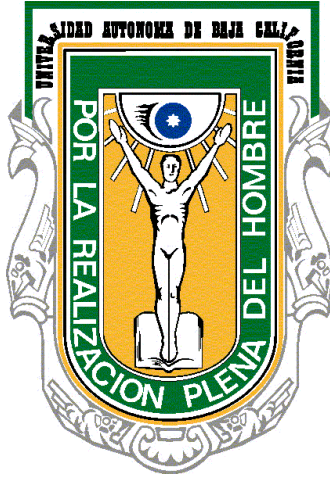


# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Medicina Mexicali

Maestría en Ciencias de la Salud



## TESIS

---

**“Selección de aptámeros de RNA contra**

***Rickettsia rickettsii*”**

**Alumno: Manuel Alejandro Meza Ferro**

**Tutora: Dra. Ana Gabriela Leija Montoya**

**Diciembre de 2019**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Ciencias de la Salud Campus Mexicali a cargo de la Dra. Ana Gabriela Leija Montoya, con el apoyo del recurso PDCPN\_2015\_1650 CONACYT. Así mismo, los experimentos de interacción fueron realizados durante una estancia de investigación en el Laboratorio de Terapia Génica a cargo del Dr. Luis Marat Álvarez Salas, en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. (Cinvestav-IPN).

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis, Dra. Ana Gabriela Leija, por todas sus valiosas enseñanzas tanto en el aula como en el laboratorio, y por estar siempre disponible para asesorarme y responder todas mis dudas.

Al Dr. Nicolás Serafín por todas sus enseñanzas, sus consejos y su gran apoyo.

A mis maestros de licenciatura, Dr. Jesús López Carrizosa y MC Gustavo Martínez Coronilla, por su apoyo para entrar al posgrado.

A mis maestros de la maestría por transmitirme un poco de su vasto conocimiento en ciencias: MC Iván Ayala, Dr. Octavio Galindo, Dr. Gustavo Vázquez.

A mis compañeros de maestría (Mario, Gaby, Rosa, Paulina, Diana, Dr. Romo y Dra. Estrada) por compartir conmigo las aulas y los retos del posgrado, y por apoyarme en el camino.

A mis amigos, José Carlos Macedo y Andrea Ruelas, por apoyarme sin falta durante este par de largos y complicados años.

A mi familia por darme la oportunidad de estar aquí día con día. A mis papás y a mi hermano, muchísimas gracias.

**ÍNDICE**

I.	<i>Abstract</i> .....	1
II.	Resumen.....	2
III.	Abreviaturas.....	3
IV.	Introducción.....	4
	<b><i>Rickettsia</i></b> .....	4
	i. Fiebre manchada de las montañas rocosas.....	5
	1. Epidemiología.....	5
	2. Aspectos clínicos.....	6
	3. Diagnóstico de la enfermedad.....	6
	ii. Mecanismos de patogenicidad.....	7
	1. Proteínas de superficie.....	8
	<b>Aptámeros</b> .....	11
	i. Características.....	11
	ii. Selección.....	12
	iii. Aplicaciones.....	14
	1. Aplicaciones terapéuticas.....	14
	2. Aplicaciones diagnósticas.....	15
V.	Antecedentes.....	17
VI.	Hipótesis.....	18
VII.	Justificación.....	18
VIII.	Objetivos.....	19
	Objetivo general.....	19
	Objetivos específicos.....	19
IX.	Diagrama experimental.....	20
X.	Materiales y Métodos.....	21
XI.	Resultados.....	28
XII.	Discusión.....	39
XIII.	Conclusión.....	42
XIV.	Perspectivas.....	42
XV.	Referencias bibliográficas.....	43
XVI.	Anexos.....	50

I. **ABSTRACT**

Rocky mountain spotted fever is a severe infectious disease caused by the bacterium *Rickettsia rickettsii*. The timely diagnosis of this disease is necessary to prevent fatal outcomes. In this work, aptamers that specifically recognize surface molecules of *R. rickettsii* were obtained from a combinatorial RNA library of  $4^{15}$  variants. Using the SELEX method (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) and after six cycles of preselection and five cycles of selection against antigens of *R. rickettsii*, six aptamers were isolated with a homology of 79.3% and with great structural similarity. Aptamer 2.3 showed high affinity for the *Rickettsia* species of the SFG group (*R. rickettsii* and *R. conorii*) in comparison with controls and with *R. typhi*. Aptamer 4.2 did not show considerable affinity for *R. rickettsii* in this study. The aptamers that were isolated in this study could be used in the future in the development of rapid detection tests for *R. rickettsii* infection.

## II. RESUMEN

La fiebre manchada de las montañas rocosas es una enfermedad infecciosa grave producida por la bacteria *Rickettsia rickettsii*. El diagnóstico oportuno de esta enfermedad es necesario para prevenir desenlaces fatales. En este trabajo se obtuvieron aptámeros que reconocen de manera específica moléculas de la superficie de *R. rickettsii* a partir de una biblioteca combinatoria de RNA de 4<sup>15</sup> variantes. Usando el método SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*) y tras seis ciclos de preselección y cinco ciclos de selección contra *R. rickettsii*, se aislaron seis aptámeros con una homología de 79.3% y con gran similitud estructural. El aptámero 2.3 mostró mayor afinidad por las especies de *Rickettsia* del grupo SFG (*R. rickettsii* y *R. conorii*) en comparación con los controles y con *R. typhi*. El aptámero 4.2 no mostró afinidad considerable por *R. rickettsii* en este estudio. Los aptámeros que fueron aislados en este trabajo podrían ser utilizados en el futuro en el desarrollo de pruebas de detección rápida de la infección por *R. rickettsii*.

### III. ABREVIATURAS

ALN	Agua libre de nucleasas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleósido trifosfato
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena doble
<i>Fwd</i>	<i>Forward</i>
GC	Guanina-citosina
HSV-1	Virus del herpes simple tipo 1
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
M	molar
Mb	Megabases
mM	Milimolar
mmol	Milimoles
ng	Nanogramos
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Polivinilideno difluoruro
<i>R.</i>	<i>Rickettsia</i>
<i>Rev</i>	<i>Reverse</i>
<i>Rh.</i>	<i>Rhipicephalus</i>
RMSF	Fiebre manchada de las montañas rocosas
RNA	Ácido ribonucleico
rNTP	Ribonucleósido trifosfato
rOmpA	<i>Rickettsial outer-membrane protein A</i>
rOmpB	<i>Rickettsial outer-membrane protein B</i>
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
sca	<i>Surface cell antigen</i>
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SFG	Grupo fiebre manchada
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
TG	Grupo tifus
TIV	Transcripción <i>in vitro</i>
U	Unidades
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
μM	Micromolar

#### IV. INTRODUCCIÓN

##### ***Rickettsia***

Las alfa-proteobacterias gramnegativas del género *Rickettsia* son microorganismos intracelulares obligados, causantes de enfermedades importantes en el ser humano. Pertenecen a la familia *Rickettsiaceae*, dentro del orden de los *Rickettsiales*. Las características comunes del género *Rickettsia* son su medio de crecimiento intracelular, el pequeño tamaño de su genoma (1.1 Mb) y su contenido relativamente bajo de GC genómico (29-33%). Las especies de *Rickettsia* han experimentado un proceso de “evolución reductiva” en el que han descartado genes necesarios para la síntesis de metabolitos. Este genoma reducido las ha vuelto dependientes del ambiente intracelular rico en nutrientes y energía de la célula hospedera eucarionte para su proliferación y supervivencia. (Thomas, Alexander, Gilligan, & Rikihisa, 2016)

Las especies de *Rickettsia* se categorizan en dos grupos principales con base en el cuadro clínico que producen: el grupo de la Fiebre Manchada (SFG), en el que se encuentra *R. rickettsii*, y el grupo del Tifus, en el que destacan *R. typhi* y *R. prowazekii*. Estos grupos se caracterizan por la antigenicidad y por los mecanismos de motilidad intracelular de sus miembros. En la última década se han propuesto mediante análisis filogenético dos nuevos grupos de menor importancia en términos de morbilidad para el ser humano: el grupo Ancestral, en el que se encuentran solamente dos especies, *R. bellii* y *R. canadensis*, que no son patógenas para el ser humano, y el grupo Transicional, que también está conformado por dos especies, *R. felis* y *R. akari*, y que se considera como un clado “hermano” del grupo SFG. (Gillespie et al., 2007)

En el grupo SFG se incluye a las especies *R. rickettsii* y *R. conorii*, organismos patogénicos causantes de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (RMSF, por sus siglas en inglés) y de la Fiebre Botonosa Mediterránea, respectivamente. Los miembros de este grupo se caracterizan por ser transmitidos a través de las secreciones de las glándulas salivales de ciertas especies de garrapatas, cuando éstas se alimentan de la sangre de mamíferos como perros, ratones, o humanos. (Chan, Riley, & Martinez, 2010)



## i. Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas

### 1) Epidemiología

La RMSF es una de las rickettsiosis más severas, con una mortalidad reportada de hasta 40% (Parola et al., 2013), principalmente cuando no se administra el tratamiento indicado (el antibiótico doxiciclina) en la fase temprana de la enfermedad, la cual comprende los primeros 5 días desde el inicio de los síntomas (Regan et al., 2015). La RMSF se presenta principalmente en el hemisferio occidental, donde fue reconocida por primera vez en la región noroeste de las Montañas Rocosas, específicamente en el Valle *Bitterroot* del estado norteamericano de Montana, a finales del siglo XIX. Fuera de Estados Unidos de América, la RMSF se considera endémica en múltiples países del continente americano, incluyendo Argentina, Brasil, Costa Rica, Colombia, Panamá y México. (Thomas et al., 2016)

El primer caso de RMSF en México fue reportado en el año de 1946. En ese entonces se determinó que el agente causal de la enfermedad era *R. rickettsii*, transmitido por las “garrapatas de cuerpo duro” de la familia Ixodidae: *Amblyomma cajennense* y *Rhipicephalus sanguineus* (Álvarez-Hernández et al., 2017). El vector de la RMSF en Mexicali, Baja California, es la especie *Rh. sanguineus*, conocida comúnmente como la “garrapata café del perro”. *Rh. sanguineus* es una de las especies de garrapata más ampliamente distribuidas en el país y en el mundo, siendo también el vector de agentes infecciosos morfológicamente similares a *Rickettsia*, como *Ehrlichia canis* y *Coxiella burnetii*. (Dantas-Torres, 2008)

Durante los años 2009 y 2010, se presentó un brote sin precedentes de RMSF en la ciudad de Mexicali; entre el 2009 y el 2016, se registraron 967 casos confirmados de RMSF con 132 muertes relacionadas. La emergencia y persistencia de la RMSF en Mexicali se ha relacionado con factores previamente reconocidos en la región, que incluyen malas condiciones de vida y una abundancia de perros callejeros que sirven como reservorios de *Rh. sanguineus* (Álvarez-Hernández et al., 2017). Particularmente en las zonas en donde se presentaron los primeros casos de RMSF, hay una importante deficiencia en los servicios públicos disponibles, como saneamiento de lotes baldíos y pavimentación de vialidades.

