



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Diseño y caracterización de un sistema de reconocimiento controlado
de VLPs de VPH-16 con el aptámero Sc5-c3”**

Tesis que presenta:

L.B.D. María Fernanda Pérez y Pérez

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias

En la especialidad de:

Genética y Biología Molecular

Director de la Tesis: Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Ciudad de México.

Diciembre, 2017.

Diseño y caracterización de un sistema de reconocimiento controlado de VLPs de VPH-16 con el aptámero Sc5-c3

Tesis que presenta:
L.B.D. María Fernanda Pérez y Pérez
Para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias
En la especialidad de: Genética y Biología Molecular

Director de la tesis: Dr. Luis Marat Alvarez Salas

**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Agosto del 2017

Resumen

La síntesis es la antorcha del genio.

José Ingenieros

Los aptámeros son moléculas seleccionadas *in vitro* para unirse con alta afinidad y especificidad por un blanco molecular. Los aptámeros han sido usados en varias aplicaciones biomédicas, incluyendo en la detección de analitos, mediante la creación de biosensores. Los biosensores son dispositivos diseñados para la detección de una molécula, que combinan un componente biológico con un detector fisicoquímico. Existen diferentes métodos por los cuales la presencia del blanco puede ser reportada por los biosensores siendo la detección electroquímica una de las más importantes. En el 2014, Lejía-Montoya y colaboradores aislaron y caracterizaron un aptámero de RNA llamado Sc5-c3, que reconoce partículas tipo virales (VLPs) del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH16). El aptámero Sc5-c3 tiene una alta afinidad por las VLPs y las reconoce incluso en mezclas complejas, como biofluidos, lo que lo convierte en una herramienta potencial para el diagnóstico de infecciones activas de VPH.

El presente trabajo consistió en determinar la secuencia y longitud que debe tener un oligodeoxinucleótido (ODN) complementario a Sc5-c3 para que sea capaz de disociarse en presencia de VLPs de VPH16. Para lograr este objetivo, se diseñaron 5 ODNs complementarios a la región ML de Sc5-c3. Esta región fue escogida debido a que es importante para la interacción Sc5-c3-VLPs y además se encuentra en cadena sencilla. Se probó la hibridación de estos 5 ODNs con Sc5-c3 a 25°C y a 90°C, encontrándose que el oligo 1 y 2 se hibridan con Sc5-c3 tanto a 25°C como a 90°C, mientras que el oligo 3 se hibrida únicamente a 25°C. Los oligos 4 y 5 no se hibridan a ninguna de las condiciones probadas. Los oligos que no se hibridaron de manera estable fueron descartados del trabajo y se procedió a retar las hibridaciones de los oligos 1 y 2 marcados fluorescentemente al agregar concentraciones crecientes de VLPs. Ninguno de los oligos probados fue capaz de separarse de Sc5-c3 al agregar VLPs al sistema, e incluso Sc5-c3 logró unirse a las VLPs aunque se encontrara hibridado con alguno de estos ODNs, lo que sugiere la formación de un complejo oligo-Sc5-c3-VLPs. Se propone diseñar un ODN más largo que se una con varias partes de Sc5-c3, haciendo cambios importantes en la estructura secundaria del aptámero. Así, al agregar las VLPs al sistema, la forma

de Sc5-c3 que interactua con el blanco se favoreceria y el ODN sería desplazado.

Abstract

Aptamers are *in vitro* selected molecules that bind with high affinity and specificity to diverse molecular targets. Aptamers have been used in several biomedical applications, including the detection of analytes, by the creation of biosensors. Biosensors are devices designed for the detection of a specific molecule, which combine a biological component with a physicochemical detector. There are different methods by which the presence of the target can be reported by biosensors, although electrochemical detection is widely used because its simplicity and low-cost. In 2014, Lejia-Montoya and colleagues isolated and characterized an RNA aptamer called Sc5-c3, which specifically recognizes HPV16 virus-like particles (VLPs). The Sc5-c3 aptamer has a high affinity for VLPs and recognizes them even in complex mixtures, such as biofluids, which makes it a potential tool for the diagnosis of active HPV infections.

The present work consisted in determining the length and sequence of ODNs complementary to Sc5-c3 able to dissociate upon HPV16 VLPs binding. To achieve this goal, five ODNs complementary to the ML region of Sc5-c3 were designed. This region was chosen because it is important for Sc5-c3 interaction with VLPs and it is single stranded. Hybridization was tested at 25°C and 90°C, finding that oligo 1 and 2 readily hybridized with Sc5-c3 at both 25 °C and 90°C, while oligo 3 hybridized only at 25°C. Oligos 4 and 5 did not hybridize in any of the conditions tested. Oligos that did not stably hybridize were discarded and the hybridizations of fluorescently labeled oligos 1 and 2 were challenged by adding increasing concentrations of VLPs. None of the oligos tested was able to dissociate from Sc5-c3 by adding VLPs to the system, and Sc5-c3 was able to bind to the VLPs even though it was hybridized, suggesting the formation of an oligo-Sc5-c3-VLPs complex. It is proposed to design longer ODN that will hybridize at several parts of Sc5-c3, producing severe changes to the secondary structure of the aptamer. Thus, when adding the VLPs to the system, the form of Sc5-c3 that interacts with the target would be favored and the ODN would be displaced.

*A mis padres
Por apoyarme de todas las maneras posibles y más*

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica bajo la dirección del Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN siendo la L.B.D. María Fernanda Pérez y Pérez becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo el número de registro 705463.

Agradecimientos

La gratitud en silencio no sirve a nadie.

G.B. Stern

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo de maestría.

De manera muy especial, quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Luis Marat Alvarez Salas por el apoyo y paciencia brindada para la realización de esta tesis. Es el mejor de los tutores, y él lo sabe. Muchas gracias también por su calidad humana y su gran generosidad.

Al Dr. Jesús Valdés Flores por sus valiosas sugerencias para la mejora de este trabajo y por los recursos que amablemente me proporcionó para el desarrollo de algunos de los experimentos de esta investigación.

Al Dr. Javier Hernández Sánchez, por el tiempo y esfuerzo invertido en la revisión de este trabajo, a pesar de las tantas actividades que lo ocupan.

Al M. en C. Eduardo Feliciano Monterrubio Ledezma, por su amor, apoyo y compañía. Me ayudaste a disfrutar el camino y no sólo la meta, muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio:

- Al M. en C. Giovanni Palomino por transmitirme su experiencia y conocimientos, por influenciarme para ser cada vez mejor, y por su disposición a ayudarme siempre que lo necesité.
- A la M. en C. Diana Valencia, por su amistad, compañerismo y por sus útiles consejos académicos y personales.
- Al M. en C. Alejandro González por toda su ayuda, por velar por mis intereses y defenderme cuando lo necesité.
- Al M. en C. Sergio Rangel por su asombrosa creatividad, acertadas sugerencias y excelente sentido del humor.

A mis compañeros de generación, pues su amistad, compañía y consejos me ayudaron a ser mejor.

Y finalmente, a mi familia:

- A mi padre, el Dr. Gerardo Francisco Pérez, por inspirarme, animarme, ayudarme, defenderme, cuidarme y amarme. Disfruté mucho de tu compañía y consejos. Gracias por siempre darte un tiempo para mí, sin importar todo el trabajo que tengas. Te amo mucho.
- A mi madre, la Psic. Marina Pérez por ser un ejemplo de valentía y entrega. La mayoría de las virtudes que tengo las aprendí de ti. Gracias por creer en mí cuando yo podía hacerlo. Te amo demasiado.
- A mi tío, el Dr. Fernando Luis Pérez, por alentarme en cada proyecto que he querido realizar desde que tengo memoria. Como bien lo dijiste, siempre has sido como mi segundo padre. Te quiero muchísimo y te admiro aún más.
- A mis hermanos Carlos Pérez y Jacob Pérez por ponerle tanto sabor a mi vida. Siempre hacen que las visitas a casa valgan la pena. Sin importar lo molestos que sean, siempre los amaré con todas mis fuerzas.

Índice

Resumen	v
Abstract	vii
Agradecimientos	xiii
1. Introducción	1
1.1. Introducción	1
1.1.1. Aptámeros	1
1.1.2. Selección <i>in vitro</i> de aptámeros	2
1.1.3. Aplicaciones de los aptámeros	3
1.1.4. Aptámeros aplicados a biosensores	4
1.2. Antecedentes	5
2. Planteamiento del problema	9
2.1. Hipótesis	9
2.2. Objetivos	9
2.2.1. Objetivo General	9
2.2.2. Objetivos Particulares	9
3. Aspectos metodológicos	11
3.1. Estrategia Experimental	11
3.2. Materiales y Métodos	11
3.2.1. Diseño de los ODNs	11
3.2.2. Síntesis y purificación de los ODNs	12
3.2.3. Síntesis del aptámero Sc5-c3	13
3.2.4. Producción de partículas tipo virus(VLPs) de VPH16	15
3.2.5. Hibridación de Sc5-c3 con los ODNs	17
3.2.6. Hibridación de los ODNs modificados con FAM	17
3.2.7. Interacción del aptámero Sc5-c3 con los ODNs fluorescentes en competencia con VLPs de VPH16	17

4. Resultados	25
4.1. Purificación de los oligodesoxinucleótidos complementarios al aptámero	25
4.2. Síntesis del aptámero Sc5-c3	25
4.2.1. PCR del DNA molde	25
4.2.2. TIV de Sc5-c3	27
4.3. Hibridación entre los ODNs y el aptámero Sc5-c3	27
4.4. Interacción del aptámero Sc5-c3 con los ODNs en competencia con VLPs de VPH16	30
4.4.1. Producción y purificación de las VLPs de VPH16	30
4.4.2. Interacción del aptámero Sc5-c3 con los ODNs en competencia con VLPs de VPH16	32
4.4.3. Ensayo de desplazamiento del ODN	34
5. Discusión	39
6. Conclusiones y perspectivas	43
6.1. Conclusiones	43
6.2. Perspectivas	43
A. Apendice	45
A.1. Composición de las soluciones utilizadas	45
Bibliografía	51

Índice de figuras

1.1. Selección de aptámeros <i>in vitro</i> mediante SELEX	3
1.2. Componentes de un biosensor	4
1.3. Esquema del biosensor electrónico de DNA (E-DNA)	6
1.4. Esquema del biosensor electroquímico basado en el aptámero de la trombina (E-AB)	7
1.5. Representación esquemática de la estructura secundaria del aptámero Sc5-c3.	8
3.1. Diagrama de la estrategia experimental	19
3.2. Diagrama general de la síntesis de RNA mediante TIV	20
3.3. Esquema general de la producción de VLPs	20
4.1. Purificación de los ODNs usando PAGE desnaturizante	26
4.2. PAGE desnaturizante de los ODNs purificados	26
4.3. Amplificación por PCR del molde para transcribir Sc5-c3	27
4.4. Purificación de la reacción de TIV	28
4.5. Hibridación entre el oligo 1 y el aptámero Sc5-c3	28
4.6. Hibridación entre el oligo 2 y el aptámero Sc5-c3	29
4.7. Hibridación entre el oligo 3 y el aptámero Sc5-c3	30
4.8. Hibridación entre el oligo 4 y el aptámero Sc5-c3	31
4.9. Hibridación entre el oligo 5 y el aptámero Sc5-c3	31
4.10. Inmunodetección en fase sólida de VLPs de VPH16	32
4.11. Esquema del resultado esperado para la interacción del aptámero Sc5-c3 marcado hibridado con un ODN en competencia con VLPs de VPH16.	33
4.12. PAGE de la interacción Sc5-c3-VLPs teñido con SYBR®Green II	34
4.13. PAGE de la interacción Sc5-c3-VLPs teñido con azul de Coomassie	35
4.14. Esquema del resultado esperado para la interacción del aptámero Sc5-c3 hibridado con un ODN marcado en competencia con VLPs de VPH16	36
4.15. Hibridación de los ODNs marcados fluorescentemente con Sc5-c3	37
4.16. Competencia del oligo 1 con cantidades crecientes de VLPs	37

4.17. Competencia del oligo 2 con cantidades crecientes de VLPs	38
---	----

Índice de Tablas

3.1. Características de los ODNs complementarios a Sc5-c3.	12
3.2. Homodímeros de los diferentes ODNs y heterodímeros de los ODNs con Sc5-c3.	12
3.3. Características del molde y los cebadores usados para la PCR.	14
3.4. Concentraciones de los componentes esenciales para la reacción de PCR.	14
3.5. Duración y temperatura de los ciclos de PCR	14
3.6. Concentraciones de los componentes esenciales para la reacción de TIV.	15
3.7. Cantidades de ODNs y Sc5-c3 usadas en los ensayos de hibridación.	21
3.8. Cantidades de ODNs marcados con FAM y Sc5-c3 usadas en los ensayos de hibridación.	22
3.9. Componentes y cantidades utilizadas para la competencia de los ODNs fluorescentes con VLPs de VPH16.	23
5.1. Valores de ΔG para la hibridación de los ODNs con Sc5-c3	40
A.1. Componentes del buffer de paro (2X)	45
A.2. Componentes del buffer TBE 10X	45
A.3. Componentes del buffer de elución de ácidos nucleicos	46
A.4. Secuencias usadas para la PCR del molde para la TIV de Sc5-c3	47
A.5. Buffer de carga de ácidos nucleicos 5X	48
A.6. Componentes del buffer de TIV 10X	48
A.7. Buffer de lisis de baculovirus	48
A.8. Buffer D-PBS 10X	48
A.9. Buffer Laemmli 2X	49
A.10. Buffer del gel concentrador	49
A.11. Buffer del gel separador	49
A.12. Buffer Tris-Glicina-SDS	49
A.13. Buffer de transferencia	50

Capítulo 1

Introducción

El principio es la mitad de todo.

Pitagoras

Introduccion

Aptámeros

La palabra aptámero deriva del latín *aptus* que significa encajar y del griego *meros* que significa región (Ku et al., 2015). Los aptámeros son moléculas seleccionadas *in vitro* para unirse con alta afinidad y especificidad por un blanco molecular (Colombo et al., 2015). Los aptámeros de ácidos nucleicos son oligonucleótidos cortos de cadena sencilla con una forma tridimensional específica y compleja que le confieren la capacidad de interactuar con otras moléculas de manera no covalente e independiente de hibridación (Stoltenburg et al., 2007). Un aptámero puede tener como blanco una variedad muy grande de moléculas, pudiendo ser estas, iones, drogas, proteínas, células completas o incluso tejidos (Lai et al., 2007).

La alta afinidad de un aptámero por su blanco se refleja en las bajas constantes de disociación que presentan, comparables con las de algunos anticuerpos monoclonales, y en algunas ocasiones, hasta más bajas (Tombelli et al., 2005). La afinidad y especificidad de un aptámero se debe a su estructura tridimensional y la interacción con el blanco (Sun y Zu, 2015). Los ácidos nucleicos de cadena sencilla tienen una fuerte tendencia a plegarse en diferentes estructuras a consecuencia de la propensión de las bases a asociarse a través de apilamiento y puentes de hidrógeno. Estas interacciones se facilitan debido al esqueleto flexible de fosfato-pentosas y al enlace rotatable beta-glicosídico entre las pentosas y las bases, permitiendo que las bases interactúen en un amplio rango de conformaciones (Gelinas et al., 2016). Esto da como resultado la existencia de numerosos motivos estructurales en los ácidos nucleicos de cadena sencilla, tales como tallos, bucles, protuberancias, horquillas, pseudonudos, cadenas tríplex o cuádruplex, entre muchas otras (Stoltenburg et al., 2007). Juntos, estos motivos proveen un gran conjunto de bloques de construcción

para generar estructuras intrincadas que interactúan con su diana usando fuerzas de carácter intermolecular, como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, apilamiento con estructuras planas y complementariedad con la forma del blanco (Gelinas et al., 2016) (Sun y Zu, 2015).

