concentración de KCl para la DNAzima (•) y hemina (○), a los 3 minutos de iniciada la reacción con H_2O_2 1 mM, con ABTS 50 µM en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8 y Tritón X-100 0.05%. El círculo verde indica el valor de absorbancia para la DNAzima obtenido sin agregado de KCl.

Sin embargo, este efecto puede atribuirse a la presencia de trazas de iones K^+ en los oligonucleótidos comerciales empleados. Estos fueron adquiridos purificados mediante la técnica de desalting (DST), que elimina los excesos de sal y pequeñas moléculas. La técnica DST, es un método básico de purificación, con lo cual se podría pensar que estos aun contengan restos de sales suficientes como para explicar la actividad observada.

Por otro lado, se pudo observar que para concentraciones en el rango estudiado no hay una variación significativa de la señal con la concentración de KCl.

Dado que el KCl es necesario para el plegamiento y estabilidad del cuarteto de guaninas, se decidió continuar utilizando en lo sucesivo una concentración 20 mM de KCl en el buffer Tris-HCl.

3.2.5. Relación óptima hemina:oligonucleótido

Se determinó la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa, midiendo la absorbancia a 420 nm de soluciones de DNAzima con distintas relaciones molares hemina: oligonucleótido $DZ5T_3$.

Se utilizó ABTS 50 µM como cosustrato reductor y se midió la absorbancia a 420 nm debida al producto de oxidación del ABTS, a los 3 minutos de iniciada la reacción con H_2O_2 0.5 mM.

Como se puede ver en la Figura 3.9 la relación molar óptima entre hemina: oligonucleótido, para obtener la máxima actividad catalítica, se encuentra entre 1.5 y 2.5.

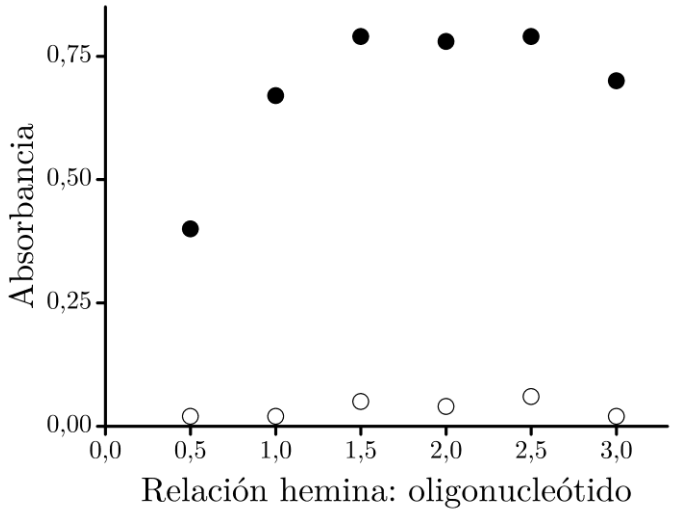


Figura 3.9- Dependencia de la actividad catalítica con las distintas relaciones hemina: oligonucleótido, con oligonucleótido 1µM (•) y hemina 0.5-3 µM (o), midiendo la absorbancia a 420 nm, ABTS 50 µM a los 3 minutos de iniciada la reacción con H_2O_2 0.5 mM en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM y Tritón X-100 0.05%.

3.2.6. Efecto del peróxido de hidrógeno

Como ya se mencionó la hemina es la responsable de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa y es también el grupo prostético de la enzima HRP. El mecanismo catalítico de la HRP se encuentra ampliamente estudiado [16]–[20] y se sabe que el peróxido de hidrógeno no solo es el sustrato de la enzima sino que también actúa como un agente inactivador de la actividad catalítica. En la HRP este efecto inactivador del H_2O_2 se da cuando éste se encuentra en concentraciones superiores a 20 mM [21].

Siendo que la DNAzima peroxidasa presenta hemina al igual que la HRP, cabe esperar encontrar el mismo efecto inactivador del sustrato en la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa.

En esta sección, en una primera instancia, se estudió el efecto del H_2O_2 en la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa. Luego se observaron los efectos del H_2O_2 sobre la hemina analizando la banda de Soret.

Las porfirinas, como la hemina, presentan bandas de absorción características en el rango entre 350-700 nm, como la banda de Soret alrededor de los 398 nm (ε_{398}=8.0x10^4 $M^{-1}cm^{-1}$), y bandas en el visible como transiciones Q (501 y 539 nm) y bandas de transferencia de carga a 627 nm. La banda de Soret es característica de la conjugación del macrociclo y varía cuando la porfirina interacciona con un ligando [2], [4], [22], [23]. En particular, cuando la hemina forma un complejo con los ácidos nucleicos (oligonucleótidos PS2.M, $DZ5T_3$, AGRO100, etc) la banda de Soret sufre hipercromismo y corrimiento al rojo de 398 a 404 nm.

Efecto del H_2O_2 en la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa

Se preparó la DNAzima con el oligonucleótido $DZ5T_3$ 1µM/hemina 2 µM. Se llevaron a cabo medidas de absorbancia a 420 nm correspondientes al producto de oxidación del ABTS (3.4 mM) a distintas concentraciones de H_2O_2.

Como se puede observar en la Figura 3.10, a tiempos mayores a 30 segundos hay un efecto inhibitorio de la actividad catalítica que aumenta a medida que la concentración de H_2O_2 aumenta. Esta inhibición, a su vez se da a concentraciones de sustrato muchos menores si la comparamos con la enzima HRP. Según Shangguan [26], esto puede deberse a que la hemina está más expuesta en el complejo cuarteto de G/hemina que en la HRP, donde el entorno proteico protege a la porfirina de la degradación por parte del H_2O_2. Por otro lado, Travascio[25] propuso que la inactivación de la DNAzima peroxidasa se podría dar además por otros factores, como la oxidación de las guaninas que conforman el cuarteto de G, lo que llevaría a que se desarme el cuarteto.

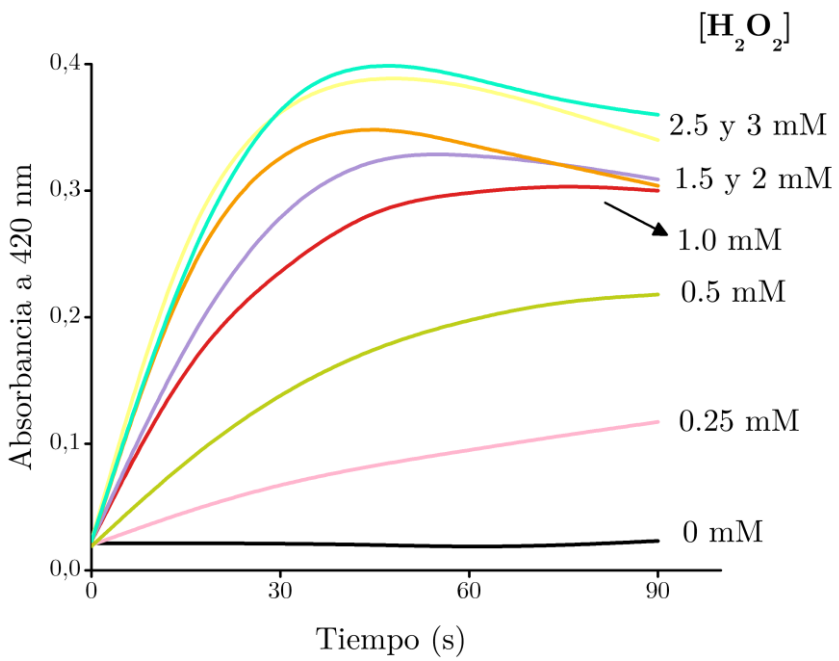


Figura 3.10- Curvas de absorbancia versus tiempo para distintas concentraciones de H_2O_2 (0 a 1.5 mM), con el oligonucleótido 1µM, hemina 2 µM, ABTS 3.4 mM en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM y Tritón X-100 0.05%.

Para las medidas de actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa, concentraciones de H_2O_2 en el rango 0.5-1.0 mM demostraron ser óptimas por lo menos a tiempos menores a 90 segundos.

Efecto del H_2O_2 en la banda de Soret de la hemina libre y formando el complejo con el oligonucleótido $DZ5T_3$ (DNAzima peroxidasa)

Se llevaron cabo medidas espectrofotométricas en el rango 300-550 nm donde se encuentra la banda de Soret de la hemina (λ=398 nm). Se estudió como afecta el H_2O_2 a dichas bandas de absorción, tanto para la hemina libre como para el complejo de esta con el oligonucleótido $DZ5T_3$. Para ello, se prepararon soluciones de hemina 8 µM y DNAzima peroxidasa conformada por oligonucleótido $DZ5T_3$ 4 µM y hemina 8 µM, ambas en buffer TKT 25 mM pH 8. Se obtuvo el espectro de la hemina y la DNAzima

en ausencia de H_2O_2 y en presencia de H_2O_2 1 mM (concentración final). En ambos casos se tomaron espectros cada 15 segundos durante un intervalo de 8 minutos.

En la Figura 3.11 se muestra como varían los espectros correspondientes a hemina (a) y hemina-oligonucleótido (DNAzima) (b) en ausencia y presencia de H_2O_2 1 mM.

Para el caso de la hemina libre (figura 3.11 (a)), en ausencia de H_2O_2, se obtuvo un máximo de absorbancia a 395 nm (longitud de onda correspondiente a la banda de Soret de la hemina en las condiciones de trabajo). El agregado de H_2O_2 generó una disminución de la absorbancia en 8 minutos de A_{395}=0.73 a A_{395}=0.58.

Para el complejo hemina-oligonucleótido (figura 3.11 (b)) en ausencia de H_2O_2 se observó un máximo de absorbancia a 400 nm. El agregado de H_2O_2 generó no solo una disminución de la absorbancia sino también un corrimiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda menores. A los 60 segundos de agregado el H_2O_2 el máximo de absorbancia llegó a 395 nm (banda de Soret de la hemina libre en estas condiciones). Para este caso, el agregado de H_2O_2 generó una disminución de la absorbancia en 8 minutos de A_{400}=0.84 a A_{395}=0.54.

En ausencia de H_2O_2 no se observaron cambios en la banda de Soret en el tiempo, tanto para el complejo hemina-oligonucleótido como para la hemina libre.

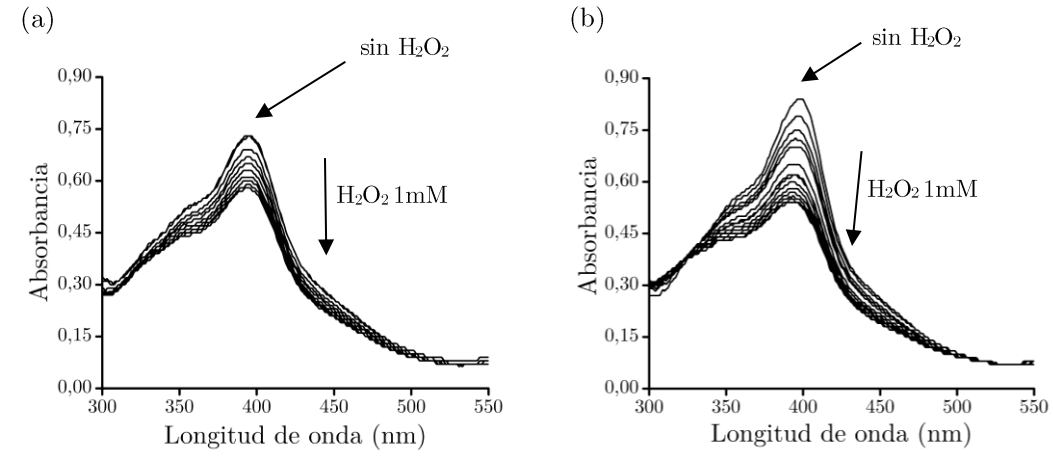


Figura 3.11- Espectros de absorbancia de hemina (a) y hemina-oligonucleótido (b) en ausencia de H_2O_2 y con el agregado de H_2O_2 1 mM, medido cada 15 segundos durante 8 minutos.

Con estos resultados podemos afirmar que el H_2O_2 afecta a la hemina. Por otro lado, el complejo hemina-oligonucleótido también se ve afectado, ya que se produce un corrimiento desde el máximo de absorbancia del complejo hemina-oligonucleótido hasta el máximo de la hemina libre, lo cual indicaría que el complejo se desarma. Es decir, el agregado de H_2O_2 genera la disociación de parte del complejo ADN-hemina.

3.2.7. Actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa en las condiciones óptimas

Una vez encontradas las condiciones óptimas para determinar la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa, se estudió la variación de la señal en función de la concentración de oligonucleótido-hemina en relación a la hemina libre (utilizada como blanco). Para ello, se prepararon soluciones de DNAzima (oligonucleótido-hemina) de concentraciones 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 µM y hemina 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5 µM. Se agregó ABTS de manera que su concentración final fuera 3.4 mM y se midió la absorbancia a 420 nm a los 3

minutos de iniciada la reacción con H_2O_2 1 mM.

En la Figura 3.12 se muestra como varía la absorbancia para las distintas concentraciones de oligonucleótido-hemina (DNAzima) o hemina libre. Se puede ver en este gráfico que hubo un aumento de la absorbancia a medida que aumentó la concentración del oligonucleótido-hemina.

Como se puede observar, hay una diferencia significativa entre la señal de la DNAzima y la hemina libre. Esta última no muestra un aumento considerable de la absorbancia a medida que aumentó su concentración. Este resultado demuestra que la catálisis de la hemina libre no es significativa frente al aporte del complejo oligonucleótido-hemina en las condiciones seleccionadas.

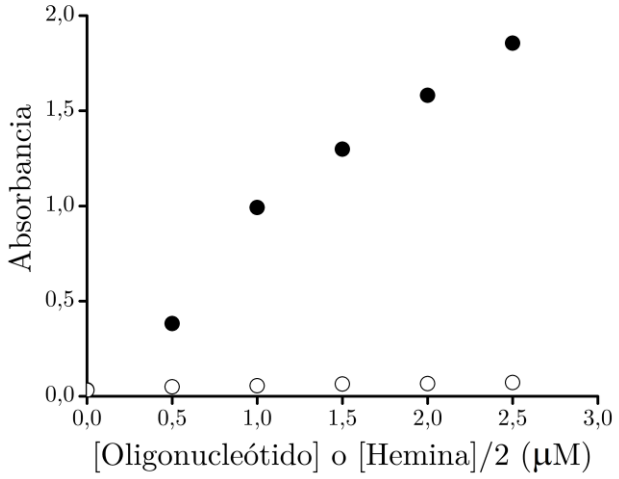


Figura 3.12- Absorbancia a 3 minutos de iniciada la reacción catalítica en función de [oligonucleótido] y [hemina]/2, para la DNAzima (•) y hemina (o) con ABTS 3.4 mM y H_2O_2 1 mM, en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM y Tritón X-100 0.05%.

En la tabla 3.1 se muestran las relaciones obtenidas entre la absorbancia de la DNAzima (A_{DZ}) y la absorbancia de la hemina libre (A_H), para las distintas concentraciones de oligonucleótido y hemina. Por otro lado, se calculó el límite de detección de la DNAzima por espectrometría UV-vis,

utilizando el criterio de tres veces la desviación estándar del blanco dividido la pendiente de la curva de calibrado. Como blanco se tomaron los valores de absorbancia obtenidos para la hemina en el rango de concentración estudiado (0-2.5 µM). Trabajando en las condiciones optimizadas para determinar la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa $DZ5T_3$, se obtuvo un límite de detección de 30 nM.

Tabla 3.1- Relación de absorbancia entre DNAzima y hemina

[Oligonucleótido] o [hemina]/2 (µM)	**Relación A_{DZ}/A_H**
0	0.8
0.5	6.5
1.0	16.6
1.5	20.3
2.0	25.0
2.5	26.0

3.3. Formación del complejo oligonucleótido-hemina

En esta sección se estudiaron los parámetros cinéticos que intervienen en la formación del complejo oligonucleótido-hemina que forma la DNAzima peroxidasa.

3.3.1. Dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato

La descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de un agente reductor que transfiere un electrón se puede expresar como:

$$H_2O_2 + 2H^+ + 2\,red \rightarrow 2\,H_2O + 2\,ox \qquad \text{ecuación 2}$$

donde ***red*** es la especie reducida y ***ox*** la especie oxidada. Además, la velocidad de esta reacción puede seguirse determinando el cambio de concentración de la especie oxidada que se va formando. En este caso, dado que usamos el

ABTS como cosustrato reductor, el producto de oxidación es el radical $ABTS^{+\bullet}$ de color verde intenso. De esta manera, podemos seguir la cinética de la reacción que queremos estudiar. Luego, la velocidad de la reacción se puede determinar por el método de velocidades iniciales como el cambio en la concentración de peróxido con el tiempo (ecuación 3). Reemplazando la concentración de peróxido por la ecuación de Lambert-Beer, se puede calcular la velocidad inicial como la pendiente de la curva de absorbancia (A) vs tiempo como se muestra en la ecuación 3:

$$v_0 = \frac{\partial[H_2O_2]}{\partial t}\Big)_{t=0} = \frac{1}{2\varepsilon l}\frac{\partial A}{\partial t}\Big)_{t=0} \approx \frac{A(\tau)}{2\varepsilon l\,\tau} \quad \text{ecuación 3}$$

Por otro lado, en gran parte de los sistemas enzimáticos, la velocidad de una reacción puede modelarse por la ecuación propuesta por Michaelis-Menten, que viene dada por:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{ecuación 4}$$

donde, v_{max} es la velocidad máxima que alcanza la reacción, [S] es la concentración del sustrato de la enzima y K_M es la constante de Michaelis-Menten.

La constante K_M es la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Cuando K_M=[S], la ecuación 4 se reduce a $v=v_{max}/2$. El valor de K_M nos da una idea de la afinidad de la enzima por el sustrato, valores de K_M pequeños indican una gran afinidad. Por el contrario, valores grandes de K_M indican una menor afinidad.

La velocidad máxima puede definirse entonces como $v_{max} = k_{cat}$ [E], donde k_{cat} es una constante que representa el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo y [E] es la concentración de enzima. Según Travascio [4], este modelo también puede aplicarse a las reacciones catalizadas por ácidos nucleicos con actividad catalítica, donde v_{max} puede escribirse como $v_{max} = k_{cat}$ [DZ], siendo [Dz] la concentración de la DNAzima. Finalmente, la ecuación 4 podría reescribirse como:

$$v = \frac{v_{max}[H_2O_2]}{K_M + [H_2O_2]} = \frac{k_{cat}[Dz][H_2O_2]}{K_M + [H_2O_2]} \qquad \text{ecuación 5}$$

Por último, un parámetro que generalmente se utiliza para evaluar la eficiencia catalítica es la relación k_{cat}/K_M. Un valor alto de k_{cat}/K_M está asociado a una mayor actividad catalítica.

Ahora cuando la velocidad es la velocidad inicial nos encontramos en la zona donde hay una relación lineal entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato. En esta zona podemos decir que $K_M >> [H_2O_2]$ con lo cual la ecuación 5 se reduce a:

$$v_0 = \frac{k_{cat}[Dz][H_2O_2]}{K_M} \qquad \text{ecuación 6}$$

Entonces, la pendiente de la curva de Michaelis-Menten en esta región es la relación $k_{cat}[Dz]/K_M$ y representa la sensibilidad. Cuanto mayor sea esta relación para una misma concentración de DNAzima, mayor será la sensibilidad de la determinación.

Para estudiar la dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato, se llevaron a cabo medidas de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa (oligonucleótido $DZ5T_3$ 1 µM y hemina 2 µM) midiendo el producto de oxidación del ABTS 3.4 mM, en presencia de soluciones de H_2O_2 en el rango de 0-4 mM. Para calcular la velocidad se utilizó el método de las velocidades iniciales descripto anteriormente.

Como podemos ver en la Figura 3.13, la reacción catalítica de la DNAzima peroxidasa se puede modelar muy bien con la ecuación de Michaelis-Menten. Para ello, se realizó un ajuste no lineal utilizando la ecuación 5 y se obtuvieron los parámetros V_{max}= (2.0 ± 0.1) 10^{-3} mMs^{-1} y K_M= (1.2 ± 0.1) mM.

Por otro lado, se calculó la k_{cat} a partir de la velocidad máxima y la concentración de DNAzima, según $\nu_{max} = k_{cat}$ [Dz], obteniéndose un valor de k_{cat}= (2.0 ± 0.1) s^{-1}.

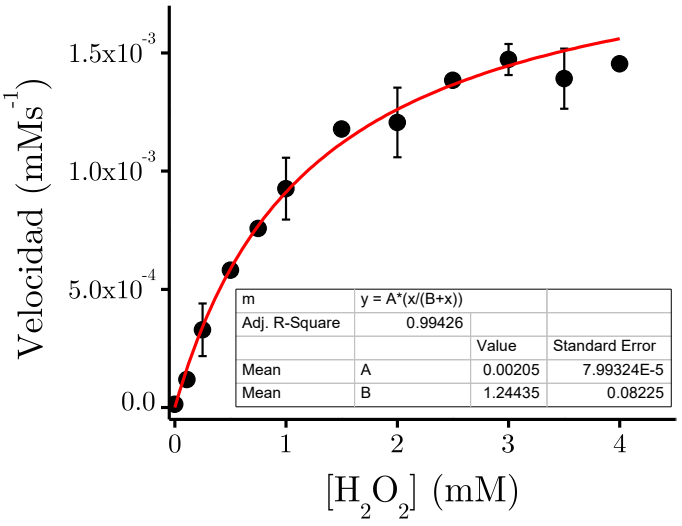


Figura 3.13- Velocidad de reacción en función de la concentración de H_2O_2 para la DNAzima peroxidasa (oligonucleótido $DZ5T_3$ 1µM y hemina 2 µM), ABTS 3.4 mM en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM y Tritón X-100 0.05%.

En la tabla 3.2 se muestran los valores calculados de K_M y k_{cat}, y la relación entre ellas. Además, se comparan estos resultados con los reportados

en bibliografía para la DNAzima peroxidasa formada por el oligonucleótido PS2.M y para la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP).

Tabla 3.2– Comparación de parámetros cinéticos calculados y los obtenidos en bibliografía.

DNAzimas y Enzimas	**K_M(mM)**	**k_{cat}(s^{-1})**	**k_{cat}/K_M**	**Ref.**
$DZ5T_3$ (5´-TTTGGGTAGGGCGGGTTGGG-3´)	1.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.7	Este trabajo
PS2.M(5´-GTGGGTAGGGCGGGTTGG-3´)	2.9 ± 0.5	3.8	1.3	[4]
Peroxidasa de rábano picante	0.3	202	673	[26]

Como ya se mencionó, K_M representa la constante de disociación del complejo enzima-sustrato (DNAzima-H_2O_2, en este caso), que es inversa a la afinidad de la enzima por el sustrato. Se puede ver a partir de los valores presentados en la tabla 3.2, que la DNAzima peroxidasa formada por el oligonucleótido $DZ5T_3$ muestra una mayor afinidad por el sustrato comparada con la DNAzima formada por el oligonucleótido PS2.M.

Por otro lado, si comparamos los valores de K_M obtenidos con las DNAzimas formadas por los oligonucleótidos $DZ5T_3$ y PS2.M, con una enzima proteica como la HRP, se puede observar que esta enzima presenta una afinidad superior por el sustrato.

En cuanto al parámetro k_{cat}, que representa el número de moléculas de sustrato transformadas en producto, se obtuvo un valor del mismo orden de magnitud tanto para la DNAzima peroxidasa utilizada en este trabajo como para la DNAzima formada por el oligonucleótido PS2.M según los valores reportados por Travascio [4]. Si se comparan los valores de k_{cat} de estas DNAzimas con el valor reportado para la HRP se puede ver que este presenta un valor de k_{cat} dos órdenes de magnitud superior.

Estos resultados reflejan una "eficiencia catalítica", dada por el parámetro

k_{cat}/K_M, altamente superior para la enzima proteica HRP comparada con las DNAzimas peroxidasas. Si bien estos parámetros catalíticos son desfavorables para las DNAzimas, estas presentan otras ventajas frentes a las enzimas como: su obtención sintética, su estabilidad, la posibilidad de diseñar racionalmente estados activos e inactivos de la secuencia, poder acoplarla a otros ácidos nucleicos con distintas funcionalidades, etc.

3.3.2. Cálculo de la constante de disociación de la DNAzima peroxidasa

En esta sección se presenta un método para calcular la constante de disociación del complejo formado por el oligonucleótido $DZ5T_3$ y la hemina:

$$\text{Oligonucleótido + Hemina} \underset{k_d}{\overset{k_f}{\rightleftharpoons}} \text{DNAzima} \qquad \text{ecuación 7}$$

Como ya se mencionó en la sección 3.2.6 las variaciones en la banda de Soret de las porfirinas pueden aportar información sobre el complejo formado entre la hemina y el oligonucleótido. En particular, estas variaciones permiten calcular la constante de disociación del complejo oligonucleótido-hemina, estudiando los espectros de absorción de la hemina en presencia de distintas cantidades de ligando (oligonucleótido).