## 2) Aspectos clínicos

La transmisión de la enfermedad se produce por la mordedura de las especies de garrapata mencionadas anteriormente. Debido a que la mordedura es indolora, la presencia de la garrapata adherida a su cuerpo no es perceptible. Después de un rango variable de adherencia de la garrapata, que en promedio es de seis a diez horas, las bacterias comienzan a ser inoculadas a partir de las glándulas salivales del vector. (Thorner, Walker, & Petri Jr., 1998)

Los aspectos clínicos de la RMSF incluyen: fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares, náusea y una erupción o exantema maculopapular que afecta toda la piel, incluyendo las palmas de las manos y las plantas de los pies. Debido a la presentación inespecífica de los pacientes con RMSF, los diagnósticos diferenciales son múltiples e incluyen entidades tan diferentes entre sí como meningitis, gastroenteritis, abdomen agudo, síndrome de choque tóxico, sarampión, entre otros. (Davis, Marx, 2007)

## 3) Diagnóstico de la enfermedad

La RMSF puede poner en peligro la vida del paciente y ofrece un periodo de ventana muy estrecho en el que el tratamiento antibiótico puede ser efectivo. Un diagnóstico presuntivo temprano basado en las características clínicas y epidemiológicas (antecedente de contacto con garrapatas portadoras de la bacteria, o bien, con perros callejeros) asociadas con la enfermedad representa el fundamento para un tratamiento exitoso. (Paddock, 2013)

Los métodos serológicos son de gran importancia para el diagnóstico confirmatorio de las enfermedades por bacterias del género *Rickettsia*. Sin embargo, debido al tiempo necesario para que los títulos de anticuerpos alcancen valores diagnósticos (dos a cuatro semanas), el diagnóstico serológico es retrospectivo y provee una confirmación de infección por *Rickettsia* sólo hasta que el paciente ya se ha recuperado de la enfermedad, o de manera póstuma (Levin, Snellgrove, & Zemtsova, 2016). La confirmación del diagnóstico se realiza cuando existe un aumento de al menos cuatro veces en el título entre las muestras de suero de las fases aguda y de convalecencia. (Chapman et al., 2006)

Para disminuir el tiempo de retraso en el diagnóstico se han desarrollado métodos de laboratorio como la inmunotinción de muestras de biopsia, el aislamiento de la bacteria en cultivos tipo *shell vial*, y la amplificación del DNA de *Rickettsia* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se considera que las técnicas basadas en la amplificación de genes por PCR permiten una identificación rápida y conveniente de *Rickettsia*, incluso en laboratorios no especializados en el diagnóstico de estos microorganismos. (Biggs et al., 2016)

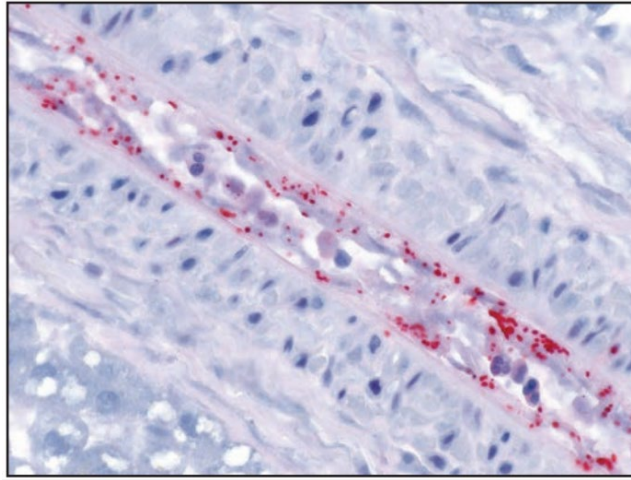
Múltiples tipos de muestras clínicas son adecuadas para su uso en la amplificación de DNA de *R. rickettsii* por medio de PCR; las biopsias de piel y las células mononucleares de sangre periférica se utilizan de forma rutinaria en laboratorios especializados. La detección mediante PCR se ha basado en la amplificación del gen codificante de la “proteína de 17 kDa” de *Rickettsia*, así como los genes *gltA* y *ompA*. (Jorgensen et al., 2015)

La detección directa de *R. rickettsii* mediante la inmunofluorescencia de tejidos permite la confirmación de la infección en pacientes que aún no presentan anticuerpos detectables en suero. Las muestras pueden ser analizadas en fresco, fijadas en formol, o bien, incluidas en parafina. Las biopsias de piel afectada por el exantema maculopapular, preferiblemente lesiones petequiales, son las muestras más utilizadas para la realización de inmunofluorescencia. En casos fatales se ha detectado a la bacteria en los tejidos de múltiples órganos como hígado, bazo, riñón, corazón, membranas meníngeas, o piel, obtenidos en la autopsia. Las técnicas histológicas confieren alta especificidad, pero baja sensibilidad, entre 53 y 75%. (Jorgensen et al., 2015)

## ii. Mecanismos de patogenicidad

Una vez que la bacteria se ha introducido en la piel del individuo, infecta a las células fagocíticas cutáneas, como los macrófagos o las células dendríticas, y es transportada a través de los vasos linfáticos a los ganglios, donde se replica y posteriormente ingresa al torrente sanguíneo y se disemina en todo el organismo. *R. rickettsii* presenta tropismo por las células endoteliales de los vasos sanguíneos de pequeño y mediano calibre (ilustración 1), y tiene la capacidad de provocar daño vascular con fuga de fluido hacia el espacio intersticial por aumento de la permeabilidad vascular. El daño en la integridad de la vasculatura da lugar a la aparición de complicaciones que pueden resultar devastadoras como meningoencefalitis, edema pulmonar agudo no

cardiogénico, neumonía intersticial, choque hipovolémico, y falla renal aguda. (Minniear & Buckingham, 2009)



**Ilustración 1. Imagen microscópica de *Rickettsia rickettsii* (rojo) en células endoteliales (azul / púrpura).** Fuente: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. / Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (2016)

La capacidad de *R. rickettsii* de infectar a un individuo depende de su habilidad para adherirse a las células del hospedero e invadirlas. Esto requiere del reconocimiento correcto de receptores celulares específicos, lo cual se logra gracias a la presencia de ciertas proteínas en la superficie de la bacteria. (Sahni, Fang, Sahni, & Walker, 2018)

### **1) Proteínas de superficie**

Se ha identificado una familia importante de genes, compuesta de por lo menos 17 miembros, denominada *sca* (*surface cell antigen*), que contiene la información para la síntesis de proteínas de superficie presentes en las especies del género *Rickettsia*. Las proteínas codificadas por estos genes presentan una estructura modular, con un “péptido señal” en el extremo N-terminal, un “dominio pasajero” central, y un “módulo de translocación” en el extremo C-terminal (péptido beta). Al ser traducidas, estas proteínas son secretadas a través de la membrana interna de la bacteria utilizando la información codificada por el péptido de señal del extremo N-terminal. Esto permite que el dominio del extremo C-terminal se inserte en la membrana externa para formar un poro transmembrana tipo barril beta, que participa en la secreción del dominio pasajero hacia el medio extracelular. (Blanc et al., 2005; Jacob-Dubuisson, Fernandez, & Coutte, 2004)

Dentro de los miembros que componen la familia de genes *sca*, cinco genes, *sca0* (también llamada *rOmpA*), *sca1*, *sca2*, *sca4*, y *sca5* (también llamada *rOmpB*), destacan por encontrarse altamente conservados entre la mayoría de las especies de *Rickettsia* del grupo SFG. La conservación de estos genes en múltiples especies a través de la evolución sugiere que podrían jugar un papel importante en su patogenicidad. (Roux & Raoult, 2000) Las proteínas *Sca0* y *Sca1* están involucradas en la fijación de *Rickettsia* a las células del hospedero, mientras que *Sca5* participa en adherencia e invasión. *Sca2* funciona como un imitador de la proteína *formina* que produce movimiento de *Rickettsia* mediante polimerización de moléculas de actina dentro de las células invadidas, y *Sca4* activa a la proteína *vinculina* e interactúa con el citoesqueleto de actina de las células del hospedero. (Gong et al., 2014)

Adicionalmente a las proteínas mencionadas, en la actualidad se han descrito otras proteínas expuestas en la superficie de *Rickettsia rickettsii*, como las proteínas *OmpW*, *GroEL*, *GroES*, *Adr1*, *Adr2*, *Porin\_4*, *TolC*, y una proteína de unión al DNA (denominada *PUD*). Sobre la función de estas proteínas expuestas en la superficie, se sabe que *GroEL* y *GroES* pertenecen a la familia de las proteínas de choque térmico, y por lo tanto juegan un papel importante en el plegamiento, prevención de la agregación y reparación de proteínas mal plegadas o dañadas. *PUD* participa en la activación de la vía de señalización *NF- $\kappa$ B* en las células endoteliales invadidas por *R. rickettsii*. *Adr1* y *Adr2* son adhesinas que se han reportado en otras especies dentro del género *Rickettsia*, y se ha demostrado que participan en la adhesión y la entrada de la bacteria a las células del hospedero. *OmpW* se asocia con resistencia bacteriana a múltiples tipos de estrés ambiental. *Porin\_4* forma un canal en la membrana externa de la bacteria que permite el paso del agua y la difusión de moléculas hidrofílicas hacia el espacio periplásmico. *TolC* forma un canal en la membrana celular que se requiere para la exportación de proteínas de virulencia y compuestos tóxicos. La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas *Adr1*, *Adr2*, *OmpW*, *Porin\_4*, y *TolC* en las especies de *Rickettsia* del grupo SFG mostró un alto nivel de conservación, con una similitud de aminoácidos de 87% - 99%. (Gong et al., 2014)

La proteína *rOmpB* (*Rickettsial outer-membrane protein B*) es una de las proteínas más abundantes de la membrana externa de *Rickettsia*, con una masa molecular de 120 kDa en su

forma madura. Es traducida en el ribosoma como una “pre-proteína” de 168 kDa, que posteriormente es escindida para liberar al dominio pasajero de 120 kDa del dominio de translocación tipo barril beta de 32 kDa, dejando al dominio de 120 kDa asociado con la cara externa de la membrana externa de la bacteria (Hackstadt, Messer, Cieplak, & Peacock, 1992).

*Rickettsia* invade la célula endotelial por medio del mecanismo de “zipper”, el cual es un mecanismo de invasión celular mediada por receptor, en el que una proteína bacteriana induce una vía de señalización en la célula del hospedero a través de la estimulación extracelular de un receptor de membrana. Estas vías de señalización inducen el reordenamiento local del citoesqueleto de la célula endotelial, así como el reclutamiento de la maquinaria endocítica en el sitio de interacción, dando como resultado la entrada de la bacteria hacia el citoplasma. (Alonso & Portillo, 2004)

Se ha identificado al receptor de membrana de las células endoteliales, Ku70, como una de las proteínas de superficie con las que interactúa *Rickettsia* para mediar su entrada a la célula. Se ha demostrado experimentalmente que la deficiencia o inhibición de Ku70 disminuye hasta en un 50% la invasión celular, por lo que se cree que existen otros receptores de superficie involucrados en la invasión por *Rickettsia*. (Martinez, Seveau, Veiga, Matsuyama, & Cossart, 2005)

A través de métodos de cromatografía de afinidad, se ha identificado a rOmpB como un ligando bacteriano del receptor Ku70, sugiriendo que la interacción rOmpB-Ku70 es de importancia en la invasión celular. Además, estudios en *R. conorii* y *R. japonica* también han demostrado que Ku70 es un receptor para la invasión por *Rickettsia* a través de su interacción con la proteína rOmpB (Martinez et al., 2005).

## **Aptámeros**

Los aptámeros son moléculas de DNA o RNA de cadena sencilla (usualmente de entre 20 y 80 nucleótidos con un peso molecular entre seis y 30 kDa) que tienen la capacidad de unirse de manera específica y con alta afinidad a moléculas blanco al plegarse en una conformación tridimensional determinada por la secuencia de nucleótidos que los componen. (Sun & Zu, 2015) De manera similar al reconocimiento conformacional que media el reconocimiento y la formación de complejos entre anticuerpo y antígeno, los aptámeros se unen a sus blancos con alta especificidad y afinidad a través de fuerzas de van der Waals, puentes de hidrogeno, interacciones electrostáticas y complementariedad de formas, con constantes de disociación ( $K_d$ ) en el rango de pico- a nanomolar. Por lo tanto, los aptámeros también se conocen como “anticuerpos químicos” y son funcionalmente utilizados como antagonistas, agonistas o ligandos. (Sun & Zu, 2015)

### **i. Características**

En 1990, Tuerk y Gold describieron el método SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), mediante el cual lograron aislar oligonucleótidos de RNA que se unían con alta afinidad y especificidad a la DNA-polimerasa del bacteriófago T4. En ese mismo año, y trabajando independientemente, Ellington y Szostak reportaron el aislamiento, a través de un método similar al SELEX, de moléculas de RNA con alta afinidad y especificidad de unión a moléculas de colorantes orgánicos a partir de una biblioteca de secuencias aleatorias de 100 nucleótidos de longitud. Estos investigadores acuñaron el término “aptámeros”, a partir del latín *aptus* (apto, apropiado) y el griego *meros* (parte, porción), para referirse a esas moléculas de RNA. (Ellington & Szostak, 1990)