Selección *in vitro* de aptámeros

La mayoría de los aptámeros conocidos han sido generados *in vitro*, por un proceso conocido como evolución sistematica de ligandos por enriquecimiento exponencial o SELEX, por sus siglas en inglés. Esta técnica fue descrita por primera vez en 1990 por tres grupos de investigación independientes, que aislaron ácidos nucleicos pequeños con funciones predefinidas (Mayer, 2009). El SELEX permite la identificación de moléculas únicas de DNA o RNA de una larga población de oligonucleótidos aleatorizados, llamada biblioteca, que se unen con alta afinidad y especificidad al blanco de interés (Tombelli et al., 2005). Los oligonucleótidos de la poza tienen dos características generales principales:

- (a) Contienen regiones de secuencia conocida de 18 a 21 nucleótidos que flanquean la porción aleatorizada, lo que permite la posterior amplificación de las secuencias por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- (b) Contienen una región de secuencia variable, sintetizada de manera aleatoria de entre 20 y 80 nucleótidos.

De esta manera, las pozas generadas contienen aproximadamente 10^{15} secuencias diferentes, siendo cada miembro de la biblioteca un oligómero lineal con una secuencia única, que potencialmente se plegarán en estructuras tridimensionales distintas (Pestourie et al., 2005). La poza de oligonucleótidos aleatorizados es un elemento indispensable de cualquier tipo de SELEX, decidiendo si se empleará una biblioteca de RNA o DNA de cadena sencilla (ssDNA). Después de que se ha generado la poza de RNA o ssDNA aleatorizado, se incuba directamente con la molécula o diana de interés, que puede inmovilizarse a diferentes soportes inertes o utilizarse en solución (Mairal et al., 2008). Seguido de la incubación, las secuencias de ssDNA o RNA que se unieron al blanco deben ser separadas de aquellas que no lo hicieron. A este paso se le conoce como partición o segregación, y es crítico durante la selección de un aptámero afectando fuertemente la especificidad y afinidad del aptámero (Li et al., 2014). Una vez que se realizó la partición, las moléculas que se unieron al blanco son disociadas y amplificadas. Mediante ciclos iterativos de selección y amplificación, es posible reducir el amplio conjunto de oligonucleótidos aleatorizados a unas pocas secuencias que tengan motivos estructurales con alta afinidad al blanco. En la figura 1.1 se aprecia un esquema del proceso general de selección de aptámeros por SELEX. Una de las grandes ventajas del SELEX es la posibilidad de adaptar las condiciones a futuras aplicaciones durante el proceso de selección. Por otra parte, la mayor desventaja del SELEX está relacionada con

la naturaleza del blanco, pues no se conoce hasta el momento una manera de determinar si cierta diana será apropiada o no para el proceso de selección, por lo que aún no es posible predecir si el procedimiento será exitoso (Mayer, 2009).

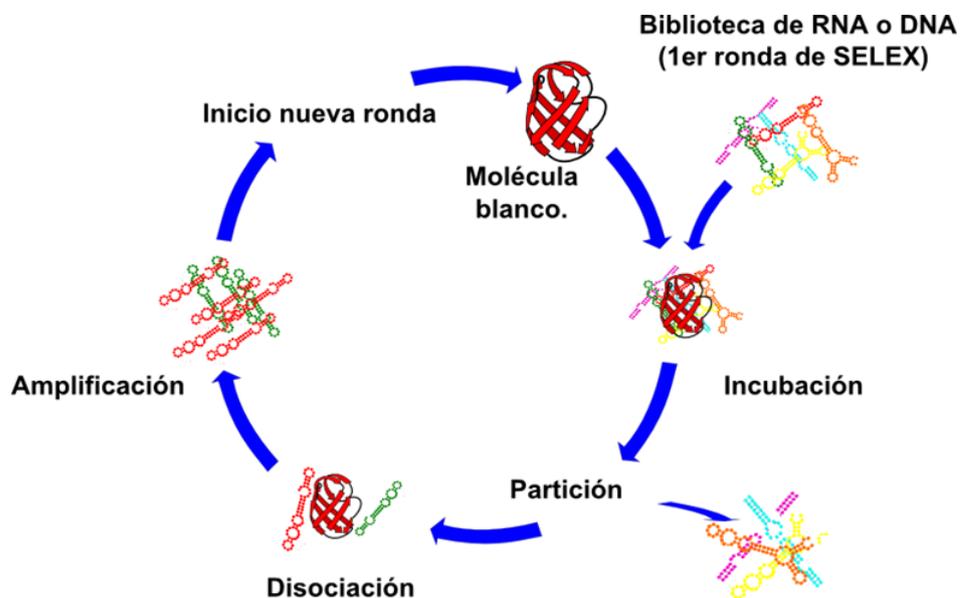


Figura 1.1: Selección de aptámeros *in vitro* mediante SELEX. Imagen tomada de (Rangel Guerrero, 2016).

Aplicaciones de los aptámeros

Los avances en el SELEX han logrado el aislamiento de aptámeros con constantes de disociación en el rango nanomolar, múltiples blancos o resistencia a nucleasas (Darmostuk et al., 2015). Esto ha permitido que los aptámeros puedan usarse en varias aplicaciones biomédicas, incluyendo:

- Como herramientas de investigación
- En bioensayos
- Para la detección de células
- En la tinción de tejidos
- Para la imagenología *in vivo* e *in vitro*
- Con fines terapéuticos
- En la nanomedicina
- Para la seguridad alimentaria y el monitoreo del ambiente
- Para la detección de células y otros analitos

Aptámeros aplicados a biosensores

Un biosensor es un dispositivo diseñado para la detección de una molécula, que combina un componente biológico con un detector fisicoquímico (figura 1.2). El componente biológico es usualmente el elemento de reconocimiento, es decir, la parte que reconoce la presencia de la molécula blanco, mientras que el detector fisicoquímico traduce el reconocimiento del componente biológico en una señal medible. Hoy en día, el biosensor más extendido es el que se utiliza para monitorear los niveles de glucosa en sangre, que usa a la enzima glucosa oxidasa para romper la glucosa presente en la sangre produciendo una liberación de electrones en una corriente detectable (MacKay et al., 2014).

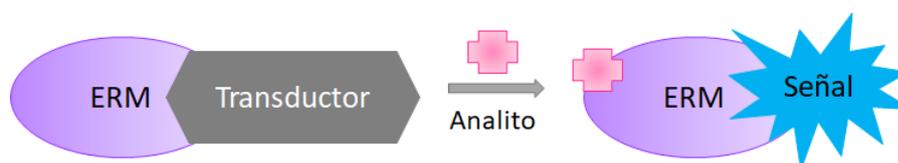


Figura 1.2: **Componentes de un biosensor.** La unión entre el analito y el ERM (elemento de reconocimiento molecular) produce una señal detectable a través del transductor. Modificado de (Navani y Li, 2006).

No sólo las enzimas pueden ser usadas como elemento de reconocimiento molecular en un biosensor. Estos elementos pueden variar, utilizándose también anticuerpos, o aptámeros. En este sentido, los aptámeros suponen una herramienta atractiva para el desarrollo de biosensores, pues un aptámero puede unirse fuertemente a su blanco, además de cambiar su conformación cuando ocurre la unión (Abe et al., 2013). Otras ventajas que presentan los aptámeros sobre los anticuerpos que los hacen una opción atractiva para los biosensores se basa en el hecho de que se seleccionan *in vitro*, siendo posible seleccionar aptámeros que se unan al blanco bajo condiciones predefinidas, lo cual puede ser difícil de lograr para un anticuerpo. Otra gran ventaja de los aptámeros es que se pueden producir mediante síntesis química, sin la necesidad de utilizar animales, lo que reduce los costos y lleva a la producción de lotes mucho más homogéneos. Por su naturaleza, los aptámeros de ácidos nucleicos son fácilmente inmovilizados en soportes sólidos, además de ser capaces de volverse a plegar, tomando su conformación nativa después de una ronda de detección, lo que generaría dispositivos reutilizables (Navani y Li, 2006). Además, los aptámeros pueden ser marcados directamente con una molécula de señalización, lo que permite su lectura directa del complejo aptámero-diana, sin la necesidad de otros componentes en el ensayo (Willner y Zayats, 2007).

Existen diferentes métodos por los cuales la presencia del blanco puede ser reportada por los biosensores. Estos generalmente caen en tres categorías: detección óptica, detección eléctrica o electroquímica y detección mecánica. Aunque todas estas técnicas son estudiadas y aplicadas, la mayoría de los investigadores prefieren utilizar la detección electroquímica ya que tiende a ser más simple, más precisa,

más sensible y más barata que otros métodos (Abe et al., 2013).

La detección electroquímica consiste en medir cambios en las propiedades eléctricas del sistema que ocurrirán sólo cuando el analito se encuentre en el medio. La aproximación más simple a este tipo de detección consiste en la inmovilización de un extremo del ácido nucleico funcional en una superficie y posteriormente medir sus propiedades eléctricas. Por lo general estas superficies suelen ser de oro, pues sus propiedades eléctricas están bien establecidas y la inmovilización covalente de ácidos nucleicos a esta superficie puede ser lograda fácilmente. Para ocasionar un cambio en la conductividad del electrodo de oro suele usarse una etiqueta óxido/reductora como azul de metileno o ferroceno en un extremo del aptámero, con el otro extremo del aptámero unido al electrodo de oro. De esta manera la distancia entre la etiqueta óxido reductora y la superficie del electrodo cambia cuando el blanco se encuentra en el medio, generando un cambio en la corriente que puede ser medido utilizando voltamperometría (MacKay et al., 2014).

En los últimos años varios biosensores han sido desarrollados siguiendo este enfoque. Tal es el caso de un sensor electrónico, libre de reactivos para la detección de ácidos nucleicos (Xiao et al., 2006). Este sensor consta de una estructura de DNA unida covalentemente a un electrodo de oro (sonda de captura), que se encuentra parcialmente hibridada con una sonda de señalización marcada en un extremo con una etiqueta óxido-reductora. La hibridación parcial de la sonda de captura con la de señalización genera una estructura tallo-burbuja que mantiene alejado el agente redox del electrodo de oro. Cuando el DNA blanco entra en el medio, éste desplaza a la sonda de señalización generando un cambio conformacional y aumentando significativamente la tasa de transferencia de electrones entre el motivo óxido-reductor y el electrodo, produciéndose una señal medible (figura 1.3).

Este mismo equipo de trabajo desarrolló un sensor electrónico muy similar para la detección de una proteína: la trombina (Xiao et al., 2005). En este caso el sensor se construyó inmovilizando un aptámero de DNA contra la trombina a un electrodo de oro y una sonda de DNA parcialmente complementaria a la secuencia del aptámero marcada con una etiqueta óxido-reductora. La hibridación del aptámero con la sonda forma un complejo de doble cadena. Esto genera un equilibrio conformacional entre el dúplex y la estructura G-cuádruplex necesaria para la unión del aptámero con la trombina. Cuando la trombina entra en el sistema, se favorece la estructura G-cuádruplex, liberando el extremo de la sonda, lo que produce una señal electrónica medible (figura 1.4).

Antecedentes

Nuestro equipo de trabajo se encuentra enfocado en el aislamiento y caracterización de ácidos nucleicos funcionales con fines terapéuticos o de diagnóstico para la detección de la infección por el virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer cérvico-uterino. El VPH es un virus relevante en la salud humana, debido a

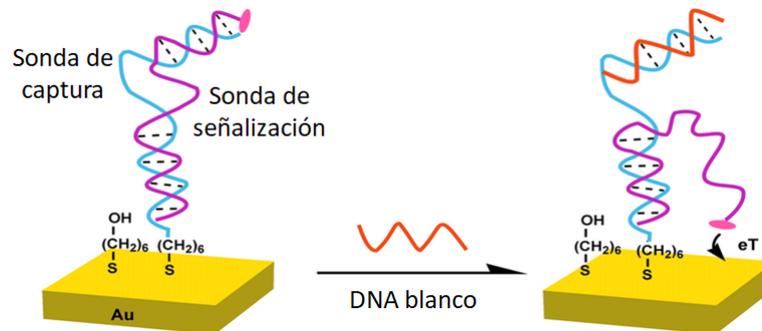


Figura 1.3: **Esquema del biosensor electrónico de DNA (E-DNA)**. La sonda de captura (en azul) se encuentra unida covalentemente a un electrodo de oro con tioles espaciadores ($\text{S}-(\text{CH}_2)_6\text{-OH}$). En ausencia del DNA blanco la sonda de captura marcada en el extremo con una etiqueta redox se encuentra híbrida con la sonda de señalización (en morado), lo que le confiere cierta rigidez que la aleja del electrodo de oro. Al agregar al medio el DNA blanco, la sonda de señalización es desplazada acercándose al electrodo lo que aumenta la tasa de transferencia de electrones (eT), generando una señal electrónica medible. (Xiao et al., 2006)

su potencial oncogénico. A pesar de que existen varios tipos de VPH, el VPH16, que es responsable de cerca del 50% de los casos de cáncer cérvico-uterino en el mundo (Castellsagué, 2008). La causa directa del cáncer cervical ocasionado por el HPV son las oncoproteínas virales E6 y E7. Por este motivo, Toscano-Garibay y colaboradores, aislaron en 2011 un aptámero contra una proteína E7 recombinante de HPV16. Se probó la especificidad de este aptámero (llamado G5 α 3N.4) en un extracto proteico libre de células. Este aptámero podría usarse para la detección de cáncer cervical causado por VPH-16, pues G5 α 3N.4 produce complejos específicos con células de carcinoma VPH positivas (Toscano-Garibay et al., 2011). En el 2014, Lejia-Montoya y colaboradores aislaron y caracterizaron un aptámero de RNA llamado Sc5-c3, que reconoce partículas tipo virales o VLPs de VPH16. Las VLPs de VPH16 son estructural e inmunológicamente similares a viriones infecciosos y el aptámero Sc5-c3 se une de manera estable y específica a éstas, incluso en mezclas complejas, como biofluidos, lo que lo convierte en una herramienta potencial para el diagnóstico de infecciones activas de VPH (Lejia-Montoya et al., 2014). La estructura secundaria del aptámero Sc5-c3 fue determinada mediante digestiones con RNasa A, RNasa T1 y RNasa V1. Con base en esta información se construyó la estructura secundaria de Sc5-c3 con ayuda del servidor Mfold (véase figura 1.2). A continuación se enlistan las diferentes regiones de Sc5-c3:

- S1 o Tallo 1: 10 nucleótidos en doble cadena con una pequeña burbuja asimétrica de 1 base.
- B1 o Burbuja 1: 4 nucleótidos en cadena sencilla

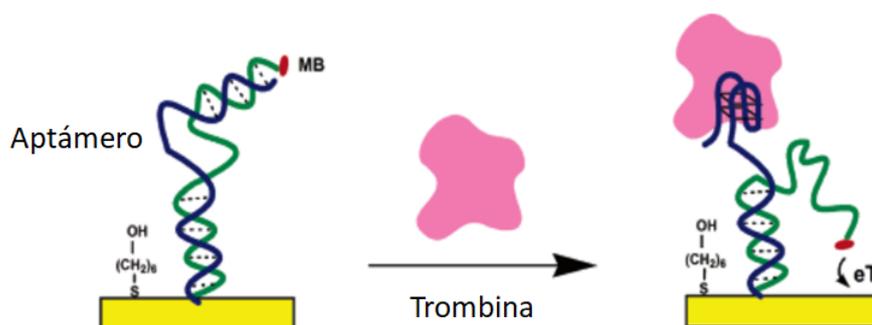


Figura 1.4: **Esquema del biosensor electroquímico basado en el aptámero de la trombina (E-AB)**. El aptámero de DNA contra la trombina (en azul) se encuentra unido covalentemente a un electrodo de oro con tioles espaciadores ($S-(CH_2)_6-OH$). Una secuencia de DNA marcada con una etiqueta redox (en verde) se encuentra formando un complejo de doble cadena con el aptámero, alejando a la molécula redox del electrodo. Al agregar la trombina, el aptámero toma la conformación de G-cuádruplex liberando la sonda marcada, que se acerca al electrodo aumentando la tasa de transferencia de electrones (eT), generando una señal electrónica medible (Xiao et al., 2005).

