



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

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Aislamiento de una población de aptámeros de DNA contra
pseudovirus del virus del papiloma humano tipo 18
mediante el método SELEX”**

T E S I S

Que presenta
BQ. Mateo Alejandro Martínez Roque

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias
en la especialidad de
Genética y Biología Molecular

Director de Tesis
Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Ciudad de México

Agosto, 2018

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Durante su realización, el autor contó con una beca personal otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONaCyT) con número de registro 456130.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1.1 El virus del papiloma humano (VPH)	9
1.1.1 El genoma viral.....	10
1.1.2 Infección de la capa basal por VPH.....	11
1.1.3 Detección de la infección por VPH	12
1.1.3 Partículas virales	12
1.2 Aptámeros.....	13
1.2.2 Ventajas del uso de aptámeros	14
1.2.1 Aislamiento de aptámeros	14
2. ANTECEDENTES	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos específicos	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Estrategia experimental.	22
6.2 Diseño y purificación de la L40.	23
6.3 Selección de secuencias afines a los PsV18.....	24
6.3.1 Primer ciclo.....	24

6.3.2	Inmunodetección de la proteína L1	25
6.3.3	Segundo ciclo y tercer ciclo de selección	25
6.3.4	Formación de la emulsión	25
6.3.5	PCR convencional	26
6.3.6	PCR asimétrica.....	26
6.3.7	Termociclaje y recuperación del producto de PCR de la emulsión ...	26
6.3.8	Purificación del producto de la emPCR	27
6.3.9	Purificación de la ssDNA (cadena sentido)	27
6.4	Evaluación del proceso de selección mediante PCR en tiempo real.	28
6.4.1	<i>Slot blot</i> de la ssDNA 3R y los PsV18	28
6.4.2	PCR en tiempo real de las secuencias recuperadas	29
7.	RESULTADOS.....	30
7.1	Diseño y purificación de la biblioteca aleatorizada (L40).	30
7.2	Selección de secuencias afines a los PsV18.....	31
7.2.1	Inmovilización de los PsV18.....	31
7.2.2	Primera ronda de selección.....	31
7.2.3	Segunda ronda de selección	33
7.2.4	Tercera ronda de selección	35
7.3	Evaluación del proceso de selección mediante PCR en tiempo real.	38
8.	DISCUSIÓN	40
9.	CONCLUSIONES	43
10.	PERSPECTIVAS.....	44
	REFERENCIAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de una cápside viral madura del VPH16.	9
Figura 2. Organización del genoma de los α -papilomavirus	10
Figura 3. Reconocimiento de un aptámero y su blanco	14
Figura 4. Proceso de aislamiento de aptámeros	16
Figura 5. Diagrama de la estrategia experimental.....	22
Figura 6. Inmunodetección de la proteína L1	31
Figura 7. emPCR de la primera ronda	31
Figura 8. emaPCR de la primera ronda	32
Figura 9. ssDNA purificada	33
Figura 10. emPCR de la segunda ronda.....	34
Figura 11. emaPCR de la segunda ronda.....	34
Figura 12. ssDNA purificada	35
Figura 13. ssDNA purificada	36
Figura 14. Resumen de los resultados del método SELEX	37
Figura 15. Afinidad de la L40p antes y después de los tres ciclos de selección (3R) contra PsV18 y otras proteínas control	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de la L40 y los cebadores para su amplificación.	23
Tabla 2. Concentración y parámetros de calidad de la ssDNA.	37

RESUMEN

Los aptámeros de ácidos nucleicos poseen características favorables que los posicionan como fuertes candidatos alternativos a los anticuerpos y otras moléculas terapéuticas y de reconocimiento, las cuales incluyen síntesis química sencilla y bien establecida, estabilidad térmica, reversibilidad térmica, independencia de un sistema biológico para su producción e integración en el diseño de biosensores, entre otras. El proceso de aislamiento de aptámeros se denomina Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX). El método SELEX tradicional requiere de varias rondas de selección (10-25 rondas) para aislar aptámeros afines y específicos y conlleva tasas de éxito muy bajas.

En el presente trabajo se estableció una variante del método SELEX que elimina algunas de las desventajas del método tradicional como el uso de PCR en solución y emplea DNasa I para aumentar la astringencia de la interacción. Además es compatible con cualquier blanco de naturaleza proteica. Para demostrar su utilidad se realizó el aislamiento de una población de aptámeros de DNA contra pseudovirus (PsV) del papiloma humano tipo 18 (VPH18) en solo tres rondas de selección. Se eligió este modelo debido a que el VPH18 es el segundo tipo de VPH más carcinogénico, solo después del VPH16, siendo responsable de aproximadamente 12% de los casos de carcinoma de células escamosas y 37% de los casos de adenocarcinoma cervical en el mundo.

Para evaluar el éxito del proceso de selección, se utilizó *Slot blot* acoplado a PCR en tiempo real. De esta forma determinamos que el número de moléculas de DNA de cadena sencilla (ssDNA) que interactúan con el pseudovirus aumentó casi 50 veces después de las tres rondas de selección por lo que se establece que las modificaciones introducidas al método SELEX aumentaron el número de moléculas afines y específicas por nuestro blanco en sólo tres ciclos logrando así el aislamiento de una población de aptámeros de DNA.

ABSTRACT

Nucleic acid aptamers possess many useful features that make them a promising alternative to antibodies and other therapeutic molecules including well-established and easy chemical synthesis protocols, reversible folding, thermal stability, no biological system requirement for production, low intrabatch variation, easy biosensor integration, etc. Isolating aptamers requires a Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) method, an iterative and highly probabilistic process which usually requires numerous rounds of selection (10-25 rounds) to isolate high affinity and specific aptamers with a very low success rate. Currently, there are many variants of the traditional SELEX method that allow aptamer isolation against more types of targets with less selection rounds. However, these methods require sophisticated and expensive equipment and do not allow aptamer isolation against large targets such as viral capsids.

In the present work, we established a variant of the SELEX method that includes the substitution of conventional PCR and the application of DNase I to increase the astringency of the interaction while compatible with large targets. The modified SELEX was applied to the isolation of a DNA aptamer population against human papillomavirus 18 (HPV18) pseudovirus (PsV). We used PsV as a target since HPV18 is the second most common carcinogenic type of HPV, only after HPV16, being responsible for approximately 12% of cases of squamous cell carcinoma and 37% of the cases of cervical adenocarcinoma in the world.

For the evaluation of the modified SELEX, coupled Slot blot/qPCR assays were used to determine if molecules with high affinity for the PsV were rapidly isolated. Using this method, the number of ssDNA molecules that interact with the PsV increased almost 50-fold after only three selection rounds. In conclusion, the modifications introduced to the SELEX process significantly increased the number of ssDNA molecules with affinity and specificity for PsV per cycle thus allowing the rapid isolation of a population of DNA aptamers.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El virus del papiloma humano (VPH)

Los papilomavirus (PV) son virus no envueltos con un diámetro de entre 50 y 60 nm (figura 1). Contienen un genoma circular cerrado de DNA de cadena doble (DNAcd) con una longitud de 7.9 kilobases (kb).¹ A la fecha, se han caracterizado más de 200 tipos de papilomavirus humanos (VPH).

Para su clasificación, la secuencia nucleotídica del gen de la proteína mayor de la cápside (L1) de los PV debe diferir en al menos 10%.¹ Estos tipos de PV se agrupan en géneros filogenéticos, que se categorizan con una letra griega seguida de un número que indica la especie.² Existen cinco géneros: los alfapapilomavirus, los betapapilomavirus, los gamapapilomavirus, los nupapilomavirus y los mupapilomavirus.

El género de los alfapapilomavirus (α -papilomavirus) es de especial relevancia clínica ya que contiene a los PV más carcinogénicos. En este género se encuentran el VPH 16 y el 18, los cuales presentan un elevado tropismo por tejido cutáneo y mucosas, en donde inducen cambios en el metabolismo celular que podrían conllevar al desarrollo de cáncer. Estos dos tipos de VPH son responsables de aproximadamente el 70% de los casos de cáncer cervical invasor en el mundo. Además, la infección por VPH también está asociada al desarrollo de otros tipos de cáncer en el tracto anogenital de ambos sexos y cáncer orofaríngeo.^{2,3}

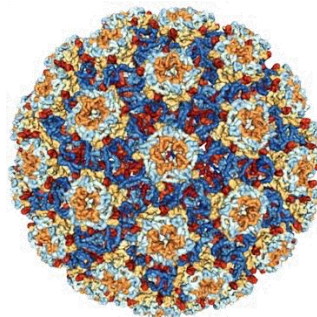


Figura 1. Modelo de una cápside viral madura del VPH16.⁴ La cápside tiene una estructura icosaédrica conformada por 72 pentámeros de la proteína L1 y aproximadamente 72 unidades de la proteína L2.

1.1.1 El genoma viral

El genoma de los PV se divide en cuatro partes: la región larga de control (por sus siglas en inglés, LCR), la región temprana (ER), la región tardía (LR) y una región pequeña variable no codificante (RNC) entre los genes de las proteínas E5 y L2.⁵

El genoma de los alfapapilomavirus (figura 2) consta de 8 genes que codifican para proteínas (L1, L2, E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y 2 regiones no codificantes, la región no codificante (NCR) y la región larga de control (LCR)².

La región codificante se divide en región temprana (ER) y región tardía (LR). La ER codifica proteínas virales que están implicadas en la replicación viral (E1 y E2), en la inducción de un estado de alta proliferación y tumorigénesis en la célula infectada (E6 y E7) y en la evasión al sistema inmune (E5).^{6,7} La LR codifica las proteínas estructurales que conforman la cápside viral, la proteína principal de la cápside (L1), y la proteína menor de la cápside (L2) las cuales solamente se expresan en estadios tardíos de la infección. La LCR, rio abajo respecto a E6, mide aproximadamente 850 pares de bases (pb) y contiene el promotor temprano y los elementos reguladores implicados en la replicación y transcripción del DNA viral. El NCR es una región corta localizada entre E5 y L2.⁸

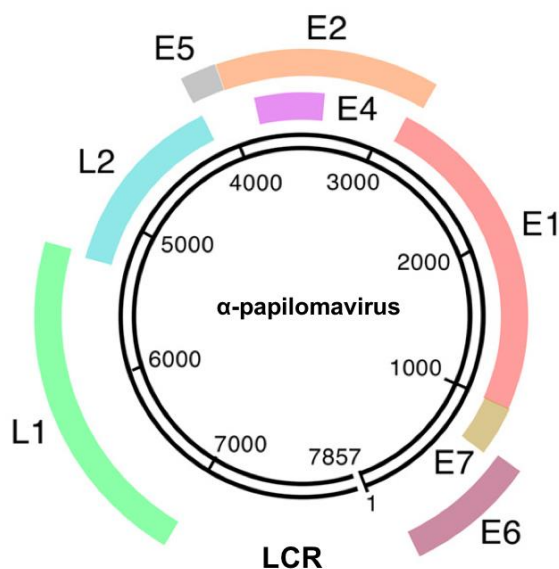


Figura 2. Organización del genoma de los α -papilomavirus⁹. En la figura se muestran los marcos abiertos de lectura para los genes virales no estructurales o genes “E”, los genes estructurales o genes “L” y la región larga de control, contenidos en el genoma viral de aproximadamente 8000 pb.