A partir de entonces, diversos grupos comenzaron a identificar aptámeros mediante el método SELEX contra múltiples blancos heterogéneos, según como fue reportado por Joyce en una de las primeras revisiones sobre el tema (Joyce, 1994); dichos blancos incluyen moléculas tan distintas como la trombina (Bock, Griffin, Latham, Vermaas, & Toole, 1992), proteínas del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1) (Craig Tuerk & MacDougal-Waugh, 1993), factores de crecimiento (Jellinek, Lynott, Rifkin, & Janjic, 1993), autoanticuerpos (Tsai & Keene, 1993), e

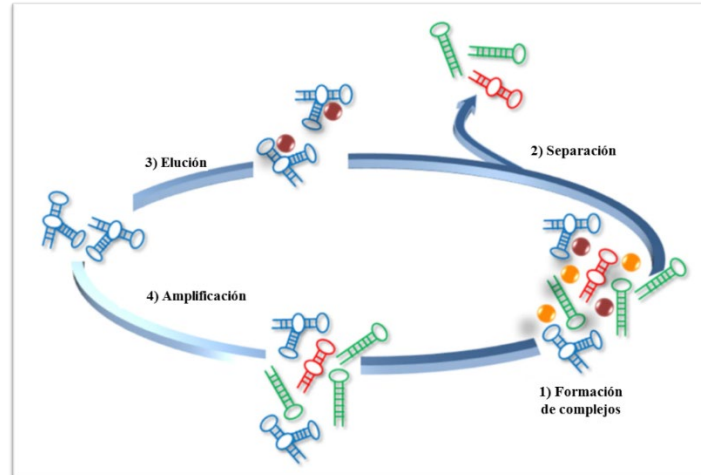
incluso moléculas pequeñas como la L-arginina (Connell, Illangsekare, & Yarus, 1993), el ATP (Sassanfar & Szostak, 1993), y la teofilina, encontrando en este último caso aptámeros capaces de distinguirla de la cafeína, la cual se diferencia por un grupo metilo. (Jenison, Gill, Pardi, & Polisky, 1994)

Debido a su alta especificidad y afinidad de unión, los aptámeros se consideran como moléculas alternativas a los anticuerpos. En comparación con estos últimos, los aptámeros ofrecen ciertas ventajas como la capacidad de reconocer blancos no-inmunogénicos o tóxicos para las células, mayor vida media, así como menor toxicidad e inmunogenicidad. Por otra parte, una vez que se han seleccionado y se ha identificado su secuencia de nucleótidos, la obtención de los aptámeros se realiza por medio de síntesis química, y no requiere del uso de cultivos celulares. (Vorobyeva, Vorobjev, & Venyaminova, 2016)

## ii. Selección

El método SELEX clásico consiste en múltiples ciclos de unión, separación y amplificación de una biblioteca inicial de secuencias de cadena sencilla de DNA o RNA, que se diseña con un segmento variable en la porción media de su secuencia. El resultado final es la selección *in vitro* de una secuencia específica a partir de esa biblioteca. En teoría, se pueden conseguir bibliotecas compuestas por  $4n$  secuencias distintas, donde  $n$  es la longitud en pares de bases de la región variable. Las cuatro fases generales del método SELEX son (ilustración 2): 1) incubación de la biblioteca combinatoria de ácidos nucleicos con la molécula blanco y formación de complejos bajo condiciones controladas de unión; 2) separación de las secuencias no-unidas de la mezcla; 3) disociación de los complejos de secuencias-molécula blanco; 4) amplificación de las secuencias disociadas para obtener un grupo enriquecido de aptámeros y reconstitución del DNA de cadena sencilla o RNA para ingresar a un nuevo ciclo. Múltiples ciclos de selección enriquecen exponencialmente la biblioteca con secuencias de mayor afinidad que posteriormente pueden ser aisladas por clonación y caracterizadas, lo que permite determinar su estructura secundaria y terciaria, así como medir su afinidad por el blanco (C Tuerk & Gold, 1990).





**Ilustración 2. Método SELEX.** Tomado y modificado de Aquino-Jarquín G, Toscano-Garibay JD: RNA Aptamer Evolution: Two Decades of SELEction. *Int J Mol Sci.* 2011; 12: 9155-9171

Desde su introducción hace casi 30 años, se han descrito múltiples modificaciones del método SELEX que permiten obtener aptámeros con mayor facilidad o con ciertas características que resulten favorables para la aplicación específica que se les quiera dar. En este respecto se pueden mencionar modificaciones como: Cell-SELEX, en donde se utilizan células vivas completas como el blanco contra el que se seleccionan los aptámeros, obteniendo moléculas con una mejor aplicación clínica (Sun & Zu, 2015); CE-SELEX, en donde se separan las secuencias unidas al blanco del resto de las secuencias mediante electroforesis, lo que permite seleccionar aptámeros con menos ciclos de selección que con el método estándar; *in vivo* SELEX, donde se administra una biblioteca de secuencias modificadas a un organismo vivo y posteriormente se recuperan los aptámeros a partir del tejido deseado. (Zhuo et al., 2017)

La decisión entre trabajar con aptámeros de DNA o de RNA implica ciertas ventajas y desventajas para ambos casos. Por ejemplo, la selección de aptámeros de RNA conlleva la necesidad de agregar un paso de retro-transcripción posterior a la fase de disociación de los complejos de secuencias-moléculas blanco (fase 3) para regenerar la biblioteca de DNA y permitir su amplificación por PCR. Aunado a lo anterior, se considera que el RNA es químicamente más inestable que el DNA, y por lo tanto, requiere de mayor cuidado en su manejo.

Sin embargo, las moléculas de RNA tienen la ventaja de formar estructuras monocatenarias naturalmente, lo que las hace más aptas para su uso como ligandos de moléculas blanco. Además, se pueden realizar modificaciones químicas a las moléculas de RNA que mejoran importantemente su estabilidad y su resistencia a la degradación por nucleasas (enzimas que degradan a los ácidos nucleicos). Por ejemplo, el grupo hidroxilo en la posición 2' del azúcar ribosa presente en los ribonucleótidos es un blanco principal para nucleasas. La estabilidad de un aptámero puede ser modificada utilizando ribonucleótidos modificados a los que se les ha adicionado un átomo de flúor en la posición 2' de la pentosa. Otras modificaciones pueden aumentar la vida media de la molécula en la circulación. Por ejemplo, moléculas acarreadoras como polietilenglicol o colesterol pueden ser acopladas a los extremos de los aptámeros para aumentar su vida media. (Zhou & Rossi, 2016)

### **iii. Aplicaciones**

Desde su introducción en 1990, se han reportado múltiples modificaciones al método SELEX que permiten adaptar la tecnología a distintos blancos o a diferentes aplicaciones (González, Elena Martín, Fernández, & García-Sacristán, 2016). En la actualidad, los aptámeros se están utilizando como herramientas para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico o de tratamiento de ciertas enfermedades.

#### **1) Aplicaciones terapéuticas**

Las estrategias que se han propuesto como posibles aplicaciones terapéuticas de los aptámeros son las siguientes: los aptámeros pueden servir como antagonistas para bloquear la interacción de blancos asociados a enfermedades, como por ejemplo, interacciones entre receptor y ligando; los aptámeros también pueden funcionar como agonistas para estimular la función de receptores blanco; se pueden utilizar aptámeros afines a un tipo celular específico para acarrear otros agentes terapéuticos directamente a las células o tejido blanco. (Zhou & Rossi, 2016)

Se encuentran en desarrollo aptámeros con finalidades terapéuticas en el tratamiento de ciertas neoplasias (Pastor, 2016), y enfermedades infecciosas; por ejemplo, se han seleccionado aptámeros contra proteínas esenciales para la interacción entre el virus del herpes simple tipo 1

(HSV-1) y el hospedero (interfiriendo con la entrada del virus a la célula), o contra proteínas implicadas en el ciclo de replicación viral del HSV-1 (atacando al virus intracelularmente) (González et al., 2016). Sin embargo, el único aptámero terapéutico actualmente aprobado por la *Food and Drug Administration* de los Estados Unidos de América se utiliza para el tratamiento de la degeneración macular asociada con la edad, y se conoce como pegaptanib sódico (Macugen®), un aptámero de RNA que inhibe la interacción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) con su receptor. (Ng et al., 2006)

## 2) Aplicaciones diagnósticas

Gracias a la alta afinidad que tienen por sus blancos, los aptámeros pueden ser desarrollados como herramientas de diagnóstico. Los aptámeros cuentan con las ventajas de poder ser conjugados y marcados fácilmente, lo que les permite combinarse con otras técnicas, como la citometría de flujo o la detección basada en nanopartículas. El primer aptámero que se utilizó como herramienta de diagnóstico fue desarrollado en 1999 por Bruno et al., quienes utilizaron un aptámero seleccionado contra la bacteria *Bacillus anthracis* para detectar esporas de ántrax. A la fecha, se han aplicado aptámeros para el diagnóstico de enfermedades tan distintas entre sí como el cáncer de colon, el infarto agudo al miocardio y la malaria. (Zhuo et al., 2017)

Una vez que se conoce la secuencia de un aptámero, se pueden desarrollar una variedad de “aptasensores” para detectar su molécula blanco, los cuales se pueden clasificar en seis categorías: detección colorimétrica, detección por fluorescencia, detección electroquímica, pruebas de tira de flujo lateral, detección sensible de masas y detección basada en PCR. (L. Wang, Wang, Wei, & Li, 2018)

En la actualidad se están diseñando aptámeros para la detección de proteínas de patógenos ya sea en sangre (suero o plasma) o dentro de células infectadas. Por ejemplo, en el diagnóstico de infecciones virales se puede mencionar el trabajo de Tombelli et al. en el que se desarrollaron biosensores acoplados a aptámeros capaces de detectar con alta especificidad la proteína Tat del HIV-1 (Tombelli, Minunni, Luzi, & Mascini, 2005). De igual manera, se ha trabajado extensamente en el desarrollo de aptámeros contra otros virus de relevancia en la salud pública a nivel mundial, como los virus de la hepatitis B y C. (Mirian, Khanahmad, Darzi, Salehi, & Sadeghi-Aliabadi, 2017)

En el caso particular de las bacterias, se han desarrollado “aptasensores” para la detección colorimétrica de especies patógenas importantes para el ser humano como *Staphylococcus aureus* (Chang et al., 2016), *Escherichia coli* (Wu et al., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (K. Y. Wang, Zeng, Yang, Li, & Lan, 2011) y *Salmonella typhimurium* (Moon, Kim, Lee, & Park, 2013), entre otras. La selección de estos aptámeros se basa en la mayoría de los casos en metodología tipo Cell-SELEX en donde se obtienen aptámeros que reconocen blancos moleculares de la superficie bacteriana.

## V. ANTECEDENTES

Diferentes estudios han reportado el aislamiento de aptámeros de RNA utilizando una biblioteca de ssDNA de 75 nt de longitud con una región aleatoria de 15 nt y dos regiones fijas conteniendo los sitios de reconocimiento de las RNA polimerasas T3 y T7: Toscano-Garibay et al. aislaron un aptámero (G5 $\alpha$ 3N.4) contra la proteína E7 del virus del papiloma humano (HPV), y que puede ser utilizado en la detección de la infección por HPV, y en la detección del cáncer cervical (Toscano-Garibay, Benítez-Hess, & Alvarez-Salas, 2011). Este mismo grupo caracterizó un aptámero de RNA (Sc5-c3), que reconoce partículas similares a virus (VLPs) formadas por la proteína L1 del HPV-16, serotipo asociado al cáncer cervical, con gran especificidad y afinidad (Leija-Montoya, Benítez-Hess, Toscano-Garibay, & Alvarez-Salas, 2014). Este aptámero demostró tener la capacidad de inhibir la infección por HPV-16 *in vitro* en un estudio que se realizó utilizando un modelo de “pseudovirus” y células 293TT de mamífero (Valencia-Reséndiz et al., 2018). Estos resultados en conjunto demuestran que el diseño de la biblioteca con una región variable de 15 nt posee la variabilidad suficiente para la obtención de aptámeros funcionales contra proteínas virales.