Determinación de la constante de disociación oligonucleótido $DZ5T_3$-hemina

La constante de disociación se determinó espectrofotométricamente midiendo el espectro de absorbancia en el rango correspondiente a la banda de Soret que presenta la hemina cuando forma complejos con ácidos nucleicos (λ=404 nm). Para ello, se utilizó una concentración de hemina 4 µM y

concentraciones crecientes de oligonucleótido (0.5 a 6 µM). En la Figura 3.14, se observa que efectivamente hubo un aumento de la intensidad de la banda y un corrimiento al rojo (398 a 404 nm) a medida que la concentración de oligonucleótido aumentó. Además, se puede apreciar un punto isosbéstico alrededor de 420 nm, lo cual quiere decir que hay especies en equilibrio que presentan la misma absortividad molar a esa longitud de onda. Estas especies en equilibrio probablemente sean la hemina-surfactante y oligonucleótido-hemina. Según Travascio[4] realizando este experimento en ausencia de Tritón X-100, no se observó el punto isosbéstico y se llegó a saturación con menor cantidad de oligonucleótido.

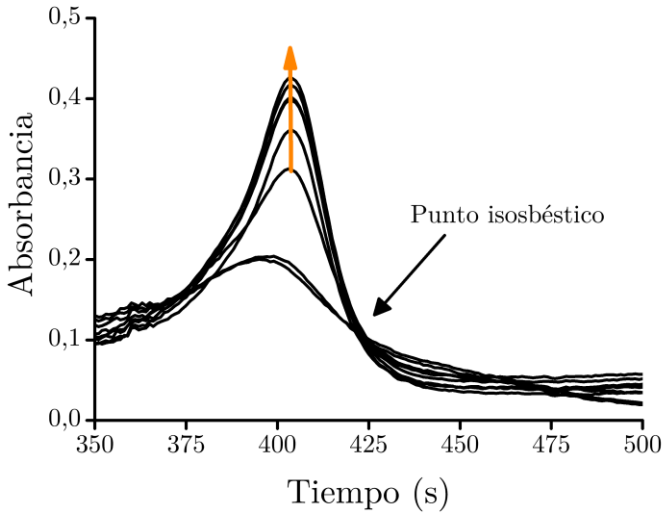


Figura 3.14- Variación del espectro de absorbancia de la hemina 4 µM con el incremento de la concentración de oligonucleótido (0 a 6 µM) en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM y Tritón X-100 0.05%.

Por otro lado, se llevaron a cabo espectros del oligonucleótido (0.5 a 6 µM) en ausencia de hemina, para el cual no se observó absorción en el rango 350-500 nm.

Con estos resultados se calculó la constante disociación para el complejo, a partir de la pendiente de la recta obtenida al graficar $[ADN]_0/(1-\alpha)$ versus $1/\alpha$ (ecuación 8).

$$\frac{[ADN]_0}{(1-\alpha)} = k_D \frac{1}{\alpha} + [Hemina]_0 \qquad \text{ecuación 8}$$

El valor obtenido fue de K_D de 500 nM. En la tabla 3.3 se compara la constante de disociación calculada para el complejo hemina-oligonucleótido $DZ5T_3$ con los reportados en bibliografía para esta y otras DNAzimas peroxidasas.

El valor de K_D obtenido para la DNAzima utilizada en este trabajo fue del mismo orden que los valores encontrados en bibliografía tanto para la DNAzima peroxidasa formada por el oligonucleótido $DZ5T_3$ como por el oligonucleótido PS2.M.

Tabla 3.3– Valores de K_D para la DNAzima peroxidasa calculado y datos de bibliografía.

Oligonucleótidos	K_D / **nM**	**Ref**
$DZ5T_3$ (5´-TTTGGGTAGGGCGGGTTGGG-3´)	500 ± 15	Este trabajo
$DZ5T_3$ (5´-TTTGGGTAGGGCGGGTTGGG-3´)	125 ± 9	[27]
PS2.M(5´-GTGGGTAGGGCGGGTTGG-3´)	415 ± 25	[27]
PS2.M(5´-GTGGGTAGGGCGGGTTGG-3´)	27 ± 2	[9]

Por otro lado, se graficó la absorbancia a 404 nm de la hemina 4 µM en función de la concentración de oligonucleótido.

Como se puede observar, en la Figura 3.15, se produce un aumento de la absorbancia a 404 nm hasta llegar una concentración de oligonucleótido cercana a 4 µM, luego del cual se observó una zona de saturación.

Estos resultados sugieren que la relación estequiométrica entre la hemina y él oligonucleótido podría ser 1 a 1, ya que la saturación se alcanza

para una concentración de oligonucleótido de 4 µM.

Sin embargo, estos resultados no se condicen con la relación óptima hemina/ oligonucleótido obtenida midiendo la actividad catalítica de la DNAzima, donde la relación hemina:oligonucleótido 2:1 dio un 14% más de señal que la obtenida con la relación hemina:oligonucleótido 1:1, y fue la elegida para llevar a cabo las demás determinaciones. Esta diferencia, si bien no es muy grande, podría explicarse teniendo en cuenta que el sistema no es el mismo en la medición de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa y en los experimentos de la banda de Soret, donde no hay H_2O_2 y ni ABTS.

Como ya se vio en la sección 3.2.6, el H_2O_2 afecta a la hemina, con lo cual esto podría explicar que se requiera una mayor cantidad de hemina superior a la relación estequiométrica de esta con el oligonucleótido para poder obtener la máxima señal.

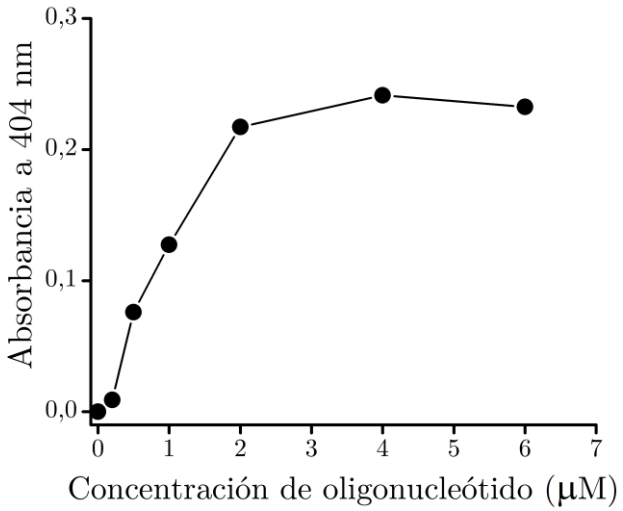


Figura 3.15- Absorbancia a 404 nm de hemina 4 µM con el agregado de distintas concentraciones de oligonucleótido $DZ5T_3$.

3.4. Medidas electroquímicas de la DNAzima peroxidasa en solución

En una primera instancia se repitieron los experimentos más relevantes llevados a cabo en la sección 3.2 realizando medidas electroquímicas para contrastarlos con los resultados obtenidos por espectroscopia UV-vis.

3.4.1. Elección del mediador redox

Al emplear un método electroquímico para determinar la actividad catalítica de la DNAzima en solución, el factor que puede impactar más significativamente en su sensibilidad es a *priori* la naturaleza del mediador rédox. Éste debe tener una cinética de transferencia electrónica adecuada tanto con la DNAzima como con el electrodo.

Para llevar a cabo la elección del mediador redox, se probaron hidroquinona, ABTS y TMB [28],[29].

La hidroquinona[29] es ampliamente utilizada como mediador redox en electroquímica, y particularmente en sistemas donde están involucradas enzimas peroxidasas. El TMB[30] y el ABTS, son preferentemente elegidos como cromóforos en dichos sistemas para llevar a cabo determinaciones ópticas de estás enzimas.

En la Figura 3.16 se muestran los voltagramas cíclicos obtenidos para estos mediadores redox, el ΔE_p y sus potenciales formales $E^{o\prime}$, obtenidos como $E^{0\prime} = (E_{pa} + E_{pc})/2$.

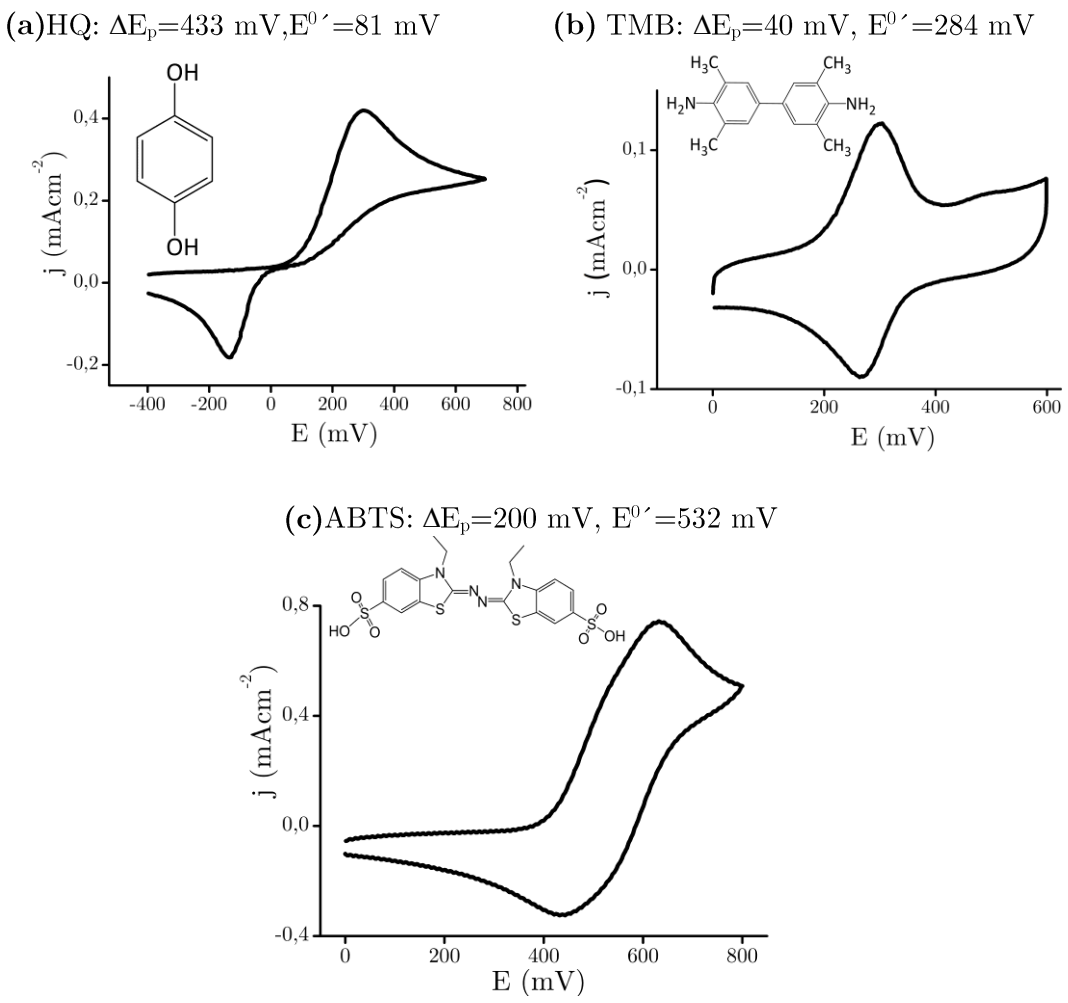


Figura 3.16- Voltametría cíclica, formula estructural, ΔEp y potenciales formales ($E^{o\prime}$) para HQ, (b) TMB y (c) ABTS, todos 3,4 mM en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM y Tritón X-100 0.05%.

Con los tres mediadores se realizaron cronoamperometrías de soluciones de hemina 2 µM y oligonucleótido $DZ5T_3$ 1 µM en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM y Tritón X-100 0.05%. En todos los casos se utilizó el mediador redox en una concentración de 3.4 mM. Una vez iniciada la reacción catalítica con H_2O_2 1 mM se esperó 3 minutos para realizar la medida electroquímica. Este tiempo permite acumular buena cantidad de mediador redox en estado oxidado y con ello obtener un valor de corriente más elevado.

En el caso de la hidroquinona, no se pudo detectar electroquímicamente su producto de oxidación. Se observó que, al preparar la hidroquinona en el buffer Tris-HCl (25 mM pH 8, KCl 20 mM y Tritón X-100 0.05%), éste tomaba una coloración amarilla similar a la benzoquinona. Por esta razón, se llegó a la conclusión de que la hidroquinona se oxidaba en presencia del buffer Tris. En general, la hidroquinona es utilizada en buffer fosfato.

En la sección 3.2.2 se llegó a la conclusión que, con el buffer Tris-HCl, se obtuvieron mejores resultados que con el buffer fosfato en las medidas de actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa. Por ello, se descartó a la hidroquinona como mediador redox para este sistema.

El producto de oxidación enzimática del TMB pudo detectarse fácilmente amperométricamente a 0.1 V (versus electrodo de referencia de Ag/AgCl)[31]. Pero no se obtuvieron diferencias entre la corriente medida para la hemina y la obtenida con la DNAzima (Figura 3.17-a).

El ABTS es oxidado primero al radical catión ($ABTS^{+\bullet}$) y luego al dicatión ($ABTS^{+2}$). Las dos especies son relativamente estables. El catión $ABTS^{+\bullet}$ pudo ser detectado electroquímicamente realizando medidas cronoamperométricas a 0 mV. Usando este mediador redox, se observó una diferencia de densidad de corriente entre la solución de DNAzima peroxidasa 1 µM de 5.5 $\mu A.cm^{-2}$ (Figura 3.17-b).

Como ya se mencionó, utilizando el ABTS como mediador redox se obtuvo la mayor diferencia de densidad de corriente límite (j), tomada a los 30 segundos, entre la DNAzima y la hemina (*background*). Por lo cual se

decidió seguir trabajando con el ABTS como mediador redox para las medidas electroquímicas.

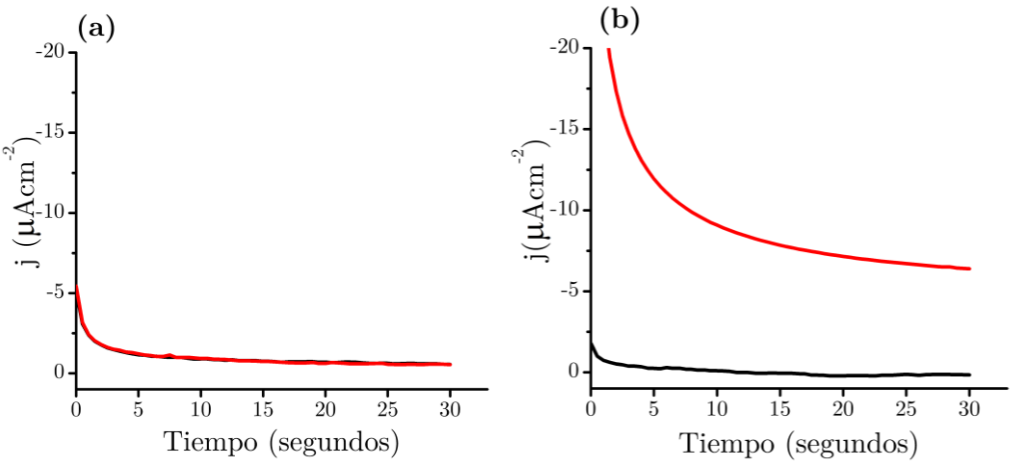


Figura 3.17- Densidad de corriente versus tiempo para DNAzima 1μM (rojo) y hemina 2 μM (negro) utilizando como mediador redox (a)TMB y (b) ATBS, ambos mediadores 3.4 mM en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM, Tritón X-100 0.05% y H_2O_2 1 mM.

3.4.2. Dependencia de la densidad de corriente con la concentración de DZ5T$_3$

Se realizaron medidas de corriente en función del tiempo para distintas concentraciones de DNAzima (oligonucleótido DZ5T$_3$-hemina) y hemina libre. Las medidas fueron realizadas cronoamperométricamente a los 3 minutos de iniciada la reacción con H_2O_2, utilizando ABTS como mediador redox. La medida cronoamperométrica se realizó a 0 mV y se midió durante 20 segundos.

En la Figura 3.18 se pueden observar los transitorios de corriente en función del tiempo para las distintas concentraciones de oligonucleótido DZ5T$_3$ que forman la DNAzima.

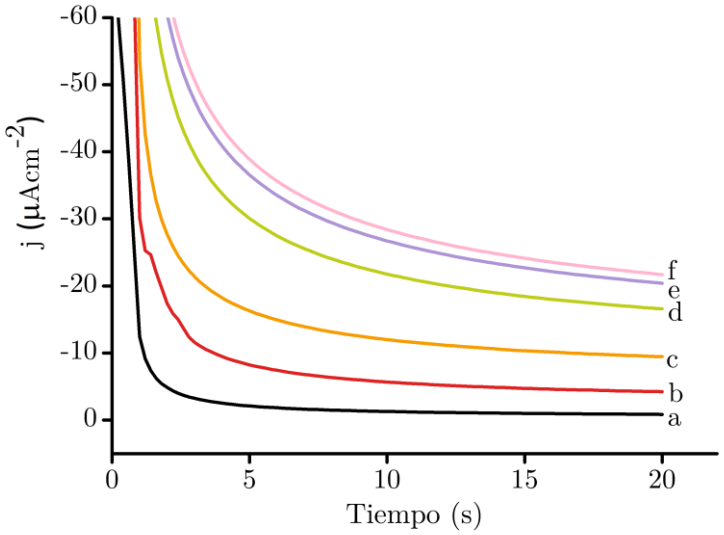


Figura 3.18– Densidad de corriente en función del tiempo para la DNAzima preparada con oligonucleótido $DZ5T_3$ de concentración: a) 0, b) 0.5, c) 1.0, d) 1.5, e) 2.0 y f) 2.5 μM, todos con hemina manteniendo una relación molar oligonucleótido:hemina=1:2 después de 3 minutos de iniciada la reacción con H_2O_2 0.5 mM.

Se tomaron los valores de corriente límite para cada punto a los 20 segundos y se graficó este valor en función de la concentración de oligonucleótido $DZ5T_3$ o hemina/2 (Figura 3.19).

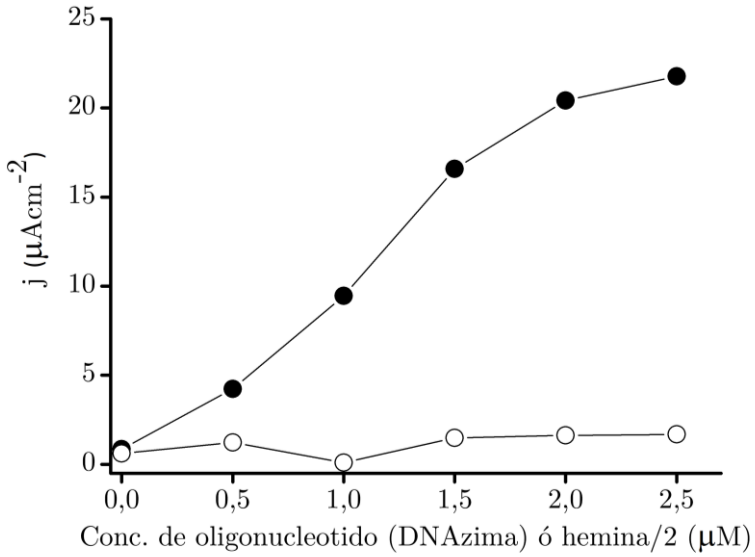


Figura 3.19– Densidad de corriente en función de la concentración de oligonucleótido en la DNAzima (•) o de hemina/ 2 (o), a los 20 segundos de medición cronoamperométrica.

Como se puede observar en el gráfico 3.19, la hemina no presentó variación de la densidad de corriente al aumentar su concentración. Para la DNAzima, sí se observa un aumento de la densidad de corriente al aumentar su concentración.

3.4.3. Estabilidad de la DNAzima peroxidasa a distintas temperaturas de almacenamiento

En esta sección se estudió como varia la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa con el tiempo, almacenada a distintas temperaturas. Se probaron tres temperaturas de almacenamiento: -20ºC (freezer), 8ºC (heladera) y 20ºC (temperatura ambiente controlada).

Estos datos son de suma importancia a lo hora de utilizar la DNAzima peroxidasa como marcador en un biosensor.

Para llevar a cabo las determinaciones, se preparó la DNAzima con oligonucleótido 1 µM y hemina libre 2 µM en buffer TKT 25 mM pH 8, según el protocoló descripto en la sección 2.3 del Capítulo Materiales y Métodos.

Las soluciones preparadas se dividieron en alícuotas en varios tubos para ser conservadas a las distintas temperaturas de almacenamiento a estudiar. En el momento de llevar a cabo las mediciones, se tomaron tres alícuotas (tubos) correspondientes a cada temperatura de almacenamiento para llevar a cabo las determinaciones por triplicado. Estas se dejaron reposar 5 minutos antes de medir para que lleguen a la temperatura ambiente del laboratorio.

Luego, se llevaron a cabo mediciones electroquímicas de la actividad catalítica de la DNAzima midiendo la corriente producida debido a la oxidación del ABTS 3.4 mM a los 3 minutos de iniciada la reacción catalítica con H_2O_2 1 mM.

Como se puede observar en la Figura 3.20, en todos los casos se observó una disminución de la actividad catalítica.

Para la DNAzima almacenada a -20ºC, se observó disminución de la actividad de aproximadamente un 25%, manteniéndose este valor por lo menos hasta los 50 días de almacenamiento.

Para la DNAzima almacenada a 8ºC, la disminución de la actividad catalítica fue entre una 10-15 %, observándose una gran dispersión de los replicados.

Finalmente, para la DNAzima almacenada a temperatura ambiente controlada a 20ºC, la disminución de la actividad catalítica va entre una 15-20 % observándose también una gran dispersión de los replicados.

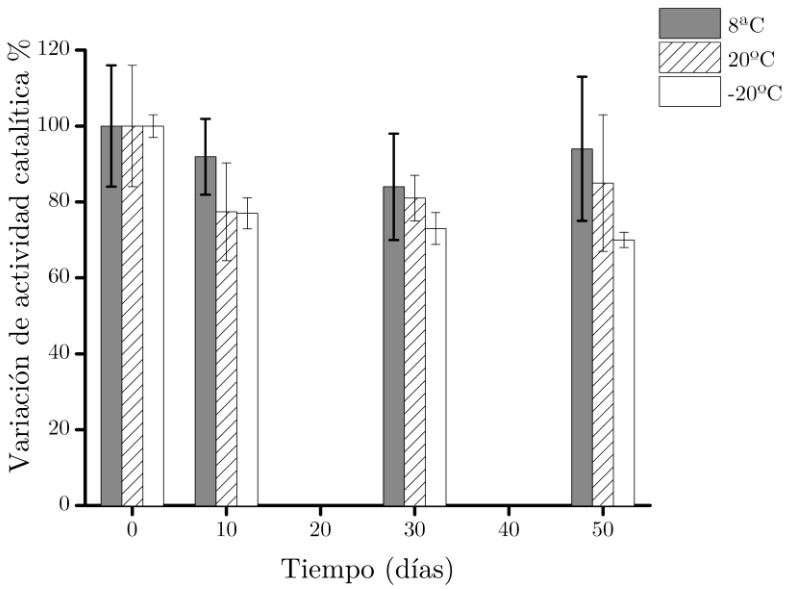


Figura 3.20– Variación de la actividad catalítica porcentual de la DNAzima peroxidasa en función del tiempo, almacenada a 8, 20 y -20 ºC.

3.4.4. Liofilización de la DNAzima peroxidasa

Se liofilizó la DNAzima peroxidasa preparada en buffer TKT 25 mM pH 8 y se evaluó si esta conservó sus propiedades catalíticas al hidratarla con agua miliQ.

Previo a la liofilización, es necesario preparar la muestra para ser procesada, de manera de que la liofilización no afecte sus propiedades fundamentales[32]. Para ello, se utilizan los crioprotectores, que son sustancias que utilizan para disminuir el daño en muestras biológicas, reemplazando el agua intramolecular y minimizando la formación de cristales. Existe una gran variedad de crioprotectores. Uno de ellos es el dimetilsulfóxido (DMSO) el cual esta presente en un 0.1% en la muestra a liofilizar, ya que la hemina esta preparada en DMSO.

Se preparó un volumen de DNAzima peroxidasa con oligonucleótido $DZ5T_3$ 1 µM y hemina 2 µM (ver sección 2.7.2 del Capítulo Materiales y Métodos). Se liofilizaron muestras por duplicado durante 20 horas a 50 mTorr, con una temperatura de condensador de -50ºC. Culminada la liofilización se reconstituyó la DNAzima con agua miliQ. Finalmente se llevaron a cabo medidas electroquímicas utilizando ABTS 3.4 mM como mediador redox e iniciando la reacción catalítica con H_2O_2 1 mM. Se midió por cronoamperometría a 0 mV durante 30 segundos los 3 minutos de iniciada la reacción catalítica con H_2O_2.

Las muestras liofilizadas arrojaron un valor de densidad de corriente (j) de un 20 % menor con respecto a las muestras sin tratar (Tabla 3.4).