1.1.2 Infección de la capa basal por VPH

Los VPH infectan las células inmaduras de la capa basal del epitelio escamoso no queratinizante del cuello uterino, cuando la integridad de la barrera epitelial ha sufrido una abrasión. La zona de transición o zona de metaplasia escamosa inmadura es la más vulnerable a la acción viral.¹⁰

La entrada de los viriones a las células de la capa basal se da mediante la interacción electrostática entre los residuos de lisina de la proteína viral L1 (Lisina 278 y Lisina 361) con las cadenas de glucosaminoglicano del proteoglicano heparán sulfato (HS) de la célula basal, provocando un cambio conformacional en la estructura del virión que conlleva a la exposición de un sitio de corte para furina/proteína en el extremo amino terminal de la proteína L2, seguido de la transferencia/reclutamiento de moléculas secundarias de HS y subsecuente transferencia al receptor de internalización viral.¹¹

Posteriormente a la internalización viral, el genoma viral es transportado al núcleo y mantenido en estado episomal con un bajo número de copias (50-100), lo cual es esencial para establecimiento de la fase temprana de infección viral. Al dejar la capa basal, las células infectadas inician su diferenciación y suprimen la replicación de su DNA, por lo tanto, el VPH no puede replicar su material genético ya que no codifican una DNA polimerasa en su genoma. Entonces, para asegurar que su genoma sea replicado, el VPH requiere reactivar la división celular en las células diferenciadas. Las proteínas virales responsables de mantener el potencial de replicación de DNA en las células diferenciadas son E6 y E7 ya que interactúan e inactivan a las proteínas p53 y Rb (proteína asociada a retinoblastoma), respectivamente.¹²

A medida que las células infectadas se dividen y se diferencian cada vez más en las capas suprabasales del epitelio cervical, los genomas virales se amplifican, las proteínas estructurales tardías se expresan y se ensamblan nuevos viriones para ser liberados al ambiente mediante el proceso natural de descamación epidermal.¹³

1.1.3 Detección de la infección por VPH

La infección persistente por VPH de alto riesgo es necesaria pero insuficiente para el desarrollo de cáncer cervical (CC), el cual se presenta después de un largo periodo de tiempo y a través de lesiones precursoras que pueden ser detectadas mediante evaluaciones citológicas cervicales. Sin embargo, este tipo de evaluaciones presenta baja sensibilidad para detectar lesiones precancerígenas y casos de cáncer tempranos, requiere realizarse en periodos de tiempo cortos y requiere de altos recursos para ser de buena calidad.

Actualmente existen varios métodos moleculares para la detección de VPH de alto riesgo, algunos de estos son: ensayos de hibridación de ácidos nucleicos (*Southern blot*, hibridación *in situ* e hibridación *Dot blot*), ensayos de amplificación de señal (Cervista HPV y Captura de híbridos) y ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (microarreglos, PCR, qPCR, entre otros). Sin embargo, estos métodos requieren personal altamente capacitado, algunos presentan baja sensibilidad y otros requieren el uso de anticuerpos y sondas de RNA (captura de híbridos), lo cual implica un alto costo por prueba.¹⁴⁻¹⁶

El método más empleado para la detección de la infección por VPH de alto riesgo es la captura de híbridos. Sin embargo, este método requiere de la purificación de DNA y no permite identificar directamente entre tipos de VPH no 16 o 18, por lo que se requiere de otro ensayo para evaluar que tipo de PV está infectando. Los ensayos de amplificación de RNA, requieren que el almacenamiento y recolección de la muestra sea en condiciones especiales para minimizar la degradación del lábil RNA implicando menor disponibilidad de la muestra y un costo mayor. Contrario al RNA, el DNA es más estable por lo que los ensayos de amplificación de esta biomolécula no presentan el problema de la degradación, sin embargo al ser una técnica sensible, el riesgo de falsos positivos es alto debido a contaminación cruzada de los reactivos y muestras^{16,17}

1.1.3 Partículas virales

El estudio del ciclo de vida de VPH es complicado debido a que la producción de viriones nativos depende del proceso de diferenciación de los queratinocitos

humanos, dicho proceso se pudo realizar *in vitro* gracias al establecimiento de cultivos organotípicos en balsa, este sistema permite la producción de viriones nativos en su ambiente natural: el epitelio en diferenciación. Sin embargo, este sistema es muy costoso y la producción de un bajo número de partículas requiere de 3 a 4 semanas.

Los retos para obtener viriones nativos en un sistema *in vivo* o *in vitro* fueron resueltos produciendo partículas virales recombinantes tomando ventaja del hecho de que al expresar únicamente la proteína L1 o la combinación de la proteína L1 y la proteína L2 resulta en el autoensamblaje de estas proteínas en partículas tipo virus (VLPs). Para la producción de los pseudovirus (PsV), en adición a las proteínas de la cápside, se transfecta un plásmido reportero que exprese la proteína amarilla fluorescente (YFP) o cualquier otro gen reportero y que sirva como pseudogenoma. Finalmente, también se puede transfectar el genoma viral completo en lugar del plásmido reportero para generar así los cuasiviriones (QsV).¹³

Los PsV fueron el modelo empleado para aislar aptámeros en este trabajo debido a que al contener ambas proteínas de la cápside y tener capacidad infectiva son más parecidos al virión natural que las VLPs. Adicionalmente, nos permitieron monitorear más fácilmente el proceso de infección debido a que contienen el gen reportero, por lo que pudimos evaluar si el aptámero aislado tiene la capacidad de bloquear la infección.

1.2 Aptámeros

Recientemente, los aptámeros de ácidos nucleicos han emergido como nuevos agentes para el diagnóstico y tratamiento de infecciones virales. Los aptámeros son moléculas de RNA o DNA de cadena sencilla (ssDNA) con una longitud de entre 20-80 nucleótidos con un peso molecular entre 6-30 kDa. Estas moléculas pueden adquirir conformaciones tridimensionales únicas, y que de forma similar al reconocimiento conformacional que media la formación del complejo anticuerpo-antígeno, pueden unirse a sus blancos correspondientes con alta especificidad y

afinidad a través de interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno y complementariedad estructural (Figura 3).¹⁸

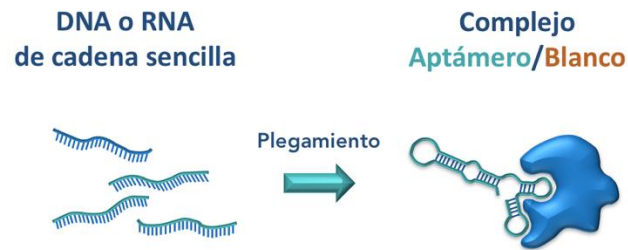


Figura 3. Reconocimiento de un aptámero y su blanco. En la figura se muestra el plegamiento del aptámero en una estructura tridimensional que le confiere la capacidad de unirse a una molécula blanco con alta afinidad y especificidad.

1.2.2 Ventajas del uso de aptámeros

Los aptámeros presentan varias ventajas frente a los anticuerpos, algunas de éstas son: capacidad para discriminar entre blancos relacionados y de pequeño tamaño, lo cual es complicado para los anticuerpos; contrario a los anticuerpos los aptámeros no son inmunogénicos; pueden ser modificados para incrementar su resistencia a la degradación por nucleasas mediante la incorporación de bases modificadas; pueden ser sintetizados con una pureza muy alta a bajo costo ya que su síntesis es *in vitro* y no requiere el uso de animales ni bacterias; son térmicamente estables, por lo que se facilita su transporte y almacenamiento; presentan alta penetrancia en los tejidos debido a su pequeño tamaño; pueden reutilizarse ya que pueden soportar varias rondas de desnaturalización-renaturalización; pueden ser producidos contra moléculas tóxicas y pueden servir como acarreadores de otras moléculas terapéuticas sin perder la capacidad de reconocer a su blanco.¹⁸⁻²⁰ Por todas las ventajas anteriores, los aptámeros son fuertes candidatos para el reemplazo de varias moléculas de reconocimiento como los anticuerpos.

1.2.1 Aislamiento de aptámeros

El método empleado para el aislamiento de aptámeros se denomina Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX, por sus siglas en inglés). Para este método se parte de una biblioteca aleatorizada de RNA o ssDNA que contiene una región central aleatorizada con una longitud de entre 20 y

80 nucleótidos, esta región está flanqueada por regiones constantes que sirven como sitio de unión a cebadores para su amplificación. Este sistema *in vitro* puede ser modificado para simular el ambiente en el que se encuentra la proteína blanco mediante la modificación del pH, fuerza iónica, tipo de buffer, temperatura, presencia y concentración de metales, entre otros. Existen diferentes protocolos SELEX para la producción de aptámeros como los basados en proteínas purificadas, en células completas y en animales vivos ²¹.