Por otra parte, actualmente se encuentra en desarrollo un método de detección de *R. typhi* basado en un ensayo de fluorescencia ligado a enzima, acoplado a un “sándwich” de perlas magnéticas y aptámeros de DNA. El ensayo mostró un importante efecto de reactividad cruzada con otras especies del género *Rickettsia*, pero no contra otros géneros bacterianos o contra células eucariotas, demostrando su alta especificidad (Bruno et al., 2016). Sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado la aplicación de la tecnología de aptámeros específicamente en el diagnóstico o en el tratamiento de la enfermedad producida por *R. rickettsii* o algún otro miembro del SFG. (de Godoy et al., 2014)

## VI. HIPÓTESIS

La alta variabilidad conformacional de una biblioteca combinatoria de RNA con una región aleatorizada de 15 nucleótidos permitirá seleccionar aptámeros específicos para *Rickettsia rickettsii* mediante el método SELEX.

## VII. JUSTIFICACIÓN

La RMSF es un problema de salud pública en la ciudad de Mexicali que ha producido decenas de muertes desde el año 2008. Las características clínicas propias de la enfermedad durante su etapa inicial dificultan su diagnóstico, y por consecuencia, retrasan el inicio del tratamiento adecuado, lo que aumenta el riesgo de secuelas graves o muerte.

La selección de aptámeros de RNA a través del método SELEX contra *Rickettsia rickettsii* permitiría identificar moléculas que pudieran ser utilizadas en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y/o de tratamiento de la fiebre manchada de las montañas rocosas.

El desarrollo de un método de diagnóstico rápido basado en los aptámeros derivados de esta investigación podría disminuir el retraso en el diagnóstico e impactar favorablemente en la morbimortalidad de la enfermedad, al permitir iniciar el tratamiento en una etapa más temprana.

## VIII. OBJETIVOS

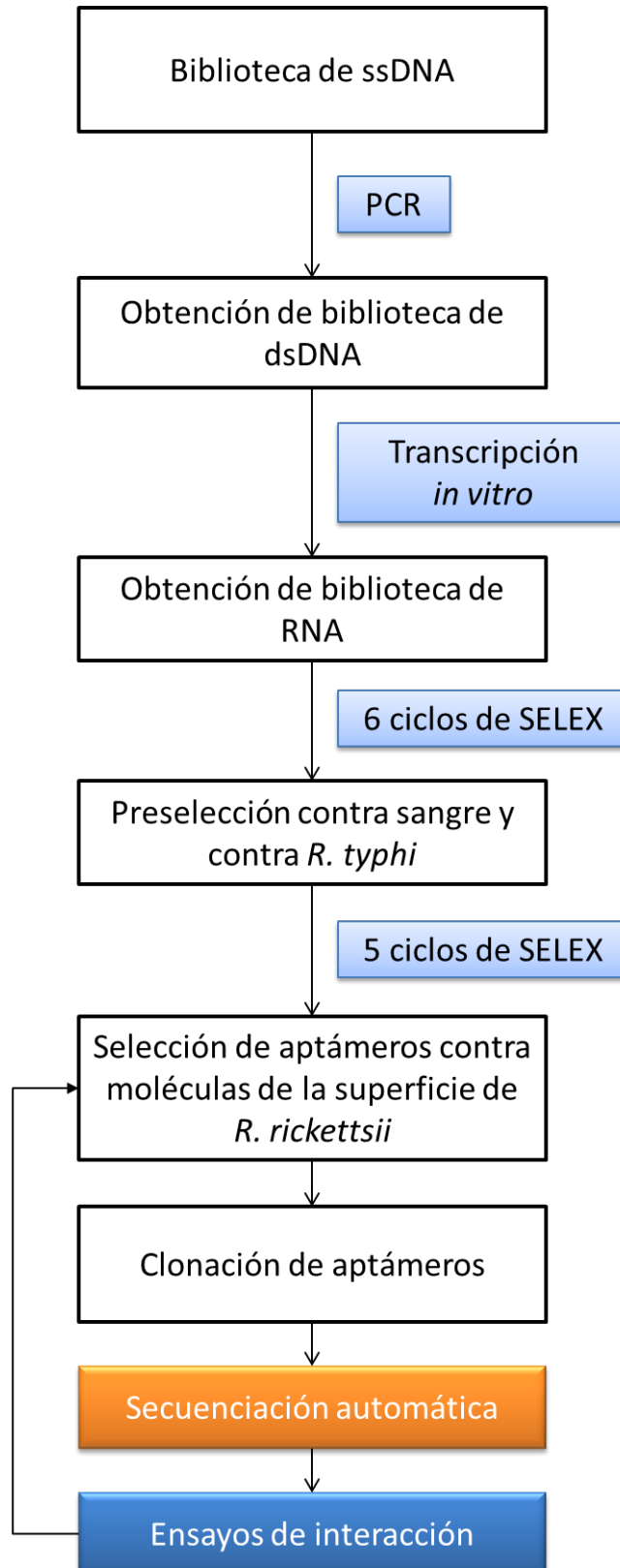
### Objetivo general

Seleccionar aptámeros de RNA contra *Rickettsia rickettsii*.

### Objetivos específicos

1. Estandarizar las técnicas para la obtención de los aptámeros de RNA
2. Generar una biblioteca combinatoria de RNA a partir de dsDNA
3. Preseleccionar la biblioteca de RNA mediante ciclos de selección negativa
4. Realizar selección positiva contra *R. rickettsii*
5. Clonar y secuenciar las moléculas obtenidas a partir de la selección
6. Analizar la interacción de aptámeros candidatos

IX. DIAGRAMA EXPERIMENTAL





## X. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Biblioteca de DNA de cadena doble (dsDNA)**

Se utilizó una biblioteca combinatoria de DNA sintético de cadena sencilla compuesta de 75 nt, la cual contiene una región central variable de 15 nt aleatorizados (nt<sup>15</sup>) flanqueada por dos secuencias fijas de 10 nt cada una. En los extremos 5' y 3' incluye las secuencias promotoras que son reconocidas por la RNA polimerasa de los fagos T7 y T3, respectivamente. Para amplificar la biblioteca y recuperar los aptámeros en cada ciclo se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: *primer Forward (Fwd)* 5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CCA AGC - 3' a una concentración final de 0.3 µM (Sigma) y *primer Reverse (Rev)* 5' - AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT - 3' a una concentración final de 0.3 µM (Sigma).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para realizar la reacción de amplificación inicial de la biblioteca de DNA de cadena sencilla (ssDNA), se incubó 0.1 µM de la biblioteca con los *primers* Fwd y Rev (0.3 µM) en buffer PCR (200 mM Tris HCl pH 8.4, 500 mM KCl) con 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, y 1 U Taq DNA Polimerasa en las siguientes condiciones: precalentamiento 2 min a 94°C, 15 ciclos de desnaturalización 1 min a 94°C, hibridación 45 s a 55°C y polimerización 2 min a 72°C, extra polimerización a 72°C por 10 min. Paralelamente se realizó un control negativo que incluye todos los componentes de la reacción a excepción de la biblioteca de DNA, con el fin de descartar alguna contaminación. Los amplicones fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

### **Transcripción *in vitro* (TIV)**

Se realizó transcripción *in vitro* utilizando como molde la biblioteca amplificada de dsDNA, la cual se incubó en buffer de transcripción (200 mM Tris-HCl pH 7.9, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM espermidina, 50 mM NaCl) con 4.5 µl de rNTPs 2.5 mM, DTT 20 mM, 20 U de inhibidor de RNAsas, y 17 U de T3 RNA polimerasa a 37°C por 24 h. Posteriormente el molde de DNA fue removido añadiendo a

la reacción 10 U de DNAsa TURBO™ (Thermo-Fisher Scientific) y se incubó por una noche a 37°C. La transcripción fue visualizada por electroforesis en agarosa al 2%.

### **Purificación de RNA**

La biblioteca de RNA obtenida mediante la transcripción *in vitro* fue purificada por extracción fenólica: se agregaron 400 µl de Trizol y 80 µl de cloroformo, se mezcló por inversión 3 veces y se sometió a centrifugación durante 5 min a 15000 × g, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 750 µl de isopropanol. La reacción se incubó por una noche a - 20°C y el RNA purificado se precipitó mediante una centrifugación a 15000 × g durante 30 minutos, el botón obtenido se lavó con 500 µl de etanol 70% y se sometió a centrifugación durante 15 min a 15000 × g. Posteriormente el botón de ARN fue resuspendido en 30 µl de agua libre de nucleasas (ALN) añadiendo 40 U de inhibidor de RNAsas [1 µl de RNaseOUT™ (Invitrogen)].

### **Reverso transcripción acoplada a PCR (RT-PCR)**

En cada ciclo de preselección y selección, las secuencias de RNA obtenidas fueron amplificadas mediante una reacción de reverso-transcripción acoplada a PCR (RT-PCR) con la finalidad de regenerar la biblioteca de DNA, que posteriormente fue utilizada en el siguiente ciclo. La RT-PCR se realizó con el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) utilizando los mismos *primers* y condiciones utilizados para PCR, sólo se añadió un paso de reverso-transcripción inicial de 30 min a 50°C. Para cada reacción se agregaron dos controles: un control negativo que contiene todos los componentes de la reacción a excepción del molde de RNA, para descartar que el amplificado se deba a contaminación, y un control de PCR en el que se utiliza la enzima Taq DNA polimerasa, para verificar que en la muestra del molde de RNA no exista contaminación por DNA.

### **Preparación de membranas**

Para los pasos de selección negativa y positiva, se requirió del uso de la bacteria inmovilizada en membranas de PVDF de  $\approx 0.25 \text{ cm}^2$  (Immobilon-P, Millipore). Inicialmente, las membranas utilizadas se sumergieron en 500  $\mu\text{l}$  de metanol absoluto para su “activación” e inmediatamente se lavaron en 500  $\mu\text{l}$  de ALN. Posteriormente, se gotearon 2  $\mu\text{l}$  del stock de *Rickettsia* (*R. typhi* para la selección negativa y *R. rickettsii* para la selección positiva) sobre la membrana, y 1  $\mu\text{l}$  en la cara contraria de la membrana.

### **Selección negativa**

La selección negativa o preselección se realizó con el fin de eliminar las secuencias de RNA que mostraron afinidad con el sistema de selección, el cual se compone de una membrana de PVDF saturada con *R. typhi*, 40 U de inhibidor RNaseOUT™ (Invitrogen) y solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS). Posteriormente, se agregó el transcrito obtenido de la biblioteca de DNA (previamente seleccionada contra sangre humana) y 40 U de inhibidor de RNaseOUT™, generando un volumen final de reacción de 80  $\mu\text{l}$ . Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en agitación constante y una vez concluido el tiempo se retiró la membrana con las moléculas de RNA que eran afines a ella, y se recuperó el sobrenadante de la reacción, el cual contiene las secuencias que no se unen al sistema. El RNA en el sobrenadante fue amplificado mediante RT-PCR y se obtuvo una biblioteca de DNA preseleccionada a la que se le realizó una transcripción *in vitro* para obtener las moléculas de RNA con menor afinidad al sistema de selección, las cuales fueron utilizadas para realizar los ciclos posteriores.

### **Selección positiva**

La selección positiva consiste en obtener las secuencias que se unen de manera específica a *R. rickettsii*, partiendo de una biblioteca preseleccionada contra sangre humana y contra *R. typhi*. Durante la selección se utilizaron membranas de PVDF saturadas con *R. rickettsii*. Para realizar la

selección se incubaron las membranas de PVDF saturadas con *R. rickettsii* junto con la biblioteca de RNA (obtenida del último ciclo de preselección) en un volumen de 80  $\mu$ l de PBS y 40U de inhibidor de RNAsas. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, en agitación y al finalizar se retiró la membrana. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces en 80  $\mu$ l de PBS con la finalidad de eliminar el RNA que no interaccionó con el blanco. La membrana se colocó en un nuevo tubo con 80  $\mu$ l de PBS y se calentó a 68°C durante 8 min para recuperar los aptámeros con afinidad a *R. rickettsii*. Los aptámeros obtenidos fueron amplificados mediante RT-PCR. Para regenerar la biblioteca de RNA se realizaron reacciones de transcripción *in vitro* como se describió anteriormente. El RNA obtenido fue eluido y purificado como se mencionó anteriormente.

### **Preparación de bacterias competentes**

Se utilizó 1  $\mu$ l de stock de bacterias *Escherichia coli* TOP10 y se cultivó en 3 ml de medio LB a 37°C por una noche. El cultivo se diluyó en 30 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 2:30 h. Se transfirió el cultivo a un tubo de 50 ml y se incubó en hielo por 10 min. Se centrifugó el cultivo a 1250  $\times$  g por 15 min y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 15 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M y el botón se resuspendió con mezclador de vórtice. Se incubó en hielo durante 25 min. Se centrifugó a 1250  $\times$  g por 15 min, se decantó y se resuspendió en 2 ml. Se hicieron alícuotas de 200  $\mu$ l con 50% de glicerol estéril.