- S2 o Tallo 2: 10 nucleótidos en cadena doble
- ML o Región del bucle mayor: 16 nucleótidos en cadena sencilla, que también puede formar una estructura inestable de doble cadena con las bases G19-C27 y G20-C26.
- UR o Región 3' no estructurada de 18 nucleótidos

Se determinó además las regiones en donde Sc5-c3 interacciona con las VLPs mediante ensayos de protección a nucleasas (figura 1.2), demostrando que cuando Sc5-c3 entra en contacto con las VLPs de VPH16, la estructura de la región ML cambia, favoreciendo la conformación de cadena sencilla. Mutaciones en diferentes regiones del aptámero probaron que las posiciones A18, A23 y C27 dentro de la región ML son muy importantes para el reconocimiento del aptámero por el blanco (Leija-Montoya et al., 2014).

Debido a la alta afinidad que tiene Sc5-c3 por las VLPs de VPH16, este aptámero podría utilizarse en muchas de las aplicaciones que tienen los ácidos nucleicos funcionales. Actualmente nuestro equipo de trabajo está utilizando a Sc5-c3 como un inhibidor de la infección de VPH16 (Valencia-Reséndiz, datos no publicados), y como elemento de reconocimiento molecular en la creación de un biosensor óptico usando nanopartículas de oro (Palomino-Vizcaino et al., 2018)

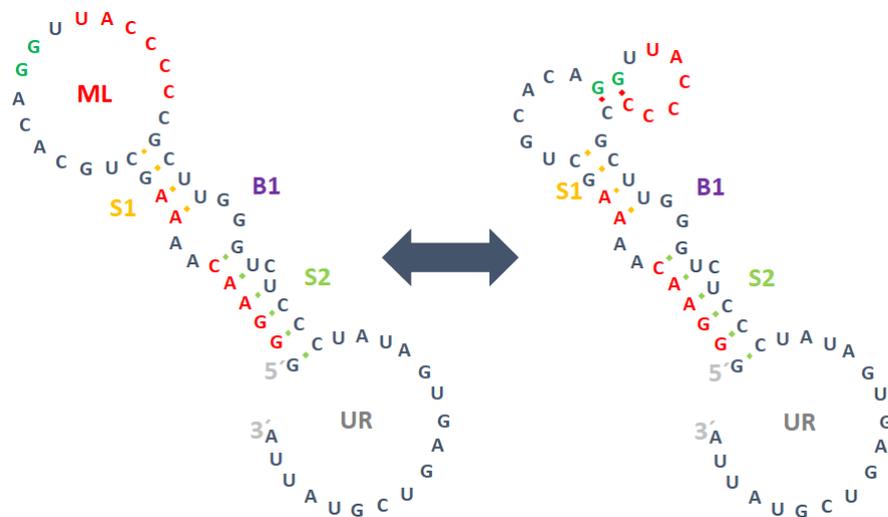


Figura 1.5: **Representación esquemática de la estructura secundaria del aptámero Sc5-c3.** En verde se muestra las bases que forman la estructura alterna de doble cadena. Las bases en rojo indican las bases que interactúan de manera directa con las VLPs. ML= Región del bucle mayor, S1= Tallo 1, B1= Burbuja 1, S2= Tallo 2, UR= Región 3' no estructurada. La secuencia del aptámero Sc5-c3 se encuentra protegida por el número de patente mexicana 327972 (Leija-Montoya et al., 2014).

Capítulo 2

Planteamiento del problema

La formulación de un problema es más importante que su solución.

Albert Einstein

Hipótesis

Si el aptámero Sc5-c3 tiene mayor afinidad por las VLPs de VPH16 que por un oligonucleótido complementario, entonces al poner en contacto el aptámero con las VLPs, el oligonucleótido dejará de interactuar con el aptámero, encontrándose libre en el sistema.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la secuencia y longitud que debe tener un oligonucleótido complementario a Sc5-c3 para que sea capaz de disociarse de Sc5-c3 en presencia de VLPs de VPH16.

Objetivos Particulares

1. Diseñar y purificar los ODNs complementarios al aptámero Sc5-c3 de diferentes tamaños.
2. Verificar la hibridación de los ODNs diseñados con el aptámero Sc5-c3.
3. Analizar la interacción del aptámero Sc5-c3 con los oligodeoxinucleótidos complementarios en competencia con VLPs de VPH16.

Capítulo 3

Aspectos metodológicos

Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado.

Albert Szent-Györgyi

Estrategia Experimental

La estrategia experimental consistió en tres partes principales:

1. Obtención de los elementos necesarios para realizar los ensayos: ODNs purificados, Sc5-c3 y VLPs de VPH16
2. Hibridación de los ODNs con Sc5-c3
3. Confirmar si los ODNs son capaces de disociarse de Sc5-c3 en presencia de VLPs de VPH16

En la figura 3.1 se muestra un diagrama de flujo que esquematiza la estrategia experimental

Materiales y Métodos

Diseño de los ODNs

Se diseñaron oligonucleótidos complementarios a la región ML del aptámero Sc5-c3. Se escogió esta región para la hibridación de los ODNs por dos razones principales:

- Seis de las dieciséis bases de esta región mantienen contacto directo con las VLPs de VPH16, y son importantes para su unión con Sc5-c3 (Leija-Montoya et al., 2014).

- Esta región se encuentra en cadena sencilla, por lo que el diseño de ODNs complementarios a esta es más sencillo.

Se sintetizaron un total de 5 ODNs complementarios a la región ML de Sc5-c3. El primero de ellos es complementario a 15 de las 16 bases de ML. Los siguientes ODNs se sintetizaron con dos posiciones menos al extremo 5' hasta llegar a una longitud total de 7 nucleótidos. Las características generales de los ODNs sintetizados se resumen en la tabla 3.1.

Para verificar que los ODNs no formaban hibridaciones estables entre ellos mismos (homodímeros) o con otras regiones de Sc5-c3 (heterodímeros), se realizó un análisis de la estabilidad. Este análisis se muestra en la tabla 3.2. El homodímero más estable tiene un valor de $\Delta G = -4.41$ kcal/mol, mientras que el heterodímero más estable tiene un valor de $\Delta G = -9.21$ kcal/mol.

Nombre del ODN	Secuencia	Número de bases	PM	T_m (°C)
Oligo 1	5'GGGGGTAACCTGTGC 3'	15	4649.1	57.7
Oligo 2	5'GGGTAACCTGTGC 3'	13	3990.6	44.6
Oligo 3	5'GTAACCTGTGC 3'	11	3332.2	34.5
Oligo 4	5' AACCTGTGC 3'	9	2698.8	27.9
Oligo 5	5'CCTGTGC 3'	7	2072.4	16.8

Tabla 3.1: **Características de los ODNs complementarios a Sc5-c3.** El peso molecular y la T_m de los ODNs fue calculada utilizando Oligoanalyzer (OligoAnalyzer y IDT-DNA-Integrated, 2012). Considerar que para un híbrido RNA-DNA la T_m puede ser $\pm 2.7^\circ\text{C}$ (Sugimoto et al., 1995).

	Homodímeros	Heterodímeros
	Dímero más probable	
Oligo 1	$\Delta G = -4.41$ kcal/mol	$\Delta G = -9.21$ kcal/mol
Oligo 2	$\Delta G = -4.41$ kcal/mol	$\Delta G = -6.14$ kcal/mol
Oligo 3	$\Delta G = -3.14$ kcal/mol	$\Delta G = -4.41$ kcal/mol
Oligo 4	$\Delta G = -3.14$ kcal/mol	$\Delta G = -4.41$ kcal/mol
Oligo 5	$\Delta G = -3.14$ kcal/mol	$\Delta G = -3.30$ kcal/mol

Tabla 3.2: **Homodímeros de los diferentes ODNs y heterodímeros de los ODNs con Sc5-c3.** Los valores de ΔG de los homodímeros y heterodímeros fueron calculados utilizando Oligoanalyzer (OligoAnalyzer y IDT-DNA-Integrated, 2012).

Síntesis y purificación de los ODNs

Todos los oligonucleótidos usados fueron sintetizados por T4 oligo (ADN Sintético SAPI de C.V., Irapuato Gto.)

Los ODNs liofilizados se centrifugaron a 15,900 g durante 5 minutos. Posteriormente se resuspendieron en 60 μL de agua libre de nucleasas. Se tomaron 30 μL de los ODNs resuspendidos y se mezclaron con 30 μL de buffer de paro 2X (Apéndice A, tabla A.1). La mezcla se calentó por 10 minutos a 80°C y se incubó en hielo por 10 minutos. Las muestras se separaron mediante PAGE desnaturante en un gel acrilamida-bisacrilamida 19:1 al 18% TBE 1X (Apéndice A, tabla A.2) Urea 7M a 250 V por 4 horas. Al finalizar la electroforesis el gel se envolvió en un film plástico y se colocó sobre una placa fluorescente irradiándose con luz ultravioleta de onda corta (320 nm). Las bandas más abundantes se recuperaron y fueron extruidas con una jeringa de 5 mL en un microtubo de 1.5 mL. Se agregaron 500 μL de buffer de elución para ácidos nucleicos (Apéndice A, tabla A.3) a cada microtubo. La elución de los ODNs se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo la elución se hizo pasar por un filtro con un poro de 0.45 μm . El filtrado se depositó en una columna de Sephadex G25, y se agregaron 5 mL de agua libre de nucleasas. El líquido eluido se recuperó en 10 fracciones de 500 μL cada una. Las fracciones obtenidas fueron cuantificadas mediante espectrofotometría UV. Las fracciones más concentradas fueron sometidas a PAGE desnaturalizante en un gel de acrilamida-bisacrilamida 19:1 al 8% TBE 1X Urea 7M, a 125 V por 45 minutos. Algunos geles fueron teñidos con SYBR®Green II 1:5,000 durante 10 minutos y escaneados con el equipo Typhoon TRIO, utilizando el filtro 526 SP y el laser azul (488 nm). Otros geles simplemente fueron sometidos a luz UV de onda corta sobre una placa de TLC, técnica conocida como UV shadowing.

Síntesis del aptámero Sc5-c3

Para producir *in vitro* el aptámero Sc5-c3, el primer paso a seguir es amplificar el molde de DNA a partir del cual se realizara la transcripción (véase figura (3.2)). Para esto se realizó una reacción de PCR del DNA molde sintético. Los cebadores y el molde utilizados en esta reacción fueron previamente purificados y proporcionados por la M. en C. Diana Valencia Reséndiz. Las características del molde y los cebadores usados pueden revisarse en la tabla 3.3, mientras que las secuencias se encuentran en la tabla A.4. Las concentraciones de templado, cebadores, MgCl_2 , dNTPs y Taq polimerasa se incluyen en la tabla 3.4, mientras que la duración y temperaturas de los ciclos de PCR se detallan en la tabla 3.5. La reacción de PCR se verificó en un gel de acrilamida-bisacrilamida 19:1 al 8% TBE 1X en el que se cargaron 2 μL de reacción de PCR, mezclados con 2 μL de buffer de carga de ácidos nucleicos 5X (Apéndice A, tabla A.5).

	Molde(p+Sc5-c3)	Cebador forward	Cebador reverse
Longitud	75 bases	30 bases	30 bases
Contenido G-C	46.7	38.7%	66.7%
T_m	70.9°C	68°C	71.9°C

Tabla 3.3: **Características del molde y los cebadores usados para la PCR.** Las temperaturas de fusión fueron calculadas con Oligoanalyzer (OligoAnalyzer y IDT-DNA-Integrated, 2012).

Reactivo	Concentración final en la reacción
DNA molde	5.8×10^{28} copias
Buffer PCR 10X	1X
Cebadores	0.25 μ M de cada uno
MgCl ₂	1.5 mM
DNTPs	200 μ M de cada uno
Taq DNA polimerasa	2.5 U por reacción

Tabla 3.4: **Concentraciones de los componentes esenciales para la reacción de PCR.** El volumen final de cada reacción fue de 50 μ L.

1 ciclo	30 ciclos			1 ciclo	1 ciclo
Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final	Mantenimiento
95°C 1 minuto	94°C 1 minuto	60°C 30 segundos	72°C 1 minuto	72°C 3 minutos	4°C ∞

Tabla 3.5: **Duración y temperatura de los ciclos de PCR.**

El producto de PCR obtenido es uno de los elementos principales para la reacción de transcripción *in vitro* (TIV). Los demás componentes utilizados y sus concentraciones se describen en la tabla 3.6. La composición del buffer de TIV 10X se detalla en el apéndice A, tabla A.6. Una vez preparada, la reacción de TIV fue incubada a 37°C durante toda la noche. Al finalizar este periodo de incubación, se agregaron a la reacción 8U de DNAsaI, y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

La TIV fue purificada mediante PAGE desnaturizante en un gel acrilamida-bisacrilamida 19:1 al 8% TBE 1X Urea 7M a 250 V por 1 hora. Después de la electroforesis el gel fue teñido con bromuro de etidio (EtBr) por 5 minutos. La banda correspondiente al aptámero fue cortada y extruida en un tubo de 1.5 mL. A cada tubo se le añadió 500 μ L de buffer de elución, y se incubaron a 4°C por durante toda la noche. Las muestras fueron filtradas utilizando un filtro de 0.45 nm. A este filtrado se le realizó una extracción fenólica agregándole 400 μ L de TRIzol® y 80 μ L de cloroformo, se mezcló por inversión 3 veces y se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 15,900 g y temperatura ambiente. La frac-

ción acuosa fue recuperada y se le añadió 900 μL de isopropanol, mezclándose por inversión e incubándose a -20°C durante toda la noche. El RNA precipitado se centrifugó a 15,900 g durante 45 minutos. Se decantó el sobrenadante y el botón fue lavado agregando 900 μL de etanol al 75 % y centrifugando a 13,000 rpm durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 20 μL de agua libre de nucleasas, agregando 8U de inhibidor de RNAsas para prevenir una posible degradación.