El método SELEX convencional basado en proteínas purificadas es el más empleado y el de interés para este proyecto. Este método tiene tres etapas generales (figura 4) la selección, la partición y la amplificación. Antes de la selección se sintetiza una biblioteca de oligonucleótidos que generalmente contiene 10^{15} moléculas con secuencia distinta. Una vez obtenida la biblioteca, se produce el blanco y se realiza la selección, en donde se hace interactuar el blanco con la biblioteca en un ambiente definido. Posteriormente, las secuencias no unidas son separadas mediante alguna técnica de partición, mientras que aquellas en complejo con el blanco son recuperadas y amplificadas por PCR en solución. Luego, los productos de la PCR se purifican dando como resultado una nueva sub-biblioteca o “*pool*” que se ha enriquecido con secuencias afines al blanco de selección. Este DNA purificado puede ser secuenciado para identificar a los aptámeros obtenidos o bien continuar con más rondas de selección. Finalmente, se procede a eliminar la cadena antisentido mediante diversas estrategias de purificación de ssDNA para el siguiente ciclo de selección. A través de estas rondas iterativas, los aptámeros específicos se enriquecen e identifican mediante análisis de secuenciación Sanger o secuenciación de próxima generación (NGS).²²

El método SELEX convencional o tradicional es altamente probabilístico y requiere de un gran número de rondas de selección (10-25 rondas) para aislar un aptámero dependiendo de la naturaleza del blanco, la astringencia de la interacción, la presencia de elementos de inmovilización del blanco, la eficiencia del método de partición y el método de amplificación de las secuencias recuperadas. Por lo que

obtener aptámeros afines y específicos es un proceso que puede tardar meses con tasas de riesgo muy elevadas.²³

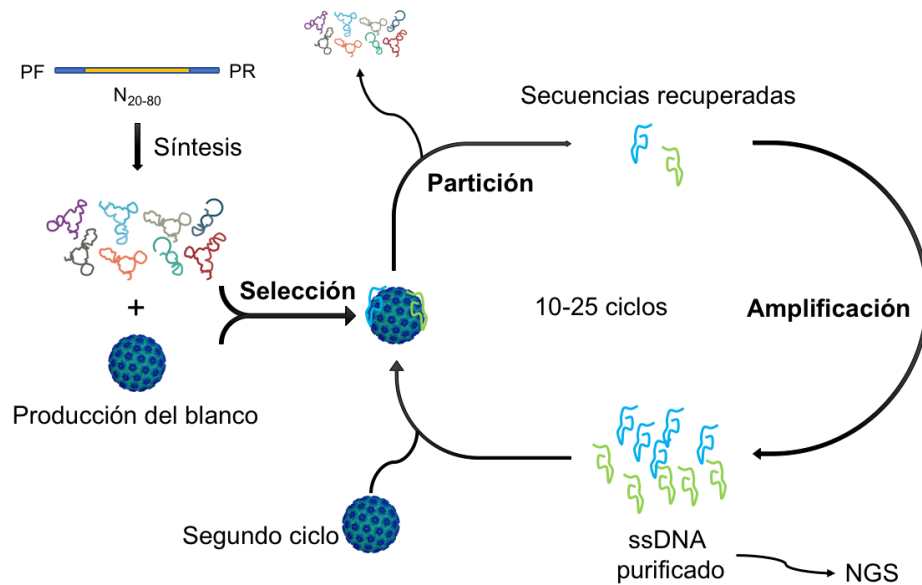


Figura 4. Proceso de aislamiento de aptámeros. En la figura se muestran los pasos generales del método SELEX (Selección, Partición y Amplificación), así como las regiones de la biblioteca inicial, la cual contiene una región central aleatorizada (N) con una longitud de entre 20 y 80 nucleótidos y las regiones constantes de unión a los cebadores (PF y PR).

Actualmente existen muchas variantes al método SELEX tradicional que permiten el aislamiento de aptámeros contra un mayor número de blancos y empleando un menor número de rondas de selección. Algunos de éstos emplean métodos microfluídicos (como electroforesis capilar, separaciones microfluídicas basadas en perlas, entre otras) para aumentar la eficiencia de partición.²⁴ Esto es posible debido a que en éstas técnicas no se emplea una matriz de inmovilización, por lo tanto, las interacciones inespecíficas entre la biblioteca y el blanco son mínimas.²⁵ Existen varias limitantes en el uso de estos métodos, algunas de ellas son el elevado costo de los equipos que requieren y su incompatibilidad con blancos de gran tamaño como una cápside viral.¹⁸ Así, sigue siendo necesario el establecimiento de protocolos SELEX de bajo costo y compatibles con blancos de gran tamaño, que incrementen la astringencia de la interacción y la eficiencia de partición.

2. ANTECEDENTES

Los aptámeros de ácidos nucleicos han emergido como nuevos agentes para el diagnóstico y tratamiento de infecciones virales. A la fecha, se han aislado aptámeros contra un gran número de virus como el VPH, el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis B (VHB), el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SCoV), el virus de la gripe, el virus del herpes simple (HSV), el virus Ébola, el virus de la fiebre del Valle del Rift, el virus del dengue, el virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), el virus de Epstein-Barr y el Citomegalovirus humano.^{18,26} La finalidad del aislamiento de aptámeros contra estos virus es desarrollar nuevas estrategias de detección, prevención y tratamiento de la infección por estos virus.

Nuestro grupo recientemente reportó el aislamiento de un aptámero de RNA, el aptámero Sc5-c3, el cual reconoce partículas virales formadas por la proteína L1 del VPH16 con alta afinidad ($K_d=0.05 \text{ pM}$)²⁷. Este aptámero demostró ser capaz de bloquear la infección de pseudovirus del VPH tipo 16 y de detectar partículas tipo virus cuando se integró en un biosensor electroquímico, el cual presentó un límite de detección de $100 \text{ fg}/\mu\text{L}$.^{28,29}

Además de los aptámeros aislados contra componentes estructurales de los viriones, también se han aislado aptámeros contra proteínas oncogénicas del VPH, un ejemplo de esto es el aptámero de RNA contra la oncoproteína E7 del VPH-16 E7, denominado A2. Este aptámero demostró ser efectivo para inducir apoptosis en células de carcinoma cervical SiHa. Por otro lado, los aptámeros F2 y F4 aislados contra la oncoproteína E6 demostraron ser efectivos para inducir la apoptosis en esta misma línea celular.³⁰⁻³²

Nuestro grupo de investigación también reportó el aislamiento del aptámero de RNA denominado G5 α 3N.4, el cual demostró afinidad y especificidad por la oncoproteína E7 del VPH tipo 16 ($K_d= 1.9 \text{ }\mu\text{M}$).³³

Con la finalidad de disminuir el número de rondas de selección necesarias para obtener aptámeros afines y específicos, se han empleado nucleasas en el método

SELEX. Ejemplo de esto es la utilización de DNAsa I bajo el principio de que el DNA puede ser protegido de la digestión cuando está fuertemente unido a una proteína³⁴. De esta forma, sólo las secuencias con afinidad por el blanco serán recuperadas después de la partición mientras que las no unidas serán degradadas. Los autores aplicaron éste método logrando el aislamiento de varios aptámeros de DNA contra una proteína viral. ³⁴

Otro problema del SELEX convencional es el empleo de PCR en solución, que presenta dos principales desventajas. La primera es la formación de SP (subproductos) que se da debido a que algunas variantes de la biblioteca pueden tener hibridaciones inespecíficas entre sí provocando la formación de subproductos más largos a partir del producto deseado, estos subproductos largos se estructuran distinto a las secuencias originales por lo que no reconocen al blanco. La segunda es el sesgo de la polimerasa que se presenta debido a que al recuperar secuencias distintas algunas formarán estructuras menos estables que otras, por lo que su amplificación será termodinámicamente más fácil en comparación con las secuencias con estructuras más estables, lo cual es indeseado ya que los aptámeros tienden a formar estructuras de este tipo. Por esta razón la PCR convencional no es la mejor opción cuando se trata de amplificar secuencias aleatorizadas. Alternativamente, se han establecido varios protocolos para la amplificación de bibliotecas aleatorizadas mediante PCR en emulsión (emPCR).³⁵⁻

37

Las características fisicoquímicas de los aptámeros les otorgan ventajas frente a los fármacos comunes, las cuales van desde su facilidad de síntesis hasta el menor número de efectos secundarios que presentan en comparación a drogas sintéticas como las usadas para el tratamiento del VIH.^{19,38} Los reportes anteriores muestran que los aptámeros tiene un gran potencial para el diagnóstico y tratamiento de infecciones virales. Por lo tanto, es de gran interés continuar con el aislamiento de aptámeros contra blancos virales.

3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, 266,000 mujeres mueren anualmente por cáncer cervical, y 85% de estas muertes ocurren en países en vías de desarrollo. El VPH18 es el segundo tipo más carcinogénico, solo después del VPH16, siendo responsable de aproximadamente 12% de los casos de carcinoma de células escamosas y 37% de los casos de adenocarcinoma cervical en el mundo. Actualmente existen vacunas para inmunizar a la población contra este tipo de VPH; sin embargo, las campañas de vacunación gratuitas solo se realizan en algunos estados de México y se dirigen a niñas de entre 11 y 13 años, lo cual, aunado a su elevado costo por dosis y su ineffectividad en mujeres ya infectadas, deja a un gran sector de la población desprotegido. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos agentes para la detección temprana de la infección y bloqueo de la misma continúa siendo de gran interés para el área clínica.

Los aptámeros de ácidos nucleicos han emergido como nuevos agentes para el diagnóstico y tratamiento de infecciones virales debido a que poseen características favorables que los posicionan como fuertes candidatos para reemplazar a los anticuerpos y otras moléculas terapéuticas y de reconocimiento. No obstante, el proceso de aislamiento es esencialmente probabilístico por lo que requiere de varias de rondas de selección (10-25 rondas) para aislar aptámeros afines y específicos lo que conlleva tasas de éxito muy bajas.

El presente trabajo pretende realizar el aislamiento de una población de aptámeros de DNA contra PsV de VPH18 (PsV18) mediante el establecimiento de un método SELEX compatible con blancos de gran tamaño y de bajo costo empleando un número bajo de rondas de selección, para posteriormente aislar un aptámero que pueda reconocer con alta afinidad y especificidad a los PsV18 con la finalidad de diseñar nuevas estrategias terapéuticas de bajo costo.

4. HIPÓTESIS

El empleo de nucleasas y emPCR en el método SELEX aumentará la astringencia de la interacción y evitará la formación de subproductos favoreciendo el aislamiento de una población de aptámeros de DNA contra PsV18.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Aislar una población de aptámeros de DNA contra PsV del virus del VPH18 (PsV18)

5.2 Objetivos específicos

- Diseñar y purificar de la biblioteca aleatorizada (L40)
- Seleccionar de secuencias afines por los PsV18
- Evaluar del método SELEX mediante *Slot blot* acoplado a PCR en tiempo real

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategía experimental.

Nuestra estrategia experimental consistió en obtener la biblioteca de secuencias (L40) purificada e inmovilizar a los PsV18 (donados por la Dra. Valencia-Resendíz) en una membrana de polifluoruro de vinildieno (PVDF), luego se realizaron tres ciclos de selección, partición y amplificación de las secuencias unidas a los PsV18 para la generación de cadena sencilla purificada. Posteriormente se evaluó el enriquecimiento de secuencias afines por nuestro blanco mediante *Slot blot* acoplado a PCR cuantitativa (qPCR). De esta forma se logró determinar que la estrategia de selección funciona y que se aisló una población de aptámeros. Para confirmar el éxito del método SELEX se secuenciará dicha población mediante secuenciación de próxima generación (NGS) para identificar a los aptámeros individuales (figura 5).