### **Clonación en vector pCR4-TOPO**

Una vez terminados los ciclos de selección positiva, se clonó el producto de PCR de la biblioteca seleccionada en el vector de clonación pCR4-TOPO (Thermo-Fisher Scientific) utilizando el kit de clonación “TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing” y siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente la construcción generada se utilizó para la transformación de bacterias competentes *E. coli* TOP10 (F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139*  $\Delta$ (*araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*).

### **Transformación bacteriana**

La transformación se realizó tomando 50  $\mu$ l de bacterias competentes *E. coli* TOP10 (F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139*  $\Delta$ (*araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*) con 2 o 4  $\mu$ l de vector. Inicialmente la reacción se incubó en hielo durante 30 minutos, posteriormente se realizó un choque térmico a 42°C durante 2 minutos. Inmediatamente después las bacterias se incubaron en hielo nuevamente y se agregaron 250  $\mu$ l de medio SOC a temperatura ambiente. Se incubaron bacterias a 37°C durante 1 h, en agitación, y se centrifugaron a 18000  $\times$  g durante 1 min. Se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en el líquido sobrante; posteriormente las bacterias se sembraron en cajas precalentadas con medio LB agar con ampicilina y se incubaron a 37°C por una noche. Las colonias obtenidas fueron resembradas en 3 ml de medio LB líquido con ampicilina y se incubaron a 37°C por una noche. Finalmente, los cultivos obtenidos fueron utilizados para la extracción de DNA plasmídico.

### **Purificación y comprobación de DNA plasmídico**

Para realizar la extracción y purificación del vector construido, se utilizó el kit comercial PureYield™ (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. Una vez purificado el vector, este se analizó en un gel de agarosa. Para comprobar la presencia del inserto en el vector se digirió este último con la enzima de restricción EcoR1. En un tubo de 1.5 ml se agregaron 4.9  $\mu$ l de ALN, 1  $\mu$ l de buffer Anza™ (Invitrogen), 0.1  $\mu$ l de BSA (10 mg/ml), 0.5  $\mu$ g de DNA plasmídico, y 12 U de enzima EcoR1 (Promega). La reacción se incubó a 37°C por una noche y posteriormente se verificó la presencia de los fragmentos esperados en un gel de agarosa al 0.7%.

### **Secuenciación de aptámeros**

La secuenciación de los aptámeros obtenidos se realizó a través del servicio brindado por el laboratorio GenScript (Piscataway, NJ) donde se realiza secuenciación por el método de Sanger.

Las muestras utilizadas para la secuenciación consistieron en más de 1500 ng del DNA plasmídico producto de la clonación de los aptámeros, el cual fue cuantificado utilizando el equipo NanoDrop™ (Thermo-Fisher Scientific). Se utilizó el *primer* M13R para la lectura de las 250 bases.

Las secuencias resultantes fueron analizadas mediante el software BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Therapeutics). Para la determinación de las estructuras secundarias se utilizó el software mFold.

### **Marcaje radioactivo**

Los aptámeros utilizados en los ensayos de interacción se marcaron con el isótopo radioactivo fósforo-32 (<sup>32</sup>P). Inicialmente se realizó PCR del DNA plasmídico para obtener dsDNA correspondiente con la secuencia del aptámero. Posteriormente, se realizó TIV de este dsDNA siguiendo el protocolo previamente mencionado, pero utilizando una mezcla de rNTPs diferente, que sólo contiene los ribonucleótidos ATP, GTP y CTP. Una vez montada la reacción se compensó la falta de UTP añadiendo 1 µl de α[<sup>32</sup>P]-UTP (3000 mCi/mmol). La reacción fue incubada durante 3 h a 37°C en un volumen final de 20 µl.

Finalizada la reacción se agregaron 20 µl de buffer stop [formamida 80% (v/v), EDTA 10 mM, azul de bromo-fenol 0.01% (p/v), xilen-cyanol 0.01% (p/v)] a cada una de las muestras y se calentaron durante 8 minutos a 65°C; posteriormente se cargaron las muestras en un gel de acrilamida desnaturizante al 8% y se dejaron correr durante 45 min a 250 V. El gel fue separado de uno de los vidrios que lo sostienen y se envolvió en plástico por ambos lados (Reynolds® 900RF). En completa oscuridad se expuso en una placa radiográfica X-Omat (Kodak) durante 5 - 8 minutos (marcando los extremos para darle orientación a la placa). La placa se reveló durante 1 min, se lavó en agua corriente y se fijó durante 45 s. Una vez seca, la placa se sobrepuso en el gel siguiendo las marcas de orientación y se cortaron los fragmentos de gel que correspondían a las bandas del aptámero marcado.

Los cortes de gel se trituraron en jeringas sin aguja de 3 ml, se colocaron en tubos de 1.5 ml, se les añadió 500 µl de buffer de elusión [acetato de amonio 0.5 M, EDTA 1 mM, SDS 0.1% (p/v)] y

se agitaron con mezclador de vórtice durante 15 s. Los tubos se colocaron en recipientes adecuados para almacenar muestras radioactivas y se incubaron durante 16 h a 4°C.

Las muestras fueron filtradas a través de poros de 0.45 nm, recuperando un volumen de  $\approx 450 \mu\text{l}$  y se realizó una extracción fenólica como se describió anteriormente. El producto obtenido fue resuspendido en  $30 \mu\text{l}$  de ALN.

### Ensayos de interacción

La interacción de los aptámeros con las proteínas de *Rickettsia* y las proteínas control se determinó utilizando un sistema de “sándwich” slot-blot. Las TIV radio-marcadas de los aptámeros a analizar se dividieron en secciones iguales para ser incubadas con  $1 \mu\text{l}$  (0.25 U de absorbancia) del blanco: *R. rickettsii* y sus respectivos controles: *R. conorii*, *R. typhi*, de células Vero y de saco vitelino.

Cada reacción se llevó a cabo en buffer salino de fosfatos 1X (D-PBS 1X), en presencia de 40 U de inhibidores de RNasas ( $1 \mu\text{l}$  RNaseOut®), en un volumen final de  $80 \mu\text{l}$  y se incubó durante 5 min en agitación a temperatura ambiente.

Una vez que se llevó a cabo la interacción, las reacciones se cargaron en un aparato de *slot-blot* y las muestras fueron filtradas a presión constante a través de dos membranas, la primera de nitrocelulosa PROTRAN (Whatman), colocada sobre una segunda membrana de nylon Hybond-N (GE Healthcare) que posee la característica de estar cargada positivamente. El complejo aptámero-proteína se mantiene retenido en la membrana superior de nitrocelulosa, mientras el aptámero libre es retenido en la membrana inferior de nylon. La radioactividad retenida en cada membrana es detectada usando un escáner fluorográfico “*Personal Imager System*” de Bio-Rad. El resultado de la interacción se muestra como porcentaje de saturación, lo cual corresponde a el aptámero unido al blanco entre el aptámero total (aptámero libre y unido al blanco) por cien. La cuantificación del aptámero libre y en interacción con las proteínas en cada muestra se determinó utilizando el programa ImageQuant 5.2.

**XI. RESULTADOS****Estandarización de técnicas para la obtención de los aptámeros de RNA**

Se determinaron las condiciones más apropiadas para los protocolos que se utilizaron en la obtención de los aptámeros.

La producción de células *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes se realizó a través de un método químico utilizando CaCl<sub>2</sub>. Para obtener la máxima eficiencia se modificaron los tiempos de incubación. En la tabla 1 se muestran las variaciones en el protocolo para la obtención de bacterias competentes.

<b>Condiciones generales</b>	<b>Condiciones de trabajo</b>
Cultivar bacterias <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en 3 ml de medio LB a 37°C por una noche	Cultivar bacterias <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en 3 ml de medio LB a 37°C por una noche
Agregar 7 ml de medio LB	Agregar 7 ml de medio LB
Incubar a 37°C por 30 min	Incubar a 37°C por 90 min
Centrifugar a 1250 $\times$ g por 10 min	Centrifugar a 1250 $\times$ g por 10 min
Incubar en hielo por 10 min	Incubar en hielo por 30 min
Agregar 5 ml de CaCl <sub>2</sub> estéril 0.1 M después de decantar	Agregar 5 ml de CaCl <sub>2</sub> estéril 0.1 M después de decantar
Centrifugar a 1250 $\times$ g por 10 min	Centrifugar a 1250 $\times$ g por 10 min
Decantar y resuspender en 1 ml de CaCl <sub>2</sub> 0.1 M	Decantar y resuspender en 1 ml de CaCl <sub>2</sub> 0.1 M
Hacer alícuotas con 50% de glicerol estéril	Hacer alícuotas con 50% de glicerol estéril

La transformación bacteriana de las células competentes se realizó mediante choque térmico. Para la estandarización del procedimiento se modificaron parámetros como el volumen de bacterias inicial, el tiempo de choque térmico, el método de agitación y el tiempo de centrifugación y de incubación, como se muestran en la tabla 2.



**Tabla 2. Transformación bacteriana**

Condiciones generales	Condiciones de trabajo
Tomar 50 µl de bacterias competentes	Tomar 100 µl de bacterias competentes
Agregar 2 µl de plásmido	Agregar 2 µl de plásmido
Incubar en hielo por 30 min	Incubar en hielo por 30 min
Inducir muestras en agua a 42°C por 30 s	Inducir muestras en agua a 42°C por 2 min
Colocar muestras inmediatamente en hielo	Colocar muestras inmediatamente en hielo
Agregar 1 ml de medio LB sin antibiótico	Agregar 1 ml de medio LB sin antibiótico
Incubar a 37°C por 1 - 2 h	Incubar a 37°C por 90 min
Centrifugar a máxima velocidad por 5 min	Centrifugar a 17500 × g por 1 min
Decantar 1 ml en cloro bajo mechero	Decantar 1 ml en cloro bajo mechero
Resuspender remanente con mezclador de vórtice	Resuspender remanente con micropipeta
Espatular en cajas de medio LB sólido	Espatular en cajas de medio LB sólido
Incubar a temperatura ambiente por una noche	Incubar a 37°C por una noche

La amplificación de la biblioteca de DNA de cadena sencilla se obtuvo a partir de una modificación de las condiciones generales de PCR (tabla 3). Se determinó una concentración de 0.2 µM de cada *primer* y una temperatura de alineamiento de 55°C para una óptima amplificación.

**Tabla 3. PCR punto final de biblioteca de DNA**

Reactivo	Condiciones generales	Condiciones de trabajo
Agua libre de nucleasas	Llevar a 25 µl	Llevar a 25 µl
Buffer para PCR 10X	1X	1X
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	3 mmol	3 mmol
dNTPs (ATP, GTP, CTP, TTP)	200 µM	200 µM
<i>Primer Fwd</i>	0.1 – 0.5 µM	0.2 µM
<i>Primer Rev</i>	0.1 – 0.5 µM	0.2 µM
Templado (biblioteca)	10 <sup>4</sup> – 10 <sup>6</sup> copias de DNA	0.25 µl
Enzima Taq polimerasa	0.1 U/µl	0.1 U/µl
Volumen final	25 µl	25 µl
<b>Fases en termociclador</b>		
• Pre calentamiento	94°C	2 min
• Desnaturalización	94°C	1 min
• Alineamiento	55°C	45 s
• Polimerización	72°C	2 min
• Extra-polimerización	72°C	10 min
• Soak	4°C	

Para obtener una mayor concentración e integridad del RNA se estandarizó la reacción de TIV. Se realizaron pruebas modificando la concentración de algunos de sus componentes como inhibidores de RNAsas, templado y RNA polimerasa (tabla 4).