Tabla 3.4– Valores de densidad de corriente (j) para la DNAzima peroxidasa sin liofilizar y liofilizada.

Muestra	**j(µAcm^{-2})**
Sin liofilizar	9.4 ±1.8
Liofilizado	7.6 ±1.0

3.5. Discusión

Se puede hacer una analogía entre la catálisis de la DNAzima peroxidasa y el ciclo catalítico de la enzima peroxidasa de rábano picante, ya que ambas comparten el mismo grupo prostético, la hemina[2],[19]. En las enzimas peroxidasas, la actividad catalítica está fuertemente determinada, como ya se mencionó anteriormente, por las características estructurales del entorno proteico alrededor del grupo prostético[33].

En la Figura 3.21 se muestra un esquema simplificado del ciclo catalítico de la enzima HRP, donde la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) implica la oxidación de dos electrones del grupo hemo de la enzima, que inicialmente tiene estado de oxidación Fe(III). Los compuestos intermediarios I y II, son estados oxidados de la peroxidasa.

El mecanismo catalítico se inicia con una molécula neutra de H_2O_2, que se une al hierro de la hemina. Esto es facilitado por la transferencia de uno de los hidrógenos del H_2O_2 al nitrógeno del grupo imidazol de un residuo de histidina, como se puede observar en la Figura 3.21 (b). Luego, a medida que el enlace O-O se escinde, lo cual es promovido por una arginina que polariza el enlace, el imidazol entrega el H al oxígeno, para dar un derivado oxo-hierro Fe^{IV}=O y una molécula de agua. De esta manera se obtiene el compuesto I.
El segundo electrón requerido para romper el enlace del H_2O_2 proviene de la misma porfirina de la HRP, produciendo un radical catión.

En un segundo paso, el radical catión es reducido al compuesto II. En el último paso, la enzima es reconvertida al estado nativo, aceptando un electrón y con la reducción de dos H^+, para dar agua.

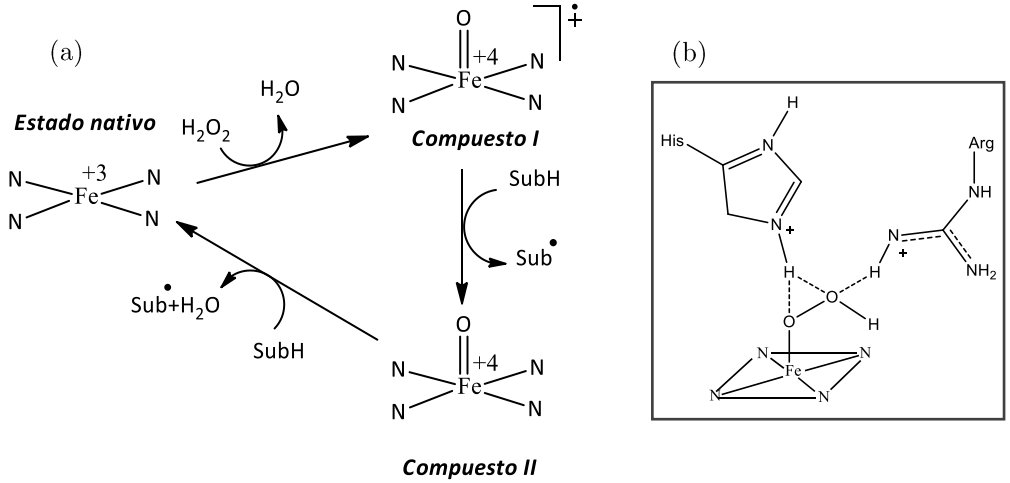


Figura 3.21–Mecanismo catalítico de la peroxidasa de rábano picante (a). Representación esquemática de la transferencia de uno de los hidrógenos del H_2O_2 a la histidina proximal y la polarización generada por la arginina (b). Adaptado de Handbook of Porphyrin Science[34]

El mecanismo catalítico de la DNAzima peroxidasa para la reducción del peróxido de hidrógeno es llevada a cabo por la hemina mediante la formación del intermediario compuesto I, similar al que se forma en el ciclo catalítico de las enzimas peroxidasas[5]. Como se describió anteriormente, en las enzimas como la HRP el entorno del grupo hemo es fundamental para la actividad catalítica. Según Travascio [5], [25], en el caso de la DNAzima peroxidasa, el entorno polar de la porfirina estaría dado por una cavidad negativa formada entre los cuartetos de guaninas. Además, postula que los buffers nitrogenados favorecen la ruptura del enlace O-O, produciendo la formación de un intermediario tipo el compuesto I de las enzimas como la HRP.

Si se parte de la suposición que el sitio catalítico de las DNAzimas es similar al de las enzimas peroxidasas, donde la formación del compuesto I es la clave de su actividad catalítica, podemos pensar que el buffer nitrogenado podría estar favoreciendo la ruptura del enlace O-O que conduce a la formación de dicho compuesto. El nitrógeno del buffer podría estar actuando

como ligando axial, favoreciendo la unión del peróxido de hidrógeno (ligando transitorio), y con ello, favoreciendo la actividad catalítica de la DNAzima, con respecto a cuando se utilizan oxo-buffers.

3.6. Conclusiones

En este capítulo, pudimos ver que una secuencia específica de ADN rica en guaninas, puede formar un complejo con la porfirina hemina y que bajo ciertas condiciones experimentales, este complejo presenta una robusta actividad catalítica de tipo peroxidasa.

Como ya se mencionó, la hemina presenta actividad catalítica por sí sola, pero al formar el complejo con el oligonucleótido rico en guaninas, su actividad catalítica aumentó por lo menos 10 veces, dependiendo de las condiciones de trabajo.

Se encontró que hay varios factores que influyen en la capacidad catalítica de la DNAzima peroxidasa formada por el oligonucleótido $DZ5T_3$, siendo los principales el pH, el tipo de buffer, el cosustrato reductor, la concentración de sales (cationes), la presencia de detergentes y la relación molar entre la hemina y el oligonucleótido. De todos ellos, la composición del buffer, que incluye a varios de ellos, parece ser lo más relevante.

En cuanto a la naturaleza química del buffer, se pudo comprobar que con el buffer Tris-HCl se obtuvieron mejores resultados que con el buffer fosfato en un rango de pH 7-9, tal como fue reportado por Sen y col.[4] para la DNAzima peroxidasa formada por el oligonucleótido PS2.M. Ellos observaron que, con los buffers nitrogenados (exceptuando el imidazol), se obtenía una mayor actividad catalítica que con los oxo-buffers, donde se producía una inhibición de la actividad catalítica[19],[35].

En cuanto a los iones potasio, fundamentales para la estabilidad del cuarteto de guaninas, no se pudo verificar que en ausencia de potasio el cuarteto de guaninas no se formara. En las soluciones preparadas en ausencia de potasio se observó actividad catalítica, lo que lleva a pensar que se encontraban trazas de potasio en las soluciones, probablemente provenientes del oligonucleótido liofilizado obtenido comercialmente. De todas maneras, se pudo observar un incremento de la actividad catalítica peroxidasa para concentraciones de KCl 1 mM o superiores, pero no observándose una variación en el rango de concentraciones estudiadas (1-100 mM). Teniendo en cuenta que se trabajó con una concentración de oligonucleótido de 1 µM, es evidente que el potasio se encontraba en exceso. Como se puede ver en la Figura 3.22 el potasio interacciona con los oxígenos de las guaninas en cada plano del cuarteto de guaninas.

Si consideramos que la DNAzima peroxidasa está formada por el apilamiento de tres cuartetos, podemos suponer que por cada DNAzima necesitamos 2 átomos de potasio. Con esto podemos asegurar que con 1 mM de potasio estamos frente a un exceso con respecto a la concentración de oligonucleótido que era 1 µM.

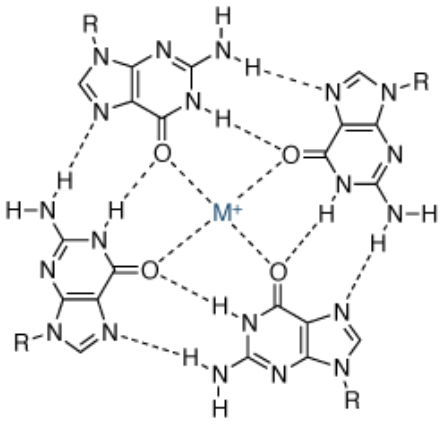


Figura 3.22- Estructura propuesta para la interacción del catión con los cuartetos de guaninas.

Se pudo observar el efecto inactivador del peróxido de hidrógeno en la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa, de la misma manera que se da en las enzimas peroxidasas como la HRP. Pero cabe señalar que en la DNAzima peroxidasa esta inhibición se dio a concentraciones de H_2O_2 por lo menos un orden de magnitud menor que con la enzima HRP. Esto se debe, probablemente al entorno que rodea el sitio catalítico. En el caso de la enzima HRP la hemina se encuentra protegida por el entorno proteico.

Se encontró que la relación molar oligonucleótido/hemina (1:2) permitió obtener la máxima actividad catalítica para DNAzima peroxidasa en las condiciones de trabajo, a pesar de que se pudo comprobar que la relación estequiométrica entre ellos es de (1:1). Esto puede deberse al efecto inhibitorio que genera el H_2O_2 mencionado previamente, llevando esto a requerir una mayor cantidad de hemina para obtener la máxima señal.

En cuanto a la formación del complejo oligonucleótido-hemina se estudió la dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato (H_2O_2) y se obtuvo una respuesta que se pudo modelar utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. Con lo cual se calcularon las constantes K_M y k_{cat}. Se encontró que, para la DNAzima formada por el complejo entre el oligonucleótido $DZ5T_3$ y la hemina, se obtuvo un valor de K_M menor al obtenido para la DNAzima formada con el oligonucleótido PS2.M y hemina. Esto nos indica que el oligonucleótido $DZ5T_3$ presenta mayor afinidad por la hemina que el oligonucleótido PS2.M. El valor de k_{cat}, que representa el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo, fue menor para la DNAzima estudiada en esta tesis que para la formada por el oligonucleótido PS2.M. Esto implica que, para una misma concentración de oligonucleótido, la velocidad máxima alcanzada por el

complejo PS2.M-hemina será mayor que para el complejo $DZ5T_3$-hemina, ya que $v_{max} = k_{cat}$ [E].

Se calculó la constante de disociación (K_D) del complejo oligonucleótido-hemina y se obtuvieron valores del mismo orden que los reportados en bibliografía para experimentos donde se utilizó el mismo oligonucleótido o la secuencia PS2.M.

Una vez que se estudiaron las condiciones óptimas de catálisis de la DNAzima peroxidasa estudiada en esta tesis, se llevaron a cabo medidas electroquímicas, obteniendo muy buenos resultados, comparables a los obtenidos con las medidas ópticas. Se probaron tres mediadores redox, y se encontró que con el ABTS (el mismo cosustrato reductor utilizado para las medidas ópticas) se obtuvieron los mejores resultados.

Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos de estabilidad de la DNAzima peroxidasa utilizada en esta tesis, almacenada a distintas temperaturas (-20, 8 y 20°C) en oscuridad durante 50 días. En todos los casos se observó una disminución de la actividad catalítica que fue desde un 10% a un 25% y estos valores no variaron significativamente hasta los 50 días de almacenamiento. La DNAzima también fue liofilizada obteniéndose una pérdida de un 20 % de su actividad al ser reconstituida por hidratación. A pesar de la pérdida de actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa con el almacenamiento a distintas temperaturas y la liofilización, estos resultados demuestran la gran estabilidad que esta presenta. Este tipo de experimentos son de gran utilidad si se requiere utilizar la DNAzima peroxidasa en biosensores. Cabe destacar que se debería hacer un estudio más sistemático y exhaustivo ya que no hay mucha información sobre el tema.

Finalmente, si comparamos la DNAzima peroxidasa con la enzima HRP se puede afirmar que esta última presenta una superioridad catalítica sobre la DNAzima peroxidasa, que se debe a millones de años de evolución frente a una molécula de ADN desarrollada *in vitro* en la década de 1990. A pesar de esto, los ácidos nucleicos presentan un gran potencial como moléculas catalíticas, ya que pueden llevarse a cabo modificaciones químicas para seguir mejorando su capacidad, presentan gran estabilidad y pueden sintetizarse acopladas a otras moléculas de ácidos nucleicos para sumar funcionalidades, como se desarrollará en los siguientes capítulos de esta tesis.

3.7 Referencias

[1] X. Zhou *et al.*, "Studies of the activity of peroxidase-like DNAzyme by modifying 3′- or 5′-end of aptamers," *Chem. Biodivers.*, vol. 9, no. 1, pp. 170–180, 2012.

[2] P. Travascio, a J. Bennet, D. Y. Wang, and D. Sen, "A ribozyme and a catalytic DNA with peroxidase activity: active sites versus cofactor-binding sites.," *Chem. Biol.*, vol. 6, no. 11, pp. 779–787, Nov. 1999.

[3] A. Chaubey and B. D. Malhotra, "Mediated biosensors," vol. 17, pp. 441–456, 2002.

[4] P. Travascio, Y. Li, and D. Sen, "DNA-enhanced complex peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin," *Chem. Biol.*, vol. 5, no. 9, pp. 505–517, 1998.

[5] P. Travascio, "DNA and RNA catalysts with peroxidase activity: an invetigation into structure and mechanism," *Biochemistry*, no. May, 2000.

[6] J. Kosman and B. Juskowiak, "Peroxidase-mimicking DNAzymes for

biosensing applications: a review.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 707, no. 1–2, pp. 7–17, Nov. 2011.

[7] Z. Zhou, Y. Du, and S. Dong, "DNA-Ag nanoclusters as fluorescence probe for turn-on aptamer sensor of small molecules.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 28, no. 1, pp. 33–7, Oct. 2011.

[8] D.-M. Kong, J. Wu, N. Wang, W. Yang, and H.-X. Shen, "Peroxidase activity-structure relationship of the intermolecular four-stranded G-quadruplex-hemin complexes and their application in Hg2+ ion detection.," *Talanta*, vol. 80, no. 2, pp. 459–65, Dec. 2009.

[9] P. Travascio, D. Sen, and A. J. Bennet, "DNA and RNA enzymes with peroxidase activity — An investigation into the mechanism of action," *Can. J. Chem.*, vol. 84, no. 4, pp. 613–619, 2006.

[10] W. Li *et al.*, "Insight into G-quadruplex-hemin DNAzyme/RNAzyme: Adjacent adenine as the intramolecular species for remarkable enhancement of enzymatic activity," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 15, pp. 7373–7384, 2016.

[11] D. Sen and W. Gilbert, "A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA," *Nature*, vol. 344, no. 6265. pp. 410–414, 1990.

[12] A. Córdoba, N. Alasino, M. Asteasuain, I. Magario, and M. L. Ferreira, "Mechanistic evaluation of hematin action as a horseradish peroxidase biomimetic on the 4-aminoantipyrine/phenol oxidation reaction," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 129, pp. 249–259, 2015.

[13] R. E. Childs and W. G. Bardsley, "The Steady-State Kinetics of Peroxidase with 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulphonic acid) as Chromogen," *Biochem. J.*, vol. 145, pp. 93–103, 1975.

[14] D. Jancura, M. Antalik, and Z. Jurasekova, "Catalytic effects of silver plasmonic nanoparticles on the redox reaction leading to ABTS + formation studied using UV-visible and Raman spectroscopy †," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, pp. 26562–26571, 2016.

[15] S. Scott, W. Chen, A. Bakac, and J. H. Espenson, "Spectroscopic Parameters, Electrode Potential, Acid Ionization Constants, and Alectron Exchange Rates of the ABTS Radicals and Ions," *J. Phys. Chem.*, vol. 97, pp. 6710–6714, 1993.

[16] E. Ferapontova and L. Gorton, "Effect of pH on direct electron transfer in the system gold electrode-recombinant horseradish peroxidase.," *Bioelectrochemistry*, vol. 55, no. 1–2, pp. 83–7, Jan. 2002.

[17] P. R. O. De Montellano, "Cat al ytic sites of hemoprotein peroxidases," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 32, pp. 89–107, 1992.

[18] G. I. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, A. Henriksen, and J. Hajdu, "The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution," vol. 417, no. May, pp. 463–468, 2002.

[19] T. Beck, M. , Gopinath E., Bruice, "Influence of nitrogen base ligation on the rate of reaction of [5,10,15,20-tetrakis(2,6-dimethyl-3-sulfonatophenyl)porphinato]iron(III) hydrate with tert-BuOOH in aqueous solution," *JACS*, vol. 115, pp. 21–29, 1993.

[20] P. R. Rich and M. Iwaki, "A Comparison of Catalytic Site Intermediates of Cytochrome c Oxidase and Peroxidases," vol. 72, no. 10, pp. 1047–1055, 2007.

[21] M. B. Arnao, M. Acosta, J. A. del Rio, and F. García-Cánovas,

"Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.*, vol. 1038, no. 1, pp. 85–89, 1990.

[22] S. Nakayama, J. Wang, and H. O. Sintim, "DNA-based peroxidation catalyst-what is the exact role of topology on catalysis and is there a special binding site for catalysis?," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 17, no. 20, pp. 5691–5698, 2011.

[23] H. N. Torres, H. Carminatti, and C. E. Cardini, "Estructura de porfirinas y metaloporfirinas," *Bioquímica Gen.*, pp. 265–272, 1983.

[24] X. Yang, C. Fang, H. Mei, T. Chang, Z. Cao, and D. Shangguan, "Characterization of G-quadruplex/hemin peroxidase: Substrate specificity and inactivation kinetics," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 17, no. 51, pp. 14475–14484, 2011.

[25] P. Travascio, P. K. Witting, a G. Mauk, and D. Sen, "The peroxidase activity of a hemin--DNA oligonucleotide complex: free radical damage to specific guanine bases of the DNA.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 7, pp. 1337–48, Feb. 2001.

[26] F. Violante-Mota, E. Tellechea, J. F. Moran, G. Sarath, and R. Arredondo-Peter, "Analysis of peroxidase activity of rice (Oryza sativa) recombinant hemoglobin 1: implications for in vivo function of hexacoordinate non-symbiotic hemoglobins in plants.," *Phytochemistry*, vol. 71, no. 1, pp. 21–6, Jan. 2010.

[27] Z. Ming *et al.*, "Studies of the Activity of Peroxidase-Like DNAzyme by Modifying 3 ' - or 5 ' -End of Aptamers," *Chem. Biodivers.*, vol. 9, pp. 170–180, 2012.

[28] S. J. Sadeghi, G. Gilardi, and a E. Cass, "Mediated electrochemistry

of peroxidases--effects of variations in protein and mediator structures.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 12, no. 12, pp. 1191–8, Dec. 1997.

[29] J. March, *Advanced Organic Chemistry*. Wiley-Interscience1, 1992.

[30] S. P. E. Ci, A. L. Is, and S. U. E. Pa, "Amperometric detection in TMB / HRP-based assays," pp. 297–302, 2005.

[31] E. Williams, M. I. Pividori, a. Merkoçi, R. J. Forster, and S. Alegret, "Rapid electrochemical genosensor assay using a streptavidin carbon-polymer biocomposite electrode," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, no. 3, pp. 165–175, Nov. 2003.

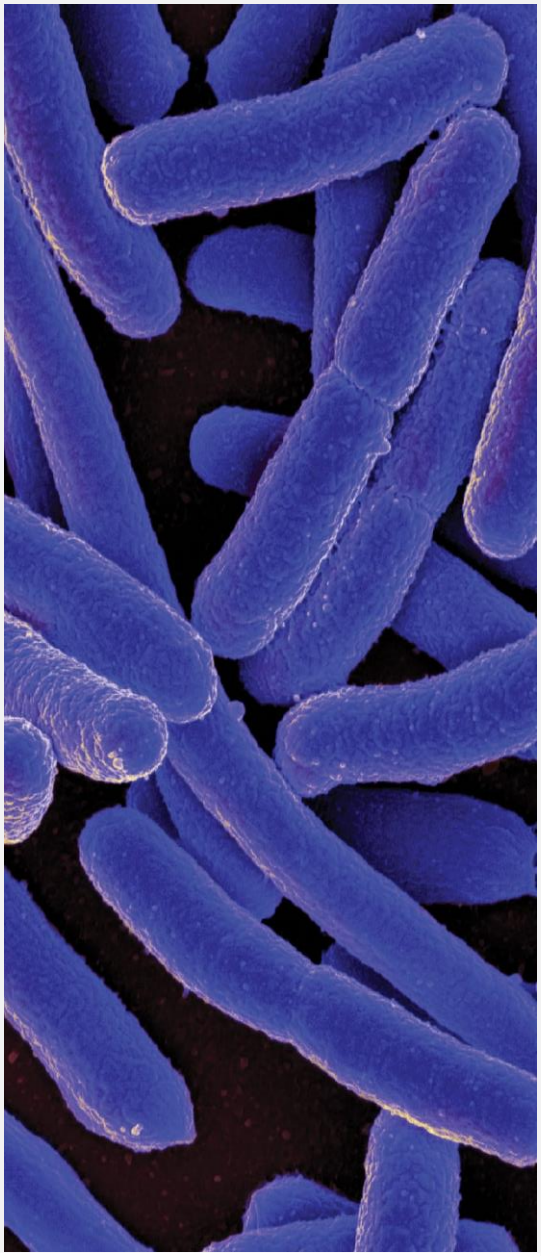
[32] L. Rey and J. May, *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, vol. 206, no. 3. 2006.

[33] L. Banci, "Structural properties of peroxidases.," *J. Biotechnol.*, vol. 53, no. 2–3, pp. 253–63, Mar. 1997.

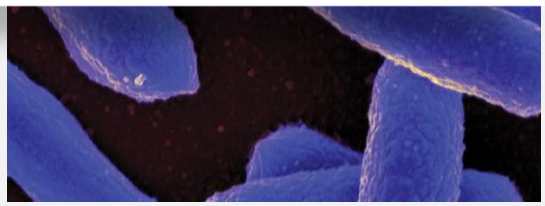
[34] Ferreira G.C., K. M. Kadish, S. K. M., and R. Guilard, Eds., *Handbook of Porphyrin Science*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2014.

[35] P. Jones and a Suggett, "The catalase-hydrogen peroxide system. A theoretical appraisal of the mechanism of catalase action.," *Biochem. J.*, vol. 110, pp. 621–629, 1968.

4



DNAzima como marcador:
Detección *E. coli* verotoxigénica productora de toxina Shiga 1



Contenidos del capítulo

4.1. Introducción 121
4.2. Diseño de la secuencia oligonucleotídica sensora 123
4.3. Resultados 127
4.3.1. Resultados preliminares 127
4.3.2. Efecto de la fuerza iónica 130
4.3.3. Respuesta obtenida con las diferentes construcciones 132
4.3.4. Relación hemina: oligonucleótido 135
4.3.5 Optimización del protocolo del ensayo 136
4.3.5.1. Tiempos de incubación 136
4.3.5.2. Puesta a punto del protocolo de ensayo 137
4.3.6. Curva de calibración 140
4.3.7. Cálculo del límite de detección 141
4.3.8. Ensayo de especificidad 142
4.4. Discusión 143
4.5 Conclusiones 144
4.6. Referencias 146

4.1. Introducción

El objetivo de este capítulo es el desarrollo de una estrategia modelo que permita determinar si un microorganismo patógeno está o no presente en una muestra, utilizando la DNAzima peroxidasa como marcador. Para alcanzar este objetivo, se diseñó un sistema del tipo "switch-on"[1], es decir, un sistema donde se genere una señal cuando el gen blanco a detectar esté presente en la muestra. Para ello se utilizó una secuencia específica correspondiente al ADN del patógeno a estudiar, y como marcador de dicho evento la DNAzima peroxidasa formada por el oligonucleótido $DZ5T_3$ y hemina.

La región específica y bien identificada sobre la cual se dirige el sensor es conocida como "gen diana" o "gen blanco" y tiene la particularidad de ser una región altamente conservada del gen que se quiere detectar.

Como sistema modelo y con el fin de desarrollar una aplicación de interés clínico, se utilizó una secuencia complementaria a un gen blanco de *Escherichia coli* verotoxigénica productora de toxina Shiga 1[2].

La bacteria *Escherichia coli* coloniza el tracto intestinal de los seres humanos y coexiste en una relación de mutuo beneficio a lo largo de la vida[3].

La mayoría de las cepas de *E.coli* son inofensivas. Sin embargo, existen cepas patogénicas que pueden causar graves enfermedades. Las cepas patogénicas se han dividido en dos grandes grupos, las cepas productoras de diarrea (DEC) y las cepas extraintestinales (ExPEC) que producen mayormente infección urinaria y meningitis en recién nacidos.

Dentro de las cepas productoras de diarrea se han identificado 6 patotipos: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica, verotoxigénica o productora de toxina Shiga (EHEC/VTEC/STEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) y *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC).

En el patotipo STEC o VTEC la patogénesis está dada por la presencia de la toxina Shiga (stx) también conocida como verotoxina (VT). Estas citotoxinas inhiben la síntesis de proteínas en las células. Las toxinas Shiga de *E. coli* se encuentran en dos formas típicas: stx1 y stx2.