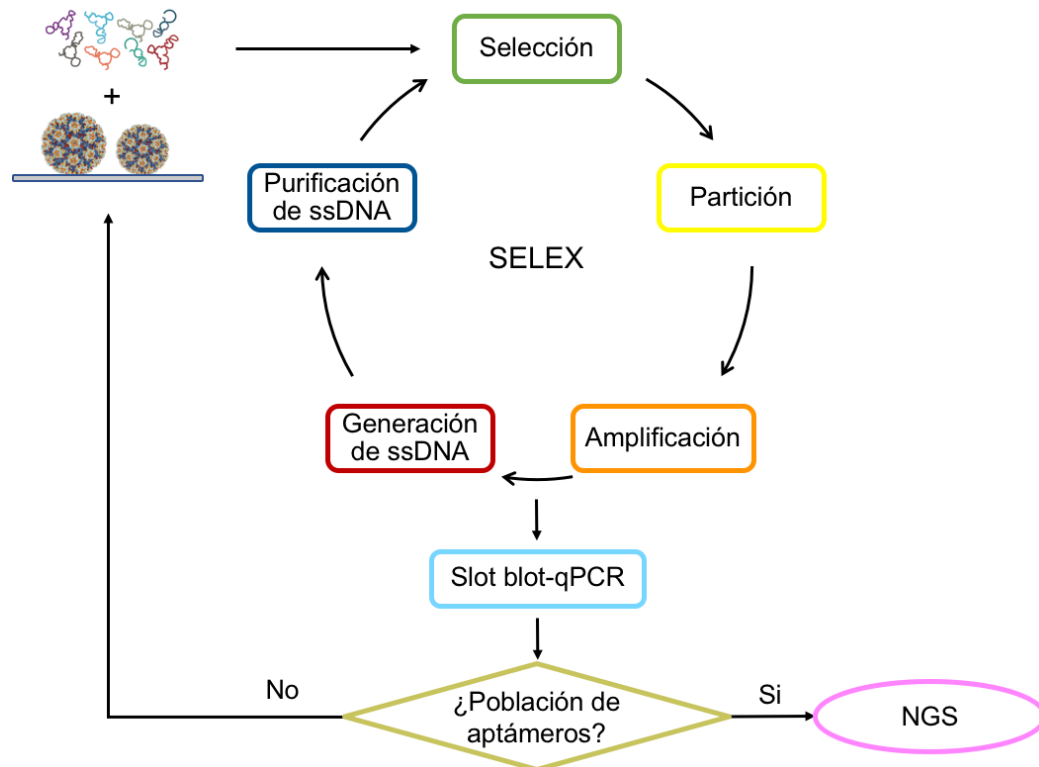


Figura 5. Diagrama de la estrategia experimental.

6.2 Diseño y purificación de la L40.

Se diseñó una biblioteca de moléculas de DNA de cadena sencilla con una longitud de 80 nucleótidos conformada una región central aleatorizada de 40 nucleótidos flanqueada por dos regiones constantes de unión a cebadores. La biblioteca y los cebadores fueron sintetizados por T4oligo® (Irapuato, Gto.) Esta biblioteca se denominará en adelante como L40 y los cebadores como PF y PR para el cebador *forward* y el cebador *reverse*, respectivamente. La secuencia de los cebadores y de L40 se muestran en la tabla 1.

Una vez adquiridos los oligonucleótidos, se procedió a purificar la L40 para eliminar productos incompletos de la síntesis que pudiesen interferir con los ensayos posteriores. Para lo cual, se resuspendió la L40 en agua libre de nucleasas (H₂O_{LN}) y se resolvió en un gel de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida::19:1) al 18% con urea 7 M durante 5 horas a 200 V. Al finalizar la electroforesis, se visualizó la banda correspondiente a la L40 utilizando una lámpara de luz UV y se escindió del gel. La banda recuperada fue triturada en una jeringa de 3 mL y depositada en un tubo eppendorf de 1.5 mL al cual se le adicionaron 400 µL de buffer de elución (acetato de amonio 0.5 M, EDTA 1 mM y SDS 0.1%) y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se eliminaron los restos de acrilamida, sales y otros contaminantes filtrando el contenido del tubo a través de un filtro de 0.45 µm (Corning) y una columna de Sephadex® G25 column (GE Healthcare Biosciences) usando H₂O_{LN}. La L40 filtrada se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop2000 y se almacenó a -20 °C. Los cebadores se resuspendieron en H₂O_{LN} y se verificó su integridad y pureza en un gel de poliacrilamida (PAGE) nativo (relación acrilamida:bisacrilamida de 29:1) al 8%.

Tabla 1. Secuencia de la biblioteca aleatorizada y los cebadores para su amplificación.

Oligos	Secuencia
L40	5'-FAM-AGTCCGAGTGACTCAGTGGC(N) ₄₀ GCCTGACACAGTCGCTGAGT-3'
PF	5'-AGTCCGAGTGACTCAGTGGC-3'
PR	5'-ACTCAGCGACTGTGTCAGGC-3'

6.3 Selección de secuencias afines a los PsV18

6.3.1 Primer ciclo

El primer ciclo de selección de este método consistió en activar una membrana de 0.5 cm² de PVDF en metanol absoluto durante 10 segundos e hidratándola en H₂O durante 2 minutos. Una vez activada, se incubó en una solución de PsV18 (22.85 nM) durante 1 hora en agitación leve, al finalizar la incubación se dejó secar la membrana para inmovilizar a los PsV18 en su superficie. La membrana seca fue activada nuevamente y bloqueada con DPBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1.8 mM pH: 7.4) suplementado con 1% de Tween-20, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación leve.

Durante el bloqueo, se reestructuraron 50 µL de la L40p (biblioteca aleatorizada purificada) en 150 µL de DPBS calentándolos a 90 °C por 10 minutos, luego se enfriaron en hielo 10 minutos y se temperaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Para remover las secuencias con afinidad a nuestro sistema de selección (PVDF, puntas, etc.) se realizó una selección negativa incubado los 400 µL de la L40p renaturalizada con una membrana de PVDF de 0.5 cm² sin PsV18 durante 1 hora a con agitación leve.

Una vez finalizado el bloqueo de la membrana con PsV18, ésta se lavó con DPBS tres veces y se incubó con la L40p renaturalizada durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación leve. Al finalizar la interacción de la L40p con los PsV18, se transfirió la membrana con PsV18 a otro tubo eppendorf en donde se lavó 5 veces con DPBS y se trató con 100 µL de DNAsa I (0.25 U/µL) durante 2 horas en agitación leve a temperatura ambiente. Al finalizar la digestión, se detuvo la reacción de digestión añadiendo 10 µL de EDTA 25 mM, se lavó la membrana 5 veces con DPBS y una última vez con H₂O_{LN}. Finalmente, para recuperar las secuencias unidas a los PsV18, se añadieron 140 µL de H₂O_{LN} a la membrana y se calentó a 90 °C durante 10 minutos. El volumen de agua recuperado fue empleado para realizar la emPCR.

6.3.2 Inmunodetección de la proteína L1

Para verificar que los PsV18 se inmovilizaran se realizó la inmunodetección de la proteína L1 en la membrana de PVDF donde se gotearon. Primero se gotearon 16 μ L de la solución con Psv18 (22.85 nM) en una membrana de PVDF activada en metanol y luego en agua. Se dejó secar y se bloqueó la membrana con leche descremada en polvo (Svelty[®]) al 10% en DPBS-Tween (DPBS adicionado con Tween 0.1% v/v) y posteriormente se incubaron con el anticuerpo monoclonal VPH16 L1 [289-16981] (Santa Cruz Biotechnology, Cat. SC57834) diluido en DPBS-Tween a 400 ng/mL, en agitación suave durante 16 horas a 4 °C. El anticuerpo secundario se diluyó 200 ng/mL en PBS-Tween adicionado con 1.5% de leche y se incubó con la membrana durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con 25 mL de PBS-Tween 0.1% durante 20 minutos y se revelaron con la solución reveladora Luminata[™] Classico (EMD Millipore, Billerica MA) en un C-DiGit[®] Blot Scanner (LI-COR Biosciences Inc., Lincoln NE).

6.3.3 Segundo ciclo y tercer ciclo de selección

El segundo ciclo y tercer ciclo de selección se realizó empleando la ssDNA ya purificada y sin la cadena antisentido generada en la emPCR obtenida a partir de las secuencias recuperadas en los subsecuentes ciclos. La ssDNA se generó mediante PCR asimétrica en emulsión (emaPCR). Todos los demás pasos se realizaron de la misma forma que en el primer ciclo de selección. La única variación fue que ssDNA empleada en la segunda ronda y tercera ronda de selección tenía una concentración de 421.8 nM y 888.6 nM, respectivamente.

6.3.4 Formación de la emulsión

La PCR en emulsión fue preparada acorde al método reportado anteriormente.²² La fase oleosa se compone de Span 80 al 4.5%, Tween 80 al 0.4%, y Triton X-100 al 0.05% en aceite mineral. La fase acuosa de 200 μ L fue una mezcla de PCR o PCR asimétrica. La emulsión fue preparada gotearo paulatinamente 8 μ L de la fase acuosa en 420 μ L de la fase oleosa en un tubo de 2 mL con fondo redondo en agitación constante a 5,000 x g empleando un microagitador magnético. La mezcla

fue agitada durante 5 minutos para después colocar 100 μL de la emulsión formada en 6 tubos para PCR con domo y adicionar 30 μL de aceite mineral sobre la emulsión. Una vez añadido el aceite mineral se inició el termociclaje.

6.3.5 PCR convencional

La mezcla de reacción para la PCR se preparó añadiendo 0.3 mmol/L de cada cebador, 3 mmol/L de MgCl_2 , 0.2 mmol/L de dATP, 0.2 mmol/L de dCTP, 0.2 mmol/L de dGTP, 0.2 mmol/L TTP, buffer 1X de la Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 0.125 unidades/ μL de DNA polimerasa Taq (Invitrogen), el volumen de $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ recuperado al final de cada ronda de selección que contiene las secuencias a amplificar y se ajustó con $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ el volumen de reacción a 200 μL .