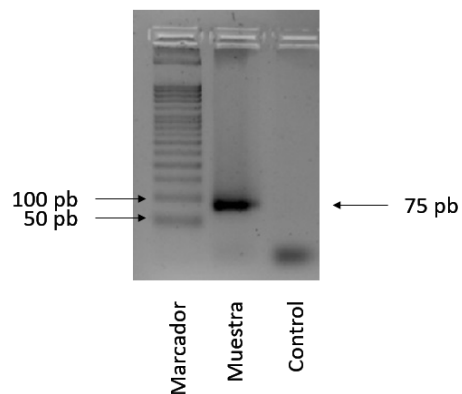
**Tabla 4. Transcripción *in vitro***

Reactivo	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo final
Agua libre de nucleasas	9.1 µl	7.9 µl	9.4 µl	4.5 µl
Buffer para TIV 5X	1X	1X	1X	1X
Ditiotreitol (DTT)	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
RNAsin/RNaseOut	16 U (40 U/µl)	16 U (40 U/µl)	24 U (40 U/µl)	20 U (40 U/µl)
rNTPs (ATP, GTP, CTP, UTP)	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
Templado (ADN)	0.4 µl	1.6 µl	2 µl	2 µl
T3 Polimerasa	-	-	10 U (20 U/µl)	20 U (20 U/µl)
T3 Polimerasa HC	8 U (80 U/µl)	8 U (80 U/µl)	-	-
Volumen final	20 µl	20 µl	25 µl	20 µl

Incubar a 37°C por una noche

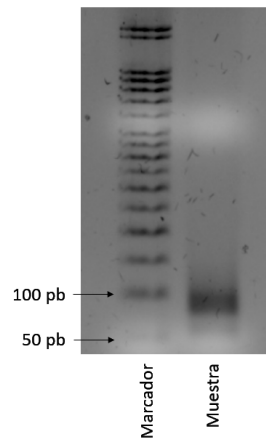
### Generación de una biblioteca combinatoria de RNA a partir de la biblioteca de dsDNA

A partir de la biblioteca de DNA de cadena sencilla (ssDNA), obtenida mediante síntesis química con una región aleatoria de 15 nucleótidos, se realizó una amplificación por PCR. Al realizar la reacción de PCR se generó una biblioteca de DNA de doble cadena (dsDNA) y se aumentó el número de copias de las secuencias de la biblioteca, esto se observó mediante la obtención de un amplicón de 75 pb, no se observó amplificado en el control sin muestra, sólo fueron visibles los oligonucleótidos en un peso por debajo de los 50 pb (figura 1).



**Figura 1. Amplificación de la biblioteca de ssDNA** Carril A: MPM 50 pb; Carril B: PCR de la biblioteca de ssDNA; Carril C: Control sin molde de PCR de la biblioteca de ssDNA

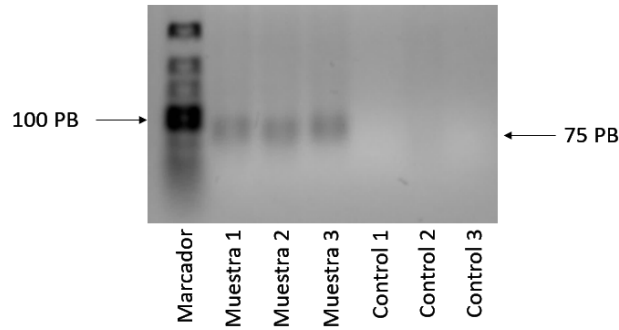
La biblioteca de dsDNA se utilizó como molde para producir la biblioteca de RNA (figura 2) mediante la técnica de transcripción *in vitro* (TIV). Lo anterior pudo ser posible porque la secuencia de DNA fue diseñada con la región promotora para la enzima RNA polimerasa T3. Mediante el uso de esta enzima, se obtuvo un transcrito de RNA de 58 pb proveniente del molde de DNA de 75 pb. La diferencia en las bases se explica por la presencia en el DNA de la región promotora de 17 pb que no se incluye en el transcrito de RNA.



**Figura 2. Transcripción *in vitro* de biblioteca de dsDNA.** Carril 1: marcador de peso molecular de 50 pb. Carril 2: transcripción *in vitro* de biblioteca de dsDNA.

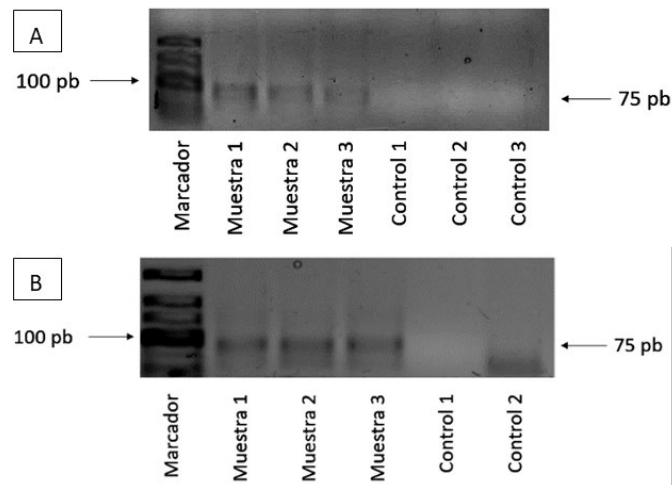
### **Preselección de la biblioteca de RNA mediante ciclos de selección negativa**

Posteriormente, la biblioteca de RNA, ésta se incubó junto con una membrana de PVDF previamente preparada y saturada con *R. typhi*. Después de la incubación, se recuperaron las secuencias de RNA que no mostraron afinidad por las moléculas de esa bacteria y se realizó RT-PCR para amplificar las secuencias recuperadas (figura 3). Los amplicones observados de 75 pb corresponden a la regeneración del dsDNA a partir del RNA obtenido de la selección negativa.



**Figura 3. Retro-transcripción de selección negativa 1 vs *R. typhi*.** Carril 1: marcador de peso molecular de 50 pb. Carriles 2 - 4: reacción de RT-PCR del RNA obtenido de selección negativa. Carril 5: control de RT-PCR sin RNA. Carril 6: control de PCR con enzima Taq y RNA. Carril 7: control de PCR con enzima Taq sin RNA.

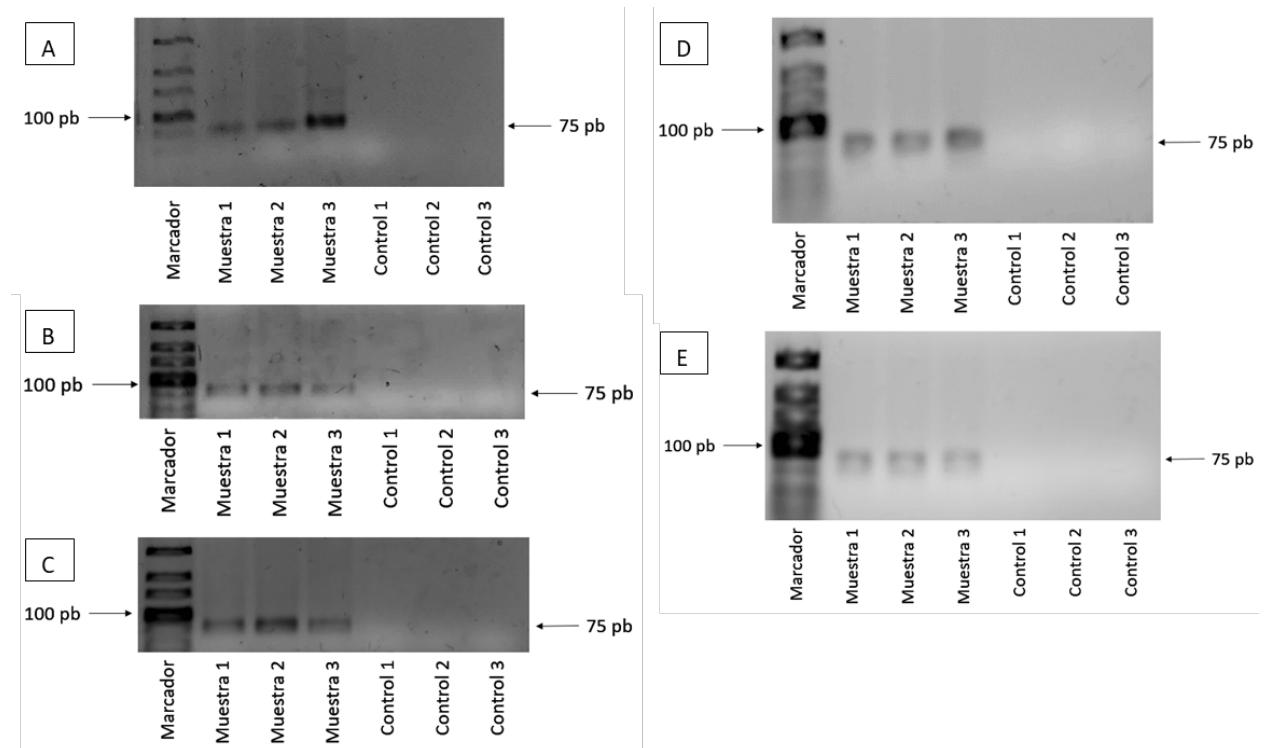
Posterior al primer ciclo de selección negativa contra *R. typhi* se realizaron dos ciclos adicionales (figura 4), obteniendo como resultado una biblioteca de RNA preseleccionada contra *R. typhi*.



**Figura 4. Retro-transcripción de ciclos de selección negativa 2 - 3 vs *R. typhi*.** A: Carril 1: marcador de peso molecular de 50 pb. Carriles 2 - 4: reacción de RT-PCR del RNA obtenido de selección negativa. Carril 5: control de RT-PCR sin RNA. Carril 6: control de PCR con enzima Taq y RNA. Carril 7: control de PCR con enzima Taq sin RNA. B: se repite el mismo orden que en A pero para el ciclo de selección negativa 3.

### Selección positiva contra *R. rickettsii*

Una vez que se obtuvo la biblioteca de RNA preseleccionada contra *R. typhi*, ésta se utilizó para realizar selección positiva mediante su incubación junto con *R. rickettsii*. Las secuencias con afinidad por las moléculas de *R. rickettsii* fueron recuperadas y se sometieron a RT-PCR para ser utilizadas en ciclos posteriores de selección. Se realizaron otros cuatro ciclos de selección positiva siguiendo el mismo protocolo mencionado (figura 5). Como resultado de estos ciclos, se obtuvieron secuencias seleccionadas contra *R. rickettsii*.

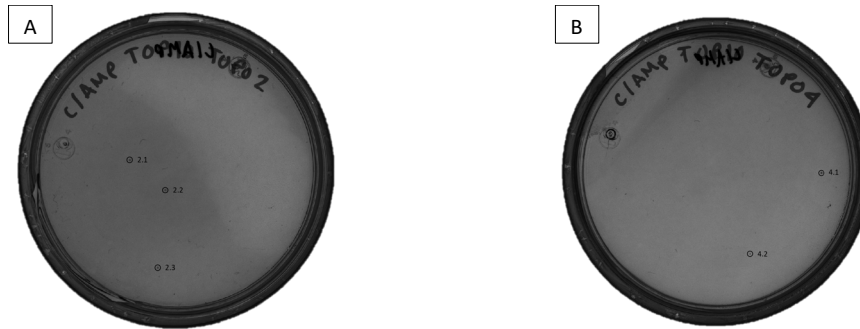


**Figura 5. Retro-transcripción de ciclos de selección positiva 1 - 5 vs *R. rickettsii*.** A: Carril 1: marcador de peso molecular de 50 pb. Carriles 2 - 4: reacción de RT-PCR del RNA obtenido de selección positiva. Carril 5: control de RT-PCR sin RNA. Carril 6: control de PCR con enzima Taq y RNA. Carril 7: control de PCR con enzima Taq sin RNA. B - E: se repite el mismo orden que en A pero para los ciclos de selección positiva 2 - 5.