	Concentración final en la reacción
DTT	5 mM
Buffer de TIV 10X	1X
rNTPs	0.41 mM
Inhibidor de RNAsas	8U por reacción
RNA polimerasa T3	5U por reacción
pPCR	cbp 60 μL

Tabla 3.6: **Concentraciones de los componentes esenciales para la reacción de TIV.** El volumen final de cada reacción fue de 60 μL

Producción de partículas tipo virus(VLPs) de VPH16

La producción de VLPs de VPH16 se realizó como se reportó antes por (Leija-Montoya et al., 2014). En el diagrama 3.3 se muestran los pasos generales que se siguieron para la producción de VLPs.

La línea celular Sf21 de InvitrogenTM derivadas de la línea ILPLB-Sf-21 AE de *Spodoptera frugiperda* se cultivo en botellas de 75 cm^2 a 26°C utilizando el medio SF900TM libre de suero. Cuando el cultivo alcanzó el 80 % de confluencia, el medio fue cambiado y las células se infectaron con la cantidad necesaria de baculovirus recombinantes con la secuencia de L1 de VPH16 para que el índice de multiplicidad de la infección (MOI) fuera igual a 1.

Los Baculovirus recombinantes fueron producidos por la Dra. Leija Montoya mediante el sistema de expresión Bac-to-Bac de InvitrogenTM (véase (Leija-Montoya et al., 2014)).

Las células infectadas se incubaron a 26°C durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de infección, el medio fue desechado y las células fueron cosechadas. Las células fueron centrifugadas a 15000 g durante 6 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de buffer de lisis de baculovirus (Apéndice A, tabla A.7). La suspensión celular se repartió en dos microtubos de 1.5 mL previamente siliconizados. Se agregaron 40 μL de una solución 25X del coctel de inhibidor de proteasas cCompleteTM. Las células fueron lisadas utilizando un sonicador a 60 % de amplitud por 3 ciclos de 5 segundos (15 segundos) intercalados por descansos de 5 segundos. Los lisados celulares fueron incubados a

37°C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se agregó la cantidad suficiente de Benzona para tener una concentración final del 0.1 %, incubando 1 hora a 37°C. Después de este tiempo, se añadió a cada tubo 170 μ L de NaCl 5M y los tubos fueron incubados en hielo por 10 minutos.

Los lisados fueron centrifugados a 3000 g por 15 minutos a 4°C. Las VLPs se purificaron a partir de este clarificado usando un gradiente de CsCl. Para esto 10 mL de una solución de CsCl al 27 % (p/p) fue colocada en los tubos para centrifuga de 14x89 mm. A este tubo se le agregó en la parte superior el clarificado utilizando puntas siliconizadas. Posteriormente se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman XL-90 usando un rotor SW41Ti a 175274g durante 20 horas a 16°C utilizando una aceleración máxima y una desaceleración sin freno. Al acabar la centrifugación se recuperó una banda blanquecina correspondiente a las VLPs purificadas y se dispuso en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer®(10 kDa). Las VLPs se dializaron usando 600 mL de D-PBS 1X (Apéndice A, tabla A.8) durante 12 horas a 4°C. El D-PBS 1X fue cambiado cada 12 horas durante 3 días. Al terminar la diálisis las VLPs fueron almacenadas en tubos siliconizados a 4°C, y posteriormente cuantificadas y caracterizadas por inmunodetección en fase sólida.

Ensayo de inmunotransferencia en fase sólida

Se mezclaron 25 μ g de VLPs purificadas con la cantidad suficiente de buffer Laemmli 2X (Apéndice A, tabla A.9) y se calentaron a 90°C durante 10 minutos. Las muestras fueron cargadas en un gel típico de un SDS-PAGE. Este gel tenía en la parte superior un gel concentrador acrilamida:bis 29:1 al 4 % preparado con buffer concentrador (Apéndice A, tabla A.10) y en la parte inferior un gel separador acrilamida-bisacrilamida 29:1 al 8 % preparado con buffer separador (Apéndice A, tabla A.11). La electroforesis se llevó a cabo a 80V por 2 horas, utilizando buffer TGSDS 1X como buffer de corrida (Apéndice A, tabla A.12).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF utilizando buffer de transferencia (Apéndice A, tabla A.13) con tres ciclos turbo de transferencia en el Trans-Blot®Turbo™Transfer System de Bio-Rad. Las membranas fueron bloqueadas en una solución de PBS+ 0.1 % Tween 20 con 10 % de leche descremada en polvo durante 2 horas en agitación constante a temperatura ambiente. Después del bloqueo la membrana fue incubada con el anticuerpo primario anti-L1 de VPH16 (Santa Cruz) con una dilución 1:500, usando como disolvente PBS+ 0.1 % Tween 20 durante toda la noche en agitación constante a 4°C. Se realizaron 3 lavados de la membrana por 10 minutos utilizando 30 mL de PBS+ 0.1 % Tween 20. Al finalizar los lavados se incubó la membrana con un anticuerpo secundario durante 2 horas con una dilución 1:2000 de un anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa (Santa Cruz) diluido con PBS+ 0.1 % Tween 20 con 3 % de leche. Las membranas se lavaron nuevamente con PBS+ 0.1 % Tween 20 3 veces por 10 minutos. El revelado se llevó a cabo agregando 500 μ L de Luminata Forte Western HRP substrate. La quimioluminiscencia de la reacción se detectó usando el equipo C-digit.

Hibridación de Sc5-c3 con los ODNs

Se probó la hibridación entre Sc5-c3 y los ODNs a diferentes temperaturas. Para confirmar la hibridación a temperatura ambiente (25°C) se colocaron 2.8 pmol de Sc5-c3 con al menos un exceso de 76 veces del ODN a hibridar. En la tabla 3.7 se detallan las cantidades utilizadas de cada ODN. La mezcla de hibridación se incubó por 2 horas a 25°C. Pasado este tiempo, las hibridaciones se incubaron en hielo por 10 minutos y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Adicionalmente se realizaron ensayos en donde la mezcla de hibridación se calentó a 90°C durante 10 minutos. Al terminar este tiempo se apagó el baño de agua y se dejó que la temperatura descendiera gradualmente hasta alcanzar los 35°C, proceso que tomó aproximadamente 2 horas. Las hibridaciones se incubaron en hielo por 10 minutos y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Es importante señalar que, para poder determinar si el patrón electroforético cambió para las muestras hibridadas, se prepararon muestras que contenían únicamente el aptámero ó el ODN, como referencia (tabla 3.7). Estas muestras se sometieron a los mismos cambios de temperatura a las que se sometieron las hibridaciones.

Una vez preparadas las mezclas de hibridación, estas se analizaron utilizando PAGE nativo utilizando un gel de acrilamida-bisacrilamida 19:1 en gradiente del 8 al 15 % TBE 1X. En este gel se cargaron 5 μ L del ensayo de hibridación mezclados con 1 μ L de buffer de carga para ácidos nucleicos 5X. La electroforesis fue a 125 V por 30 minutos. Pasado este tiempo, el gel fue teñido con SYBR®Green II 1:5,000 durante 10 minutos y escaneado con el equipo Typhoon TRIO, utilizando el filtro 526 SP y el laser azul (488 nm).

Hibridación de los ODNs modificados con FAM

Las mezclas de hibridación usando ODNs marcados en el extremo 5' con el fluoróforo FAM se realizaron como se detalla en la tabla 3.8. Una vez preparadas, las hibridaciones fueron incubadas a 25°C durante 2 horas. Las muestras se mantuvieron el hielo por 10 minutos y se almacenaron a -20°C en tubos ámbar hasta su uso.

Las hibridaciones se verificaron en un gel de acrilamida-bis 19:1 en gradiente del 8 al 15 % TBE 1X. En el gel se cargaron 10 μ L del ensayo de hibridación mezclados con 2 μ L de buffer de carga para ácidos nucleicos 5X, sometiendo el gel a un voltaje de 125V por 50 minutos. Al terminar la electroforesis el gel fue enjuagado en agua bidestilada durante 5 minutos y escaneado con el equipo Typhoon TRIO, utilizando el filtro 520 BP y el laser verde (532 nm).

Interacción del aptámero Sc5-c3 con los ODNs fluorescentes en competencia con VLPs de VPH16

Las hibridaciones de los ODNs fluorescentes se mezclaron con cantidades crecientes de VLPs de VPH16. Las cantidades utilizadas se especifican en la tabla

3.9. Como control, las hibridaciones fueron incubadas con proteínas no relacionadas como BSA. También se incluyó un control con oligo fluorescente y VLPs, para verificar que estos no interactúan. Una vez preparadas las mezclas de interacción, se colocaron en un agitador de orbital a 25°C durante 1 hora. Al terminar la incubación las muestras se colocaron en hielo durante 10 minutos y se cargaron en un gel acrilamida-bisacrilamida 19:1 en gradiente del 8 al 15% TBE 1X mezclandolas con 6 μ L de buffer de carga de ácidos nucleicos 5X. El gel se corrió a 125V durante 50 minutos, se enjuagó en agua bidestilada durante 5 minutos y se escaneó en el equipo Typhoon TRIO, utilizando el filtro 520 BP y el laser verde (532 nm).

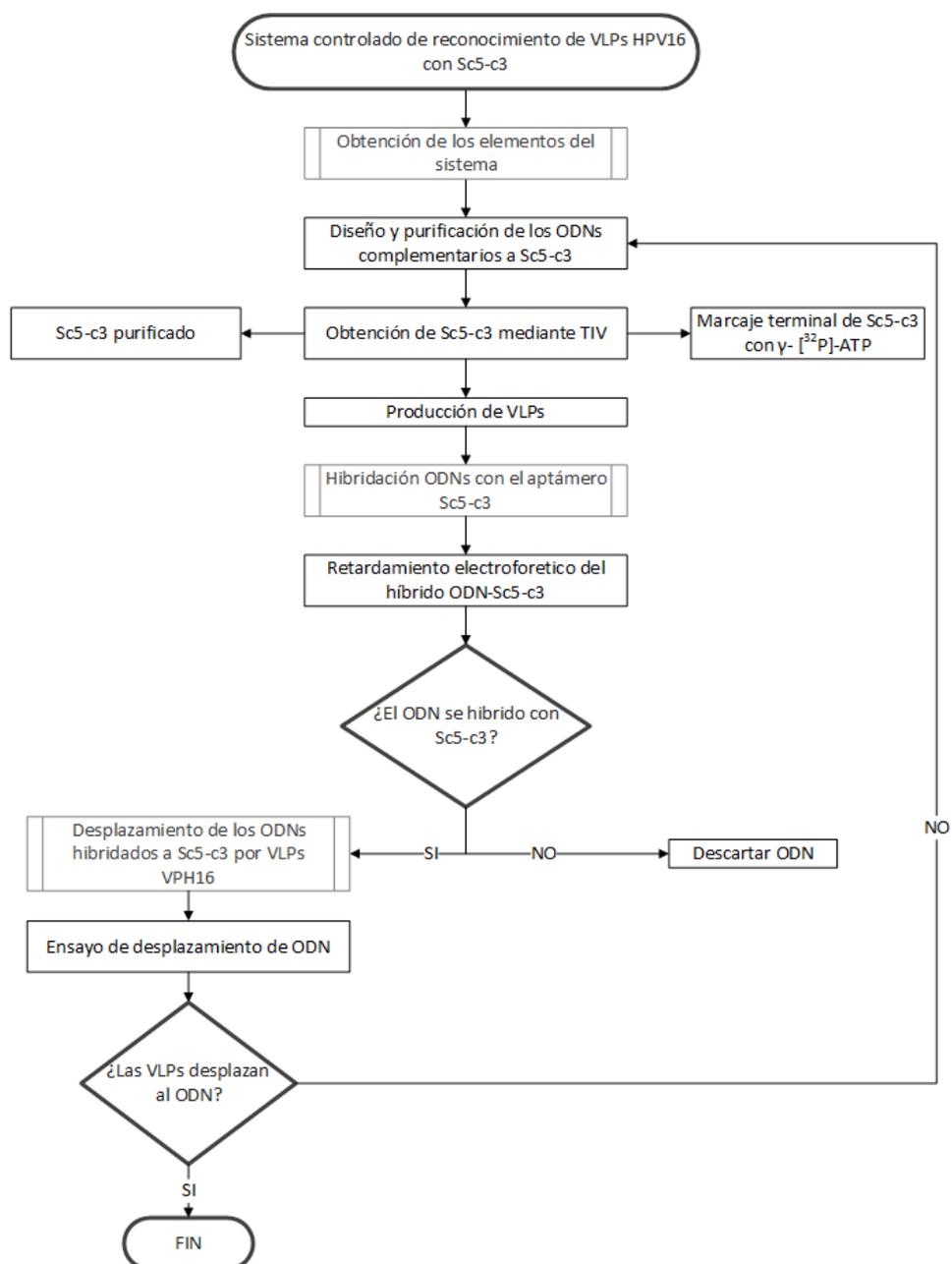


Figura 3.1: Diagrama de la estrategia experimental

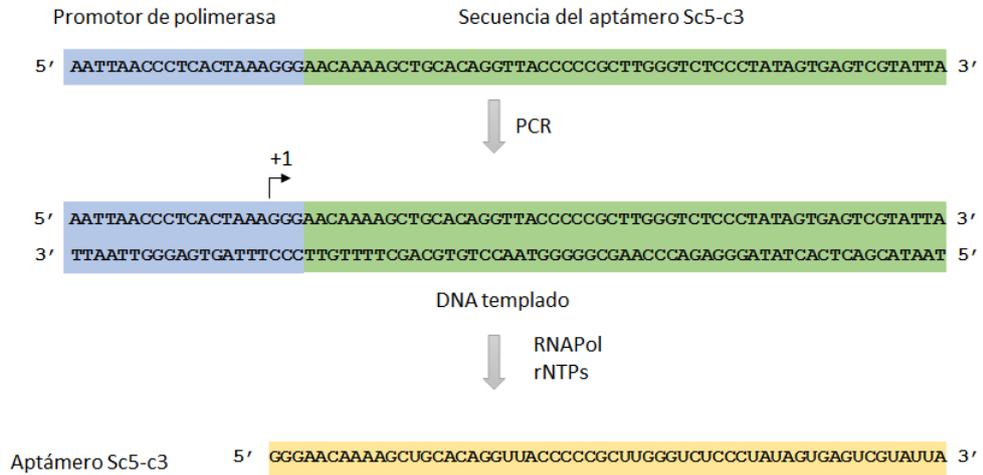


Figura 3.2: **Diagrama general de la síntesis de RNA mediante TIV.** Se muestran los diferentes pasos a seguir para obtener el aptámero Sc5-c3 a partir de un molde de DNA sintético

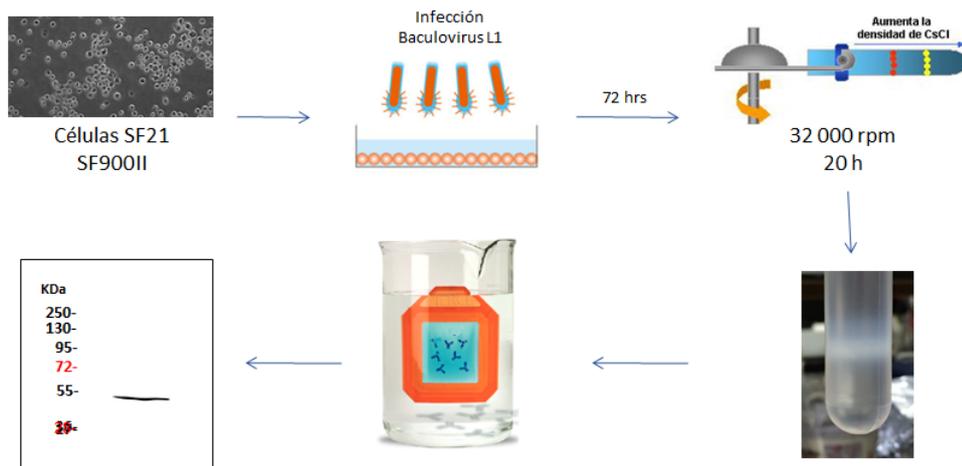


Figura 3.3: Esquema general de la producción de VLPs.