6.3.6 PCR asimétrica

La mezcla de reacción para la PCR asimétrica se preparó añadiendo 0.3 mmol/L de primer *forward*, 0.03 mmol/L de cebador *reverse*, 3 mmol/L de MgCl_2 , 0.2 mmol/L de dATP, 0.2 mmol/L de dCTP, 0.2 mmol/L de dGTP, 0.2 mmol/L TTP, buffer 1X de la Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 0.125 unidades/ μL de la polimerasa de DNA Taq (Invitrogen), 2 nmol/L de producto de emPCR y se ajustó con $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ el volumen de reacción a 200 μL .

6.3.7 Termociclaje y recuperación del producto de PCR de la emulsión

La amplificación se realizó en un termociclador (Applied Biosystems). Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo empleando las siguientes condiciones de ciclaje: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos y 25 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión a 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, respectivamente. Al finalizar el termociclaje, se recuperaron los 600 μL de emulsión en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 17,136 x g durante 5 minutos. Después de la centrifugación se eliminó la fase oleosa (fase superior) y añadieron 500 mL de diclorometano saturado en H_2O . Se centrifugó esta mezcla a 17,136 x g durante 5 minutos y se recuperó la fase superior que contiene el DNA y se verificó que se haya generado el producto de PCR esperado cargando 5 μL de la fase superior en un gel de poliacrilamida (relación acrilamida:bisacrilamida 19:1) al 8% y se visualizó en el analizador

fluorográfico de barrido Typhoon™ Trio (en el caso de la emPCR) o mediante tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV.

6.3.8 Purificación del producto de la emPCR

Una vez verificado que la emPCR de la primera, segunda y tercera ronda generará el amplicón esperado se procedió a purificarlo mediante precipitación etanólica. Para lo cual, se adicionó acetato de amonio 7.5M hasta alcanzar una concentración de 2.5M en la mezcla, seguido se añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se agitó en un vórtex. La mezcla se colocó a -20 °C durante 30 minutos para facilitar la precipitación del DNA, al finalizar este periodo de tiempo, la mezcla se centrifugó a 17,136 x g durante 20 minutos a 4 °C. Al finalizar la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 75% al DNA precipitado para remover las sales, se centrifugó a 17,136 x g durante 20 minutos. Finalmente, después de decantar el etanol al 75%, se dejó secar el DNA precipitado durante 15 minutos a temperatura ambiente, se resuspendió en H₂O_{LN} y se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop2000.

6.3.9 Purificación de la ssDNA (cadena sentido)

Una vez obtenido el producto de emPCR de cada ciclo de selección se procedió a generar la ssDNA. Para esto, el producto obtenido de la emPCR se resolvió en un gel de poliacrilamida grande (16 x 18 cm) (relación acrilamida:bisacrilamida 19:1) al 10%. Se cargó el volumen total recuperado de la emPCR y se corrió 2 horas a 250 V. Al finalizar la electroforesis, el gel fue incubado durante 10 minutos en una solución con bromuro de etidio y se visualizó en el transiluminador (Enduro) para proceder a cortar la banda correspondiente a la cadena sencilla, la cual se diferencia de la doble cadena al ser menos compacta y tener mayor migración electroforética. Una vez recortada, la banda fue triturada en una jeringa de 3 mL y depositada en un tubo eppendorf de 1.5 mL al cual se le adicionaron 400 µL de buffer de elución (Acetato de amonio 0.5 M, EDTA 1 mM y SDS 0.1%) y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se eliminaron los restos de acrilamida filtrando la elución a través de un filtro (Corning) de 0.45 µm.

El ssDNA se purificó mediante precipitación etanólica. Para lo cual, se adicionó acetato de amonio 7.5M hasta alcanzar una concentración de 2.5M en la mezcla, seguido se añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se agitó en un vórtex. La mezcla se colocó a -20 °C durante 2 horas para facilitar la precipitación del DNA, al finalizar este periodo de tiempo, la mezcla se centrifugó a 17,136 x g a una temperatura de 4 °C. Al finalizar la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 75% al DNA precipitado para remover las sales, se centrifugó a 17,136 x g durante 25 minutos. Finalmente, después de decantar el etanol al 75%, se dejó secar el DNA precipitado durante 15 minutos a temperatura ambiente, se resuspendió en H₂O_{LN} y se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop2000.

6.4 Evaluación del proceso de selección mediante PCR en tiempo real.

6.4.1 Slot blot de la ssDNA 3R y los PsV18

Para preparar las mezclas de interacción la L40p y la ssDNA de la tercera ronda de selección (ssDNA 3R) se reestructuraron a 90 °C durante 10 minutos y se enfriaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se preparó una mezcla de interacción con 5 nmol/L de PsV18 y 5 nmol/L de la ssDNA 3R en un volumen final de 30 µL de DPBS. La mezcla se incubó en agitación suave a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se colocó en un sistema de Slot blot previamente reportado.^{39,40} El slot blot se ensambló con una membrana de nitrocelulosa (NC) (GE Healthcare Biosciences) y se hicieron fluir las mezclas de interacción. La membrana de NC retienen los complejos DNA-proteína. Antes y después de colocar las mezclas de interacción, los pozos del slot-blot se lavaron con 1 mL de DPBS. Posteriormente, se recortó el área por donde fluyeron las mezclas de interacción y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 µL, se añadieron 150 µL de H₂O_{LN} y se recuperaron las secuencias unidas a los PsV18 calentándola a 90 °C durante 10 minutos y recuperando el H₂O_{LN} remanente. Como control de selección se incubó la L40p sin proteína y con los PsV18 y como controles de especificidad se emplearon BSA, GFP y PsV16. Una vez recuperadas las secuencias se determinó mediante qPCR si la cantidad de secuencias retenidas en

la membrana de NC era mayor cuando se hacía fluir la mezcla de interacción con ssDNA 3R y PsV18 que cuando se hacía fluir la mezcla de interacción con los controles.

6.4.2 PCR en tiempo real de las secuencias recuperadas

La mezcla de reacción para la PCR en tiempo real se preparó añadiendo 0.3 mmol/L del PF y PR, 12.5 μ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 2.5 μ L de las secuencias recuperadas y se ajustó el volumen con H₂O_{LN} a 25 μ L. Se inició el protocolo de termociclado con el programa de ciclaje descrito anteriormente para la L40p en el termociclador Rotor Gene (Corbet Research). Se realizó una curva estándar con la L40p desde 10² hasta 10¹⁰ moléculas, para mediante interpolación determinar la cantidad de secuencias recuperadas en cada mezcla de interacción.

7. RESULTADOS

7.1 Diseño y purificación de la biblioteca aleatorizada (L40).

Para el diseño de la L40 se decidió emplear DNA debido a que se ha reportado que la afinidad de los aptámeros no se relaciona con su naturaleza química.⁴¹ Mientras que la longitud de la región aleatorizada fue de 40 bases, esto debido a que existe un reporte que sugiere que emplear menos de 50 bases se relaciona con el aislamiento de aptámeros de alta afinidad contra blancos proteicos⁴¹.

Para la purificación de la L40 se tomó en cuenta su migración relativa a los colorantes xilencianol y azul de bromofenol, así como su abundancia esperando que la L40 completa (80 bases) sea el producto mayoritario.

Al purificar la L40 mediante PAGE desnaturante se observó un producto mayoritario cuya migración electroforética corresponde al peso esperado de 80 bases. Además, también se observaron algunos productos indeseados de mayor peso, lo cual es esperado debido a que durante la síntesis de oligonucleótidos mediante el método de fosforamiditos usando un soporte sólido, ocurre una reacción secundaria, dando lugar a la formación de oligómeros N-ramificados de mayor tamaño y en consecuencia menor migración electroforética.⁴² Por lo cual, la purificación en gel de la L40 fue necesaria. Una vez purificada la L40 se logró la eliminación los oligómeros N-ramificados de mayor tamaño creados en la síntesis química.

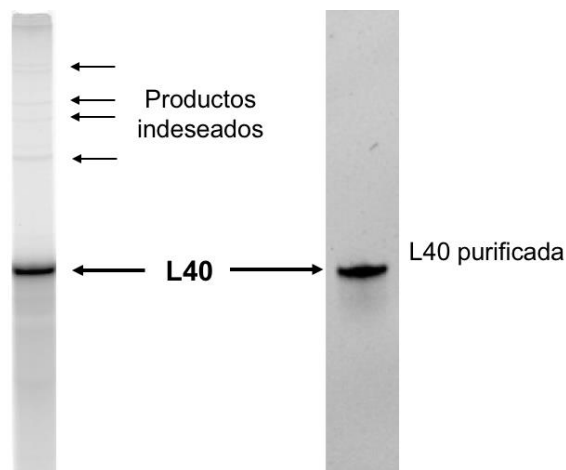


Figura 1. Purificación de la L40. PAGE desnaturante al 18%. En esta figura podemos observar a la L40 sin purificar (Izquierda) y purificada (derecho).

7.2 Selección de secuencias afines a los PsV18.

7.2.1 Inmovilización de los PsV18

Para realizar la primera ronda de selección primero se inmovilizó los PsV18 en una membrana de PVDF. En la figura 6 se muestra la inmunodetección de la proteína L1 en la membrana donde se gotearon los PsV18, lo cual nos indica que los PsV18 se inmovilizaron correctamente, mientras que en la región de la membrana donde se goteó albúmina sérica bovina (BSA) no se observó ninguna señal.

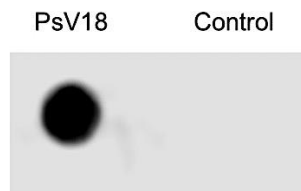


Figura 6. Inmunodetección de la proteína L1. En esta figura se muestra la señal donde se inmovilizaron los PsV18 mediante goteo, así como otra región de la membrana donde se goteó BSA como control.

7.2.2 Primera ronda de selección

La amplificación mediante emPCR de las secuencias recuperadas de la primera ronda de selección contra los PsV18 originó un amplicón del tamaño esperado (80 pb), correspondiente a la longitud de la biblioteca aleatorizada (figura 7). No se observa la formación de subproductos de mayor peso molecular, lo que nos indica que la emulsión se mantuvo estable y evitó la hibridación inespecífica de las moléculas recuperadas.