Se han identificado más de 50 serotipos de *Escherichia coli* productores de la toxina Shiga en humanos, dentro de los cuales los serotipos más virulentos son O157:H7, O141:H4, O103:H2, O121:H19, O26:H1 entre otros[4]. Estos serotipos son agentes etiológicos de la diarrea sanguinolenta y el síndrome urémico hemolítico asociado a la diarrea (SUH). Los síntomas clínicos del SUH pueden incluir diarrea acuosa o hemorrágica, púrpura trombocitopénica trombótica, secuelas neurológicas y muerte[5].

La principal vía de transmisión de la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga es el consumo de agua o alimentos contaminados con la bacteria, por lo que esta cepa es considerada uno de los patógenos más relevantes en las infecciones transmitidas por alimentos, por ejemplo, a través de carnes,

leche, derivados no pasteurizados o agua de consumo. La transmisión persona a persona, por la ruta fecal-oral, es también muy importante especialmente en comunidades cerradas como guarderías, hogares de ancianos y escuelas.

La primera infección por STEC fue identificada por Riley y col. en 1982 cuya cepa correspondió al serotipo O157:H7. Desde entonces, este serotipo ha sido asociado a numerosos brotes en distintas regiones del mundo.

La detección de STEC a partir de muestras clínicas y de alimentos se puede realizar por aislamiento y caracterización de la cepa patógena mediante técnicas microbiológicos, detección de toxina Shiga libre, detección de anticuerpos en sangre y detección de genes stx1 y stx2 por PCR[6] o qPCR [7]. Existen inmunoensayos que permiten la detección directa de las toxinas stx1 y stx2 en muestras de heces o en cultivos fecales enriquecidos con caldo (Meridian Bioscience, TECRA Diagnostics Biokits) o detección de anticuerpos en suero (Chemtest). En cuanto a los métodos de diagnóstico rápidos de STEC, se han desarrollado ensayos de inmunocromatografía (*lateral flow immunoassay*) para detectar distintos serotipos a partir de muestras de heces enriquecidas en caldo (Meridian Bioscience, Coris Bioconcept), muestras alimenticias y ambientales (Milipore) o anticuerpos en suero (Chemstest).

4.2. Diseño de la secuencia oligonucleotídica sensora

Para el diseño de la secuencia oligonucleotídica de ADN se pensó en una construcción formada por al menos dos regiones. Una región complementaria al gen blanco a detectar (elemento de reconocimiento) y otra región compuesta por el oligonucleótido $DZ5T_3$, que forma la DNAzima peroxidasa cuando interacciona con hemina (elemento que genera la señal).

Esta secuencia sensora se diseñó con una estructura tipo horquilla o *stem-loop,* como se muestra en la Figura 4.1.

Esta estructura permitió ubicar la secuencia del oligonucleótido $DZ5T_3$ en la zona del tallo de la horquilla, es decir donde el ADN presente hibridación intramolecular y la DNAzima no pueda formarse. Por otro lado, la zona de la secuencia complementaria al gen blanco a detectar, que sería la secuencia de captura, se ubicó en el bucle de la horquilla.

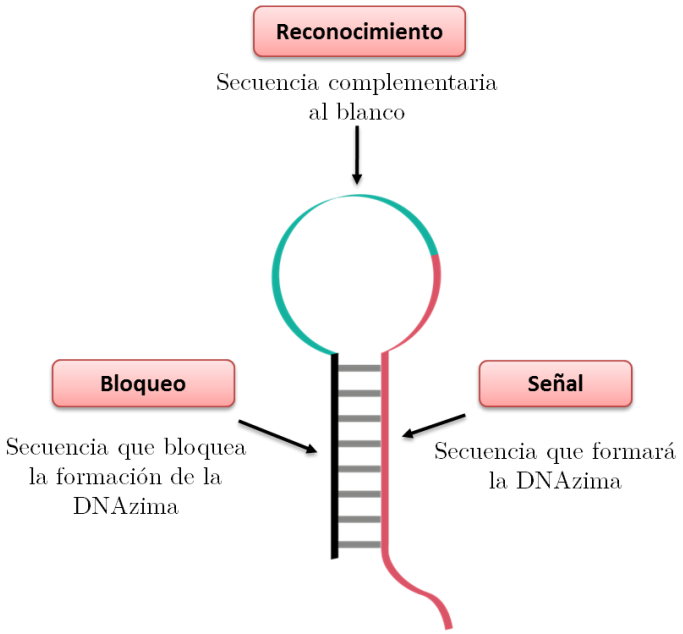


Figura 4.1- Representación esquemática de la horquilla, donde se indican las distintas regiones funcionales.

La secuencia blanco a detectar corresponde a una región específica de un gen de *E. coli* verotoxigénica productora de toxina Shiga I. Esta secuencia de 30-*mer* (5´-ACAACACTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCT-3´) fue obtenida de un trabajo publicado por Watterworth *et al.*[2]. En particular, corresponde a genes de toxina Shiga I subunidad A y subunidad B. En dicho trabajo desarrollaron un ensayo para detectar múltiples factores de virulencia

de *E. Coli* mediante PCR (stx1, stx2, st, it, eaf, IAL).

Otros autores[5],[6], también han reportado secuencias específicas para detectar estos factores de virulencia de *E. Coli.* En esta tesis se eligió trabajar con las secuencias obtenidas por Watterworth, porque éste realizó un estudio mucho más exahustivo de especificidad para los distintos factores de virulencia de *E. Coli.*

El principio de funcionamiento de este ensayo se muestra en la Figura 4.2, este se basa en que la horquilla se encuentre plegada y en presencia de la secuencia blanco se produzca un cambio de conformación al producirse la hibridación con dicha secuencia complementaria (blanco). Este evento de reconocimiento molecular produce que la horquilla se abra, dejando libre la secuencia del oligonucleótido $DZ5T_3$ para formar la DNAzima peroxidasa. De esta manera, la DNAzima peroxidasa puede generar una señal al oxidar un cosustrato reductor en presencia de peróxido de hidrógeno.

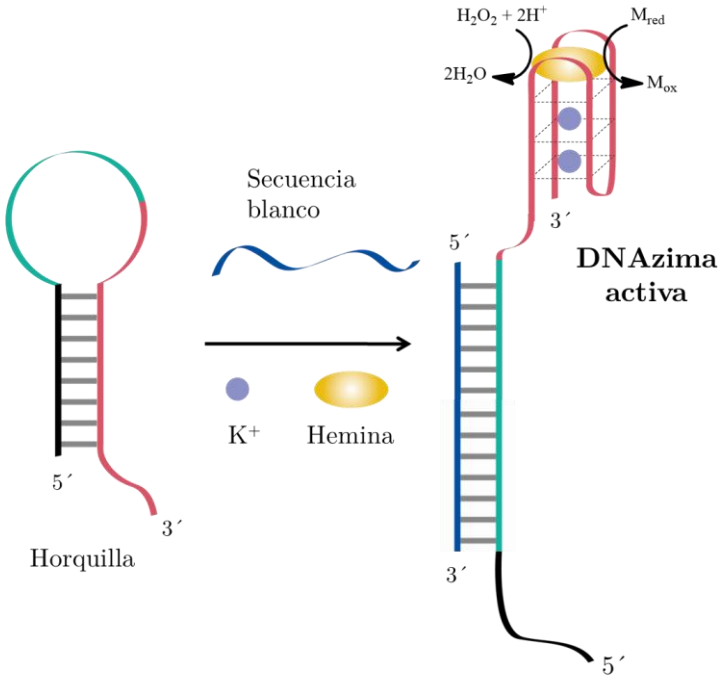


Figura 4.2- Representación esquemática del principio de funcionamiento: la horquilla se abre al encontrarse con su secuencia complementaria permitiendo que se forme la DNAzima peroxidasa (forma activa) y se genere una señal.

Se diseñaron cuatro construcciones oligonucleotídicas conformadas por la secuencia complementaria a la secuencia blanco (Watterworth *et al.)* y el oligonucleótido $DZ5T_3$ (que forma la DNAzima peroxidasa), un separador constituido por timinas (dTTP) y por último una secuencia bloqueante, que es complementaria a parte de la secuencia del oligonucleótido $DZ5T_3$ (para que la DNAzima peroxidasa se encuentre en estado inactivo).

En la tabla 4.1 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos propuestos como secuencia de captura, denominados H-I, H-II, H-III y H-IV (donde H significa horquilla).

Tabla 4.1-Secuencias de oligonucleótidos utilizados en las distintas construcciones.

Construcción	Secuencia (5´a 3´)
H-I	**TTTGGGTAGGGCGGGTTGGG**TTTTTTAGAACGCCCACTGA GATCATCCAGTGTTGTCCCAACCC
H-II	TACCCAAAAGAACGCCCACTGAGATCATCCAGTGTTGTT**TTTG GGTAGGGCGGGTTGGG**
H-III	CCCAACCCAGAACGCCCACTGAGATCATCCAGTGTTGTT**TTTG GGTAGGGCGGGTTGGG**
H-IV	CCGCCCTAAGAACGCCCACTGAGATCATCCAGTGTTGTT**TTTG GGTAGGGCGGGTTGGG**

Negrita: secuencia de $DZ5T_3$; Gris: secuencia complementaria al blanco; Subrayado: secuencia que bloquea el oligonucleótido $DZ5T_3$.

En todos los casos, la secuencia complementaria al blanco se ubicó en la región del bucle de la horquilla y la longitud del tallo fue de ocho bases. En las distintas construcciones oligonucleotídicas lo que se varió fue la zona bloqueada de la secuencia de la DNAzima y la ubicación de la secuencia $DZ5T_3$ en el extremo 5' o 3'.

La longitud del tallo se eligió teniendo en cuenta que la estabilidad de las horquillas de ácidos nucleicos depende principalmente del largo del tallo y de la naturaleza de las bases que éste contenga (los pares C-G son más fuertes

que los pares A-T, porque los primeros presentan tres interacciones puente hidrógeno y los segundos dos). Si la horquilla tuviera un tallo muy corto, por ejemplo, menor a cuatro bases, sería más inestable y tendería a abrirse. Por el contrario, si el tallo fuera muy extenso, mayor a 12 bases la horquilla sería muy estable y tendería a estar en forma cerrada.

En el caso de la construcción H-I, la secuencia $DZ5T_3$ se ubicó en el extremo 5' de la zona de captura y se bloquearon las últimas ocho bases de la secuencia $DZ5T_3$ del extremo 3'. En los demás casos la secuencia $DZ5T_3$ se ubicó en el extremo 3' de la secuencia de captura y se bloquearon distintas zonas de la secuencia $DZ5T_3$ pero siempre desde el extremo 5'.

Cabe destacar que se pueden encontrar otras zonas de complementariedad de bases en las secuencias oligonucleotídicas planteadas, además de la zona complementaria a la secuencia de la DNAzima peroxidasa (zona de bloqueo).

Una vez diseñadas las construcciones oligonucleotídicas se evaluó cual era la construcción más adecuada y se optimizó el protocolo. Finalmente se realizó una curva de calibración para la detección de la secuencia blanco de *E. coli* verotoxigénica, llevando a cabo medidas ópticas y electroquímicas.

4.3. Resultados

4.3.1. Resultados preliminares

En una primera instancia se determinó la señal de fondo generada por cada construcción en ausencia de secuencia blanco, midiendo la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa contenida en la horquilla. Esto nos permitió determinar si la DNAzima peroxidasa se encontraba o no bloqueada en ausencia de dicha secuencia blanco. Estas determinaciones se contrastaron con lo obtenido para cada construcción en presencia de cantidades equimolares

de secuencia blanco. Todas las determinaciones se llevaron a cabo en las condiciones experimentales optimizadas para medir la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa presentadas en el capítulo precedente.

Para llevar a cabo estos experimentos se prepararon soluciones stock 100 µM de las cuatro construcciones y de la secuencia blanco en buffer TE pH 8. Luego se llevaron a cabo diluciones en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM, Tritón X-100 0,05%, según lo descripto en el Capítulo de Materiales y Métodos. Se mezclaron alícuotas de cada construcción oligonucleotídica con la secuencia blanco a detectar, de manera que la concentración final de ambas sea 0.5 µM. La mezcla se incubo durante 90 minutos a 57ºC para permitir la hibridación de las secuencias complementarias. Finalmente se agregó la hemina (concentración final 1µM) y se incubó por otros 30 minutos a 25ºC, para permitir que se forme la DNAzima peroxidasa. Este procedimiento se llevó a cabo de la misma manera con las distintas construcciones oligonucleotídicas en ausencia de secuencia blanco.

La medición de la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa de cada construcción oligonucleotídica se llevó a cabo mediante la determinación de la absorbancia a 420 nm generada por el producto de oxidación del ABTS 3.4 mM a los tres minutos de iniciada la reacción catalítica con H_2O_2 1mM.

En la tabla 4.2 se muestra el cambio de absorbancia relativa (A_{rel}) porcentual dada por la siguiente ecuación:

$$A_{rel} = \frac{A_{H+sec.blanco} - A_H}{A_H} * 100 \qquad \text{ecuación 4.1}$$

Donde:-$A_{H+sec.blanco}$ es la absorbancia generada por la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa en la horquilla, en presencia de secuencia blanco.

-A_H es la absorbancia generada por la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa en la horquilla.

Como se puede observar en la tabla 4.2, la señal generada por la DNAzima (en la horquilla) en presencia de la secuencia blanco cambia respecto a la señal de fondo en el mejor de los casos en un 54%.

Tabla 4.2- Cambio de absorbancia relativa porcentual para las distintas construcciones oligonucleotídicas.

Construcción oligonucleotídica	A_{rel} (%)
H-I	1.1
H-II	9.5
H-III	25.0
H-IV	54.0

Con estos resultados no es posible pensar la horquilla como una secuencia sensora, ya que la DNAzima se forma en ausencia de secuencia blanco en un porcentaje elevado.

Los ácidos nucleicos con estructura tipo horquilla pueden encontrarse en dos estados: en forma de horquilla o *random coil* (conformación de un polímero donde los monómeros están orientados en forma aleatoria). En el caso particular de la horquilla diseñada en este trabajo, esta incluye la secuencia de la DNAzima peroxidasa, con lo cual hay varios equilibrios estructurales involucrados.

Por ello, todo indicaría que en las condiciones experimentales utilizadas el equilibrio entre el oligonucleótido plegado en una estructura tipo horquilla y *random coil* con formación de la DNAzima peroxidasa, no estaba desplazado hacia la izquierda como se esperaba (Figura 4.3).

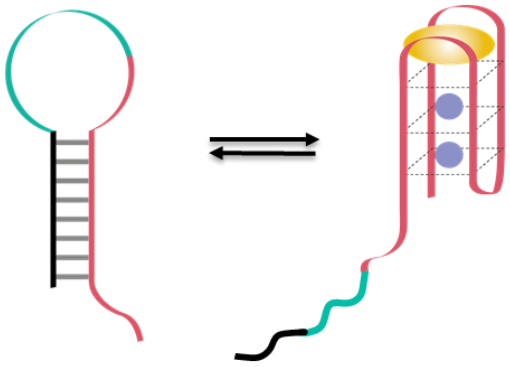


Figura 4.3- Esquema de equilibrio entre el oligonucleótido plegado en una estructura tipo horquilla y *random coil* con formación de la DNAzima peroxidasa.

Como ya se mencionó en la introducción de la tesis, los ácidos nucleicos están cargados negativamente a lo largo de todo su esqueleto ribosa-fosfato a pH>3. La presencia de iones metálicos como sodio y magnesio, permiten neutralizar las cargas negativas, reduciendo así la repulsión entre los fosfatos, de modo que las moléculas puedan plegarse en estructuras compactas[10] [11]. Con lo cual, la presencia de estas sales podría favorecer que, en ausencia de secuencia blanco, el equilibrio se desplace hacia la horquilla, minimizando la señal de fondo debida a la formación de la DNAzima peroxidasa en ausencia de secuencia blanco.

Por estos motivos se continuó estudiando el efecto de la fuerza iónica en el plegamiento de los oligonucleótidos utilizados.

4.3.2. Efecto de la fuerza iónica

Con el fin de estudiar el efecto de la fuerza iónica se llevaron a cabo mediciones de la actividad catalítica de la DNAzima en la horquilla aumentando la fuerza iónica con NaCl. Se prepararon soluciones de la construcción H-IV en ausencia y presencia de secuencia blanco, ambos

oligonucleótidos 0.5 µM en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8 y el KCl 20 mM, Tritón X-100 y diferentes concentraciones de NaCl. Se midió la absorbancia a 420 nm, utilizando ABTS 3.4 mM y H_2O_2 1 mM.

Se calculó nuevamente el cambio de absorbancia relativa porcentual para la construcción H-IV en presencia de cantidades equimolares de secuencia blanco, para las diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 4.3).

Tabla 4.3- Cambio de absorbancia relativa porcentual para la secuencia H-IV en función de la concentración de NaCl.

Concentración de NaCl (mM)	A_{rel} (%)
0	54
50	198
100	259
150	255
200	404

En la Figura 4.4 se puede observar cómo va aumentando esta relación de cambio, siendo la absorbancia obtenida por la muestra cada vez mayor respecto a la señal de fondo.

A pesar de que se pudo disminuir la señal generada por la DNAzima en ausencia de secuencia blanco, esta no fue nula. Para calcular el porcentaje de la DNAzima "activa" en la horquilla en ausencia de secuencia blanco, se comparó la absorbancia generada por esta última con la de la DNAzima peroxidasa libre.

Se prepararon soluciones de la construcción H-IV y la DNAzima peroxidasa ambas 0.5 µM (con hemina 1 µM) en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20mM, Tritón X-100 0.05%, NaCl 200 mM. Luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 420 nm debido al producto de oxidación del ABTS 3.4 mM en presencia de H_2O_2 1mM. En

cada caso se restó la absorbancia generada por la hemina en la misma concentración (1µM) usada para formar la DNAzima peroxidasa.

El porcentaje de DNAzima activa se determinó como:

$$\%\ DNAzima\ activa = \frac{A_{horquilla} - A_{hemina}}{A_{DNAzima} - A_{hemina}} * 100 \quad \text{ecuación 4.2}$$

Donde:
-$A_{horquilla}$ es la absorbancia de la DNAzima en la horquilla 0.5 µM.
-$A_{DNAzima}$ es la absorbancia de la DNAzima libre 0.5 µM.
-A_{hemina} es la absorbancia de la hemina 1 µM.

Se calculó que en estas condiciones aproximadamente un 13% de la horquilla se abre y forma la DNAzima peroxidasa en ausencia de secuencia blanco.

4.3.3. Respuesta obtenida con las diferentes construcciones

Se realizaron medidas de actividad catalítica para las cuatro construcciones oligonucleotídicas en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de secuencia blanco (ver Capítulo Materiales y Métodos).

En la Figura 4.4 se muestran las curvas obtenidas de absorbancia en función de la concentración de secuencia blanco para las distintas construcciones oligonucleotídicas.

Como se puede observar, las construcciones H-II, H-III y H-IV mostraron una respuesta aceptable, mientras que la construcción H-I tuvo una respuesta mucho menor. Esto último puede explicarse si tenemos en cuenta lo publicado por Zhou y col[12], descripto en la introducción de esta tesis. En dicho trabajo concluyen que las modificaciones en la secuencia de la DNAzima peroxidasa en el extremo 3' producen una disminución de la capacidad catalítica

comparada con casos en los que el extremo 3' se encontraba libre. En la construcción H-I el extremo 3' correspondiente a la secuencia que formará la DNAzima no se encuentra libre, sino que esta adosado a la secuencia de captura del blanco.

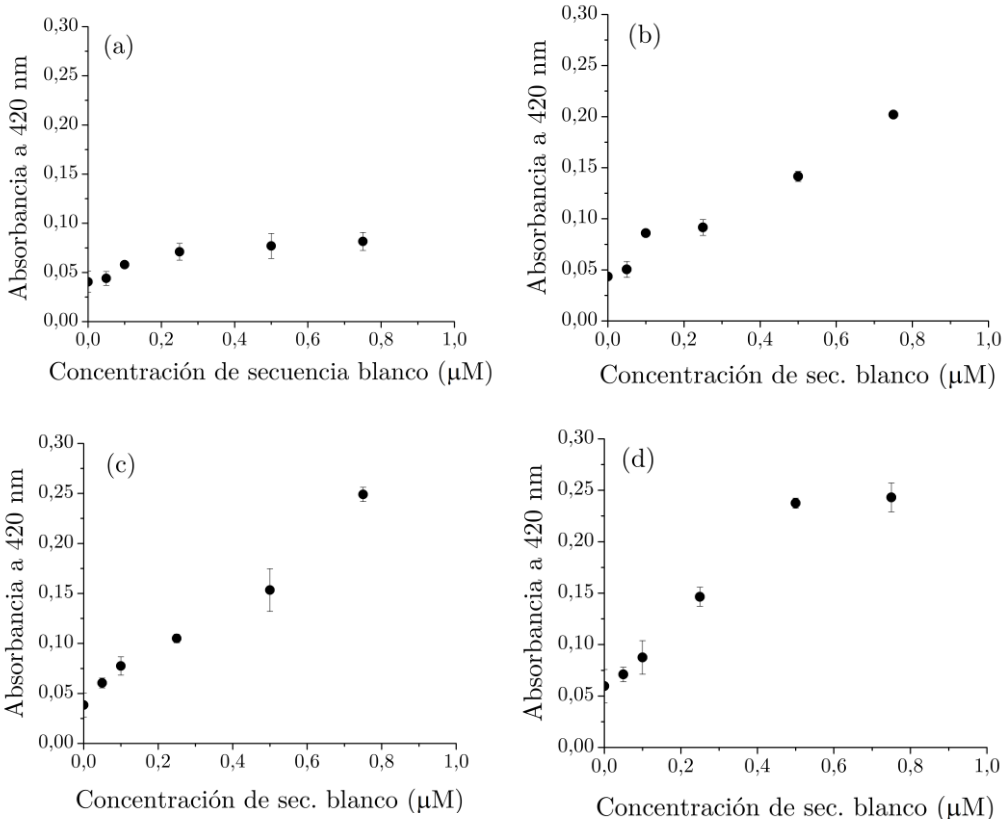


Figura 4.4- Curvas de absorbancia en función de la concentración de secuencia blanco para las construcciones H-I (a), H-II (b), H-III (c) y H-IV (d), todas en concentración 0.5 µM en buffer tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM, NaCl 200 mM y tritón X-100 0.05%, ABTS 3.4 mM e iniciando la reacción catalítica con H_2O_2 1 mM. Determinaciones por triplicado.

Se realizó un ajuste lineal de las curvas en el rango de concentración 0 a 0.5 µM de secuencia blanco. Con ello se calculó la sensibilidad (pendiente de la curva) y la señal de fondo (ordenada al origen) para cada construcción, como se muestra en la tabla 4.4. Se puede observar que la construcción H-IV

es la que presentó mayor sensibilidad, aunque también la mayor señal de fondo.

Tabla 4.4- Sensibilidad y señal de fondo obtenidas para las distintas construcciones oligonucleotídicas.

Construcción oligonucleotídica	Sensibilidad (μM^{-1})	Señal de fondo (µM)
H-I	0.07 ±0.02	0.045 ±0.004
H-II	0.19 ±0.03	0.049 ±0.008
H-III	0.22 ±0.02	0.048 ±0.005
H-IV	0.36 ±0.01	0.055 ±0.002

En la Figura 4.5 se compara la absorbancia debido a la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa en cada construcción en presencia de cantidades equimolares de secuencia blanco (0.5 µM). También se muestra el valor de absorbancia en ausencia de secuencia blanco en cada caso y el valor para la hemina libre. En este gráfico se puede ver también que la construcción H-IV es la más adecuada para llevar a cabo la detección de la secuencia blanco a pesar de tener la mayor señal de fondo.

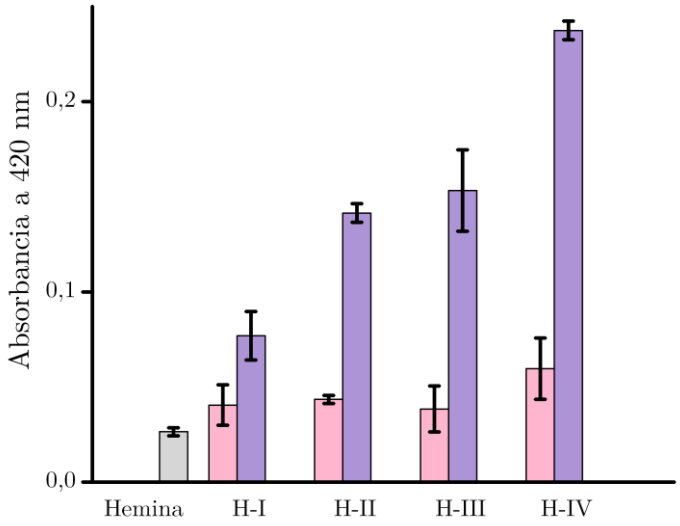


Figura 4.5- Comparación de valores de absorbancia a 420 nm para hemina 1µM (gris), construcciones H-I, H-II, H-III y H-IV 0.5 µM todos con hemina 1 µM, en ausencia (rosa) y presencia de 0.5 µM de secuencia blanco (violeta), en buffer Tris-HCl 25 mM pH8, KCl 20 mM, Tritón X-100 0.05%, NaCl 200 mM, ABTS 3.4 mM y H_2O_2 1 mM.