### Clonación y secuenciación de aptámeros

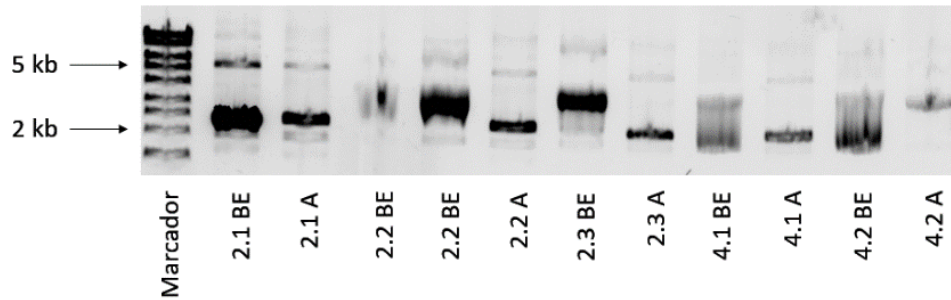
Una vez realizados los cinco ciclos de selección positiva contra *R. rickettsii*, se clonó el producto de la amplificación de la selección en el vector de clonación pCR4-TOPO. El vector construido se

utilizó para la transformación de bacterias *E. coli* TOP 10 utilizando dos protocolos distintos con 2 y 4  $\mu$ l de vector. Las bacterias transformadas se cultivaron en medio selectivo LB agar con ampicilina a 37°C por una noche. Se observó el crecimiento de 3 colonias en la caja de la reacción con 2  $\mu$ l de vector y 2 colonias en la caja de la reacción con 4  $\mu$ l de vector (figura 6). Posteriormente se recultivaron las colonias observadas en medio LB líquido con ampicilina por una noche y se realizó extracción de DNA plasmídico utilizando el kit comercial PureYield.



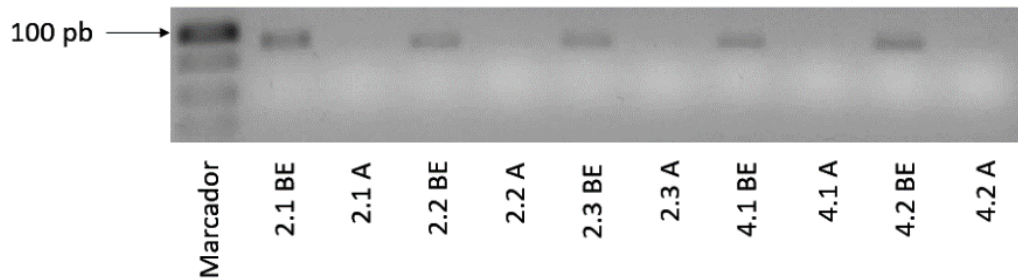
**Figura 6. Transformación de bacterias competentes *E. coli* TOP 10.** Protocolo con 2  $\mu$ l (A) y con 4  $\mu$ l (B) del vector pCR4-TOPO ligado a producto de PCR de selección positiva 5.

Una vez que se obtuvo el crecimiento de las bacterias en el medio sólido, las colonias se resembraron en medio líquido y a partir de esos cultivos se extrajo el DNA plasmídico utilizando el kit PureYield. Se analizaron las muestras de DNA plasmídico (figura 7) obtenidas a partir de las 5 colonias y se observaron bandas con altos pesos moleculares, entre 2 y 5 kb, lo que demuestra la presencia de DNA plasmídico en las 5 colonias obtenidas (2.1, 2.2, 2.3, 4.1 y 4.2). Cada plásmido se analizó 2 veces ya que a partir de la purificación se obtuvo plásmido en buffer de elusión (BE) y agua libre de nucleasas (A). La concentración del plásmido en buffer de elusión fue mayor que en agua libre de nucleasas.



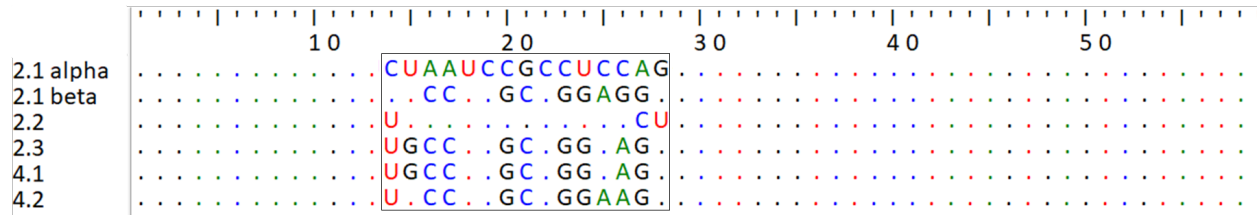
**Figura 7. Purificación mediante sistema PureYield de plásmido transformado.** Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carriles 2 - 12: Plásmido purificado a partir de colonias transformadas con plásmido pCR4® - TOPO® SP5.

Los plásmidos purificados se sometieron a digestión con la enzima de restricción EcoR1 (figura 8) para comprobar la presencia del inserto. Tras la digestión, se observó una banda de casi 100 pb en todas las muestras de plásmido extraído con buffer de elusión y no así con las muestras extraídas en agua libre de nucleasas, dicha banda indica la presencia del inserto que corresponde al aptámero separado del plásmido por medio de la digestión enzimática (Anexo 1).



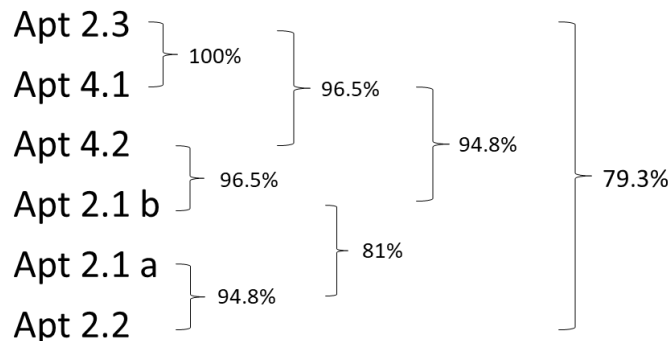
**Figura 8. Digestión con enzima EcoR1 de plásmido purificado.** Carril 1: marcador de peso molecular de 50 pb. Carriles 2 - 11: Plásmido TOPO TA-SP5 digerido con enzima EcoR1.

Para determinar las secuencias individuales de los aptámeros, cada vector se cuantificó utilizando el equipo *Genova Nano Micro-volume Life Science Spectrophotometer* y se enviaron al laboratorio GenScript (NJ, USA) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas de los aptámeros se alinearon por medio del programa BioEdit Sequence Alignment Editor (figura 9).



**Figura 9. Secuencias de aptámeros de RNA.** En el recuadro se muestra la secuencia correspondiente con la región aleatorizada de 15 nucleótidos.

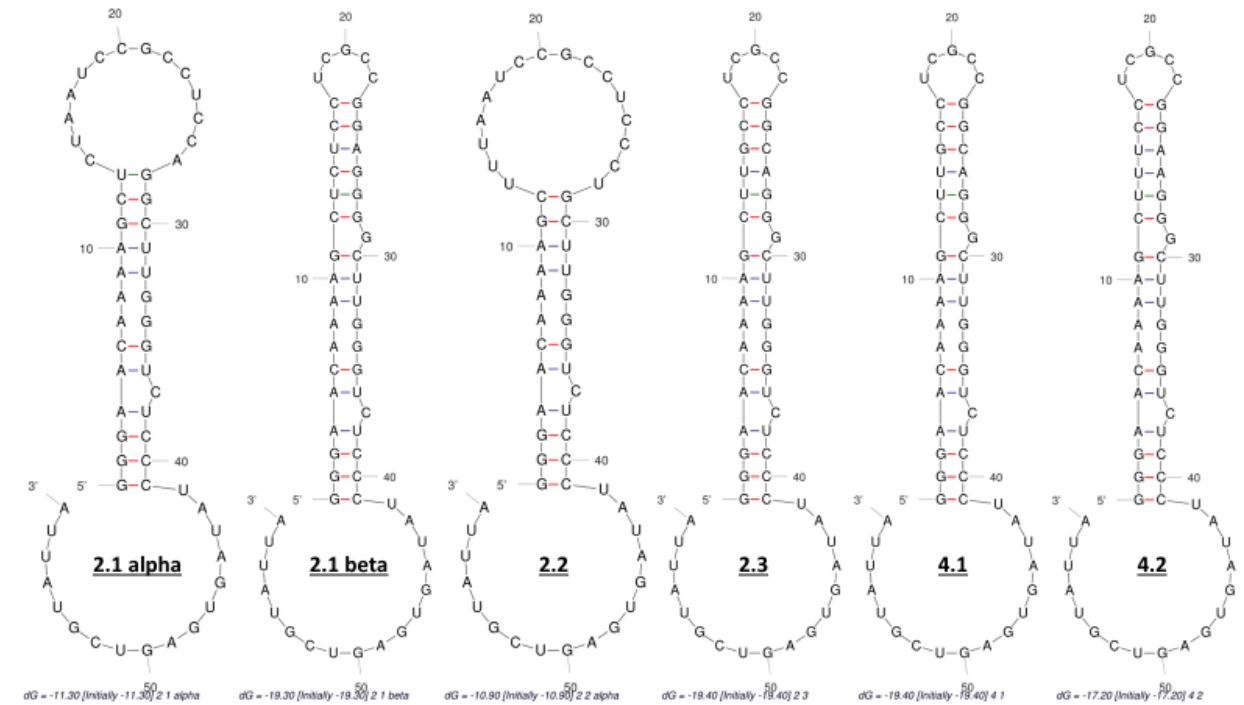
Los aptámeros obtenidos presentan 3 bases conservadas (U18, C19 y C22), lo que representa un 20% de homología en la región aleatoria y un 79.3% de homología respecto a la secuencia completa. Así mismo, las secuencias 2.3 y 4.1 mostraron una homología de 100% entre sí y una homología de 96.5% con la secuencia 4.2. Las secuencias 2.3 y 4.1 mostraron una homología de 100% entre sí y una homología de 96.5% con la secuencia 4.2. Las secuencias 2.1 alpha y 2.2 mostraron una homología de solo 79.3%. El porcentaje de homología se esquematiza en la figura 10.



**Figura 10. Diagrama de árbol que muestra la homología de las secuencias de los aptámeros.**

La estructura secundaria de las secuencias obtenidas se determinó utilizando el programa Mfold (figura 11). Se observa gran similitud en las estructuras secundarias obtenidas: las secuencias 2.1 alpha y 2.2 presentan un patrón estructural tipo bucle-tallo-bucle, mientras que el resto de las secuencias (2.1 beta, 2.3, 4.1 y 4.2) tienen un patrón estructural tallo-bucle.





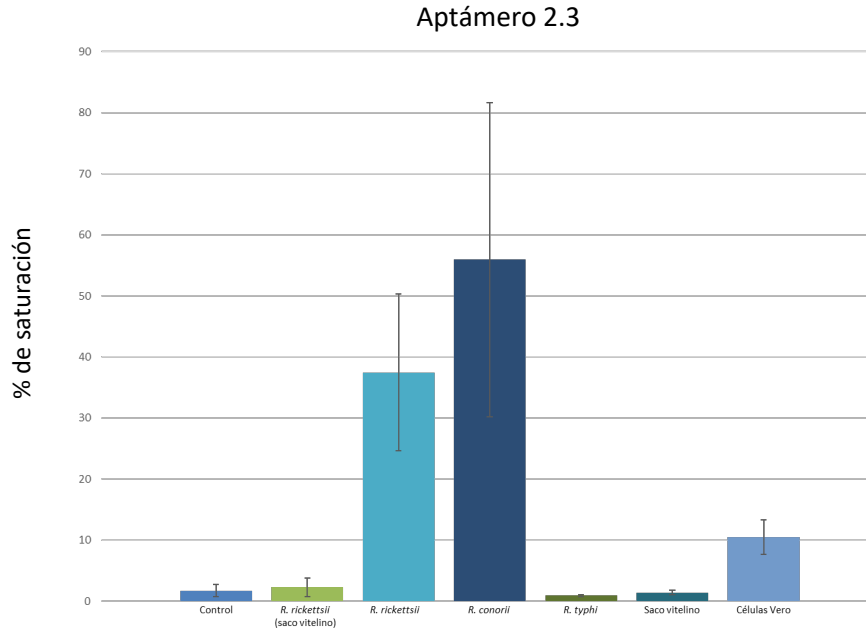
**Figura 11. Estructuras secundarias de las secuencias de RNA identificadas.** Estructuras determinadas in silico mediante el programa mFold.

Los aptámeros 2.3 y 4.2 se utilizaron para realizar ensayos de interacción (figuras 12 y 13) utilizando tres especies de *Rickettsia* (*R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. typhi*) y otros controles pertinentes (saco vitelino, células Vero); se realizó cada ensayo de interacción por triplicado y la información se muestra como el promedio de los tres experimentos.