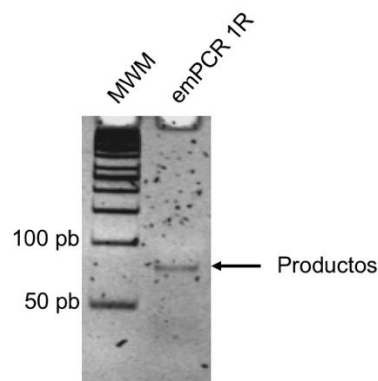


Figura 7. emPCR de la primera ronda. MWM: marcador de peso molecular; emPCR 1R: PCR en emulsión de las secuencias recuperadas en la primera ronda de selección. En la figura se indica con una flecha el amplicón esperado con un peso molecular aproximado de 80 pb. Visualización en PAGE nativo al 8%.

Una vez purificado el producto de la emPCR 1R, se emplearon 8 ng como molde para la emaPCR. La visualización del producto de la emaPCR reveló dos bandas (figura 8), la banda menos compacta y de mayor migración electroforética corresponde al ssDNA, mientras que la menos compacta y de menor migración electroforética corresponde al DNA de cadena doble (dsDNA). Como marcador de cadena sencilla se cargaron 2 ng de la L40p en el carril de la izquierda. También podemos observar que no se formaron subproductos y que la cantidad de ssDNA fue substancial, por lo que emplear de 2-3 nmol/L de producto de emPCR como molde es adecuado.

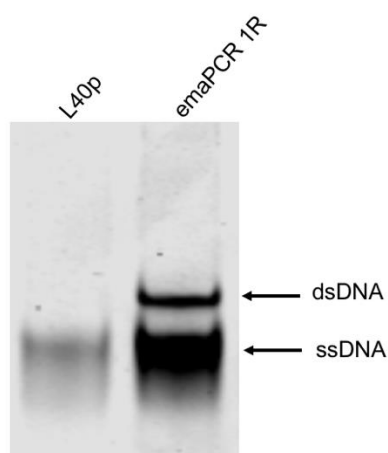


Figura 8. emaPCR de la primera ronda. L40p: biblioteca aleatorizada purificada como control de cadena sencilla; emaPCR 1R: PCR asimétrica en emulsión. En la figura se indica el amplicón esperado con un peso aproximado de 80 pb (flecha superior) y el ssDNA generado (flecha inferior). Visualización en PAGE nativo al 8%.

La ssDNA 1R se purificó y verificó su integridad mediante PAGE nativo. La purificación de la cadena sencilla obtenida de una PCR asimétrica es necesaria en el proceso de selección ya que la doble cadena puede interactuar inespecíficamente con el blanco interfiriendo con el proceso de selección.³⁵ Además este protocolo de purificación elimina todos los componentes de la reacción de PCR remanentes en el producto de emaPCR proporcionando un mayor grado de pureza al ssDNA obtenido lo que a su vez facilita su cuantificación.

En la figura 9 podemos observar una banda con una migración electroforética igual a la de la L40p, mientras que la banda correspondiente a la dsDNA no se observa lo que nos indica que el dsDNA se eliminó exitosamente. La concentración de la ssDNA 1R producida fue de 421.8 nmol/L siendo incluso mayor a la reportada

empleando otros métodos de producción de ssDNA.⁴³ Los parámetros de calidad y la concentración de la ssDNA 1R (tabla 2) son óptimos para continuar con el proceso de selección.

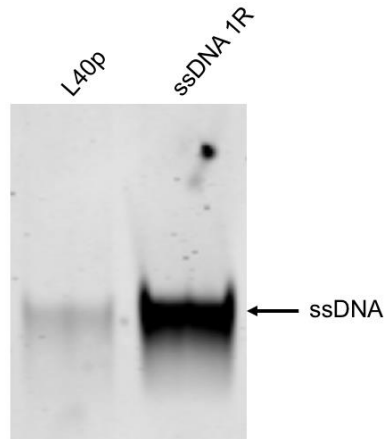


Figura 9. ssDNA purificada. L40p: biblioteca aleatorizada purificada como control de cadena sencilla; ssDNA 1R: DNA de cadena sencilla purificada de la primera ronda de selección (indicada con la flecha). Visualización en PAGE nativo al 8%.

7.2.3 Segunda ronda de selección

La ssDNA 1R purificada se usó como molde para realizar la segunda ronda de selección. Los PsV18 se inmovilizaron de igual forma que en la primera ronda y las condiciones del SELEX (interacción, digestión con DNAsa I, etc.) fueron las mismas. La amplificación mediante emPCR de las secuencias recuperadas de la segunda ronda de selección contra los PsV18 originó un amplicón con un tamaño correspondiente a la longitud de la biblioteca aleatorizada (figura 10). Sin embargo, también se observó la producción de una baja cantidad de subproductos posiblemente debido a que la emulsión no se mantuvo estable durante el termociclaje. A pesar de lo anterior, la cantidad de amplicón esperado fue mayoritaria, por lo que se procedió a realizar la emaPCR teniendo en cuenta que el ssDNA se purifica y con esto los subproductos más largos se eliminarían.

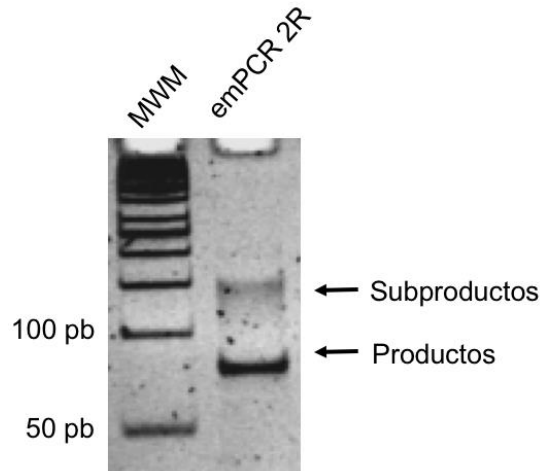


Figura 10. emPCR de la segunda ronda. MWM: marcador de peso molecular; emPCR 2R: PCR en emulsión de las secuencias recuperadas en la segunda ronda de selección. En la figura se indica el amplicón esperado con un peso aproximado de 80 pb (flecha inferior) y los subproductos formados (flecha superior). Visualización en PAGE nativo al 8%.

Una vez purificado el producto de la emPCR 2R, se emplearon 8 ng como molde para la emaPCR. La visualización del producto de la emaPCR reveló tres bandas (figura 11), la banda menos compacta y de mayor migración electroforética corresponde al ssDNA, mientras que la menos compacta y de menor migración migración electroforética corresponde al DNA de cadena doble (dsDNA). También podemos observar la formación de una cantidad baja de subproductos, los cuales serán eliminados en la purificación de la ssDNA.

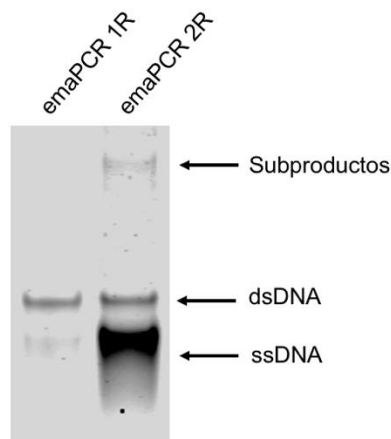


Figura 11. emaPCR de la segunda ronda. L40p: biblioteca aleatorizada purificada como control de cadena sencilla; emaPCR 1R: PCR asimétrica en emulsión. En la figura se indica el amplicón esperado con un peso aproximado de 80 pb (flecha intermedia), el ssDNA 2R producido (flecha inferior) y los subproductos formados (flecha superior). Visualización en PAGE nativo al 8%.

Una vez producida la ssDNA 2R se purificó y verificó su integridad mediante PAGE nativo. En la figura 12 podemos observar una banda con una migración electroforética igual a la del ssDNA de la emaPCR 1R (validad con la L40p), mientras que la banda correspondiente al dsDNA no se observa, lo que nos indica que el dsDNA se eliminó exitosamente. La concentración de la ssDNA 2R producida fue de 888.6 nmol/L. Los parámetros de calidad y la concentración de la ssDNA 2R (tabla 2) son óptimos para continuar con el proceso de selección.

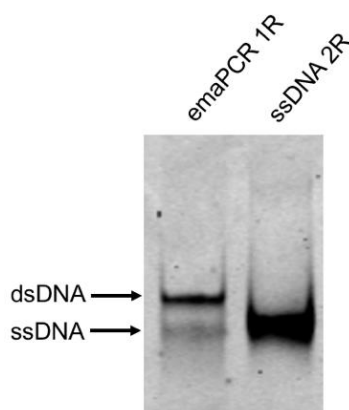


Figura 12. ssDNA purificada. emaPCR 1R: PCR asimétrica en emulsión de la primera ronda de selección; ssDNA 2R: DNA de cadena sencilla purificada de la segunda ronda de selección. Visualización en PAGE nativo al 8%.

7.2.4 Tercera ronda de selección

Una vez obtenida la ssDNA 2R purificada, ésta se empleó para realizar la tercera ronda de selección. Los PsV18 se inmovilizaron de igual forma que en la segunda ronda y las condiciones del SELEX (interacción, digestión con DNAsa I, etc.) fueron las mismas. La amplificación mediante emPCR de las secuencias recuperadas de la tercera ronda de selección contra los PsV18 originó un amplicón con un tamaño de aproximadamente de 80 pares de bases, correspondiente a la longitud de la biblioteca aleatorizada (figura 12). No se observa la formación de subproductos de mayor peso molecular, lo que nos indica que la emulsión se mantuvo estable y evitó la hibridación inespecífica de las moléculas recuperadas.

Una vez purificado el producto de la emPCR 3R, se emplearon 8 ng como molde para la emaPCR y se purificó el ssDNA de igual forma que en rondas anteriores.

Una vez producida la ssDNA 3R se purificó y verificó su integridad mediante PAGE nativo. En la figura 13 podemos observar una banda con una migración

electroforética igual a la de la L40p, mientras que la banda correspondiente a la dsDNA no se observa, lo que nos indica que la dsDNA se eliminó exitosamente. La concentración de la ssDNA 3R producida fue de 570.9 nmol/L.

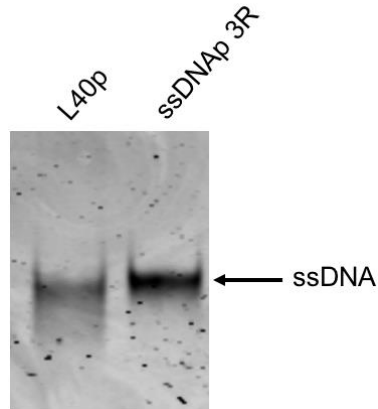


Figura 13. ssDNA purificada. L40p: biblioteca aleatorizada purificada como control de cadena sencilla; ssDNA 1R: DNA de cadena sencilla purificada de la tercera ronda de selección (indicada con la flecha). Visualización en PAGE nativo al 8%.