Hibridación de Oligo 1 con Sc5-c3			
Componentes	Control Oligo 1	Control Sc5-c3	Hibridación Oligo 1 + Sc5-c3
Oligo 1	215.1 pmol	-	215.1 pmol
Sc5-c3	-	2.83 pmol	2.83 pmol
H ₂ O libre de nucleasas	cbp 50μL		
Hibridación de Oligo 2 con Sc5-c3			
Componentes	Control Oligo 2	Control Sc5-c3	Hibridación Oligo 2 + Sc5-c3
Oligo 2	250.6 pmol	-	250.6 pmol
Sc5-c3	-	2.83 pmol	2.83 pmol
H ₂ O libre de nucleasas	cbp 50μL		
Hibridación de Oligo 3 con Sc5-c3			
Componentes	Control Oligo 3	Control Sc5-c3	Hibridación Oligo 3 + Sc5-c3
Oligo 3	300 pmol	-	300 pmol
Sc5-c3	-	2.83 pmol	2.83 pmol
H ₂ O libre de nucleasas	cbp 50μL		
Hibridación de Oligo 4 con Sc5-c3			
Componentes	Control Oligo 4	Control Sc5-c3	Hibridación Oligo 4 + Sc5-c3
Oligo 4	370 pmol	-	370 pmol
Sc5-c3	-	2.83 pmol	2.83 pmol
H ₂ O libre de nucleasas	cbp 50μL		
Hibridación de Oligo 5 con Sc5-c3			
Componentes	Control Oligo 5	Control Sc5-c3	Hibridación Oligo 5 + Sc5-c3
Oligo 5	483	-	483 pmol
Sc5-c3	-	2.83 pmol	2.83 pmol
H ₂ O libre de nucleasas	cbp 50μL		

Tabla 3.7: Cantidades de ODNs y Sc5-c3 usadas en los ensayos de hibridación.

Hibridación de Oligo 1-FAM con Sc5-c3		
Componentes	Control Oligo 1-FAM	Hibridación Oligo 1-FAM + Sc5-c3
Oligo 1-FAM	0.1 pmol	0.1 pmol
Sc5-c3	-	10 pmol
H ₂ O libre de nucleasas	cbp 10μL	
Hibridación de Oligo 2-FAM con Sc5-c3		
Componentes	Control Oligo 2-FAM	Hibridación Oligo 2-FAM + Sc5-c3
Oligo 2-FAM	0.1 pmol	0.1 pmol
Sc5-c3	-	50 pmol
H ₂ O libre de nucleasas	cbp 10μL	
Hibridación de Oligo 3-FAM con Sc5-c3		
Componentes	Control Oligo 3-FAM	Hibridación Oligo 3-FAM + Sc5-c3
Oligo 3-FAM	0.1 pmol	0.1 pmol
Sc5-c3	-	50 pmol
H ₂ O libre de nucleasas	cbp 10μL	

Tabla 3.8: Cantidades de ODNs marcados con FAM y Sc5-c3 usadas en los ensayos de hibridación.

Tabla 3.9: Componentes y cantidades utilizadas para la competencia de los ODNs fluorescentes con VLPs de VPH16.

Desplazamiento del Oligo 1-FAM							
a) CONTROLES							
	O1-FAM	Hibridación	O1-FAM+VLPs	O1-FAM+VLPs	O1-FAM+VLPs	O1-FAM+VLPs	Hibridación+BSA
O1-FAM	0.1 pmoles	-	0.1 pmoles	0.1 pmoles	0.1 pmoles	0.1 pmoles	-
Hibridación Sc5-c3-O1-FAM	-	10 μ L	-	-	-	-	10 μ L
VLPs de VPH16	-	-	2.5 μ g	5 μ g	7.5 μ g	-	-
BSA	-	-	-	-	-	-	7.5 μ g
Inhibidor de RNAsas RiboLock	-	-	-	-	-	-	20 U
DPBS 1X	-	-	-	cbp 30 μ L	-	-	-
b) PROBLEMA							
	Hibridación+VLPs						
Hibridación Sc5-c3-O1-FAM	10 μ L						
VLPs de VPH16	2.5 μ L	2.5 μ L	5.1 μ L	5.1 μ L	7.6 μ L	7.6 μ L	7.6 μ L
Inhibidor de RNAsas RiboLock	20 U						
DBPS 1X	-	-	-	cbp 30 μ L	-	-	-
Desplazamiento del Oligo 2-FAM							
a) CONTROLES							
	O2-FAM	O2-FAM	O2-FAM	O2-FAM+VLPs	O2-FAM+VLPs	O2-FAM+VLPs	Hibridación+BSA
O2-FAM	0.1 pmoles	-					
Hibridación Sc5-c3-O2-FAM	-	-	-	-	-	10 μ L	10 μ L
BSA	-	-	-	-	-	-	7.5 μ g
VLPs de VPH16	-	-	-	7.6 μ g	-	-	-
Inhibidor de RNAsas RiboLock	-	-	-	-	-	-	20 U
DPBS 1X	-	-	-	cbp 30 μ L	-	-	-
b) PROBLEMA							
	Hibridación+VLPs						
Hibridación Sc5-c3-O2-FAM	10 μ L						
VLPs de VPH16	2.5 μ L	2.5 μ L	5.1 μ L	5.1 μ L	7.6 μ L	7.6 μ L	7.6 μ L
Inhibidor de RNAsas RiboLock	20 U						
DBPS 1X	-	-	-	cbp 30 μ L	-	-	-

Capítulo 4

Resultados

La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad.

Jules Verne

Purificación de los oligodesoxinucleótidos complementarios al aptámero

Los ODNs sintetizados se purificaron utilizando PAGE desnaturizante basándose en dos criterios: la abundancia y la migración en el gel. El producto de síntesis completo debería ser el más abundante; sin embargo, vemos que esto no se cumple en el caso del oligo 1 y 2, donde los productos principales no tienen el patrón de migración esperado (figura 4.1).

Para verificar la integridad y pureza de los ODNs purificados se realizó un PAGE desnaturizante (figura 4.2). Este gel fue teñido con el colorante fluorescente SYBR®Green II, pues los ODNs no pudieron visualizarse con otro colorante menos sensible como el bromuro de etidio (EtBr). Conforme los ODNs disminuyen su tamaño, menor capacidad tiene el SYBR®Green II para teñirlos (figura 4.2a), posiblemente por que el número de bases para interactuar disminuye, lo que resultó en una tinción muy tenue para los oligos 4 y 5. Se optó por utilizar UV Shadowing para visualizar los oligos 4 y 5, ya que esta técnica no depende de la interacción de colorantes fluorescentes con los ODNs a visualizar. Con esta técnica los oligos 4 y 5 fueron visualizables, mostrando el patrón electroforético esperado (figura 4.2b).

Síntesis del aptámero Sc5-c3

PCR del DNA molde

Una vez realizada la PCR de la secuencia molde para la transcripción del aptámero Sc5-c3, se procedió a verificar la reacción de PCR en un PAGE nativo. La

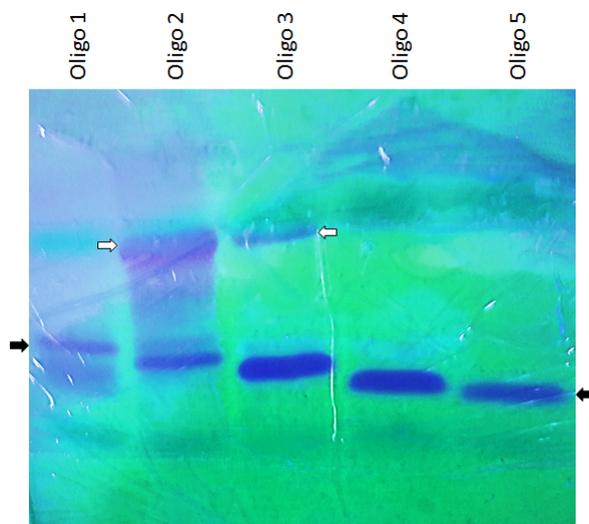


Figura 4.1: **Purificación de los ONDs usando PAGE desnaturizante.** Gel al 20% 7M urea visualizado mediante luz UV. Las flechas negras muestran los ODNs recuperados, mientras que las flechas blancas señalan los productos secundarios de la síntesis que fueron separados por tamaño

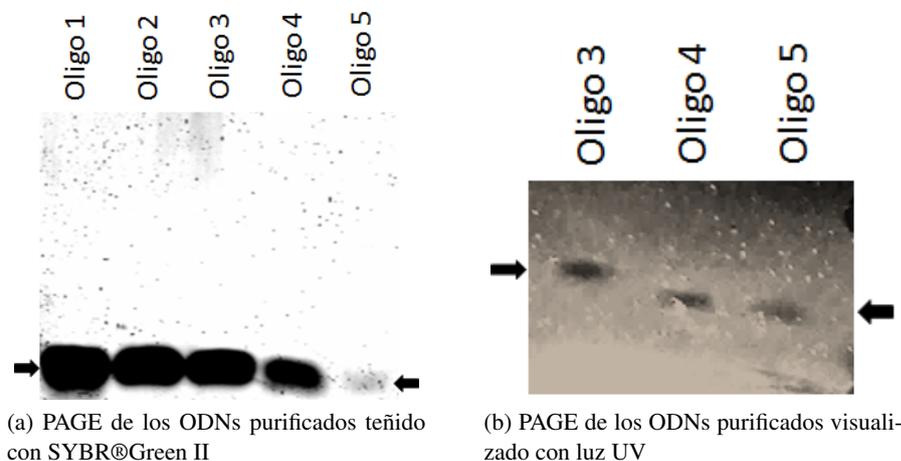


Figura 4.2: **PAGE desnaturizante de los ODNs purificados.** Geles al 8%, 7M urea. (a): Se cargaron en el gel 50 ng del oligo 1 y 2, 150 ng del O3 y 180 ng del O5. Posterior a la electroforesis el gel fue teñido con SYBR®Green II 1:5,000. (b): Se cargaron en el gel 100 ng del oligo 3 y 500 ng del oligo 4 y 5. Después de la electroforesis el gel fue sometido a luz UV usando como fondo una placa florescente. Las flechas negras señalan la banda única correspondiente al ODN purificado

reacción de PCR se realizó como se indica en la sección de materiales y métodos. De acuerdo con lo esperado, no se obtuvo ningún amplicón en la reacción que no tiene molde, mientras que la reacción que contiene molde presentó un único amplicón del tamaño esperado (75 bp) (figura 4.3).

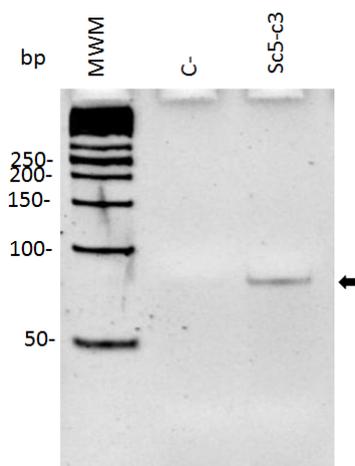


Figura 4.3: **Amplificación por PCR del molde para transcribir Sc5-c3.** PAGE al 8% teñido con EtBr. MWM: Marcador de peso molecular de 50 bp; C-: Control negativo de PCR; Sc5-c3: Producto de la amplificación del molde para producir Sc5-c3. La flecha negra señala el único amplicón obtenido de 75 bp.

TIV de Sc5-c3

Los productos secundarios de la reacción de transcripción fueron separados del aptámero Sc5-c3 mediante PAGE desnaturizante. La banda correspondiente a Sc5-c3 de 58 bases se identificó por su abundancia y su migración con respecto al colorante xylen-cyanol (figura 4.4)

Hibridación entre los ODNs y el aptámero Sc5-c3

En la figura 4.5 se muestra un gel representativo de un ensayo de hibridación entre el oligo 1 y Sc5-c3. Se puede notar que bajo estas condiciones, la hibridación entre el oligo 1 y el aptámero Sc5-c3 puede visualizarse claramente en un PAGE nativo, pasando la mayoría de Sc5-c3 a formar parte de un complejo de menor migración electroforética (flechas blancas). Esta hibridación ocurrió cuando el ensayo se lleva a cabo a 25°C y también a 90°C. Lo mismo ocurre en el caso de la hibridación del oligo 2 con Sc5-c3, donde se formó una cantidad notable de la especie de mayor migración electroforética tanto a 25°C como a 90°C (figura 4.6).

En el caso de la hibridación del oligo 3 con Sc5-c3, también es posible apreciar una banda de menor migración electroforética, correspondiente al híbrido oligo



Figura 4.4: **Purificación de la reacción de TIV.** PAGE al 8% desnaturizante teñido con EtBr. La flecha negra señala el transcrito correspondiente a Sc5-c3.

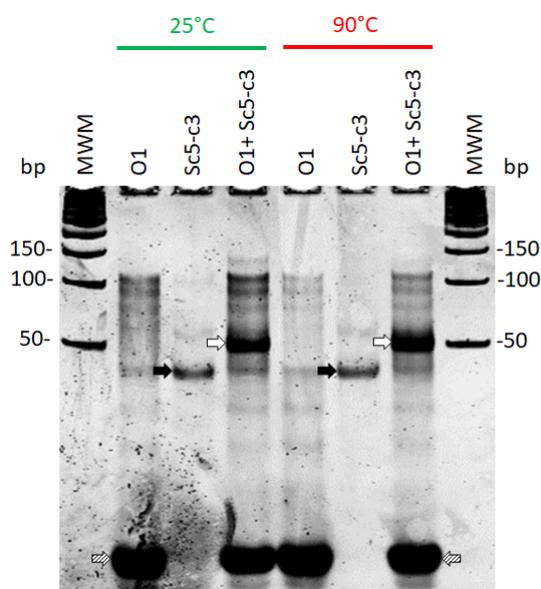


Figura 4.5: **Hibridación entre el oligo 1 y el aptámero Sc5-c3.** PAGE en gradiente del 8% al 15% teñido con SYBR®Green II. MWM: Marcador de peso molecular de 50 bp; O1: Oligo 1; O1+Sc5-c3: Oligo 1 hibridado con Sc5-c3. Las flechas negras señalan a Sc5-c3, las flechas blancas al híbrido O1+Sc5-c3 y las flechas con franjas diagonales al oligo 1 libre.