Con estos resultados se decidió seleccionar la construcción H-IV para la estrategia de detección de toxina Shiga I producida por *Escherichia coli* verotoxigénica.

4.3.4. Relación hemina: oligonucleótido

En el capítulo 3 se había estudiado la relación óptima hemina:oligonucleótido para obtener la mejor actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa. En esta sección se evaluó cual era esa relación para la DNAzima peroxidasa contenida en la construcción H-IV.

Para ello se llevaron a cabo determinaciones de actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa en la construcción H-IV preparada con diferentes relaciones molares hemina/oligonucleótido (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3), tanto en ausencia como en presencia de secuencia blanco (ver Capítulo Materiales y Métodos). En la Figura 4.6 se muestran los resultados obtenidos.

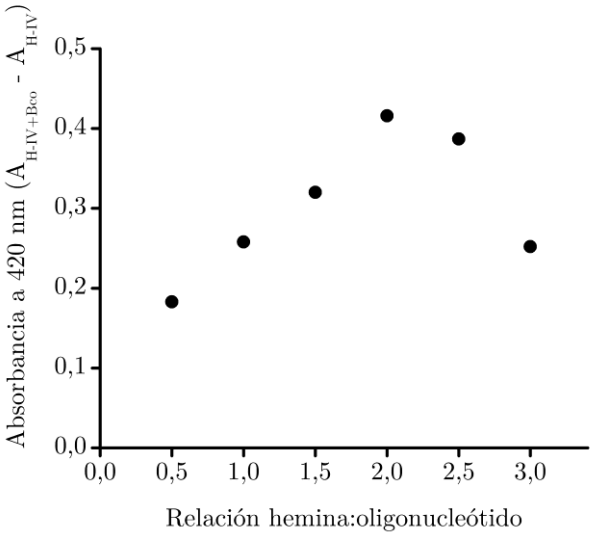


Figura 4.6- Absorbancia corregida a 420 nm a los 3 minutos de iniciada la reacción catalítica para la construcción H-IV 0.5 µM preparada con diferentes relaciones hemina/oligonucleótido, en presencia de 0.5 µM de secuencia blanco. Medidas en buffer Tris-HCl pH 8 25 mM, KCl 20 mM, Tritón X-100 0.05%, NaCl 200 mM, ABTS 3.4 mM y H_2O_2 1 mM.

Se puede observar que la relación óptima hemina/oligonucleótido fue de 2, coincidiendo este valor con lo obtenido en el capítulo III para el oligonucleótido $DZ5T_3$ que forma la DNAzima peroxidasa.

4.3.5 Optimización del protocolo del ensayo

Una vez seleccionada la construcción más adecuada para detectar la secuencia blanco en estudio, se llevó a cabo la optimización del ensayo.

En general, para el desarrollo de sensores se busca llegar a un protocolo de ensayo lo más simple posible, donde se minimice la preparación de la muestra, el tiempo de incubación, los pasos requeridos para el ensayo y finalmente todo lo involucrado en el proceso de medición.

En relación a esto, primero se probaron distintos tiempos de incubación de la horquilla con la secuencia blanco. En una segunda instancia, se evaluó la posibilidad de realizar el ensayo en un solo paso, para minimizar la manipulación.

4.3.5.1. Tiempos de incubación

Según datos bibliográficos, los tiempos de incubación reportados para permitir la hibridación entre dos hebras, como en este trabajo de estructuras tipo horquilla con una secuencia complementaria, van entre 60 y 90 minutos [13], [14]. Intentando minimizar estos tiempos se llevó a cabo el ensayo con diferentes tiempos de incubación.

Para ello, se llevó a cabo el procedimiento de la misma manera que en el punto 4.3.1 (excepto tiempos de incubación), utilizando la construcción H-IV y la secuencia blanco ambas en concentración 0,5 µM (hemina 1 µM). Se prepararon cuatro tubos por triplicado, los cuales fueron incubados a 57º C

durante 15, 30, 60 y 90 minutos, respectivamente. Luego de cada tiempo de incubación se agregó hemina y se dejó reaccionar durante 30 minutos para permitir que se forme la DNAzima peroxidasa (ver Capítulo Materiales y Métodos). Se llevaron a cabo medidas de absorbancia a 420 nm correspondientes al producto de oxidación del ABTS a los 3 minutos de iniciada la reacción con H_2O_2 1 mM.

Como se puede observar en la Figura 4.7, una incubación de 30 minutos fue suficiente para permitir la hibridación entre las dos secuencias utilizadas en este trabajo y no es necesario incubar por tiempos más largos. Con lo cual, se redujo el tiempo de incubación de la horquilla con la secuencia blanco de 90 a 30 minutos.

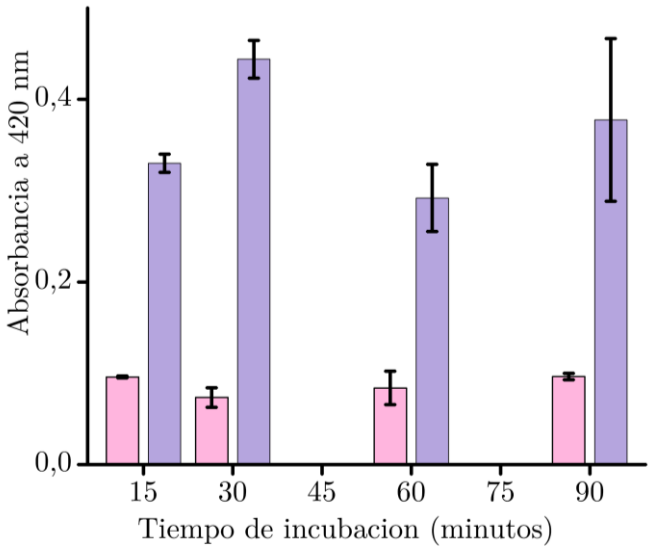


Figura 4.7-Absorbancia a 420 nm y 3 minutos de reacción para distintos tiempos de incubación de H-IV 0.5 µM, hemina 1 µM, en ausencia de secuencia blanco (rosa) y presencia de 1µM de secuencia blanco (violeta), en buffer Tris-HCl pH8 25 mM, KCl 20mM, Tritón X-100 0.05%, NaCl 200 mM, ABTS 3.4 mM y H_2O_2 1 mM.

4.3.5.2. Puesta a punto del protocolo de ensayo

En esta sección se estudió la posibilidad de llevar a cabo el ensayo en una menor cantidad de pasos con respecto a lo realizado en las secciones anteriores.

En bibliografía se encontraron trabajos en los que se detectan secuencias específicas de ADN con horquillas, realizando el ensayo en dos pasos[7],[9],[10]. En un primer paso se produce la hibridación de las secuencias de ADN complementarias y luego se agrega la hemina para permitir que se forme la DNAzima peroxidasa.

En la Figura 4.8 se muestran los diagramas de flujo para las cinco variantes del protocolo que se probaron. Todos los experimentos se llevaron a cabo con la construcción H-IV (ver Capítulo Materiales y Métodos).

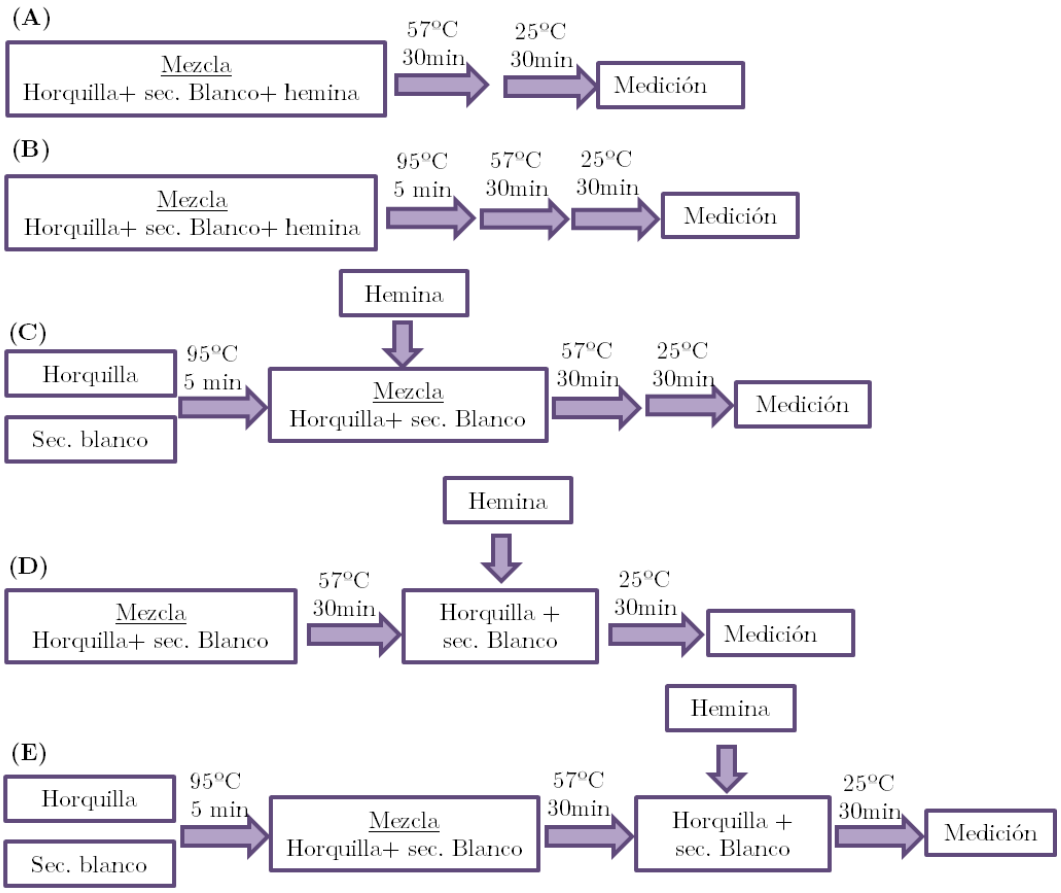


Figura 4.8- Diagrama de flujo del protocolo de ensayo llevado a cabo de diferentes maneras. Partiendo de la mezcla sin desnaturalizar(A) y con desnaturalización previa a 95ºC (B). Partiendo de las soluciones de horquilla previamente de desnaturalizadas y agregado de hemina (C), agregado de hemina a la mezcla horquilla/sec. blanco después de la hibridación sin desnaturalización (D) y con desnaturalización previa (E).

En la tabla 4.5 se muestra el cambio de absorbancia relativa porcentual (ecuación 4.1) obtenida con cada protocolo de ensayo.

Tabla 4.5- Cambio de absorbancia relativa porcentual

Ensayo	A_{rel} (%)
A	110
B	240
C	210
D	420
E	490

Con el ensayo en un paso, caso A (sin desnaturalización) y B (con desnaturalización), no se obtuvo una buena relación entre la absorbancia generada por la construcción H-IV en presencia de secuencia blanco con respecto a la señal de fondo. A su vez si comparamos entre estos se puede observar que la desnaturalización de la muestra a 95ºC mejoró la respuesta en el caso B con respecto al A.

En el caso C, se agregó la hemina después de la desnaturalización de los oligonucleótidos, pero nuevamente la señal de fondo fue elevada con respecto a la generada por la construcción H-IV en presencia de secuencia blanco.

Los mejores resultados se obtuvieron realizando el ensayo en varios pasos (caso D y E), agregando la hemina después de la incubación de la construcción H-IV con la secuencia blanco para permitir la hibridación de las secuencias complementarias. Nuevamente se observó un mejor resultado cuando los oligonucleótidos fueron desnaturalizados previamente a 95ºC como es el caso de ensayo E.

Estos resultados llevan a concluir que es necesario llevar a cabo el ensayo en varios pasos para no perder sensibilidad.

En la Figura 4.10 se muestra el esquema de realización del ensayo, con las distintas rampas de temperatura y tiempos de cada etapa optimizados. Se puede observar que el tiempo total del ensayo es de 80 minutos.

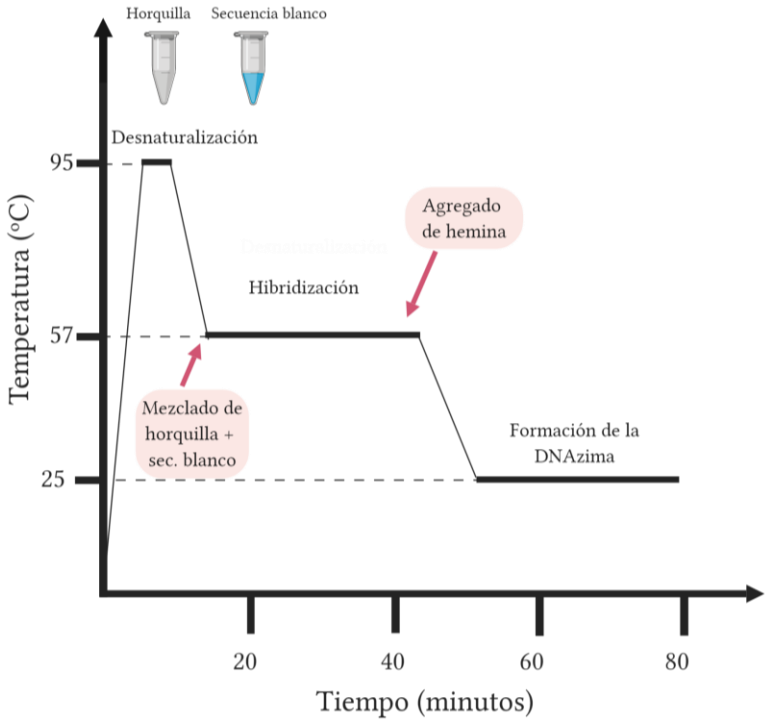


Figura 4.10- Esquema de realización del ensayo.

4.3.6. Curva de calibración

Se realizó la curva de calibración con la construcción H-IV 0.5 µM y hemina 1.0 µM en presencia de distintas concentraciones de secuencia blanco en el rango 0.025-1 µM. Estas determinaciones se llevaron a cabo óptica y electroquímicamente, utilizando ABTS como cosustrato reductor en ambos casos. Para las medidas con detección óptica se midió la absorbancia a 420 nm a los 3 minutos de iniciada la reacción catalítica con H_2O_2 1 mM. Para las medidas electroquímicas se realizó una medida amperométrica a 0 mV (ABTS) y se midió la densidad de corriente a los 3 minutos de iniciada la reacción catalítica con H_2O_2 1 mM debida a la reducción en el electrodo del

catión radical $ABTS^{+\bullet}$.

En la Figura 4.11 se muestran las curvas de calibrado obtenidas con ambos métodos de detección. Se puede observar en ambos casos una respuesta lineal a concentraciones bajas de secuencia blanco, mientras que a concentraciones mayores a 0.5 µM se observó una meseta.

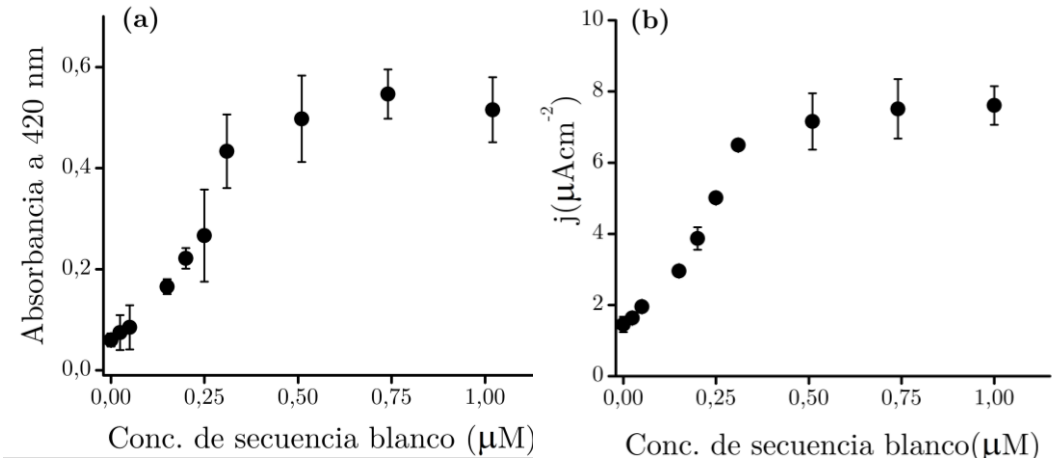


Figura 4.11- Respuesta en función de la concentración de secuencia blanco, para la detección óptica (a) y amperométrica (b). Para H-IV 0.5 µM (hemina 1 µM) y secuencia blanco 0.025-1 µM en buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM, NaCl 200 mM, Tritón X-100 0.05%, ABTS 3.4 mM y H_2O_2 1 mM. Determinaciones por triplicado.

4.3.7. Cálculo del límite de detección

Se calculó el límite de detección de las determinaciones, como tres veces la desviación estándar del blanco (construcción H-IV+ Hemina) dividido la pendiente de la curva de calibración (Figura 4.11), la cual fue tomada en la zona lineal[17]. Para la construcción H-IV, los límites de detección estimados óptica y electroquímicamente fueron 174 nM y 144 nM respectivamente.

Estos resultados muestran que el límite de detección obtenido tanto óptica como electroquímicamente son del mismo orden. Una ventaja del uso de los métodos electroquímicos para el desarrollo de biosensores, más allá de su alta sensibilidad, radica en que el equipamiento utilizado puede ser

miniaturizado. Sumado a esto la utilización de celdas electroquímicas con electrodos serigrafiados, descartables y de bajo costo, los cuales requieren unos pocos microlitros de solución resultan muy atractivos para el desarrollo de biosensores.

4.3.8. Ensayo de especificidad

Para determinar la especificidad de la construcción oligonucleotídica H-IV en la detección de la secuencia de *Escherichia coli* verotoxigénica toxina Shiga I (STX1), se realizaron experimentos utilizando secuencias correspondientes a otros patógenos de *E. coli*[2]: verotoxigénica toxina Shiga II (stx2), enterotoxigénica (gen de toxina termolábil, IT), enterotoxigénica (gen de toxina resistente al calor, ST), enteropatogénica (gen factor adherente, EAF), enteroinvasiva (plásmido invasivo, IAL). En la tabla 4.6 se describen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

El ensayo de especificidad se llevó a cabo mediante determinaciones electroquímicas, realizando la metodología de ensayo según lo descripto previamente (ver Capítulo Materiales y Métodos).

Tabla 4.6- Secuencias de patógenos de *E. coli* utilizadas

Patógenos	Secuencia (5' a 3')
Stx2	GCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAG
IT	AGCGGCGCAACATTTCAGGTCGAAGTCC
ST	ATCAGAAAATATGAACAACACATTTTACTGCTGTGAAC
EAF	CGGCGCTGGTGATTTCGGGTTCGTCA
IAL	CTTATGTTCAAGGAAATAATTGTTGGCCTCCTTCTC

En la Figura 4.12 se muestran los valores de densidad de corriente promedio obtenidos para la construcción H-IV en ausencia y en presencia de cada una de las secuencias de los distintos patógenos de *E. coli* estudiados.

Como se puede observar cuando la secuencia blanco fue la stx1 (estudiada en este trabajo) se obtuvo un buen valor de densidad de corriente, mientras que con las secuencias correspondientes a los otros patógenos este valor fue similar a la señal de fondo, es decir a la generada por la construcción H-IV en ausencia de secuencia blanco.

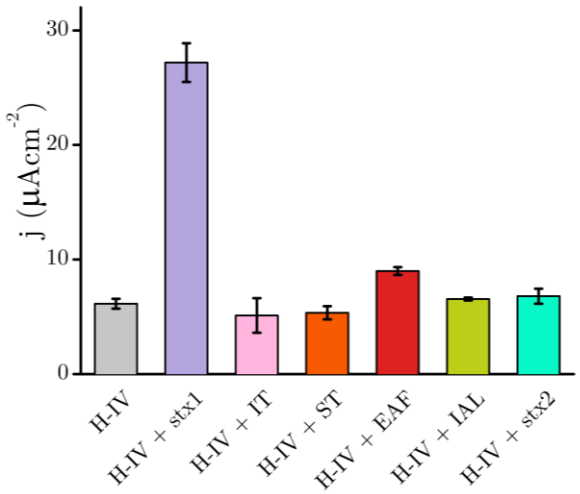


Figura 4.12- Densidad de corriente medida para las diferentes secuencias de *E. coli* patógenas 0.5 µM, empleando la construcción H-IV 0.5 µM (hemina 1 µM). En buffer Tris-HCl 25 mM pH 8, KCl 20 mM, NaCl 200 mM, Tritón X-100 0.05%, ABTS 3.4 mM y H_2O_2 1 mM. Determinaciones por triplicado.

4.4. Discusión

Para desarrollar un sensor de tipo "switch ON", es primordial que el sensor se "prenda" o genere una señal en presencia del analito a detectar y se encuentre "apagado" o no genere señal en ausencia de este. La señal generada por el sensor en ausencia de analito, lo que denominamos señal de fondo, es muy difícil de minimizar en las construcciones basadas en ácidos nucleicos. Esto se debe a que los ácidos nucleicos de cadena corta que forman estructuras tipo horquillas presentan un equilibrio entre la forma cerrada y su forma abierta *random coil*. El aumento de la fuerza iónica de la solución favorece a

la estructura cerrada, porque apantalla las cargas negativas de los grupos fosfato de su esqueleto (a pH>3), disminuyendo la repulsión de cargas.

Se logró, con el aumento de la fuerza iónica, desplazar el equilibrio hacia la forma cerrada de la horquilla, llevando esto a una disminución de la señal de fondo. De todas maneras, parte de la DNAzima peroxidasa se activa en ausencia de secuencia blanco. Es decir, un porcentaje de las horquillas se abrieron, permitiendo que se forme la DNAzima peroxidasa, aunque la secuencia blanco a detectar no esté presente.

4.5 Conclusiones

Se diseñó una secuencia oligonucleotídica capaz de detectar una hebra de ADN correspondiente a una sección de un gen específico de toxina Shiga I producida por *Escherichia coli* verotoxigénica.

Se diseñaron cuatro construcciones oligonucleotídicas como secuencia sensora, de las cuales se seleccionó la construcción H-IV como la óptima para llevar a cabo el ensayo. Cabe destacar que a futuro se podrían llevar a cabo más modificaciones en la secuencia planteada a fin de mejorar la detección de la secuencia blanco.

Se lograron poner a punto las condiciones de ensayo para obtener la máxima actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa en la construcción oligonucleotídica. Se logró bajar el tiempo de incubación entre la secuencia sensora y la secuencia blanco, pero no se pudieron minimizar los pasos del ensayo.

Se estimaron los límites de detección tanto óptica como electroquímicamente (amperométricamente), obteniendo el mismo orden de magnitud para ambos 174 y 144 nM, respectivamente. A fin de comparar estos

resultados con los previamente publicados, se encontró un solo trabajo donde todo el sistema está en solución, en el cual detectaban células Hela, obteniéndose un límite de detección de 500 células[15]. Lo planteado en esta tesis de trabajar en solución no es lo más común, y si hay varios trabajos publicados con sistemas similares en los que se utilizan las secuencias oligonucleotídicas "sensoras" inmovilizadas sobre superficies. Se han reportado valores de límite de detección para la detección de secuencias de ADN utilizando oligonucleótidos inmovilizados sobre electrodos de oro de 0.6 nM (detección electroquímica) [17] y 1 nM[19] (detección por quimioluminiscencia). Por un lado, se puede ver que los valores de límites detección son un orden de magnitud menor si los comparamos con el valor obtenido en solución en esta tesis. Por otro lado, la estrategia de utilizar oligonucleótidos inmovilizados sobre superficies, que si bien está estudiada y se han reportado una gran variedad de metodologías de inmovilización (unión covalente, avidina-biotina, quimisorción, etc), no resulta sencilla de implementar. Esto se debe a varias razones, el ADN está cargado negativamente a lo largo de todo su esqueleto ribosa-fosfato a pH>3 y esto puede generar interacciones inespecíficas con la superficie pudiendo afectar el plegamiento del ADN. Además, para llevar a cabo la inmovilización se requiere de secuencias de ADN modificadas con grupos funcionales, lo que aumenta considerablemente su costo. De todas maneras, resulta atractivo para trabajos futuros.

En cuanto a la especificidad, la construcción oligonucleotídica H-IV mostro ser específica para la secuencia de *Escherichia coli* verotoxigénica toxina Shiga I (stx1) y no detectó las secuencias blanco correspondientes a los otros patógenos de *Escherichia coli* estudiadas (Stx2, IT, ST, EAF e IAL).

Los sensores electroquímicos atraen la atención debido a que son de simple manejo, presentan alta sensibilidad y además son compatibles con técnicas de microfabricación. La instrumentación utilizada para realizar las medidas electroquímicas puede miniaturizarse, hacerse compacta, portátil y de bajo costo[20].