Los resultados del proceso de selección se resumen en la figura 14 y se describen a continuación. En dicha figura se muestra el marcador de peso molecular (carril 1), el control negativo de la PCR sin molde (carril 2), la PCR en solución de la L40p (carril 3), la L40p como control de cadena sencilla (carril 4), una emPCR (carril 5), el producto de la emPCR obtenido de la primera ronda, segunda ronda y tercera ronda de selección (6, 7 y 8) y la ssDNA producida a partir de cada emPCR (carriles 9, 10 y 11).

Es importante señalar que al amplificar la L40p mediante PCR en solución no se obtiene producto esperado, en su lugar se forman subproductos de mayor longitud. Por otro lado al emplear emPCR si se obtiene una gran cantidad de producto esperado, alrededor de 3-4 μ g de producto de emPCR purificado.

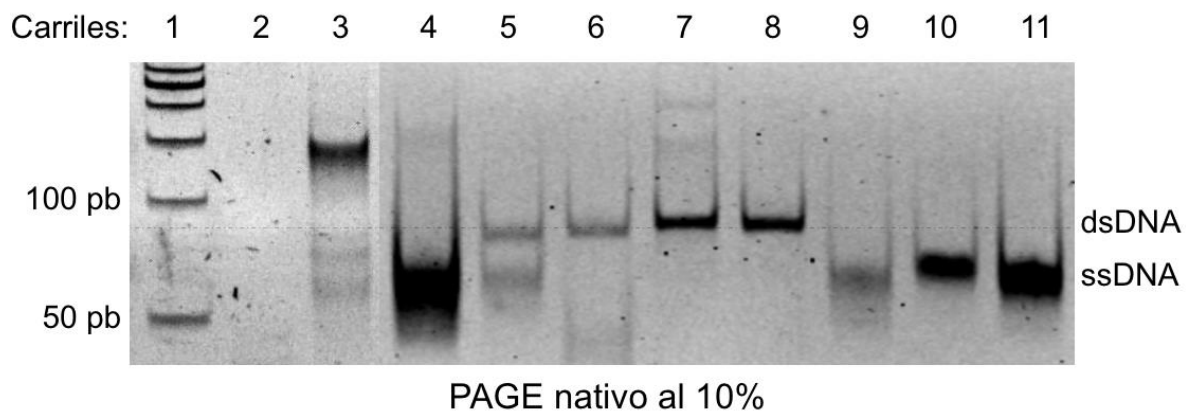


Figura 14. Resumen de los resultados del método SELEX. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: control negativo de la PCR (sin molde); carril 3: PCR en solución de la L40p; carril 4: L40p como control de cadena sencilla; carril 5: emPCR; carril 6: producto de la emPCR de la primera ronda; carril 7: producto de la emPCR de la segunda ronda; carril 8: producto de la emPCR de la tercera ronda; carriles 9: ssDNA purificado de la primera ronda de selección (ssDNA 1R); carril 10: ssDNA 2R; carril 11: ssDNA 3R.

Tabla 2. Concentración y parámetros de calidad de la ssDNA. En la tabla se muestra la concentración y los parámetros de calidad de la ssDNA obtenida en cada ronda de selección.

Muestra	Rondas	nmol/L	260/280	260/230
ssDNA	1	421.8	1.7	1.61
	2	888.6	1.9	1.64
	3	570.9	1.65	1.6

7.3 Evaluación del proceso de selección mediante PCR en tiempo real.

Una vez realizadas las tres rondas de selección contra los PsV18, se evaluó la afinidad de las secuencias recuperadas después del tercer ciclo de selección (ssDNA 3R) mediante el uso de un aparato de *Slot blot* y qPCR para determinar si se había seleccionado una población de aptámeros, en este ensayo se espera que la cantidad de secuencias recuperadas de la membrana de nitrocelulosa por donde fluyó la interacción PsV18-ssDNA 3R sea mayor que las secuencias recuperadas de la interacción PsV18-L40p y los controles. En la figura 8 podemos observar que el número de moléculas de ssDNA unidas a nuestro blanco fue casi 50 veces mayor cuando se hicieron interactuar los PsV18 con la 3R, comparado a cuando se hicieron interactuar con la L40p indicando el enriquecimiento de secuencias afines por nuestro blanco. También podemos observar que un gran número de éstas moléculas afines, son específicas para los PsV18 debido a que al interactuar la 3R con las proteínas control BSA, GFP y PsV16 se retuvieron menos de la mitad de las secuencias retenidas con los PsV18.

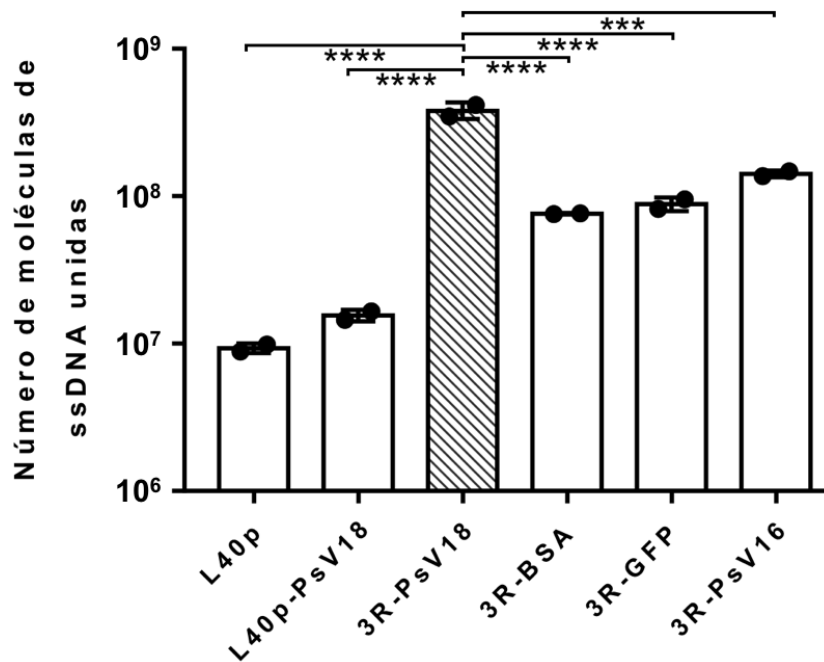


Figura 15. Afinidad de la L40p antes y después de los tres ciclos de selección (3R) contra PsV18 y otras proteínas control. En esta figura se muestra el número de moléculas de ssDNA unidas a nuestra proteína blanco para cada una de las mezclas de interacción que se indican. Análisis de varianza de un factor (***= $p < 0.0001$, **= $p < 0.002$). N=2.

8. DISCUSIÓN

Los aptámeros de ácidos nucleicos poseen muchas características favorables que los posicionan como fuertes candidatos para reemplazar a los anticuerpos y otras moléculas terapéuticas y de reconocimiento.²¹ En el presente trabajo se estableció una variante del método SELEX que elimina algunas de las desventajas del método tradicional (uso de PCR en solución y baja astringencia de la interacción) y que es compatible con cualquier blanco de naturaleza proteica. Para demostrar su utilidad, se realizó el aislamiento de una población de aptámeros de DNA contra PsV18 empleando solamente tres rondas de selección. Se eligió este blanco, debido a que la infección por el VPH es necesaria para el desarrollo de cáncer cervical, dicho padecimiento es responsable de 266,000 muertes anuales en el mundo⁴⁴, por lo tanto el desarrollo de nuevos métodos de bajo costo para la prevención del desarrollo del cáncer cervical siguen siendo una necesidad.

A partir de los resultados de la cuantificación del número de secuencias retenidas en la membrana de nitrocelulosa, encontramos que la estrategia de selección fue exitosa debido al incremento de casi 50 veces en el número de moléculas afines por los PsV18 después de las tres rondas de selección. En comparación a otros protocolos de selección,^{33,45-48} el número de rondas necesarias para aumentar la abundancia de secuencias afines por nuestro blanco fue muy bajo, siendo comparable con algunos métodos basados en electroforesis capilar.²³ Por otra parte, también observamos que algunas de las secuencias enriquecidas presentaban afinidad por algunas proteínas control, lo cual también se ha reportado en otras variantes del SELEX.^{19,31} La estrategia más común para eliminar estas moléculas inespecíficas es realizar una selección negativa o contraselección contra una mezcla compleja de proteínas, de esta forma las moléculas afines por otras proteínas distintas al blanco se unirían a éstas y pueden ser eliminadas,¹⁸ dicha estrategia queda como perspectiva en este trabajo.

Uno de los aspectos más cruciales en el método SELEX es la eficiencia de partición de las moléculas de DNA unidas al blanco y las no unidas.⁴⁹ Una forma de aumentar la eficiencia de partición es incrementando la astringencia de la selección, lo cual

se logra modificando las condiciones en las que se lleva a cabo la interacción entre la biblioteca aleatorizada y el blanco de selección, ya sea modificando el buffer de interacción, el pH, incrementando la temperatura o bien empleando nucleasas que degraden las secuencias no unidas al blanco.³⁴ La inmovilización de los PsV18 en la membrana de PVDF permitió el empleo de DNAsa I, lo que permitió la eliminación de secuencias inespecíficas en cada ronda de selección. Gracias a esta estrategia, el número de rondas necesarias para aumentar la proporción de las secuencias afines por el blanco fue menor siendo suficientes sólo tres rondas de selección para obtener un aumento significativo.

Otro factor que favoreció el aislamiento de una población de aptámeros fue el uso de PCR en emulsión. Con este tipo de PCR se logró evitar la formación de subproductos y con ello la pérdida de potenciales aptámeros durante el proceso de selección, como se ha reportado en otros métodos SELEX que emplean este tipo de PCR.^{18,36,50} Además, la gran cantidad de ssDNA generada mediante PCR en emulsión asimétrica nos permitió alcanzar una concentración adecuada de DNA para subsecuentes rondas de selección. La concentración de la ssDNA obtenida por el método aquí descrito fue superior a muchos otros protocolos de generación de ssDNA.^{36,43}

En comparación con otros métodos SELEX que emplean tecnologías similares como inmovilización en PVDF, *Slot blot* y qPCR^{23,33,45,49}, el método reportado en este trabajo logró el enriquecimiento significativo de secuencias afines por nuestro blanco en sólo tres rondas de selección, mientras que en otros métodos se requiere un mayor número de ciclos, lo que conlleva un costo elevado de recursos y tiempo.