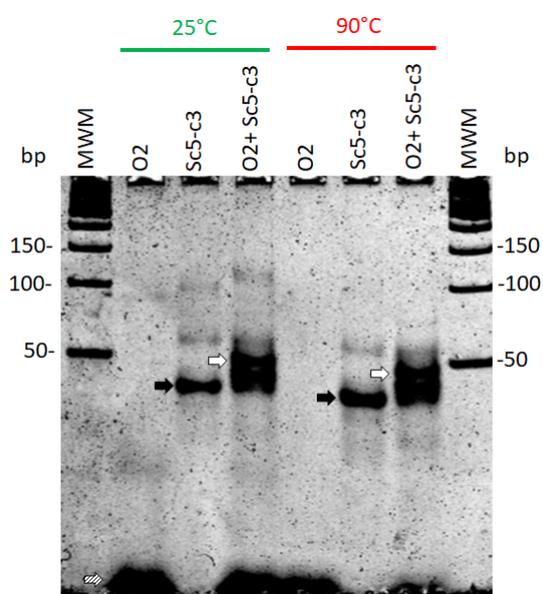


Figura 4.6: **Hibridación entre el oligo 2 y el aptámero Sc5-c3.** PAGE en gradiente del 8% al 15% teñido con SYBR®Green II. MWM: Marcador de peso molecular de 50 bp; O2: Oligo 2; O2+Sc5-c3: Oligo 2 hibridado con Sc5-c3. Las flechas negras señalan a Sc5-c3, las flechas blancas al híbrido O2+Sc5-c3 y las flechas con franjas diagonales al oligo 2 libre.

3-Sc5-c3 únicamente cuando la hibridación se llevó a cabo a 25°C (figura 4.7). Además, la banda de menor migración electroforética se apreció de baja intensidad, a diferencia de la observada en el caso de los híbridos entre el oligo 1-Sc5-c3 y oligo 2-Sc5-c3. No se observó ninguna banda en el carril que contiene al oligo libre, pues su tinción se dificulta a las cantidades que fueron cargadas en el gel.

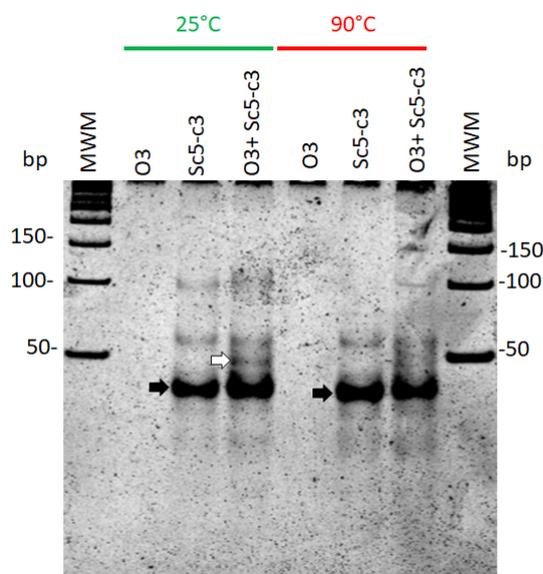


Figura 4.7: **Hibridación entre el oligo 3 y el aptámero Sc5-c3.** PAGE en gradiente del 8% al 15% teñido con SYBR®Green II. MWM: Marcador de peso molecular de 50 bp; O3: Oligo 3; O3+Sc5-c3: Oligo 3 hibridado con Sc5-c3. Las flechas negras señalan a Sc5-c3, las flechas blancas al híbrido O3+Sc5-c3.

No fue posible visualizar en un PAGE nativo la hibridación entre el oligo 4 y Sc5-c3, como se puede apreciar en la figura 4.8, y tampoco se observó el oligo 4 libre en los carriles que lo contienen. Lo mismo ocurrió en el caso de la hibridación entre el oligo 5 y Sc5-c3 (figura 4.9), faltando el complejo de menor migración electroforética y el oligo 5 libre.

Interacción del aptámero Sc5-c3 con los ODNs en competencia con VLPs de VPH16

Producción y purificación de las VLPs de VPH16

Para verificar el desplazamiento de los ODNs hibridados con Sc5-c3 en presencia de las VLPs de VPH16, fue necesaria la producción y purificación de VLPs de VPH16. Los detalles técnicos de este procedimiento se especifican en la metodología. La producción de la proteína L1 se evaluó mediante inmunodetección en fase sólida que se muestra en la figura 4.10. La proteína purificada mostró un

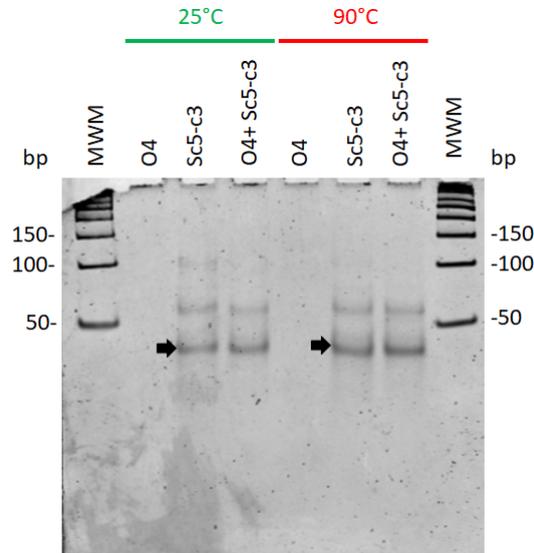


Figura 4.8: **Hibridación entre el oligo 4 y el aptámero Sc5-c3.** PAGE en gradiente del 8% al 15% teñido con SYBR®Green II. MWM: Marcador de peso molecular de 50 bp; O4: Oligo 4; O4+Sc5-c3: Oligo 4 hibridado con Sc5-c3. Las flechas negras señalan a Sc5-c3.

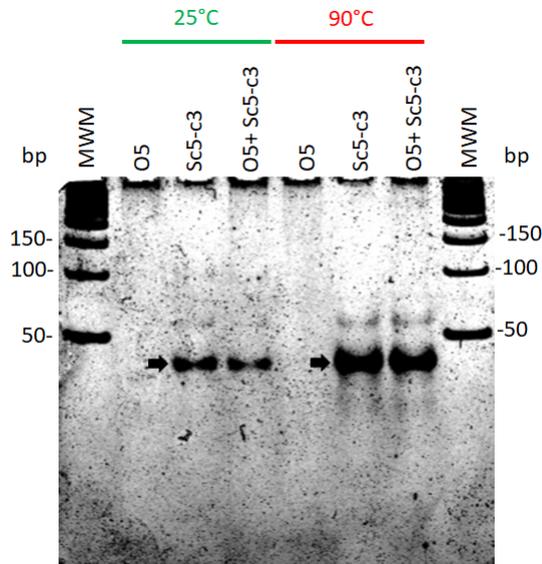


Figura 4.9: **Hibridación entre el oligo 5 y el aptámero Sc5-c3.** PAGE en gradiente del 8% al 15% teñido con SYBR®Green II. MWM: Marcador de peso molecular de 50 bp; O5: Oligo 5; O5+Sc5-c3: Oligo 5 hibridado con Sc5-c3. Las flechas negras señalan a Sc5-c3.

patrón de corrimiento electroforético esperado, correspondiente al observado para otras preparaciones de VLPs que han sido analizadas por microscopía electrónica, en las que se demuestra la formación de VLPs.



Figura 4.10: **Inmunodetección en fase sólida de VLPs de VPH16.** Anticuerpo anti L1 de VPH16

Interacción del aptámero Sc5-c3 con los ODNs en competencia con VLPs de VPH16

El principal objetivo de esta tesis fue determinar si existía desplazamiento de los ODNs complementarios a Sc5-c3 cuando las VLPs de VPH16 se añadieran mediante ensayos de retardamiento electroforético. Hay dos maneras de realizar el retardamiento electroforético. La primera de ellas consiste en marcar radioactivamente el aptámero Sc5-c3 e hibridarlo con los ODNs sin marcar. En la figura 4.11 se muestra el resultado esperado para este experimento.

Se ha reportado que las VLPs de VPH16 producidas por el autoensamblaje de la proteína L1 tienen un tamaño de 60 nm, similar al de los viriones nativos (Zhao et al., 2005). Con este dato, se realizó un gel con un poro lo suficientemente grande como para que entrara el complejo Sc5-c3-VLP, pero capaz de resolver los ácidos nucleicos libres. Se sabe que el tamaño de poro aparente para un gel de acrilamida/bisacrilamida con un 4%T y un 1.2%C es de 200 nm aproximadamente (Stellwagen, 1998). Se preparó un gel de poliacrilamida nativo con una parte superior al 4% de acrilamida-bisacrilamida 80:1, abarcando un cuarto del volumen del gel, mientras que la parte inferior comprendía tres cuartas partes del volumen con una concentración en gradiente del 8 al 15% con un radio acrilamida-bisacrilamida 19:1 (figuras 4.12,4.13). En este gel se cargaron distintas cantidades de la interacción de Sc5-c3 con VLPs de VPH16, cargando además como control

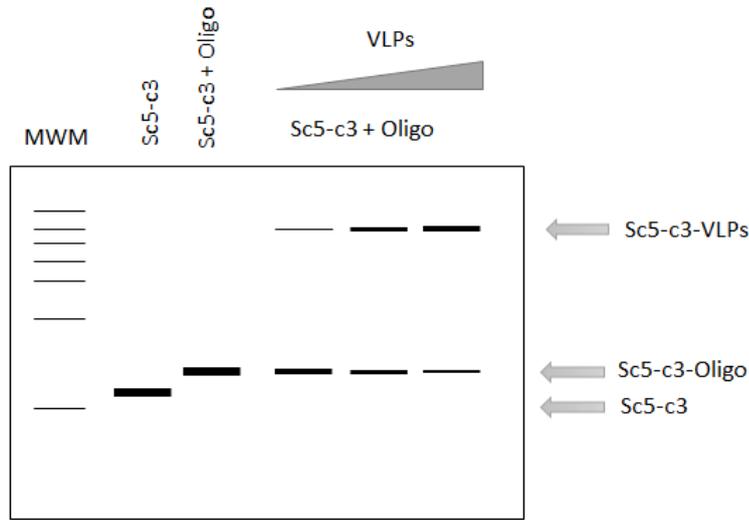


Figura 4.11: **Esquema del resultado esperado para la interacción del aptámero Sc5-c3 marcado hibridado con un ODN en competencia con VLPs de VPH16.**

la misma cantidad de Sc5-c3 en el carril contiguo. Al teñir los ácidos nucleicos con SYBR®Green II, se puede notar que, a pesar de que se cargó la misma cantidad de Sc5-c3 en los carriles 3-4, 5-6 y 7-8 la cantidad de Sc5-c3 disminuye en los carriles 4, 6 y 8, que son los mismos que contienen VLPs. Por otra parte, no se observó la presencia de ninguna banda en la parte superior del gel, en donde se esperaban encontrar el complejo Sc5-c3-VLP, posiblemente por que al unirse a las VLPs el aptámero Sc5-c3 quedó protegido de la tinción con SYBR®Green II. Para evidenciar la presencia de los complejos proteicos, el mismo gel fue teñido con azul de Coomassie al 0.1 %, obteniéndose una banda muy tenue en los carriles que contenían VLPs (figura 4.13), sin embargo esta banda no se encuentra en la parte superior del gel, donde se esperaba el complejo Sc5-c3-VLPs, lo que sugiere que las VLPs están perdiendo su estructura, encontrándose en el gel como monómeros de L1.

Se investigó más sobre la estabilidad de las VLPs en geles de poliacrilamida, encontrándose que los oligómeros de L1 ensamblados en las VLPs de VPH16 producidas en células Sf21 son disgregados en monómeros de L1 dependiendo del pH y la temperatura del gel durante la electroforesis (Zhao et al., 2005). Es necesario que el sistema tenga un pH de 7 y que la temperatura del gel se mantenga a 7°C para prevenir la reordenación de los enlaces disulfuro entre los monómeros de L1. Es por este motivo que cuando se trató de realizar un retardamiento electroforético del complejo Sc5-c3 se obtuvieron complejos proteicos cuyo tamaño correspondía a monómeros de L1 (figura 4.13). El gel realizado tenía un pH de 8.3 y la temperatura durante la electroforesis alcanzó temperaturas superiores a los 7°C.

Aún cuando las condiciones del gel pueden ser modificadas para mantener in-

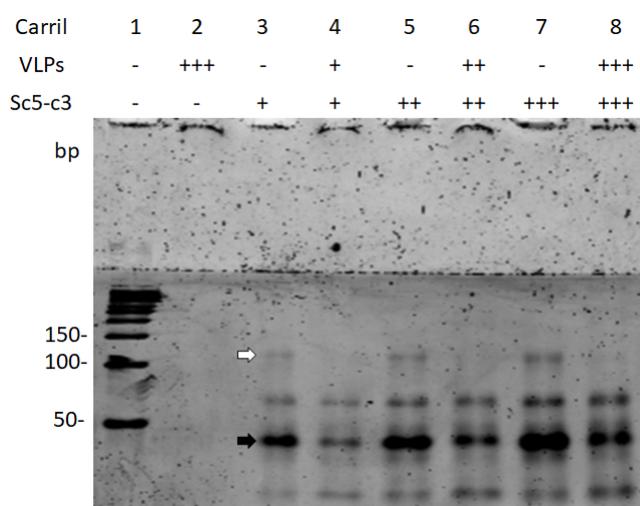


Figura 4.12: **PAGE de la interacción Sc5-c3-VLPs teñido con SYBR®Green II.** Las cantidades de Sc5-c3 cargadas en el gel fueron las mismas para los carriles 3-4, 5-6, y 7-8, con la diferencia de que los carriles 4,6 y 8 contenían además VLPs. Las flechas negras y blancas señalan las bandas que disminuyen su intensidad más notoriamente cuando se colocan VLPs.

tegras los enlaces disulfuro de las VLPs, la entrada de estas a un gel se dificulta debido a su gran tamaño. Recientemente se encontró que las VLPs de VPH16 producidas en células Sf21 tienen un tamaño de 246 nm aproximadamente (Palomino-Vizcaino et al., 2018), por lo que para que el complejo Sc5-c3-VLPs entre a un gel de acrilamida, se tendría que utilizar una solución acrilamida-bisacrilamida con 0.5 %C y un 3 %T. Estos porcentajes hacen que el gel resultante sea muy laxo y sumamente difícil de manejar. Aunque se han utilizado geles de poliacrilamida y agarosa para el ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA), los geles de poliacrilamida ofrecen mejor resolución de los complejos de proteínas-RNA; además de que algunos complejos son significativamente más estables en matrices de poliacrilamida que en agarosa o en solución (Hellman y Fried, 2007). Dichas estas dificultades, consideramos que la mejor opción era realizar el retardamiento electroforético marcando los ODNs (figura 4.14). Dado que los ODNs a utilizar tienen pocas bases, lo que dificulta su marcaje radioactivo, se optó por utilizar ODNs marcados fluorescentemente.