4.6. Referencias

[1] K. Leung *et al.*, "A highly sensitive G-quadruplex-based luminescent switch-on probe for the detection of polymerase 3 0 – 5 0 proofreading activity," *METHODS*, 2013.

[2] L. Watterworth, E. Topp, H. Schraft, and K. T. Leung, "Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic Escherichia coli.," *J. Microbiol. Methods*, vol. 60, no. 1, pp. 93–105, Jan. 2005.

[3] M. J. Hill, B. S. Drasar, C. Public, C. Hospital, and T. N. Colonic, "The normal colonic bacterial flora," no. table I, pp. 318–323, 1972.

[4] D. L. Woodward, C. G. Clark, R. A. Caldeira, R. Ahmed, and F. G. Rodgers, "Verotoxigenic Escherichia coli (VTEC): A major public health threat in Canada.," *Can. J. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 5, pp. 321–330, 2002.

[5] D. Gómez *et al.*, "Detección de Escherichia coli productor de toxina shiga (STEC) en alimentos," *Instituto nacional de Epidemiología*. .

[6] A. W. Paton and J. C. Paton, "Direct detection and characterization of shiga toxigenic escherichia coli by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eae, ehxA and saa," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, no. 1, pp. 271–274, 2002.

[7] E. Barbau-Piednoir, K. Dierick, N. Botteldoorn, S. Denayer, S. De Keersmaecker, and N. H. Roosens, "Detection and discrimination in food samples of five E. coli pathotypes using a Combinatory SYBR®Green qPCR screening system," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018.

[8] V. Chizhikov, A. Rasooly, K. Chumakov, and D. A. N. D. Levy, "Microarray Analysis of Microbial Virulence Factors," vol. 67, no. 7, pp. 3258–3263, 2001.

[9] U. Reischl *et al.*, "Real-Time Fluorescence PCR Assays for Detection and Characterization of Shiga Toxin , Intimin , and Enterohemolysin

Genes from Shiga Toxin-Producing Escherichia coli," vol. 40, no. 7, pp. 2555–2565, 2002.

[10] Z. J. Tan and S. J. Chen, "Nucleic acid helix stability: Effects of salt concentration, cation valence and size, and chain length," *Biophys. J.*, vol. 90, no. 4, pp. 1175–1190, 2006.

[11] D. F. Patterson and C. T. Coburn, "Optimization of a PS2.M-based catalytical beacon in preparation for use as a device to explore mRNA secondary structures," no. July, 2010.

[12] Z. Ming *et al.*, "Studies of the Activity of Peroxidase-Like DNAzyme by Modifying 3 ' - or 5 ' -End of Aptamers," *Chem. Biodivers.*, vol. 9, pp. 170–180, 2012.

[13] R. Freeman, X. Liu, and I. Willner, "Chemiluminescent and chemiluminescence resonance energy transfer (CRET) detection of DNA, metal ions, and aptamer-substrate complexes using hemin/G-quadruplexes and CdSe/ZnS quantum dots.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 30, pp. 11597–604, Aug. 2011.

[14] Q. Guo, Y. Bao, X. Yang, K. Wang, Q. Wang, and Y. Tan, "Amplified electrochemical DNA sensor using peroxidase-like DNAzyme," *Talanta*, vol. 83, no. 2, pp. 500–504, 2010.

[15] I. Willner, B. Shlyahovsky, M. Zayats, and B. Willner, "DNAzymes for sensing, nanobiotechnology and logic gate applications.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, no. 6, pp. 1153–65, Jun. 2008.

[16] S. Bi, M. Chen, X. Q. Jia, and Y. Dong, "A hot-spot-active magnetic graphene oxide substrate for microRNA detection based on cascaded chemiluminescence resonance energy transfer," *Nanoscale*, vol. 7, no. 8, pp. 3745–3753, 2015.

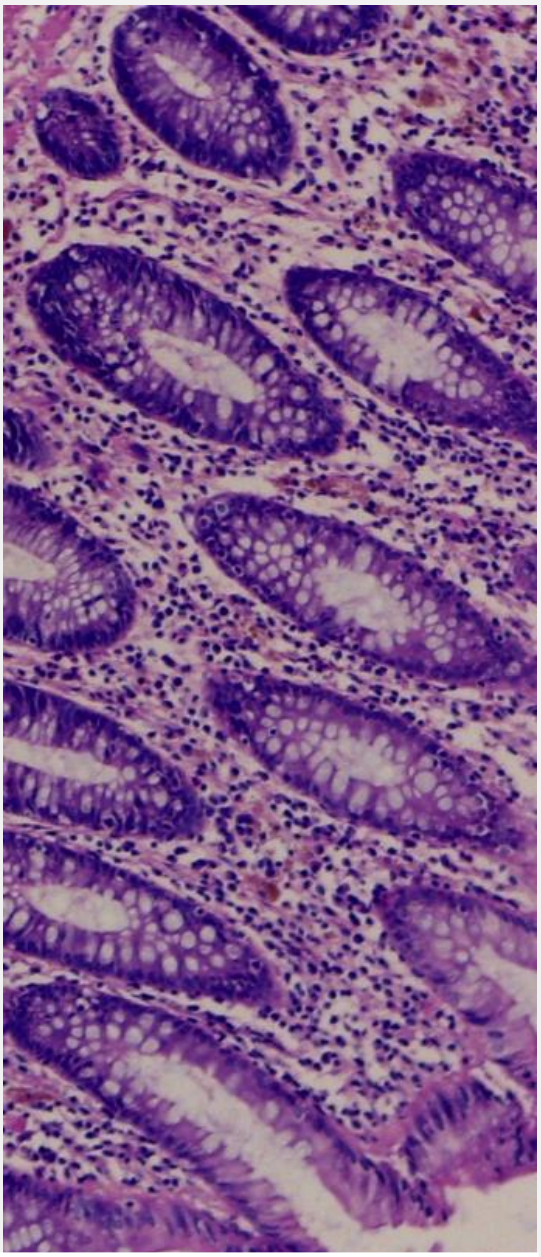
[17] A. Shrivastava, V. Gupta, and R. Article, "Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods," *Chronicles Young Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 21–25, 2011.

[18] Q. Guo, Y. Bao, X. Yang, K. Wang, Q. Wang, and Y. Tan, "Amplified electrochemical DNA sensor using peroxidase-like DNAzyme.," *Talanta*, vol. 83, no. 2, pp. 500–4, Dec. 2010.

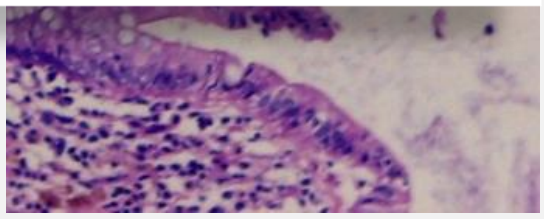
[19] V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, A. Dishon, M. Kotler, and I. Willner, "Amplified Chemiluminescence Surface Detection of DNA and Telomerase Activity Using Catalytic Nucleic Acid Labels," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 7, pp. 2152–2156, 2004.

[20] L. Lv, Z. Guo, J. Wang, and E. Wang, "G-Quadruplex as Signal Transducer for Biorecognition Events," pp. 2076–2095, 2012.

5



DNAzima como marcador:
Detección de biomarcadores en preparados histológicos



Contenidos del capítulo

5.1. Introducción 151
5.2. Proceso histológico 153
5.2.1. Procesamiento del tejido 153
5.2.2. Acondicionamiento de la muestra para el marcado con anticuerpos o aptámeros 154
5.2.3. Marcado con anticuerpos o aptámero-DNAzima 157
5.2.4. Revelado 159
5.2.5. Preparado del tejido para su conservación y observación en microscopio 160
5.3. Detección de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) . 161
5.3.1. Aptámero contra PTEN 163
5.3.2. Detección de PTEN en muestras de endometrio 166
5.3.3. Detección de PTEN en muestras de colon 169
5.4. Discusión 173
5.5. Conclusiones 174
5.6. Referencias 175

5.1. Introducción

En este capítulo se propone el uso de la DNAzima peroxidasa acoplada a aptámeros, para la detección de biomarcadores en secciones histológicas.

Para llevar a cabo este objetivo se diseñó una única secuencia de ADN compuesta por dos dominios como se muestra en la Figura 5.1. Un dominio de esta secuencia de ADN está formado por un aptámero que reconoce un biomarcador específico (sitio de reconocimiento) y el otro dominio está conformado por la DNAzima peroxidasa (sitio de amplificación de la señal).

En la sección histológica el aptámero interacciona específicamente con el biomarcador presente en el tejido, mientras que la DNAzima peroxidasa genera una marca en el lugar, debido a la oxidación de un compuesto redox (cromóforo cuyo producto de oxidación, en este caso, es un compuesto insoluble) en presencia de agua oxigenada (sustrato catalítico de la DNAzima peroxidasa). De esta manera, la marca obtenida en el tejido puede ser observada con un microscopio óptico, permitiendo no solo la identificación de biomarcadores de interés, sino también su localización histológica y correlación con parámetros morfológicos.

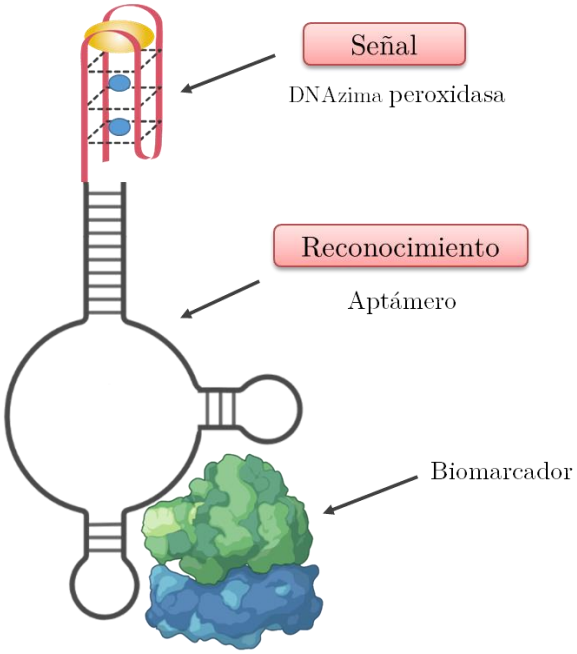


Figura 5.1- Representación esquemática de la construcción compuesta por un aptámero y la DNAzima peroxidasa, donde se muestra el dominio de reconocimiento, el dominio de amplificación de la señal y la interacción del aptámero con el biomarcador.

En esta tesis, se trabajó en la detección de la proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3 fosfatasa (PTEN) en diferentes tejidos humanos.

PTEN es un supresor tumoral, es decir mantiene bajo control la división celular. Cuando el gen que produce PTEN se pierde o muta, esta proteína no se produce, lo que lleva a una división celular descontrolada contribuyendo al desarrollo de cáncer[1].

Para llevar a cabo las marcaciones histológicas se contó con muestras de tejidos humanos correspondientes a biopsias de pacientes sanos y con diferentes patologías, como adenocarcinoma de colon o adenocarcinoma de endometrio. Las muestras biológicas utilizadas en esta tesis son anonimizadas y fueron provistas por el Dr. Martín Radrizzani de la Universidad Nacional de San Martín.

5.2. Proceso histológico

Para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos es necesario llevar a cabo una serie de operaciones de preparación de la muestra denominado proceso histológico. Éste permite observar al microscopio óptico con mayor contraste un tejido marcado o teñido (en forma general o específica), que en caso contrario sería transparente.

El proceso histológico está comprendido por varios pasos que se detallan a continuación[2]:

1) Obtención del tejido.
2) Fijación.
3) Lavados.
4) Deshidratación.
5) Aclarado.
6) Infiltración.
7) Inclusión.
8) Corte con micrótomo.
9) Colocación en portaobjetos.
10) Desparafinado.
11) Hidratación.
12) Tinción o marca/revelado.
13) Deshidratación.
14) Montado.
15) Observación en el microscopio.

Para llevar a cabo las marcaciones histológicas con la construcción aptámero-DNAzima, se partió de muestras de tejidos incluidos en parafina ya fijados en portaobjetos. Es decir, los pasos 1 a 9 fueron realizados previamente y provistos por el Dr. Radrizzani.

5.2.1. Procesamiento del tejido

El proceso histológico comienza con la obtención del tejido que se quiere estudiar. Este tejido se trata con una solución fijadora, que en general es formaldehido al 4%. La fijación tiene como objetivo mantener las estructuras celulares y moleculares inalteradas durante el procesamiento posterior. Luego se realizan una serie de lavados con agua destilada para eliminar el exceso de fijador.

El tejido se deshidrata con soluciones de etanol de distintas concentraciones hasta llegar a etanol absoluto (70%, 90% y 100%).

El aclarado se realiza con solventes y tiene la función de eliminar toda el agua del tejido para luego poder ser incluido en parafina. En general se utiliza xileno porque la parafina es soluble en este solvente.

La infiltración consiste en sumergir el tejido en baños de parafina en estado líquido para que el tejido quede embebido en ella. Las parafinas utilizadas en histología presentan puntos de fusión cercanos a los 60^0C.

La inclusión del tejido en parafina (medio de inclusión) tiene como finalidad proporcionar al tejido un soporte sólido para poder obtener secciones muy delgadas de la muestra.

El corte en finas láminas se realiza para observar la muestra en el microscopio, y además para obtener la mayor cantidad de secciones del tejido y de esta manera llevar a cabo distintas coloraciones y/o marcaciones. Estos cortes se realizan con micrótomo y las láminas obtenidas tienen espesores que van desde nanómetros a decenas de micrómetros, dependiendo del equipamiento utilizado.

Una vez obtenidos los cortes, estos son fijados en portaobjetos. En esta etapa la muestra puede ser almacenada a temperatura ambiente por largos períodos de tiempo.

5.2.2. Acondicionamiento de la muestra para el marcado con anticuerpos o aptámeros

Como ya se mencionó, en este trabajo se partió de muestras de tejidos previamente fijados en portaobjetos. Entonces, para iniciar el proceso de marcación o tinción del tejido, fue necesario eliminar el medio de inclusión

para que los componentes del tejido estén disponibles para interactuar con el anticuerpo o el aptámeros o anticuerpos.

El desparafinado se llevó a cabo en dos etapas, primero con temperatura colocando los portaobjetos en estufa a 62^0C, durante 45 minutos. En segundo lugar, por inmersión en cubas con xileno, como se muestra en la Figura 5.2.

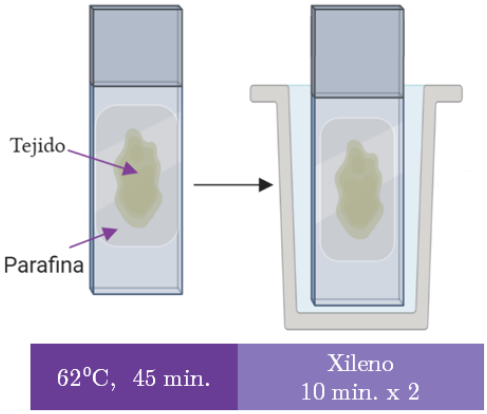


Figura 5.2- Desparafinado del tejido

Luego se llevó a cabo la rehidratación del tejido que permite que estos puedan ser marcados o teñidos con moléculas hidrosolubles. Para ello, se colocaron los tejidos de manera secuencial en etanol absoluto (100%), dos diluciones de etanol en agua (90% y 70%) y finalmente agua destilada, como se muestra en la Figura 5.3.

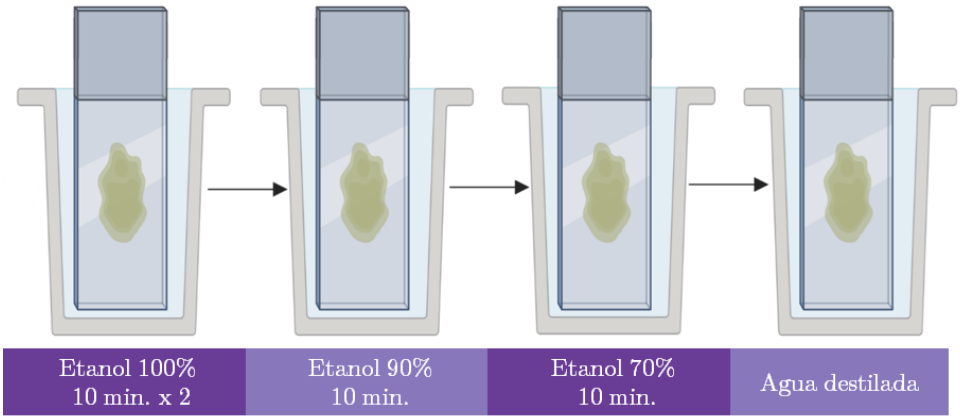


Figura 5.3- Hidratación del tejido

Cuando se va a llevar a cabo la detección proteínas (antígenos) en una muestra de tejido con anticuerpos (inmuhistoquímica) o con aptámeros es necesario realizar la recuperación antigénica (*antigen retrieval*). Esto se realiza porque se ha demostrado que la fijación del tejido con solución de formaldehído provoca numerosas y complejas reacciones entra las proteínas del tejido. Estas reacciones se pueden dar entre las proteínas que actúan como antígenos, llevando a esto a que los sitios de unión o epítopes se encuentren enmascarados. Los enlaces formados entre las proteínas son reversibles y se ven a afectados por el pH, la temperatura y el medio en que se encuentre el tejido. Con lo cual la ruptura de dichos enlaces incrementa la sensibilidad de la técnica inmunohistoquímica o histoquímica con aptámeros. La recuperación de antígenos se llevó a cabo incubando los vidrios durante 20 minutos a 90-95°C en buffer citrato pH 6 (conteniendo 0.05% de tween-20).

Muchos tejidos presentan entre otras enzimas peroxidasas, con lo cual si se va a revelar usando un sustrato y cromóforo para peroxidasa es necesario inactivar esta actividad endógena. La actividad endógena se inactivó incubando los tejidos en solución de H_2O_2 3% durante 20 minutos.

El bloqueo es necesario para evitar las interacciones inespecíficas de las moléculas de reconocimiento (aptámeros y anticuerpos) con ciertos componentes del tejido, debido a interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Las interacciones inespecíficas pueden traer aparejado una señal de fondo muy intensa y no deseada. El bloqueo se realizó incubando el tejido con albúmina de suero bovino (BSA) 2% en buffer TKT 25 mM pH 8 por 30 minutos. Para las marcaciones con anticuerpo se utilizó BSA 2% en PBS 10 mM pH 7.5.

5.2.3. Marcado con anticuerpos o aptámero-DNAzima

La inmunohistoquímica es la técnica tradicionalmente utilizada para identificar y localizar proteínas (antígenos) en tejidos mediante el uso de anticuerpos específicos, por interacción antígeno-anticuerpo.

Como ya se mencionó en la introducción de esta tesis, la IHQ se puede llevar a cabo mediante un método directo (anticuerpo primario conjugado a un marcador o *label*) o indirecto (uso de un anticuerpo secundario conjugado a un marcador o *label*). El método directo no es comúnmente utilizado porque se requiere que todos los anticuerpos con los que se trabaja estén conjugados con un marcador y esto es muy costoso. En cambio, el uso de un anticuerpo secundario conjugado a un marcador, dirigido contra la especie (humano, ratón, conejo, etc) e isotipo (IgM, IgG, IgE, IgA, IgY) del anticuerpo primario, puede ser usado contra varios de estos, lo cual reduce los costos.

Por estas razones, en esta tesis se llevó a cabo el marcado con anticuerpos mediante el método indirecto ya que es el comúnmente utilizado.

Marcado con anticuerpos (IHQ)

El marcado con anticuerpos fue utilizado como control positivo. Para ello, se requiere colocar un volumen de solución sobre el tejido e incubar durante períodos de tiempo que van desde 1 hora a temperatura ambiente hasta toda la noche (ON) a 4ºC, dependiendo del anticuerpo a utilizar. En este trabajo, la IHQ se realizó incubando el tejido con un volumen de anticuerpo durante toda la noche a 4ºC. Luego de la incubación se realizaron dos lavados para eliminar el exceso de anticuerpo que no interaccionó con la proteína. Finalmente se llevó cabo la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) y nuevamente se realizaron

lavados para eliminar el exceso de los ligandos.

Marcado con la construcción aptámero-DNAzima

Para llevar a cabo el marcado con la construcción aptámero-DNAzima se incubó el tejido con un volumen de esta solución durante toda la noche a temperatura ambiente (20ºC) en cámara húmeda. Luego de la incubación se realizaron dos lavados para eliminar el exceso de construcción aptámero-DNAzima que no interaccionó con la proteína (ver Capítulo Materiales y Métodos).

En la Figura 5.4 se muestra un esquema donde se compara el proceso de marcado con anticuerpos (método indirecto) y con la construcción aptámero-DNAzima, donde se puede ver que este último requiere menos pasos para llevar a cabo la marcación del tejido.

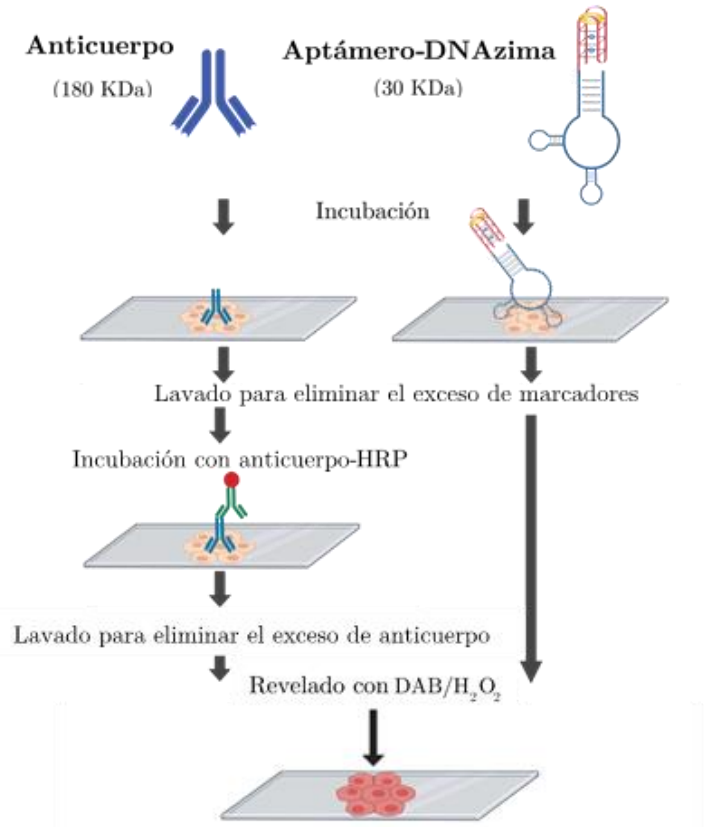


Figura 5.4- Esquema comparativo del marcado con anticuerpos y con la construcción aptámero-DNAzima.

5.2.4. Revelado

El revelado se llevó a cabo de la misma manera tanto para las muestras tratadas con la construcción aptámero-DNAzima como para las tratadas con anticuerpos, ya que la construcción aptámero-DNAzima presenta actividad peroxidasa y el anticuerpo secundario utilizado estaba conjugado a la enzima HRP, que también presenta actividad peroxidasa.

Como cromóforo se utilizó diaminobencidina (DAB) que genera un producto oxidado de color marrón insoluble y se utilizó H_2O_2 para iniciar la reacción catalítica (sustrato de la enzima o DNAzima). En la Figura 5.5 se muestra una representación esquemática del proceso de revelado para la construcción aptámero-DNAzima. La reacción es la misma en el caso de la marcado con anticuerpos conjugados con la enzima HRP (ver Capítulo Materiales y Métodos).

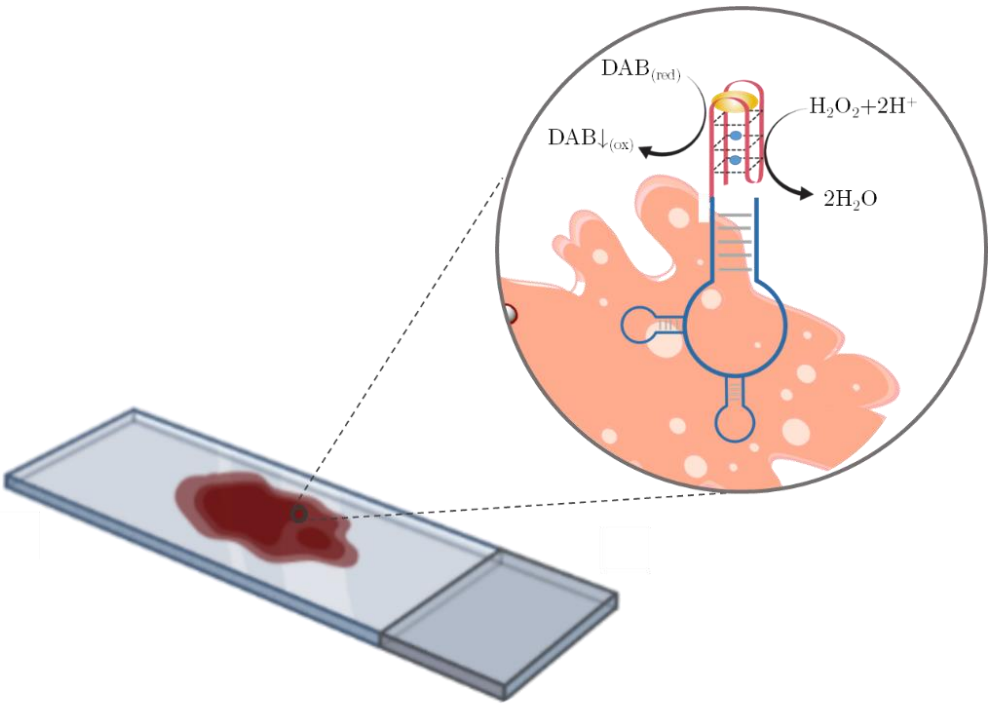


Figura 5.5- Proceso de revelado con DAB/H_2O_2 para la construcción aptámero-DNAzima.