Para concluir que nuestro método SELEX fue exitoso, es necesario demostrar que la biblioteca inicial perdió variabilidad a través del proceso de selección y que las secuencias específicas por nuestro blanco se enriquecieron. Para demostrar lo anterior emplearemos NGS, la cual nos permitirá secuenciar cada una de las moléculas de DNA contenidas en la L40p y la ssDNA 3R y agruparlas con base en la homología de sus secuencias mediante el uso algoritmos bioinformáticos para

determinar el enriquecimiento de grupos de moléculas con secuencias similares, lo que nos indicaría que el método SELEX funciona.¹⁸

En conclusión, se logró el aislamiento de una población de aptámeros de DNA contra PsV18 en solamente tres rondas de selección empleando un método SELEX de costo relativamente bajo y compatible con un gran número de blancos proteicos, incluyendo cápsides virales completas. Dicho método puede ser usado para el aislamiento de aptámeros contra otros blancos proteicos de interés clínico, como otros tipos de virus o biomarcadores.

9. CONCLUSIONES

- La PCR en emulsión facilita la amplificación de las secuencias recuperadas después de cada ciclo de selección ya que inhibe la formación de subproductos.
- La PCR asimétrica en emulsión tiene una eficiencia de producción de cadena sencilla muy alta, lo cual hace posible su purificación en un gel de poliacrilamida nativo (escisión de gel).
- Se aisló una población de aptámeros de DNA contra PsV18 mediante el método de SELEX establecido.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar una ronda de selección negativa contra la membrana de nitrocelulosa o emplear PVDF al evaluar el método SELEX.
- Realizar rondas de contraselección para disminuir el número de moléculas inespecíficas.
- Secuenciar la población de aptámeros obtenida para identificar la secuencia de aptámeros individuales.
- Caracterizar la interacción de los aptámeros individuales con los PsV18.

REFERENCIAS

1. Liu, Y., Pan, Y., Gao, W., Ke, Y. & Lu, Z. Whole-genome analysis of human papillomavirus types 16, 18, and 58 isolated from cervical precancer and cancer samples in Chinese women. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
2. Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H. & Doorbar, J. Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses* **7**, 3863–3890 (2015).
3. Ajila, V., Shetty, H., Babu, S., Shetty, V. & Hegde, S. Human Papilloma Virus Associated Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *J. Sex. Transm. Dis.* **2015**, 1–5 (2015).
4. Cardone, G., Moyer, A. & Cheng, N. Maturation of the Human Papillomavirus 16 Capsid. *MBio* **5**, e01104-14 (2014).
5. Chemes, L. B., Sánchez, I. E., Alonso, L. G. & de Prat-Gay, G. Intrinsic Disorder in the Human Papillomavirus E7 Protein. *Flex. Viruses Struct. Disord. Viral Proteins* 313–346 (2011).
6. Bernat, A., Avvakumov, N., Mymryk, J. S. & Banks, L. Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300. *Oncogene* **22**, 7871–81 (2003).
7. Moody, C. A. & Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 550–560 (2010).
8. Cornet, I. *et al.* Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *J. Virol.* **86**, 6855–6861 (2012).
9. Riemer, A. B. *et al.* A conserved E7-derived cytotoxic T lymphocyte epitope expressed on human papillomavirus 16-transformed HLA-A2+ epithelial cancers. *J. Biol. Chem.* **285**, 29608–29622 (2010).
10. Toro de Méndez, M. & Ferrández Izquierdo, A. Detección de virus papiloma

- humano (HPV) a partir de muestras celulares de cuello uterino en base líquida. Correlación con la inmunorreactividad de la proteína p 16INK4a. *Investig. clínica* **52**, 3–14 (2011).
11. Laniosz, V., Dabydeen, S. A., Havens, M. A. & Meneses, P. I. Human Papillomavirus Type 16 Infection of Human Keratinocytes Requires Clathrin and Caveolin-1 and Is Brefeldin A Sensitive. *J. Virol.* **83**, 8221–8232 (2009).
 12. Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A. & Sakai, H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front. Microbiol.* **3**, 1–12 (2012).
 13. Biryukov, J. & Meyers, C. Papillomavirus infectious pathways: A comparison of systems. *Viruses* **7**, 4303–4325 (2015).
 14. Abreu, A. L. P., Souza, R. P., Gimenes, F. & Consolaro, M. E. L. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virol. J.* **9**, 262 (2012).
 15. Laudadio, J. Human papillomavirus detection: testing methodologies and their clinical utility in cervical cancer screening. *Adv. Anat. Pathol.* **20**, 158–67 (2013).
 16. Villa, L. L. Laboratory Methods for Detection of Human Papillomavirus Infection. *Springer* 23–30 (2009).
 17. Piana, A. *et al.* Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection: new insights into their role in diagnostics and epidemiological surveillance OF PUBLIC. *Ital. J. Public Health* **6**, 164–171 (2009).
 18. Sun, H. & Zu, Y. A Highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules* **20**, 11959–11980 (2015).
 19. Nicol, C. *et al.* An RNA Aptamer Provides a Novel Approach for the Induction of Apoptosis by Targeting the HPV16 E7 Oncoprotein. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).

20. Wandtke, T., Woniak, J. & Kopiski, P. Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections. *Viruses* **7**, 751–780 (2015).
21. Zhou, J. & Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 181–202 (2016).
22. amplificacion biblio emulsi3n 2011.pdf.
23. Ruff, P., Pai, R. B. & Storici, F. Real-Time PCR-Coupled CE-SELEX for DNA Aptamer Selection. *ISRN Mol. Biol.* **2012**, 1–9 (2012).
24. Dembowski, S. K. & Bowser, M. T. Microfluidic methods for aptamer selection and characterization. *Analyst* **143**, 21–32 (2018).
25. Wang, J., Rudzinski, J. F., Gong, Q., Soh, H. T. & Atzberger, P. J. Influence of Target Concentration and Background Binding on In Vitro Selection of Affinity Reagents. *PLoS One* **7**, 1–8 (2012).
26. Shum, K. T., Zhou, J. & Rossi, J. J. Aptamer-based therapeutics: New approaches to combat human viral diseases. *Pharmaceuticals* **6**, 1507–1542 (2013).
27. Leija-Montoya, A. G., Benítez-Hess, M. L., Toscano-Garibay, J. D. & Alvarez-Salas, L. M. Characterization of an RNA Aptamer Against HPV-16 L1 Virus-Like Particles. *Nucleic Acid Ther.* **24**, 344–355 (2014).
28. Valencia-Reséndiz, D. G. *et al.* Inhibition of Human Papillomavirus Type 16 Infection Using an RNA Aptamer. *Nucleic Acid Ther.* **00**, nat.2017.0687 (2018).
29. Chekin, F. *et al.* Nucleic aptamer modified porous reduced graphene oxide/MoS₂based electrodes for viral detection: Application to human papillomavirus (HPV). *Sensors Actuators, B Chem.* **262**, 991–1000 (2018).
30. Belyaeva, T. *et al.* An RNA Aptamer Targets the PDZ-Binding Motif of the HPV16 E6 Oncoprotein. *Cancers (Basel)*. **6**, 1553–1569 (2014).

31. Cesur, Ozlem *et al.* The subcellular localisation of the human papillomavirus (HPV) 16 E7 protein in cervical cancer cells and its perturbation by RNA aptamers. *Viruses* **7**, 3443–3461 (2015).
32. Nicol, C., Bunka, D. H. J., Blair, G. E. & Stonehouse, N. J. Effects of single nucleotide changes on the binding and activity of RNA aptamers to human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **405**, 417–421 (2011).
33. Toscano-Garibay, J. D., Benítez-Hess, M. L. & Alvarez-Salas, L. M. Isolation and Characterization of an RNA Aptamer for the HPV-16 E7 Oncoprotein. *Arch. Med. Res.* **42**, 88–96 (2011).
34. Liu, Y. *et al.* DNase-mediated single-cycle selection of aptamers for proteins blotted on a membrane. *Anal. Chem.* **84**, 7603–7606 (2012).
35. Kumar, T., Bruno, J. G. & Dhiman, A. ABCs of DNA aptamer and related assay development. *Biotechnol. Adv.* **35**, 275–301 (2017).
36. Shao, K. *et al.* Construction and optimization of an efficient amplification method of a random ssDNA library by asymmetric emulsion PCR. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **64**, 239–243 (2017).
37. Williams, R. *et al.* Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. *Nat. Methods* **3**, 545–550 (2006).
38. González, V. M., Elena Martín, M., Fernández, G. & García-Sacristán, A. Use of aptamers as diagnostics tools and antiviral agents for human viruses. *Pharmaceuticals* **9**, 1–34 (2016).
39. Wong, I. & Lohman, T. M. A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5428–32 (1993).
40. Leija-Montoya, A. G. Caracterización de aptámeros de ARN contra VLPs de VPH-16. (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, 2010).

41. Mckeague, M. *et al.* Analysis of In Vitro Aptamer Selection Parameters. *J. Mol. Evol.* (2015).
42. Liebert, M. A., Cazenave, C., Bathany, K. & Rayner, B. Formation of. *Structure* **185**, 181–185 (2006).
43. Svobodová, M., Pinto, A., Nadal, P. & O' Sullivan, C. K. Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 835–842 (2012).
44. Ochoa Carrillo, F. J., Guarneros de Regil, D. B. & Velasco Jiménez, M. T. Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención. *Gac. Mex. Oncol.* **14**, 157–163 (2015).
45. Woo, H. M., Lee, J. M., Yim, S. & Jeong, Y. J. Isolation of single-stranded DNA aptamers that distinguish influenza virus hemagglutinin subtype H1 from H5. *PLoS One* **10**, 1–13 (2015).
46. Sung, H. J., Kayhan, B., Ben-Yedidia, T. & Arnon, R. A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* **279**, 48410–48419 (2004).
47. Wang, G. *et al.* Selection and characterization of DNA aptamer against glucagon receptor by cell-SELEX. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
48. Moore, M. D. *et al.* Generation of neutralizing aptamers against herpes simplex virus type 2: Potential components of multivalent microbicides. *J. Gen. Virol.* **92**, 1493–1499 (2011).
49. He, J., Liu, Y., Fan, M. & Liu, X. Isolation and identification of the DNA aptamer target to acetamiprid. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 1582–1586 (2011).
50. Hänniger, T., Wessels, H., Fischer, C., Paschke-Kratzin, A. & Fischer, M. Just in time -selection: A rapid semiautomated SELEX of DNA aptamers using magnetic separation and BEAMing. *Anal. Chem.* **86**, 10940–10947 (2014).