Ensayo de desplazamiento del ODN

Para determinar si existía desplazamiento de los ODNs en presencia de VLPs, se hicieron hibridaciones entre los ODNs fluorescentes y un exceso de Sc5c-3 de al menos 100 veces, con el objetivo de que la mayoría del ODN marcado se uniera al aptámero. Con las cantidades empleadas en este experimento, la mayoría de el

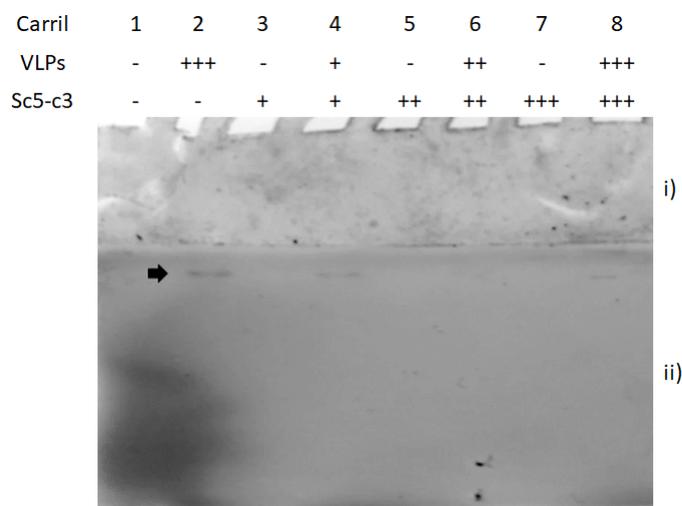


Figura 4.13: **PAGE de la interacción Sc5-c3-VLPs teñido con azul de Coomassie.** El mismo gel del la figura 4.12 fue teñido con Azul de Coomassie 0.1 %. La flecha negra señala la migración de las proteínas presentes en el gel.

oligo 1-FAM se unió a Sc5-c3, pero es claro que conforme el ODN se hace más pequeño la eficiencia de hibridación disminuye. Como se puede apreciar en la figura 4.15, el oligo 3 no pudo hibridar con Sc5-c3 bajo estas condiciones. Fue por ello, que se decidió descartar el oligo 3 de los ensayos de desplazamiento posteriores.

Una vez probada la hibridación de Sc5-c3 con el oligo 1 marcado con FAM, ésta se retó agregando concentraciones crecientes de VLPs. Conforme la cantidad de VLPs aumenta, la intensidad del complejo Sc5-c3-Oligo 1 disminuye, pero la cantidad de oligo 1 libre no aumenta, por lo que el oligo 1 no se esta separando de Sc5-c3 en presencia de las VLPs (figura 4.16). Además, conforme la concentración de VLPs aumenta, aparece un barrido en la parte superior de los carriles, indicando que el oligo 1 no se libera de Sc5-c3 cuando se agregan las VLPs, y que además Sc5-c3 continua interactuando con las VLPs aunque el oligo 1 se encuentre unido a la región ML.

Posteriormente se probó si ocurría el desplazamiento del oligo 2. Debido a sus características (tabla 3.1), la hibridación del oligo 2 con Sc5-c3 es menos estable que la que ocurre entre el aptámero y el oligo 1. Por esta razón se modificaron las condiciones de hibridación, colocando una mayor cantidad de Sc5-c3, esperando que el oligo sin hibridar disminuyera, para que si fuera desplazado por las VLPs, los cambios en la cantidad de oligo 2 libre fueran más notorios. Hechos estos ajustes, se retó la hibridación de Sc5-c3-oligo 2 con cantidades crecientes de VLPs. Los resultados se muestran en la figura 4.17. Al hibridar Sc5-c3 con el oligo 2, se formaron 2 complejos diferentes. El complejo mayoritario, de una mayor migración electroforética, no presenta cambios notorios en su intensidad cuando se le agregan cantidades crecientes de VLPs. Por otra parte, el complejo minoritario

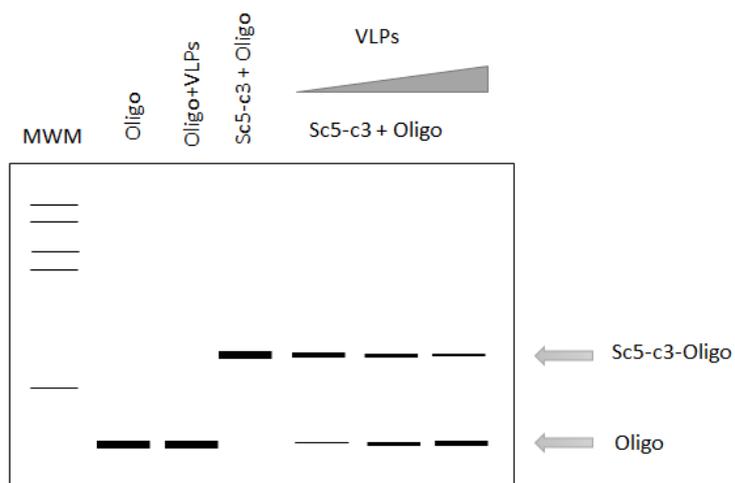


Figura 4.14: **Esquema del resultado esperado para la interacción del aptámero Sc5-c3 hibridado con un ODN marcado en competencia con VLPs de VPH16.**

presenta una disminución evidente conforme la concentración de VLPs aumenta (figura 4.17), lo que sugiere que este complejo tiene una mayor afinidad por las VLPs. No se observaron cambios en la concentración de oligo 2 libre al agregar las VLPs, por lo que se concluye que en este caso el desplazamiento tampoco está ocurriendo.

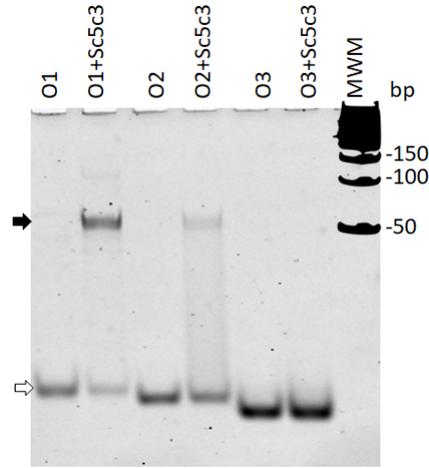


Figura 4.15: **Hibridación de los ODNs marcados fluorescentemente con Sc5-c3.** PAGE nativo en gradiente del 8 al 15%. La flecha blanca indica la migración de los ODNs, mientras la flecha negra señala una banda de mayor migración electroforética cuando se agrega Sc5-c3, lo que evidencia la hibridación.

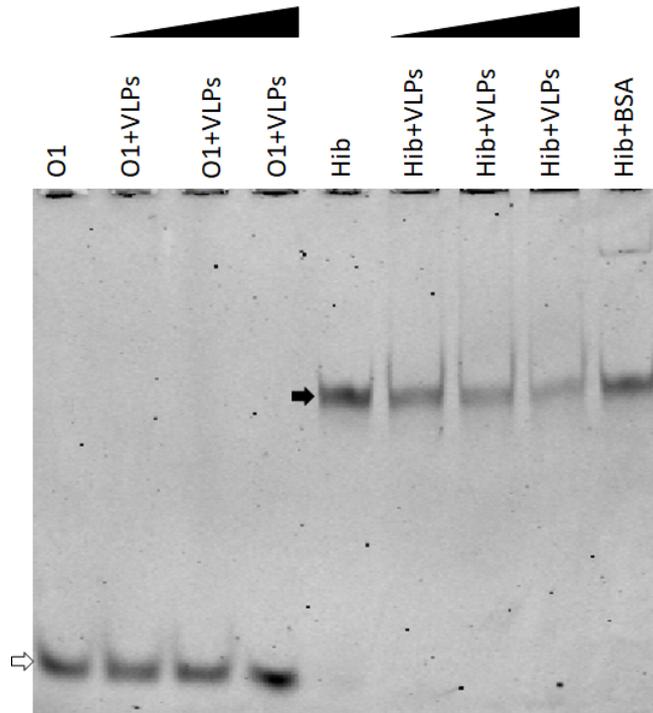


Figura 4.16: **Competencia del oligo 1 con cantidades crecientes de VLPs.** PAGE nativo en gradiente del 8 al 15%. La flecha blanca señala al oligo 1 libre. El complejo Sc5-c3-Oligo 1 se señala con la flecha negra.

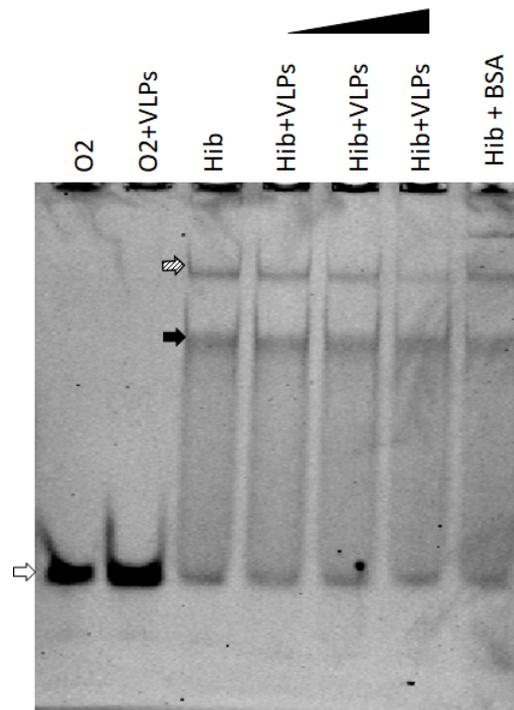


Figura 4.17: **Competencia del oligo 2 con cantidades crecientes de VLPs.** PAGE nativo en gradiente del 8 al 15 %. La flecha blanca señala al oligo 2 libre, la flecha negra señala el complejo Sc5-c3-oligo 2 mayoritario, mientras que la flecha rayada señala el complejo Sc5-c3-oligo 2 menos abundante.

Capítulo 5

Discusión

*La ciencia es todo aquello sobre lo cual
siempre cabe discusión.*

José Ortega y Gasset

Al purificar los ODNs diseñados mediante PAGE desnaturizante se vio la presencia de productos no deseados, especialmente en el caso del oligo 2, donde la mayoría de la reacción consistió en un producto secundario con una migración electroforética mucho menor que la del producto deseado, cuya movilidad corresponde a un dímero del oligonucleótido. Se ha observado que durante la síntesis de oligonucleótidos con el método de fosforamiditos usando un soporte sólido derivado de una 2'-deoxicitidina, ocurre una reacción secundaria, dando lugar a la formación de oligómeros N-ramificados, que tienen dos cadenas idénticas ligadas a los grupos 5'-hidroxil y 3'-hidroxil de la citidina (Cazenave et al., 2006). Es posible que producto secundario observado corresponda a un oligómero N-ramificado, ya que todos los ODNs utilizados en este trabajo tienen una deoxicitidina en el extremo 3' (véase tabla 3.1).

Como se puede apreciar en la tabla 5.1 conforme los ODNs van disminuyendo su tamaño, mayor es el valor de ΔG para su hibridación, lo que quiere decir que disminuye su estabilidad relativa (Breslauer et al., 1986), por lo que es de esperarse que conforme el tamaño del ODN disminuya, más inestable sea su hibridación con Sc5-c3. Esto corresponde con lo observado a lo largo de esta tesis, pues mientras el oligo 1 se une de manera estable a Sc5-c3, el oligo 2 se une más débilmente, mientras que la hibridación del oligo 3 sólo se pudo lograr cuando existe un exceso de más de 100 veces de oligo 3, que de aptámero 3.7.

La T_m de los ODNs utilizados es también una medida útil que nos ayuda a predecir la estabilidad de la hibridación de cada ODN. Se sabe que para una reacción de reasociación típica, la temperatura óptima de reasociación es de 25°C bajo la T_m (Hames y Higgins, 1985). Siendo la temperatura óptima de reasociación del oligo 1 y Sc5-c3 de 32.7°C, la del oligo 2 y Sc5-c3 de 19.6°C, la del oligo 3 y Sc5-c3 de 9.5°C. Esto concuerda con los resultados obtenidos, ya que la hibridación entre

Híbridación	ΔG	$T_m(^{\circ}C)$
Oligo 1+ Sc5-c3	$\Delta G= -30.92$ kcal/mol	57.7
Oligo 2+ Sc5-c3	$\Delta G= -24.78$ kcal/mol	44.6
Oligo 3+ Sc5-c3	$\Delta G= -18.65$ kcal/mol	34.5
Oligo 4+ Sc5-c3	$\Delta G= -16.34$ kcal/mol	27.9
Oligo 5+ Sc5-c3	$\Delta G= -13.06$ kcal/mol	16.8

Tabla 5.1: **Valores de ΔG para la hibridación de los ODNs con Sc5-c3.** Los valores de ΔG fueron calculados utilizando Oligoanalyzer (OligoAnalyzer y IDT-DNA-Integrated, 2012).

el oligo 1 y Sc5-c3 fue muy eficiente, pues teóricamente la temperatura óptima de reasociación es de 32.7°C. La hibridación entre el oligo 2 y Sc5-c3 tuvo una menor eficiencia, pues la temperatura óptima de reasociación está al menos 5°C por debajo de la temperatura a la que se llevaron a cabo los ensayos. La hibridación entre el oligo 3 y Sc5-c3 fue muy ineficiente y ocurrió únicamente a 25°C (figura 4.7). Cuando el aptámero Sc5-c3 y el oligo 3 se calentaron a 90°C se dejó que la temperatura disminuyera hasta los 35°C, temperatura que está muy por arriba de la temperatura óptima de reasociación, por lo que sería muy poco probable que la hibridación ocurriera bajo estas condiciones.

A partir de los resultados obtenidos en las hibridaciones de los ODNs sin modificar se decidieron las condiciones de los ensayos de hibridación para los ODNs fluorescentes con Sc5-c3. Los comportamientos para las hibridaciones del oligo 1-FAM y Sc5-c3 y oligo 2-FAM y Sc5-c3 resultaron semejantes a lo observado con las hibridaciones anteriores. Sin embargo la hibridación entre el oligo 3-FAM y Sc5-c3 no ocurrió a pesar de que la hibridación se incubó a 25°C. Estos cambios pueden deberse a las variaciones en la cantidad de oligo 3 y oligo 3-FAM utilizados en ambos ensayos de hibridación. Para la hibridación de oligo 3 y Sc5-c3 se utilizaron 300 pmoles de oligo 3, mientras que para la hibridación de oligo 3-FAM y Sc5-c3 se utilizaron 0.1 pmoles de oligo 3-FAM.

Al retar el complejo oligo 1-FAM-Sc5-c3 con cantidades crecientes de VLPs, se evidenció el hecho de que el aptámero Sc5-c3 se une a las VLPs aunque la región ML se encuentre en doble cadena. Se descartó que el oligo 1-FAM libre fuera liberado y unido a las VLPs, pues el oligo 1-FAM no mostró interacción con las VLPs. Estos resultados sugieren que Sc5-c3 continúa interactuando con las VLPs mediante otras regiones del aptámero, tales como S1 o S2 (figura 1.2). Otra posibilidad es que la región ML de Sc5-c3 interactúe con las VLPs utilizando los residuos de ribosa, y no con las distintas bases, lo que haría posible la unión del aptámero con su blanco aunque la región ML se encuentre en doble cadena. Esta suposición se refuerza con el hecho de que es de suma importancia que las bases de Sc5-c3 que se encuentran en contacto con las VLPs de VPH16 sean ribonucleótidos, pues al cambiarlos por deoxinucleótidos la unión de Sc5-c3 con el blanco decrece de

manera importante (Palomino-Vizcaino, datos no publicados).