5.2.5. Preparado del tejido para su conservación y observación en microscopio

Finalizado el marcado, se llevó a cabo la deshidratación del tejido, que es necesaria para eliminar el agua y poder utilizar luego un medio de montaje.

La deshidratación se realizó sumergiendo la muestra en soluciones de etanol de concentración creciente 70%, 90% y 100%, durante 5 minutos en cada caso (Figura 5.6).

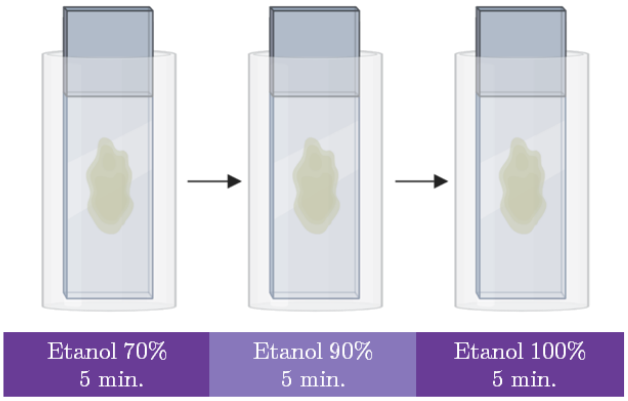


Figura 5.6- Proceso de deshidratación de tejidos.

El montado del tejido tiene como objetivo preservar la muestra durante un período prolongado de tiempo, en un estado de conservación estable. El montado además asegura el cumplimiento de las pautas internacionales, las cuales exigen que las muestras clínicas preparadas para diagnóstico se conserven durante 10 años.

Para el montaje se utilizan los denominados medios de montaje, qué para preparados histológicos, son medios no acuosos. Estos no deben afectar la posterior observación del tejido por microscopía óptica. Por esta razón, los medios de montaje utilizados en histología tienen un índice de refracción igual al del vidrio. Por otro lado, permiten que se coloque un cubreobjetos sobre la

muestra ya marcada o teñida y que este quede adherido. En este trabajo se utilizó como medio de montaje bálsamo sintético.

Como se muestra en la Figura 5.7 previo al montado se sumergieron las muestras en dos cubas con xileno por 5 minutos en cada una. Este procedimiento se denomina aclarado del tejido y proporciona un medio orgánico para que se disuelva el bálsamo.

Luego se agregó una gota de bálsamo sintético sobre el cubreobjetos y se colocó sobre el portaobjetos recién sacado de la cuba con xileno.

Finalizado el montado, se observaron las muestras en el microscopio óptico (*Leica MC 2500*).

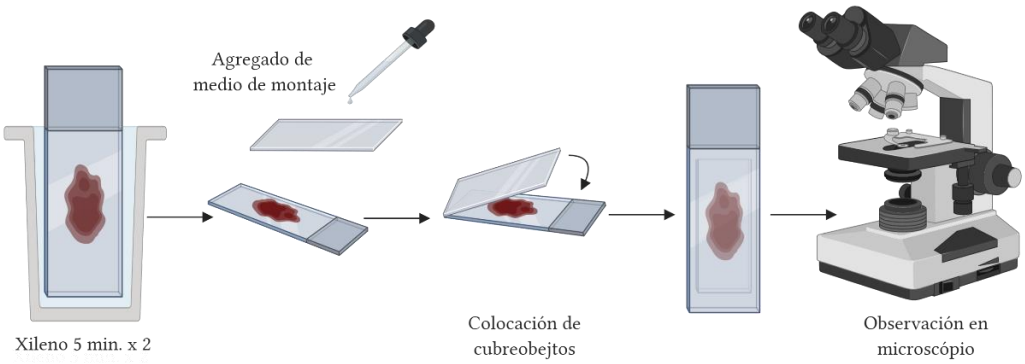


Figura 5.7- Montado de muestras para observar al microscopio.

5.3. Detección de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN)

En esta sección se presentará el uso de la DNAzima peroxidasa como marcador acoplada al aptámero contra fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN). Como ya se mencionó anteriormente PTEN es un supresor tumoral. PTEN desempeña un papel crítico en la modulación de funciones celulares, como la proliferación, el crecimiento, la supervivencia y el metabolismo, en respuesta a estímulos extracelulares mediados por los

receptores de membrana citoplasmática y las proteínas G[3]. Este se localiza tanto en el núcleo como en citoplasma de la célula, donde ejerce diferentes funciones según su localización[4].

Como se puede ver en la Figura 5.8, PTEN en el citoplasma, tiene actividad fosfatasa y forma parte de la ruta de señalización de la fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K), que genera en la membrana plasmática fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3) en respuesta a estímulos extracelulares[5]. Cuando PI3K es activada, fosforila PIP_2 para producir PIP_3. Esto produce a su vez, la activación de proteína quinasa serina/treonina (AKT) que regula varios procesos celulares como proliferación, supervivencia inapropiada, metabolismo alterado de células tumorales, etc [6]. Si PTEN está en el citoplasma desfosforila el PIP_3, generando una disminución de la actividad de AKT. Pero si se produce la pérdida o reducción significativa de la expresión del gen de PTEN, la proteína no se produce, lo que trae como consecuencia incrementos en la expresión de AKT[7].

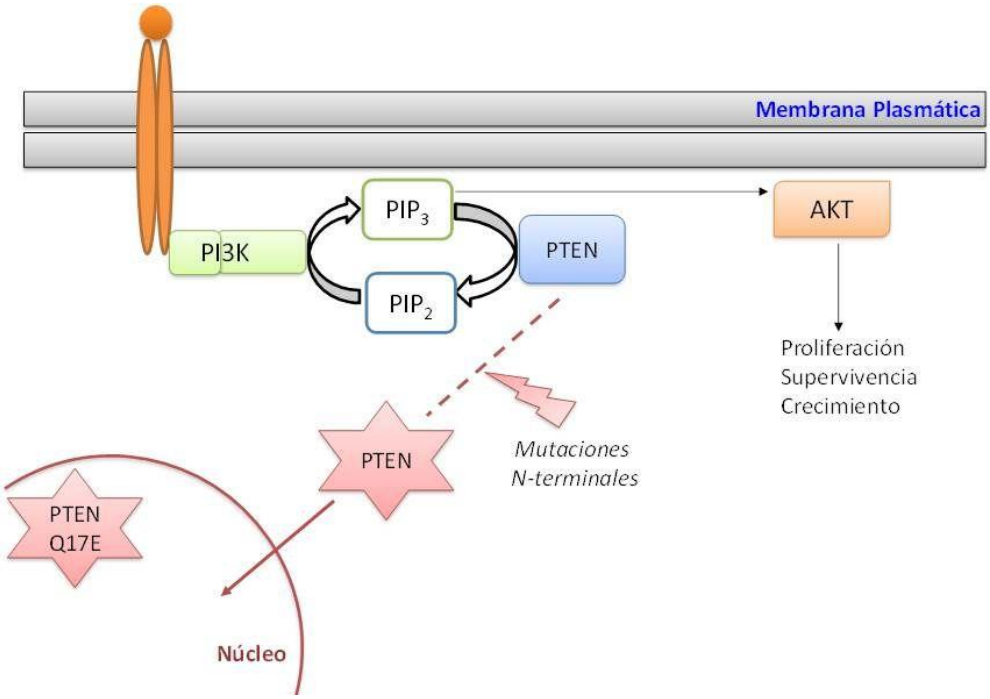


Figura 5.8- Ruta de señalización de PTEN. Imagen tomada de Janire Mingo y col [8].

PTEN en el núcleo regula positivamente la reparación del ADN y es independiente de la actividad fosfatasa. Pero la pérdida de PTEN en el núcleo desencadena la vía de señalización PI3K/AKT/PTEN por secuestro de PTEN del citoplasma[9]. Por estas razones, PTEN es un potencial biomarcador y posible objetivo farmacológico.

Numerosos estudios clínicos proponen que la localización de PTEN puede ser usada como factor de pronóstico de enfermedad o patognomónico, ya que la ausencia de PTEN en el núcleo se asocia a los tumores más agresivos en esófago, colon, endometrio, páncreas, etc[1].

La actividad de PTEN se pierde por mutaciones como deleciones o metilación de su promotor en muchos cánceres humanos primarios y metastásicos. Las deleciones son un tipo de mutación donde se pierde parte del material genético. La metilación del gen promotor, que es quien regula la transcripción de una región del ADN, hace que se modifique la función. También se han encontrado mutaciones en la línea germinal de PTEN en pacientes con predisposición familiar al cáncer[3].

Rutinariamente la expresión de PTEN se determina mediante IHQ en preparados histológicos de gran variedad de tejidos, como endometrio, mama, cerebro, colon, tiroides, próstata, piel, etc [6],[10]–[12].

5.3.1. Aptámero contra PTEN

El aptámero contra PTEN utilizado en este trabajo fue provisto por el Dr. Radrizzani del Laboratorio de Neurología y Citogenética Molecular de la Universidad Nacional de San Martín.

Estructuralmente la proteína PTEN consta de dos dominios, unoregulatorio (C2) y el otro con actividad fosfatasa (PTPs), como se muestra

en la Figura 5.9. Para llevar a cabo la selección utilizaron como molécula *target* un péptido perteneciente al dominio PTPs de PTEN (Figura 5.8 en azul). No se utilizó la proteína completa, ya que el dominio PTPs es el que presenta la actividad fosfatasa que es crítica para la función supresora de tumores de PTEN[11].

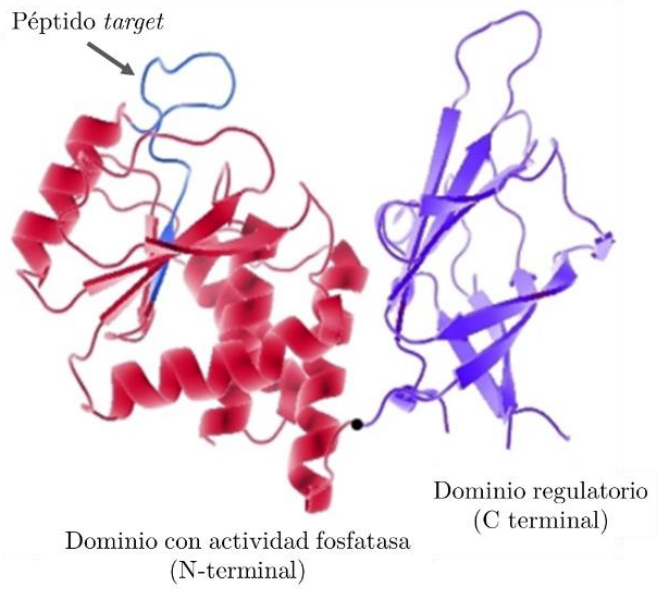


Figura 5.9– Representación esquemática de la estructura de PTEN (PBD:1DR5) obtenida de Protein Data Bank. **DOI:** 10.2210/pdb1D5R/pdb.

Radrizzani *et.al* [13] sintetizaron por SELEX varios clones de aptámeros contra PTEN. El patrón de reconocimiento de PTEN fue comprobado mediante un ensayo Western Blot de proteínas purificadas de cerebro de ratón. Por otro lado, se realizaron marcaciones histológicas de tejidos con diagnóstico de adenocarcinoma de endometrio, llevando a cabo la marcado con los aptámeros obtenidos y anticuerpos contra PTEN.

El aptámero se sintetizó con una molécula de biotina en su extremo 5´y se utilizó la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con avidina. Mediante la interacción específica avidina-biotina se ancló la HRP al

aptámero para generar una marcación, debido a la oxidación de un cromóforo (DAB) en presencia del sustrato (H_2O_2) de dicha enzima.

Los mejores resultados los obtuvieron con los clones denominados PTEN Z7 (que generó coloración en los núcleos de las células) y PTEN-Z14 (que generó coloración en citoplasma). Además, se comprobó que al hacer una incubación previa del tejido con el anticuerpo anti-PTEN, no se observó marcación con el aptámero PTEN Z7, con lo que queda demostrado que el anticuerpo y el aptámero comparten el mismo epítope. No fue así con el aptámero PTEN-Z14, que generó marcación en el citoplasma con lo cual se comprobó que no comparte el epítope con el anticuerpo anti PTEN [13].

En esta tesis, se utilizó el aptámero PTEN Z7 para llevar a cabo el marcado histológico acoplando éste a la secuencia PS2.M, oligonucleótido que también forma una DNAzima peroxidasa en presencia de hemina.

Con la plataforma *mFold* se obtuvo una predicción de la estructura secundaria del aptámero PTEN Z7 compuesto por 52-*mer* como se puede observar en la Figura 5.10

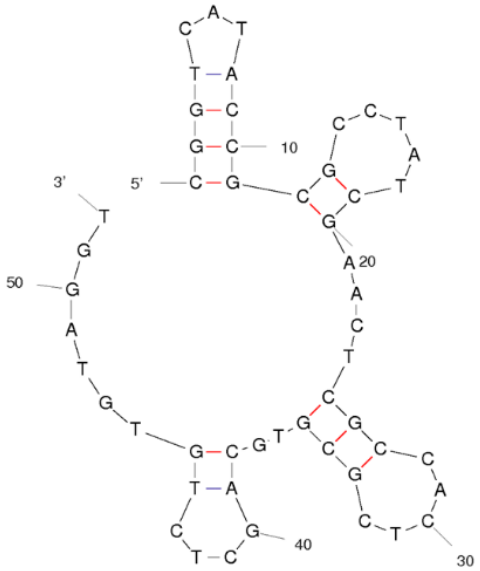


Figura 5.10- Predicción de la herramienta informática *mFOLD* de la estructura secundaria 2D más estable del aptámero PTEN Z7. ΔG: -4.95 kcal/mol.

A continuación, se muestra la secuencia de la construcción aptámero PTEN Z7-PS2.M obtenida comercialmente, donde la secuencia PS2.M se muestra subrayada:

5´-GTGGGTAGGGCGGGTTGGCGGTCATACCGCGCCTATCGAACTC GCCACTCGCGTGCAGCTCTGTGTAGGT-3´

5.3.2. Detección de PTEN en muestras de endometrio

El endometrio es el tejido que recubre el útero y que, hasta la aparición de la menopausia, se renueva cada mes con el ciclo menstrual. En la Figura 5.11 se muestra una representación esquemática del aparato reproductor femenino y se puede ver una tinción histológica con hematoxilina de Harris de una biopsia de endometrio normal. La tinción con hematoxilina de Harris es una tinción general que se utiliza para observar la estructura del tejido, esta tiñe los componentes ácidos de las células de color violeta En particular, la hematoxilina tiñe intensamente los ácidos nucleicos de los núcleos de las células.

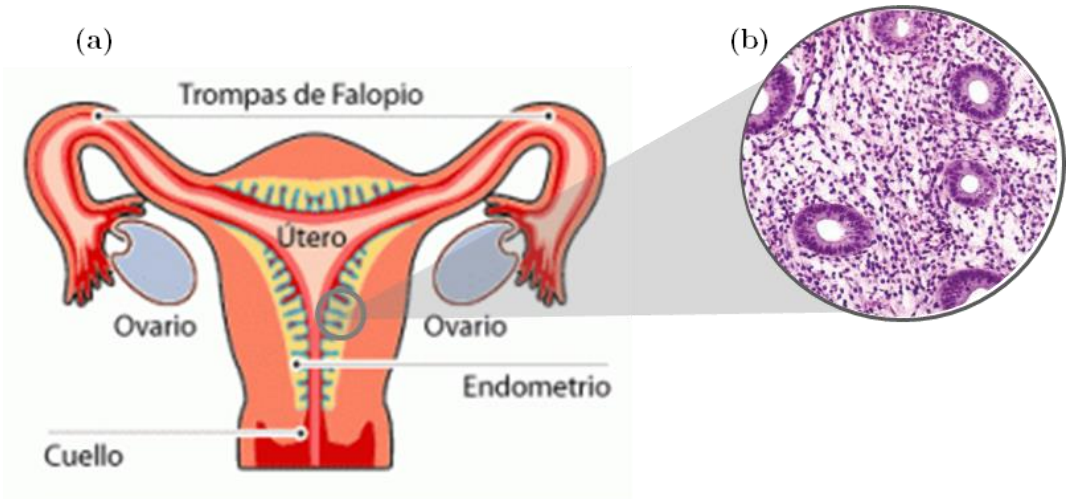


Figura 5.11. Representación esquemática del aparato reproductor femenino (a). Tinción histológica con hematoxilina/eosina de una muestra de endometrio sano (b).

El supresor tumoral PTEN es uno de los biomarcadores moleculares utilizados para la detección de ciertos carcinomas de endometrio, junto con otros marcadores como ciertos receptores hormonales (receptores de estrógenos y receptores de progesterona), supresores tumorales (P53), oncogenes (her-2-neu, K-ras, c-myc y C-erb-B2), etc [14]. No todos estos marcadores son estudiados por IHQ. Otras técnicas que se utilizan son FISH (marcación fluorescente in situ) que es una técnica citogenética de marcación de cromosomas con sondas fluorescentes[15] y qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) para buscar genes de los marcadores moleculares[16].

El aptámero contra PTEN Z7 desarrollado por el grupo del Dr. Radrizzani fue probado previamente a esta tesis con extendidos provenientes de biopsias de endometrio, que presentaban diagnóstico de adenocarcinoma de endometrio. Para ello se utilizó, como se comentó previamente, el aptámero PTEN Z7 acoplado a la enzima HRP, mediante la interacción avidina-biotina.

En la figura 5.12 se muestran las imágenes correspondientes a tinción de contraste con hematoxilina de Harris (Fig. 5.12(a)) y tinción/marcado con hematoxilina de Harris y aptámero PTEN Z7-HRP, respectivamente, en tejidos con pérdida de PTEN (5.12(b)) y sin pérdida de PTEN (5.12(c)).

En el tejido sin pérdida de PTEN (fig. 5.12 (b)), se observa una coloración marrón debida al producto de oxidación del DAB, mientras en el tejido que presenta pérdida de PTEN (fig. 5.12 (c)) muchas células aparecen sin marca. Estos resultados demostraron que el aptámero interacciona con PTEN.

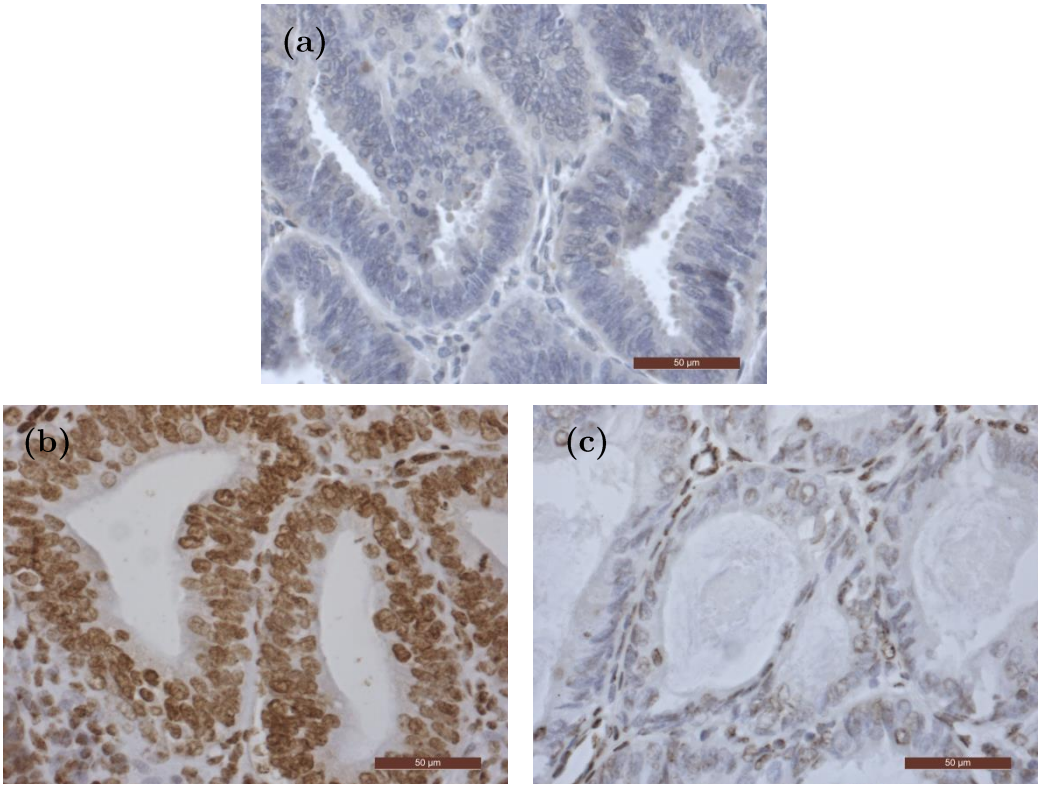


Figura 5.12–Muestras con diagnóstico de adenocarcinoma de endometrio. Tinción con hematoxilina (a). Marcado con aptámero-HRP y hematoxilina en un tejido sin pérdida de PTEN(b) y con pérdida de PTEN (c). Imágenes tomadas a 500x, barra 50µm.

Marcado con la construcción aptámero PTEN Z7-DNAzima

Se trabajó con muestras de tejidos correspondientes a biopsias de endometrio con diagnóstico de adenocarcinoma. Se llevó a cabo el procesamiento y marcado de las muestras según lo descripto en el Capítulo Materiales y Métodos. Como control positivo se llevaron a cabo marcaciones en muestras correspondientes al mismo paciente con anticuerpo monoclonal de conejo anti PTEN IgG (*Promega*) y anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG conjugado con HRP (*Promega*). En ambos casos se utilizó DAB/H_2O_2 para revelar.

Como se puede observar en la Figura 5.13 el marcado es comparable en ambos casos, apreciándose una marca más intensa cuando se utilizó la construcción aptámero-DNAzima. La menor intensidad en la marca obtenida

con anticuerpo anti PTEN y anticuerpo secundario–HRP puede deberse al estado de conservación de estos, lo cual, muestra ventajas del uso de secuencias de ADN frente al uso de proteínas.

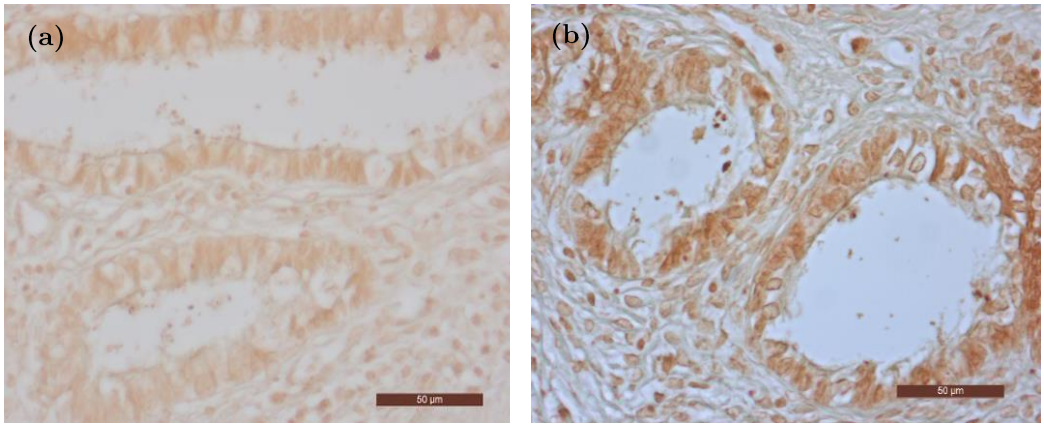


Figura 5.13– Marcado de muestras de endometrio con anticuerpo anti-PTEN/anticuerpo secundario-HRP (a) y aptámero PTEN Z7-DNAzima (b). Imágenes tomadas a 500x, barra 50 µm.

5.3.3. Detección de PTEN en muestras de colon

La detección de PTEN en muestras de colon proporciona una idea de la susceptibilidad a contraer cáncer colorrectal [17]. Junto a PTEN se analizan otros biomarcadores como los oncogenes BRAF y K-ras, el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), etc.

El colon está formado por la mucosa, submucosa, capas musculares gruesas, subserosa y serosa (Figura 5.14). En un colon normal, la mucosa epitelial presenta una estructura glandular tipo tubular simple, que en un corte longitudinal se observan alargadas. El corte longitudinal facilita la tipificación glandular, mientras que un corte transversal del tejido es más útil para observar la interrelación de las glándulas con el tejido conjuntivo que queda entre ellas.

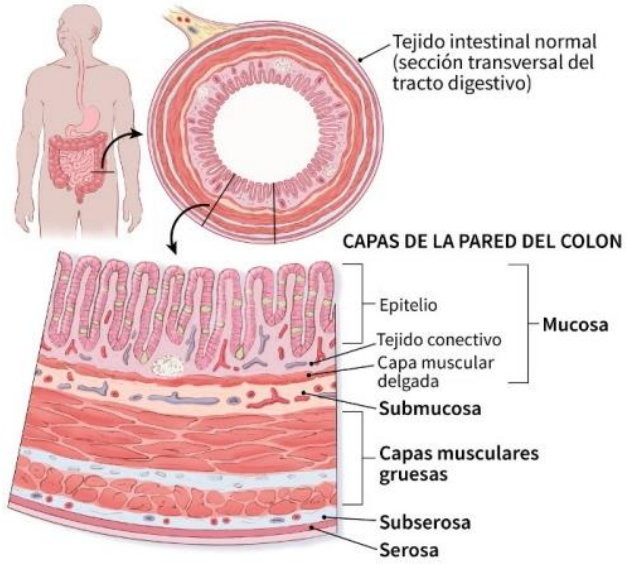


Figura 5.14- Representación esquemática del colon y las capas que lo componen. Imagen tomada de la *American Cancer Society*.

Cuando se inicia un proceso tumoral se generan cambios en la morfología de la estructura tubular de la mucosa epitelial, como se puede observar en la Figura 5.15. En ella, se muestran tinciones con hematoxilina-eosina de cortes histológicos de muestras de colon que presentan distintos grados de avance en el proceso tumoral. La hematoxilina tiñe las regiones ácidas de violeta (es decir los ácidos nucleicos de los núcleos de las células) y la eosina tiñe las regiones básicas, como el citoplasma de las células.

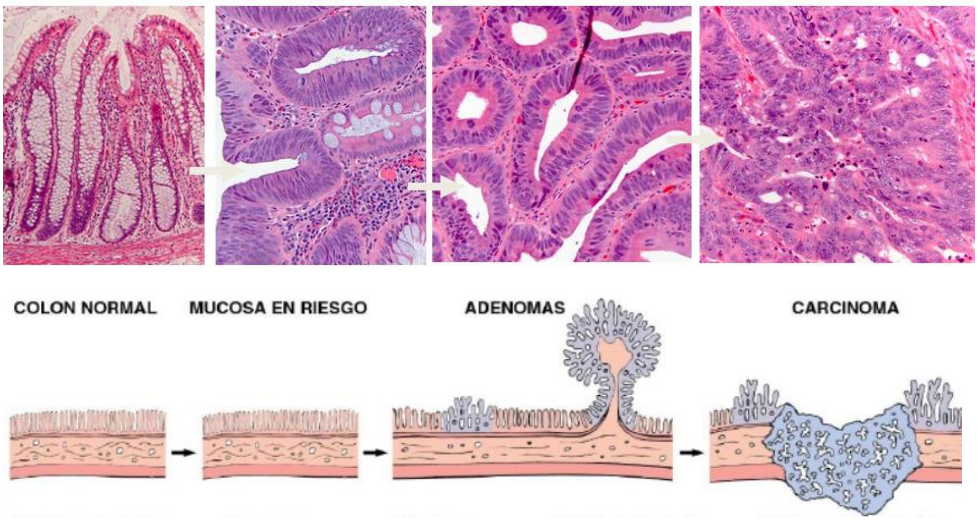


Figura 5.15- Tinciones histológicas de muestras de colón con hematoxilina-eosina (arriba) y representación esquemática de las capas que componen el colon (abajo) en distintos estadios del proceso tumoral. Imagen tomada Robinson Patología Humana.

Marcado con la construcción aptámero PTEN-DNAzima

Para llevar a cabo el marcado con la construcción aptámero-DNAzima se trabajó con muestras de colon normal y con diagnóstico de adenocarcinoma de colon sin pérdida de PTEN. Si bien estas muestras no presentan pérdida de PTEN, pueden ser utilizadas para comprobar que el aptámero interacciona con la proteína PTEN en el tejido. Todas las muestras corresponden a cortes transversales de las glándulas tubulares.

Se llevó a cabo el procesamiento y marcado de las muestras según lo descripto en el Capítulo Materiales y Métodos. Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal de conejo anti PTEN IgG (*Promega*) y anticuerpo secundario conjugado de cabra anti-conejo IgG conjugado con HRP (*Promega*). Como control negativo, se utilizó la secuencia PS2.M que forma la DNAzima peroxidasa en presencia de hemina. En los tres casos, se reveló con DAB/H_2O_2.

Como se puede observar en la Figura 5.16, se obtuvo un marcado comparable con el anticuerpo y con la construcción aptámero-DNAzima, tanto para la muestra de colon normal como la muestra con diagnóstico de adenocarcinoma de colon. En ambos casos se observa marcado en la zona en la que PTEN es más abundante, dentro de las estructuras glandulares, obteniéndose un buen contraste lo que permite evidenciar los cambios morfológicos de estas estructuras glandulares. La construcción aptámero-DNAzima mostró mayor marcación de fondo si se la compara con los resultados obtenidos utilizando anticuerpos.

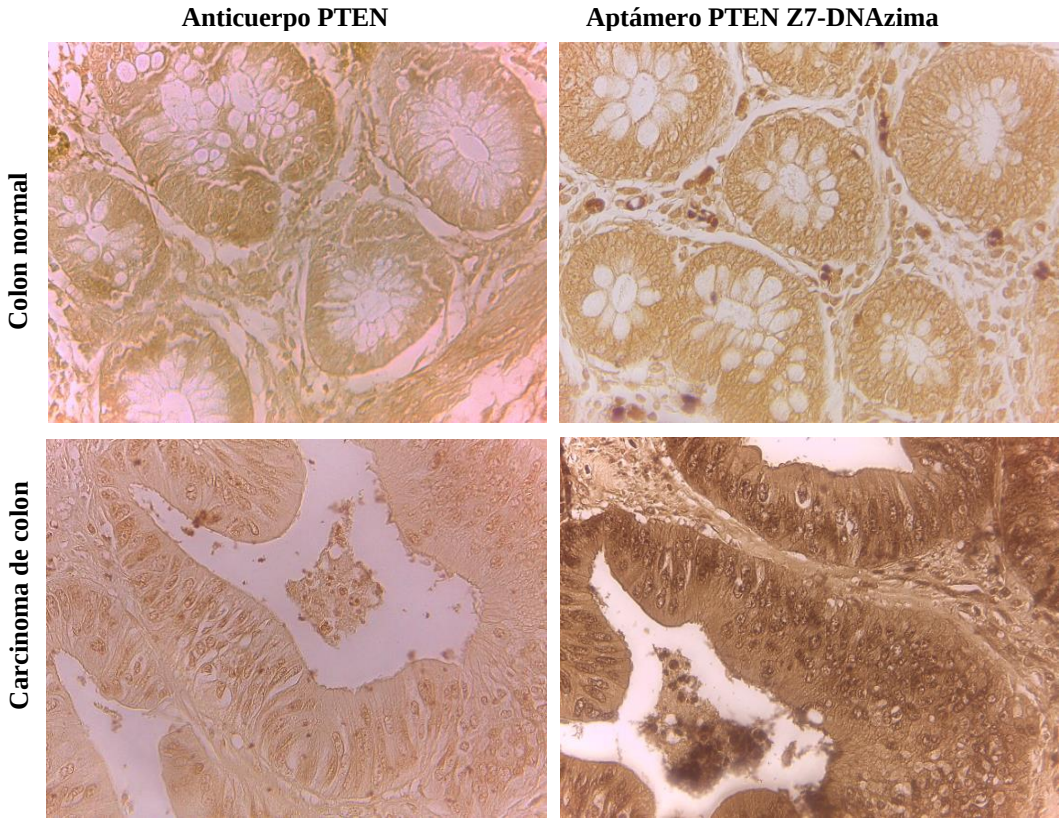


Figura 5.16– Muestras de colón normal y con diagnóstico de adenocarcinoma de colon, marcadas con anticuerpo anti-PTEN/anticuerpo secundario-HRP (control positivo) y construcción aptámero PTEN Z7-DNAzima. Imágenes tomadas a 200x.

En cuanto al control negativo llevado a cabo con la DNAzima peroxidasa formada por el oligonucleótido PS2.M y hemina, se observó una leve coloración de fondo, la cual es más intensa en las zonas externas a las glándulas (Figura 5.17). Esto indica que el ADN que forma la DNAzima peroxidasa o la hemina que está libre puede estar interaccionando inespecíficamente con el tejido y con ello generando una señal de base.

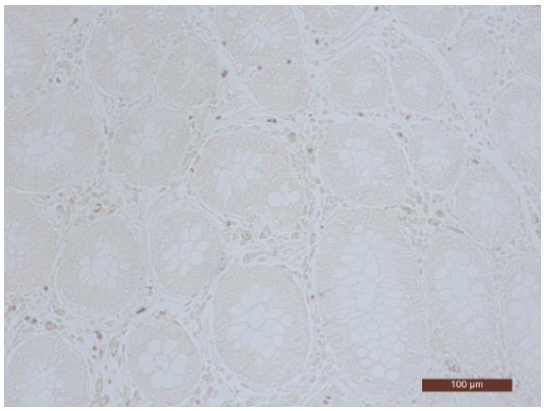


Figura 5.17- Marcado con DNAzima peroxidasa como control negativo. Imágenes tomadas a 100x, barra 100 µm.

5.4. Discusión

El uso de ácidos nucleicos en la detección de proteínas u otras moléculas de interés tiene como gran ventaja que se puede diseñar una molécula de ADN que conste de una zona de reconocimiento (aptámero) y otra que actúa como marcador (DNAzima).

El uso de los ácidos nucleicos (aptámeros, DNAzimas) presenta varias ventajas frente al uso de proteínas (anticuerpos, enzimas), por su versatilidad para diseñar construcciones, el menor costo, la estabilidad térmica y de almacenamiento y que al obtenerse por síntesis química presentan un alto nivel de estandarización no obtenida con los anticuerpos.

Estas ventajas sumado al hecho que los ácidos nucleicos pueden desnaturalizarse y renaturalizarse rápidamente, abre un abanico de posibilidades a la hora de desarrollar metodologías de detección más simples, rápidas y confiables.

El uso del aptámero contra PTEN acoplado a la DNAzima peroxidasa como marcador en lugar de utilizar la enzima HRP, trae aparejadas ciertas ventajas. La construcción aptámero-DNAzima implica utilizar una

construcción compuesta solo de ADN, lo cual presenta, como ya se mencionó, notables ventajas frente al uso de proteínas. Por otro lado, el uso del aptámero acoplado a la enzima HRP resulta más engorroso de preparar y tanto el aptámero-biotina como la HRP-avidina tienen alto costo y no presentan gran estabilidad de almacenamiento.

El uso de ácidos nucleicos trae importantes beneficios a la hora de desarrollar técnicas de detección de moléculas, simplificando el procedimiento operativo, eliminando pasos como la utilización de marcadores, evitar la manipulación de compuestos radiactivos, evitar el uso de animales de laboratorio, etc.

5.5. Conclusiones

Se pudieron llevar a cabo marcaciones histológicas con las construcciones aptámero-DNAzima en tejidos, como colon y endometrio para estudio del biomarcador PTEN asociado a distintos tipos de cáncer.

Tanto en muestras de endometrio como colon, se pudieron obtener marcaciones similares a las obtenidas por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo contra PTEN.

Si bien se logró la detección de las proteínas estudiadas, cabe remarcar que para llevar a cabo un diagnóstico de una enfermedad es importante señalar que se deben estudiar varios biomarcadores moleculares para cada paciente y las tinciones o marcados histológicos deben ser analizados por un patólogo. La metodología utilizada en esta tesis para llevar a cabo histoquímica es una herramienta potencialmente útil para el diagnóstico.

5.6. Referencias

[1] M. S. Song, L. Salmena, and P. P. Pandolfi, "The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 283–296, 2012.

[2] J. W. Bartholomew *et al.*, *Staining Procedures*. Williams & Wilkins, 1981.

[3] A. Carnero, "The PKB / AKT Pathway in Cancer," pp. 34–44, 2010.

[4] C. M. Barbeito, "Estudio de PTEN como supresor tumoral : desarrollo de modelos animales , evaluación de terapias dirigidas e interacción con el proceso inflamatorio," 2015.

[5] S. M. Planchon, K. A. Waite, and C. Eng, "The nuclear affairs of PTEN," *J. Cell Sci.*, vol. 121, no. 3, pp. 249–253, 2008.

[6] K. Garg, R. R. Broaddus, R. A. Soslow, D. L. Urbauer, D. A. Levine, and B. Djordjevic, "Pathologic scoring of PTEN immunohistochemistry in endometrial carcinoma is highly reproducible," *Int. J. Gynecol. Pathol.*, vol. 31, no. 1, pp. 48–56, 2012.

[7] F. Meier *et al.*, "The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of effective treatment of advanced melanoma," *Bioscience*, vol. 10, pp. 2986–3001, 2005.

[8] J. Mingo *et al.*, "A pathogenic role for germline PTEN variants which accumulate into the nucleus," *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 26, no. 8, pp. 1180–1187, 2018.

[9] M. S. Song, L. Salmena, and P. P. Pandolfi, "The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 283–296, 2012.

[10] S. A. Backman *et al.*, "Early onset of neoplasia in the prostate and skin of mice with tissue-specific deletion of Pten," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 6, pp. 1725–1730, 2004.

[11] J. Li *et al.*, "PTEN , a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer," *Cancer Res.*, vol. 275, pp. 1943–1947, 1997.

[12] Y. Qin, Z. Huo, X. Song, X. Chen, X. Tian, and X. Wang, "mir-106a regulates cell proliferation and apoptosis of colon cancer cells through targeting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway," *Oncol. Lett.*, pp. 3197–3201, 2017.

[13] V. L. Moncalero, R. V Costanzo, C. Perandones, and M. Radrizzani, "Different conformations of phosphatase and tensin homolog, deleted on chromosome 10 (PTEN) protein within the nucleus and cytoplasm of neurons.," *PLoS One*, vol. 6, no. 4, p. e18857, 2011.

[14] "Consenso nacional inter-sociedades sobre cáncer de endometrio." Programa Nacional de Consensos Inter-Sociedades Programa Argentino de Consensos de Enfermedades Oncológicas, 2016.

[15] J. S. Woo, S. K. Apple, P. S. Sullivan, J. Y. Rao, N. Ostrzega, and N. A. Moatamed, "Systematic assessment of HER2/neu in gynecologic neoplasms, an institutional experience," *Diagn. Pathol.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–9, 2016.

[16] A. C. Kölbl, L. M. Victor, A. E. Birk, U. Jeschke, and U. Andergassen, "Quantitative PCR marker genes for endometrial adenocarcinoma," *Mol. Med. Rep.*, vol. 14, no. 3, pp. 2199–2205, 2016.

[17] S. Navarro *et al.*, "Recomendación para la determinación de biomarcadores en el carcinoma colorrectal. Consenso Nacional de la

Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica," *Rev. Esp. Patol.*, vol. 45, no. 3, pp. 130–144, 2012.

Conclusiones y perspectivas futuras

La hipótesis planteada en esta tesis es que los ácidos nucleicos pueden ser utilizados como elementos de reconocimiento biológico y generación de señales ópticas y electroquímicas para su uso en biosensores y marcaciones histológicas. Con el fin de comprobar esta hipótesis, en primer lugar se estudió y optimizó la actividad catalítica de la DNAzima peroxidasa. Luego se diseñaron secuencias de ADN bifuncionales, conteniendo la DNAzima peroxidasa y un oligonucleótido (secuencia complementaria o un aptámero), de manera que la secuencia diseñada pueda reconocer en forma específica una molécula blanco y se genera una señal óptico o electroquímica por acción de la DNAzima peroxidasa. Estas secuencias bifuncionales fueron empleadas para detección de secuencias correspondientes a genes y para marcaciones histológicas.

En el capítulo 3, se estudiaron los ácidos nucleicos con actividad catalítica peroxidasa, la DNAzima peroxidasa, como reportera de la presencia y concentración de ciertas secuencias oligonucleotídicas o proteínas. Se estudiaron ciertas variables que se consideraron importantes para maximizar su capacidad catalítica, tales como el pH, la composición del buffer, la presencia de sales y la relación óptima entre la concentración de

oligonucleótido y hemina. Si bien la DNAzima peroxidasa presentó una capacidad de catálisis suficientemente alta para diversas aplicaciones potenciales, ésta fue menor a la capacidad catalítica de la enzima HRP. No obstante, caben destacarse las ventajas que presentan los ácidos nucleicos, en particular el ADN, frente a las proteínas como marcadores. Algunas de ellas radican en el menor costo, mayor estabilidad, obtención por síntesis química, posibilidad de diseñar secuencias de oligonucleótidos como bloques funcionales, entre otras. Esta última característica de los ácidos nucleicos de poder sintetizarse como bloques funcionales permitió explorar los demás objetivos de esta tesis.

En el capítulo 4 se estudió el uso de la DNAzima peroxidasa como marcador combinado a una secuencia de ADN complementaria a una región específica de un gen que permita detectar la presencia de un patógeno. Esta secuencia complementaria actuó como secuencia sensora, y la DNAzima peroxidasa acoplada a ella actúo como elemento amplificador de la señal de dicho evento. Como sistema modelo, se utilizó una secuencia blanco correspondiente a una región de un gen de la bacteria *Escherichia coli* verotoxigénica. Esta región específica del gen codifica la producción de toxina Shiga. Se pudo detectar dicha secuencia blanco y se pudo comprobar la especificidad de la secuencia sensora frente a otros patógenos de *Escherichia coli.* Uno de los métodos comúnmente usados para detectar la presencia de este patógeno es el cultivo diferencial. Los cultivos requieren de varios días para permitir el crecimiento del patógeno buscado, con lo cual la detección del material genético de un patógeno específico presenta ventajas frente a éste. En cuanto a la detección del material genético, ésta se suele llevar a cabo por qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real) donde la detección se lleva a

cabo por fluorescencia luego de la amplificación del material genético. En este sentido, la detección electroquímica planteada en esta tesis presenta una ventaja importante frente a la detección por fluorescencia. El equipamiento en el caso de las determinaciones electroquímicas puede ser miniaturizado fácilmente, lo cual permite fabricar dispositivos portátiles y económicos, siendo esto de gran utilidad en biosensores.

Finalmente, en el capítulo 5 se estudió el uso de la DNAzima peroxidasa como marcador combinado con un aptámero de ADN. El aptámero utilizado fue el aptámero contra PTEN, un supresor tumoral que se utiliza como biomarcador en varios tipos de cáncer como el de endometrio, colón, mama, próstata, etc. En este caso se trabajó con muestras reales correspondiente a biopsias de humanos sanos o con diagnóstico de cáncer de colón o endometrio. Se pudieron obtener resultados comparables a las obtenidas mediante inmunohistoquímica, técnica en la cual se utilizan anticuerpos como elementos de reconocimiento antigéncio. Como ya se mencionó, el uso de ácidos nucleicos, en particular el ADN, presenta ciertas ventajas frente a las proteínas, en este caso particular frente a los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica. Entre las ventajas mencionadas, las más relevantes son la obtención de las secuencias de ADN por síntesis química, lo cual redunda en una mayor reproducibilidad entre lotes, su gran estabilidad, su bajo costo, no es necesario utilizar animales de laboratorio y la posibilidad de poder sintetizarse contra blancos no inmunogénicos. De todas maneras, cabe destacar que aún no se han obtenido gran variedad de aptámeros contra blancos moleculares.

Lo presentado en esta tesis puede seguir desarrollándose a futuro llevando a cabo modificaciones en las secuencias propuestas en cuanto a su

composición de bases o mediante modificaciones químicas. Estas últimas permiten mejorar no solo las capacidades de reconocimiento molecular y catalíticas, sino también su estabilidad.

Se ha demostrado que los ácidos nucleicos proporcionan un abanico de posibilidades por sus propiedades de reconocimiento molecular y actividad catalítica. Estas propiedades los hacen candidatos para su potencial uso en el desarrollo de biosensores y en la detección de biomarcadores en muestras de tejidos.

Perspectivas a futuro

Como perspectiva a futuro se plantea utilizar muestras reales para detectar el gen de Shiga toxina producido por *Escherichia coli* verotoxigénica con la construcción oligonucleotídica propuesta. En particular, se pretende llevar a cabo las determinaciones, en una primera instancia, en muestras de agua de consumo. En una segunda etapa, pasar a matrices más complejas como materia fecal, leche y otros alimentos. Para determinar la presencia de material genético específico en una muestra, es necesario llevar a cabo una preparación previa de ésta, que incluye varios pasos. En la figura S1 se muestra una representación esquemática de los pasos generales requeridos. En una primera instancia se debe extraer el ADN de la muestra. Esto incluye varios pasos: lisado de células, remoción de lípidos de membranas, desnaturalización y remoción de proteínas, remoción de ARN y otros contaminantes, precipitación de ADN y finalmente recuperación del ADN purificado de la muestra. Una vez extraído el ADN, la secuencia de ADN a detectar debe ser amplificada, es decir se deben obtener muchas copias de ella por sobre las demás. Para esto se utilizan técnicas como PCR (reacción en

cadena de la polimerasa) o LAMP (sistema de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos). Estas técnicas de amplificación permiten aumentar exponencialmente la cantidad de moléculas de ADN de una secuencia específica, si se cuenta con los *primers* adecuados (secuencias que delimitarán la zona de interés). En particular, se propone usar la técnica de LAMP que trabaja a temperatura constante, lo que permite desarrollar un equipamiento menos sofisticado si se lo compara con la PCR. La PCR trabaja con ciclos de temperaturas altas y bajas alternadas, lo cual requiere de equipos que hacen uso del efecto Peltier para que los cambios sean rápidos. Por otro lado, INTI junto con la Universidad Nacional de San Martín ha desarrollado un dispositivo portátil LAMP el cual podría ser utilizado para este trabajo.

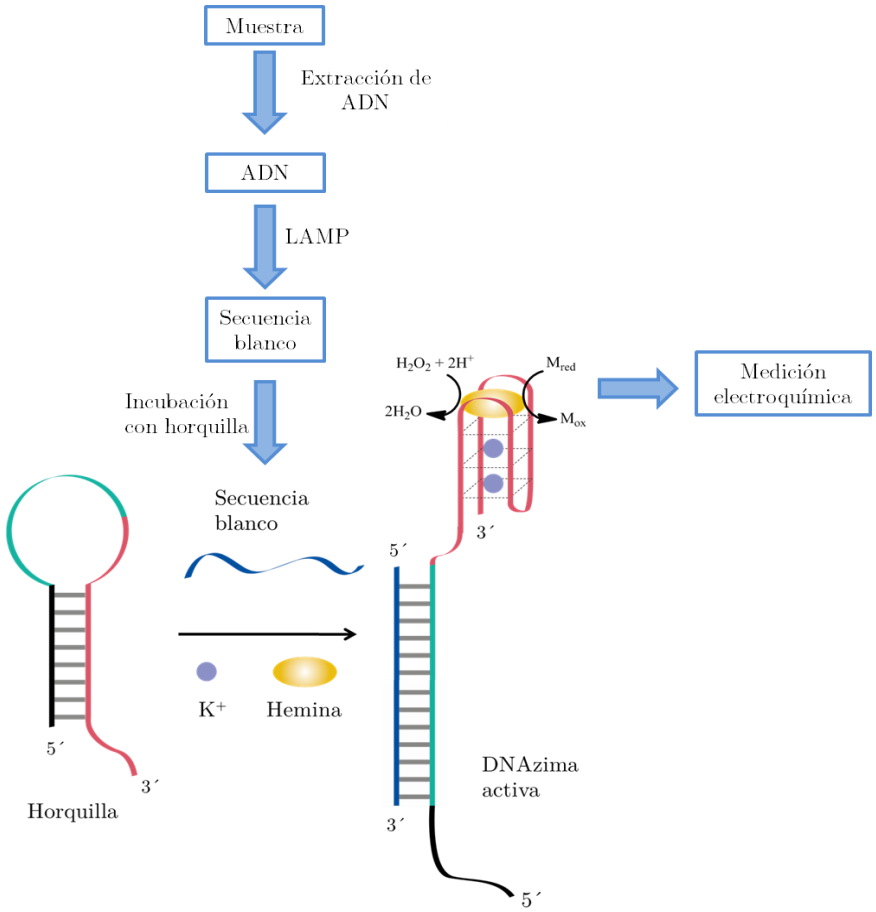


Figura S1- Representación esquemática del procedimiento general para detectar una secuencia blanco en muestras reales.

Finalmente, se propone llevar a cabo el ensayo según lo descripto en el capítulo 4 de esta tesis, utilizando en una primer instancia, la secuencia sensora elegida y llevar a cabo la detección electroquímica según fue planteada.