Cuando se realizó la competencia del oligo 2-FAM-Sc5-c3 con VLPs no hubieron cambios en la cantidad de oligo 2-FAM libre al agregar las VLPs de VPH16 por lo que el oligo 2 tampoco es desplazado de Sc5-c3 por las VLPs de VP16. Interesantemente, en este experimento el patrón electroforético cambio notoriamente, teniendo más de una banda correspondiente al complejo oligo 2-FAM-Sc5-c3 (figura 4.17, carril 3). Estos cambios pueden deberse a la cantidad de Sc5-c3 utilizado, pues para mejorar la hibridación, se agregó una cantidad 5 veces mayor de Sc5-c3 que la utilizada para la hibridación del oligo 1-FAM-Sc5-c3. Interesantemente, el complejo mayoritario de Sc5-c3 no se ve alterado al agregar cantidades crecientes de VLPs, pero el complejo minoritario si sufre cambios (figura 4.17, carriles 4,5 y 6). Estos cambios nos llevan a pensar que aunque ambos complejos de Sc5-c3 con el oligo 2-FAM son lo suficientemente estables como para soportar la electroforésis, el complejo minoritario es menos estable y por lo tanto es el primero que cambia al momento de agregar las VLPs. A pesar de que el experimento de desplazamiento del oligo 2-FAM tiene diferencias con la del oligo 1-FAM, la conclusión general de ambos experimentos es que ninguno de los ODNs probados se separaron de Sc5-c3 por la presencia de las VLPs, y que a pesar de que estos ODNs se encuentran unidos a Sc5-c3, este sigue uniéndose a su blanco, formando un complejo oligo-Sc5-c3-VLPs.

Es posible que los ODNs utilizados en esta tesis, no cambien de manera importante la estructura de Sc5-c3, y que esta permanezca sin cambios mayores después de la hibridación, lo que le permitiría continuar uniéndose a su blanco. Para que un ODN hibridado a Sc5-c3 pueda ser desplazado por las VLPs, se sugiere realizar una estrategia similar a la del biosensor de la trombina. En este caso el aptámero utilizado tenía 12 bases en su extremo 5' que no forman parte de la estructura del aptámero. Estas bases brindaron estabilidad a la hibridación del ODN reportero, pues este sólo se encuentra unido a 5 bases del aptámero ($T_m = 16^\circ\text{C}$, $\Delta G = -8.31$ kcal/mol). La estabilidad de unión de estas nueve bases está por debajo de la de los ODNs utilizados en esta tesis (tabla 5.1), por lo que la unión puede ser más fácilmente desplazada por la trombina. Además estas 9 bases se encuentran repartidas a lo largo de la secuencia del aptámero por lo que el aptámero inmovilizado está en un equilibrio conformacional entre el duplex aptámero-reportero y la forma capaz de unirse al blanco, que tiene una conformación de G-cuádruplex. Al agregarse la trombina, la forma G-cuádruplex de unión al blanco es favorecida liberando al ODN reportero como un elemento de cadena sencilla (Xiao et al., 2005).

Un cambio de diseño semejante en el ODN bloqueador para Sc5-c3 podría resultar en el rearreglo del aptámero y evitar la interacción con las VLPs. Sin embargo, la naturaleza de la asociación Sc5-c3-VLP requiere ser mejor comprendida antes de proponer un diseño de ODN bloqueador óptimo. Los resultados del presente trabajo aportan a éste fin y contribuirán al diseño de un biosensor eficaz para la detección de la infección por VPH.

Capítulo 6

Conclusiones y perspectivas

Conclusión es el lugar donde llegaste cansado de pensar.

Anónimo

Conclusiones

- Se lograron diseñar y purificar ODNs de diferentes tamaños complementarios al aptámero Sc5-c3.
- Se obtuvieron purificadas las partículas tipo virales de VPH16.
- Se realizó la hibridación del oligo 1 con Sc5-c3 a 25°C y a 90°C.
- Se realizó la hibridación del oligo 2 con Sc5-c3 a 25°C y a 90°C.
- Se realizó la hibridación del oligo 3 con Sc5-c3 a 25°C.
- Se realizó la hibridación del oligo 1-FAM con Sc5-c3 a 25°C.
- Se realizó la hibridación del oligo 2-FAM con Sc5-c3 a 25°C.
- Se demostró que el oligo 1-FAM no se disocia de Sc5-c3 cuando son agregadas las VLPs de VPH16.
- Se demostró que el oligo 2-FAM no se disocia de Sc5-c3 cuando son agregadas las VLPs de VPH16.

Perspectivas

- Modificar las condiciones en las que se lleva a cabo la hibridación del oligo 3-FAM con Sc5-c3, para obtener un complejo oligo 3-FAM-Sc5-c3 estable.

- Diseñar nuevos ODNs que sean complementarios a más de una región de Sc5-c3 y verificar si son desplazados del aptámero por las VLPs.

Apéndice A

Apendice

*El colmo de la estupidez es aprender
lo que luego hay que olvidar.*
Erasmus de Rotterdam

Composición de las soluciones utilizadas

Buffer de paro (2X)	
Componentes	Concentración
Formamida	95 %
EDTA	20 mM
Azul de bromofenol	0.05 % (p/v)
Xilen cianol	0.05 % (p/v)

Tabla A.1: Componentes del buffer de paro (2X)

Buffer TBE 10X)	
Componentes	Concentración
Tris base	890 mM
Ácido bórico	890 mM
EDTA	20 mM
pH= 8.3	

Tabla A.2: Componentes del buffer TBE 10X

Buffer de elución de ácidos nucleicos)	
Componentes	Concentración
CH ₃ COOHNH ₄	0.5M
EDTA	1 mM
SDS	0.1 % (p/v)

Tabla A.3: Componentes del buffer de elución de ácidos nucleicos

Tabla A.4: Secuencias usadas para la PCR del molde para la TIV de Sc5-c3

Nombre	Secuencia
DNA molde	AATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGCACAGGTTACCCCGCTTGGGTCTCCCCTATAGTGAGTCGTATTA
Primer forward	AATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCT
Primer reverse	TAATACGACTCACTATAGGIGAGACCCCAAGC

Buffer de carga de ácidos nucleicos 5X	
Componentes	Concentración
Tris HCL	250 mM
Glicerol	125 % (v/v)
EDTA	25 mM
Azul de bromofenol	0.1 % (p/v)
Xilencianol	0.1 % (p/v)

Tabla A.5: Buffer de carga de ácidos nucleicos 5X

Buffer de TIV 10X	
Componentes	Concentración
Tris HCl	400 mM
MgCl ₂	60 mM
Esperimidina	20 mM
DTT	10 mM
pH= 7.9	

Tabla A.6: Componentes del buffer de TIV 10X

Buffer de lisis de baculovirus	
Componentes	Concentración
D-PBS	1X
MgCl ₂	9.5 mM
Brij-58	0.25 % (p/v)

Tabla A.7: Buffer de lisis de baculovirus

Buffer D-PBS 10X	
Componentes	Concentración
KCl	26.6 mM
KH ₂ PO ₄	14.7 mM
NaCl	1379.3 mM
Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	80.6 mM

Tabla A.8: Buffer D-PBS 10X

Buffer Laemmli 2X	
Componentes	Concentración
SDS	4 % (p/v)
Glicerol	20 % (v/v)
β -mercaptoetanol	10 % (v/v)
Azul de bromofenol	0.004 % (p/v)
Tris-HCl	0.125M
pH= 6.8	

Tabla A.9: Buffer Laemmli 2X

Buffer del gel concentrador	
Componentes	Concentración
Tris-HCl	0.5M
SDS	0.4 % (p/v)
pH= 6.8	

Tabla A.10: Buffer del gel concentrador

Buffer del gel separador	
Componentes	Concentración
Tris-HCl	0.5M
SDS	0.4 % (p/v)
pH= 8.8	

Tabla A.11: Buffer del gel separador

Buffer Tris-Glicina-SDS	
Componentes	Concentración
Tris-HCl	25mM
Glicina	192mM
SDS	0.1 % (p/v)
pH= 8.3	

Tabla A.12: Buffer Tris-Glicina-SDS

Buffer de transferencia	
Componentes	Concentración
Tris-base	25mM
Glicina	192mM
Metanol	10 % (v/v)
pH= 8.3	

Tabla A.13: Buffer de transferencia

Bibliografía

*Libros, caminos y días dan al hombre
sabiduría.*

Proverbio árabe

- ABE, K., YOSHIDA, W. y IKEBUKURO, K. Electrochemical biosensors using aptamers for theranostics. En *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes*, páginas 183–202. Springer, 2013.
- BRESLAUER, K. J., FRANK, R., BLÖCKER, H. y MARKY, L. A. Predicting dna duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 83(11), páginas 3746–3750, 1986.
- CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic oncology*, vol. 110(3), páginas S4–S7, 2008.
- CAZENAVE, C., BATHANY, K. y RAYNER, B. Formation of n-branched oligonucleotides as by-products in solid-phase oligonucleotide synthesis. *Oligonucleotides*, vol. 16(2), páginas 181–185, 2006.
- COLOMBO, M., MIZZOTTI, C., MASIERO, S., KATER, M. M. y PESARESI, P. Peptide aptamers: The versatile role of specific protein function inhibitors in plant biotechnology. *Journal of integrative plant biology*, vol. 57(11), 2015.
- DARMOSTUK, M., RIMPELOVA, S., GBELCOVA, H. y RUMML, T. Current approaches in SELEX: an update to aptamer selection technology. *Bio-technology advances*, vol. 33(6), páginas 1141–1161, 2015.
- GELINAS, A. D., DAVIES, D. R. y JANJIC, N. Embracing proteins: structural themes in aptamer-protein complexes. *Current opinion in structural biology*, vol. 36, 2016.
- HAMES, B. D. y HIGGINS, S. J. *Nucleic acid hybridisation: a practical approach*. IRL press Oxford, 1985.

- HELLMAN, L. M. y FRIED, M. G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature protocols*, vol. 2(8), páginas 1849–1861, 2007.
- KU, T.-H., ZHANG, T., LUO, H., YEN, T. M., CHEN, P.-W., HAN, Y. y LO, Y.-H. Nucleic acid aptamers: an emerging tool for biotechnology and biomedical sensing. *Sensors*, vol. 15(7), 2015.
- LAI, R. Y., PLAXCO, K. W. y HEEGER, A. J. Aptamer-based electrochemical detection of picomolar platelet-derived growth factor directly in blood serum. *Analytical chemistry*, vol. 79(1), 2007.
- LEIJA-MONTOYA, A. G., BENÍTEZ-HESS, M. L., TOSCANO-GARIBAY, J. D. y ALVAREZ-SALAS, L. M. Characterization of an RNA aptamer against HPV-16 L1 virus-like particles. *Nucleic Acid Therapeutics*, vol. 24(5), páginas 344–355, 2014.
- LI, F., ZHANG, H., WANG, Z., NEWBIGGING, A. M., REID, M. S., LI, X.-F. y LE, X. C. Aptamers facilitating amplified detection of biomolecules. *Analytical chemistry*, vol. 87(1), 2014.
- MACKAY, S., WISHART, D., XING, J. Z. y CHEN, J. Developing trends in aptamer-based biosensor devices and their applications. *IEEE transactions on biomedical circuits and systems*, vol. 8(1), páginas 4–14, 2014.
- MAIRAL, T., ÖZALP, V. C., SÁNCHEZ, P. L., MIR, M., KATAKIS, I. y O SULLIVAN, C. K. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 390(4), páginas 989–1007, 2008.
- MAYER, G. The chemical biology of aptamers. *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48(15), 2009.
- NAVANI, N. K. y LI, Y. Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors. *Current opinion in chemical biology*, vol. 10(3), páginas 272–281, 2006.
- OLIGOANALYZER, P. y IDT-DNA-INTEGRATED, D. Technologies. 2012.
- PALOMINO-VIZCAINO, G., RESÉNDIZ, D. G. V., BENÍTEZ-HESS, M. L., MARTÍNEZ-ACUÑA, N., TAPIA-VIEYRA, J. V., BAHENA, D., DÍAZ-SÁNCHEZ, M., GARCÍA-GONZÁLEZ, O. P., ALVAREZ-SANDOVAL, B. A. y ALVAREZ-SALAS, L. M. Effect of HPV16L1 virus-like particles on the aggregation of non-functionalized gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 100, páginas 176–183, 2018.
- PESTOURIE, C., TAVITIAN, B. y DUCONGE, F. Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. *Biochimie*, vol. 87(9), 2005.

- RANGEL GUERRERO, S. I. *Aislamiento de una poblacion de aptameros de RNA para la proteina L1 monomerica del virus del papiloma humano tipo 16*. Proyecto Fin de Carrera, CINVESTAV, 2016.
- STELLWAGEN, N. C. Apparent pore size of polyacrylamide gels: Comparison of gels cast and run in tris-acetate-edta and tris-borate-edta buffers. *Electrophoresis*, vol. 19(10), páginas 1542–1547, 1998.
- STOLTENBURG, R., REINEMANN, C. y STREHLITZ, B. SELEX, a revolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular engineering*, vol. 24(4), 2007.
- SUGIMOTO, N., NAKANO, S.-I., KATOH, M., MATSUMURA, A., NAKAMUTA, H., OHMACHI, T., YONEYAMA, M. y SASAKI, M. Thermodynamic parameters to predict stability of rna/dna hybrid duplexes. *Biochemistry*, vol. 34(35), páginas 11211–11216, 1995.
- SUN, H. y ZU, Y. A highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules*, vol. 20(7), 2015.
- TOMBELLI, S., MINUNNI, M. y MASCINI, M. Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20(12), 2005.
- TOSCANO-GARIBAY, J. D., BENÍTEZ-HESS, M. L. y ALVAREZ-SALAS, L. M. Isolation and characterization of an RNA aptamer for the HPV-16 E7 oncoprotein. *Archives of medical research*, vol. 42(2), páginas 88–96, 2011.
- WILLNER, I. y ZAYATS, M. Electronic aptamer-based sensors. *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46(34), páginas 6408–6418, 2007.
- XIAO, Y., LUBIN, A. A., BAKER, B. R., PLAXCO, K. W. y HEEGER, A. J. Single-step electronic detection of femtomolar DNA by target-induced strand displacement in an electrode-bound duplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103(45), páginas 16677–16680, 2006.
- XIAO, Y., PIOREK, B. D., PLAXCO, K. W. y HEEGER, A. J. A reagentless signal-on architecture for electronic, aptamer-based sensors via target-induced strand displacement. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127(51), páginas 17990–17991, 2005.
- ZHAO, Q., GUO, H. H., WANG, Y., WASHABAUGH, M. W. y SITRIN, R. D. Visualization of discrete L1 oligomers in human papillomavirus 16 virus-like particles by gel electrophoresis with Coomassie staining. *Journal of virological methods*, vol. 127(2), páginas 133–140, 2005.

*No explicar la ciencia me parece perverso.
Cuando uno se enamora, quiere contarlo al mundo.*
Broca's Brain: Reflections on the Romance of Science
Carl Sagan

*Temer al amor es temer a la vida,
y los que temen a la vida ya están medio muertos.*
Bertrand Russell