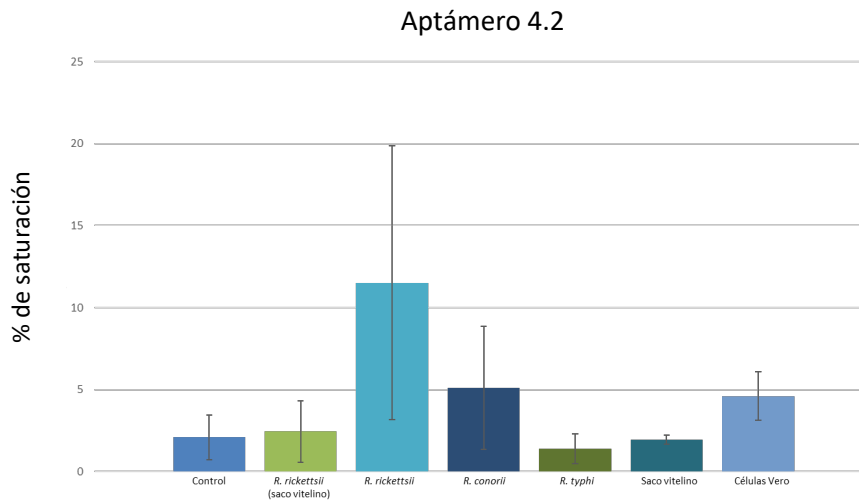
El aptámero 2.3 mostró afinidad por las especies de *Rickettsia* del grupo SFG (*R. rickettsii* y *R. conorii*) en comparación con los controles y con *R. typhi*; en orden descendente, el porcentaje de saturación del aptámero 2.3 fue de 55.9% con *R. conorii*, 37.4% con *R. rickettsii*, 10.5% con células Vero, 2.2% con *R. rickettsii* en saco vitelino, 1.7% con el control sin antígenos, 1.4% con saco vitelino y 0.9% con *R. typhi*. Por lo tanto, se observa que la interacción fue mínima con *R. typhi* y que la mayor interacción fue con *R. conorii* y *R. rickettsii*.

Los resultados obtenidos con el aptámero 4.2 mostraron una amplia desviación estándar, por lo que no fueron concluyentes; en orden descendente, el porcentaje de saturación del aptámero

4.2 fue de 11.5% con *R. rickettsii*, 5.1% con *R. conorii*, 4.5% con células Vero, 2.4% con *R. rickettsii* en saco vitelino, 2.0% con el control sin *Rickettsia*, 1.9% con saco vitelino y 1.3% con *R. typhi*.



**Figura 12. Ensayos de interacción del aptámero 2.3 con diferentes cepas de rickettsia y sus controles.**



**Figura 13. Ensayos de interacción del aptámero 4.2 con diferentes cepas de rickettsia y sus controles.**

## XII. DISCUSIÓN

Anteriormente, Bruno y colaboradores identificaron aptámeros de DNA contra *R. typhi* utilizando como molde una secuencia de 72 nucleótidos con una región aleatoria central de 36 nucleótidos. (Bruno, Chao, Zhang, Ching, & Phillips, 2016). Este grupo de investigadores obtuvo 3 secuencias candidato que presentaban afinidad por células completas de *R. typhi* (*whole cell-SELEX*). Posteriormente, determinaron la secuencia más afín (denominada Rt-18R) y la acoplaron a un sistema de reportero enzimático. Se encontró un límite de detección de entre 100 y 1000 células de *R. typhi* por mililitro, y nula reactividad cruzada con concentraciones comparables de *E. coli* o células hospederas murinas L929. Cabe mencionar que sí se observó reactividad cruzada con otras especies del género *Rickettsia* (*R. japonica*, *R. conorii*, *R. parkeri*) e incluso con el género *Orientia* (que pertenece a la misma familia de *Rickettsia*). Sin embargo, a la fecha, no se ha reportado el aislamiento de aptámeros de RNA contra *R. rickettsii* fuera de nuestro grupo de investigación.

En este trabajo se obtuvieron, a través del método SELEX, aptámeros capaces de interactuar con moléculas de la superficie de *rickettsia*. Dos de estos aptámeros, denominados 2.3 y 4.2, se utilizaron en ensayos de interacción, donde se determinó que en efecto presentan afinidad por *R. rickettsii*. A través de estos ensayos de interacción también se observó la disminuida afinidad de los aptámeros por *R. typhi*, posiblemente como consecuencia de los 3 ciclos de preselección a los que se sometió la biblioteca de secuencias de RNA.

Por el momento, se desconoce la o las moléculas de superficie con las que interactúan los aptámeros. Cabe mencionar que el blanco utilizado para la selección es una mezcla heterogénea de moléculas. Resulta lógico pensar que los aptámeros probablemente interactúan con alguna de las proteínas más abundantes de la superficie, como las proteínas de la familia sca. Se conoce que las proteínas rOmpA y rOmpB, en particular, son dos de las proteínas más abundantes en la superficie de *R. rickettsii* (Noriea, Clark, Mead, & Hackstadt, 2017), por lo que podrían ser una buena opción para ser utilizadas en futuros ensayos en los que se busque el blanco molecular específico de los aptámeros obtenidos en esta investigación.

El aptámero 2.3 mostró mayor afinidad por la especie *R. conorii*. Esto resulta interesante pues *R. conorii* no fue utilizada en la selección de aptámeros, pero pertenece al mismo grupo que *R. rickettsii*, el grupo SFG (Parola et al., 2013). Por lo anterior, se podría suponer que el blanco molecular es una proteína que se encuentra en la superficie de ambas especies, pero no en la superficie de la especie *R. typhi*. La comparación de las proteínas presentes en la superficie de estas tres especies podría ser de gran utilidad para dilucidar la identidad del blanco en futuros experimentos.

Como se mencionó previamente, las muestras de rickettsia son una mezcla heterogénea, que incluyen restos de células Vero, esto como resultado inherente al proceso de cultivo para la obtención de rickettsia. Cabe mencionar que durante el proceso de preselección se utilizaron muestras de *R. typhi* obtenidas mediante el mismo proceso que *R. rickettsii*, por lo que la preselección permitió eliminar moléculas afines tanto a *R. typhi* como a las células Vero. Esto se puede ver reflejado en los ensayos de interacción, pues ambos aptámeros (2.3 y 4.2) mostraron baja interacción con el control de células Vero (10.5% de saturación con el aptámero 2.3 y de 4.5% con el aptámero 4.2). Por lo tanto, se puede sugerir que la interacción observada al utilizar las diferentes muestras de rickettsia corresponde en su mayor parte a la interacción con la bacteria. Si en el futuro se utilizaran células aisladas de rickettsia para la realización de los ensayos de interacción, se podrían obtener resultados más confiables con respecto a la verdadera afinidad de los aptámeros por estas bacterias.

Los aptámeros analizados en los ensayos de interacción presentan un 96.5% de homología en su secuencia. Sin embargo, a pesar de la alta homología, mostraron resultados muy diferentes en los ensayos. El aptámero 4.2, el cual presenta en su secuencia las bases U15 y C25, disminuye considerablemente la interacción con *R. conorii* en comparación con el aptámero 2.3 que se diferencia del aptámero 4.2 únicamente en las bases G15 y A25. Sugiriendo que las posiciones 15 y 25 en los aptámeros obtenidos son relevantes para la interacción con dicha cepa.

El diseño *in silico* muestra que ambos aptámeros analizados poseen una estructura idéntica; está bien establecido que los aptámeros tienen la capacidad de modificar su estructura tridimensional en presencia de su molécula blanco (Jayasena, 1999). Así, es posible que la pequeña diferencia

que existe entre las secuencias de ambos aptámeros lleve a una diferencia en la estructura tridimensional de unión al ligando y por lo tanto la diferencia en el resultado de los ensayos de interacción.

Por otra parte, es interesante observar que, a pesar de partir de una variabilidad teórica de  $4^{15}$  moléculas, fue posible obtener secuencias con altos porcentajes de homología. Incluso, los aptámeros 2.3 y 4.1, derivados de distintos plásmidos comparten la misma secuencia. Este hecho aunado a los resultados de interacción, nos indica que efectivamente se efectuó una presión selectiva para la obtención de los aptámeros contra rickettsia. Incluso, al comparar las secuencias de todos los aptámeros obtenidos en este trabajo y los aptámeros obtenidos bajo distintos protocolos por diferentes miembros del equipo de trabajo (15 aptámeros en total), se encontró que todos los aptámeros poseen una secuencia conservada en común que consta de 4 bases consecutivas (datos no publicados). El hecho de que esta secuencia conservada se encuentren en diferentes posiciones a lo largo de la región aleatorizada de los aptámeros obtenidos, nos indica que la presencia de esa región se debe a la presión selectiva ejercida y no por una baja variabilidad de la biblioteca inicial.

### **XIII. CONCLUSIÓN**

A través de 3 ciclos de selección negativa contra sangre humana, 3 ciclos de selección negativa contra *R. typhi* y 5 ciclos de selección positiva contra *R. rickettsii* se aislaron 6 aptámeros con una homología de 79.3% y con gran similitud estructural.

Dentro de los aptámeros analizados, el aptámero 2.3 presentó una mayor afinidad 55.9% por *R. conorii* y 37.4% por *R. rickettsii*, demostrando capacidad para discriminar entre especies de *Rickettsia* de los grupos SFG y TG.

### **XIV. PERSPECTIVAS**

- Determinar la constante de disociación ( $K_d$ ) de los aptámeros aislados.
- Determinar en forma experimental la estructura del aptámero en presencia y ausencia del blanco, para conocer la región específica del aptámero en interacción con la proteína.
- Conocer el aptámero mínimo mediante recortes en los extremos 5' y 3'
- Realizar modificaciones en el azúcar o las bases nitrogenadas para incrementar la estabilidad del aptámero en microambientes con contenidos de nucleasas.
- Determinar la funcionalidad del aptámero en muestras de pacientes infectados.
- Desarrollar un aptasensor basado en los aptámeros aislados

**XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Alonso, A., & Portillo, F. G. Del. (2004). Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *International Microbiology*. <https://doi.org/im2304028> [pii]
- Álvarez-Hernández, G., Roldán, J. F. G., Milan, N. S. H., Lash, R. R., Behravesh, C. B., & Paddock, C. D. (2017). Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30173-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1)
- Biggs, H. M., Behravesh, C. B., Bradley, K. K., Dahlgren, F. S., Drexler, N. A., Dumler, J. S., ... Traeger, M. S. (2016). Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States. *MMWR. Recommendations and Reports : Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports*, 65(2), 1–44. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6502a1>
- Blanc, G., Ngwamidiba, M., Ogata, H., Fournier, P. E., Claverie, J. M., & Raoult, D. (2005). Molecular evolution of Rickettsia surface antigens: Evidence of positive selection. *Molecular Biology and Evolution*, 22(10), 2073–2083. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi199>
- Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H., & Toole, J. J. (1992). Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 355(6360), 564–566. <https://doi.org/10.1038/355564a0>
- Bruno, J. G., Chao, C., Zhang, Z., Ching, W., & Phillips, T. (2016). Aptamer-Magnetic Bead Sandwich Assay for Sensitive Detection of Rickettsia Cells. *Aptamers and Synthetic Antibodies*, 2(1), 12.
- Chan, Y. G. Y., Riley, S. P., & Martinez, J. J. (2010). Adherence to and invasion of host cells by spotted fever group Rickettsia species. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00139>

- Chang, T., Wang, L., Zhao, K., Ge, Y., He, M., & Li, G. (2016). Duplex Identification of *Staphylococcus aureus* by Aptamer and Gold Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.11656>
- Chapman, A. S., Bakken, J. S., Folk, S. M., Paddock, C. D., Bloch, K. C., Krusell, A., ... Ohl, C. a. (2006). Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis--United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR. Recommendations and Reports : Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports / Centers for Disease Control*, 55(RR-4), 1–27. <https://doi.org/rr5504a1> [pii]
- Connell, G. J., Illangesekare, M., & Yarus, M. (1993). Three Small Ribooligonucleotides with Specific Arginine Sites. *Biochemistry*, 32(21), 5497–5502. <https://doi.org/10.1021/bi00072a002>
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>
- de Godoy, D. T., Missailidis, S., Favacho, A. R. M., Mares-Guia, M. A. M. M., Rozental, T., & Lemos, E. R. S. (2014). Aptamers In the Diagnosis Of Rickettsiosis Sensu Lato. *Virus Reviews and Research*, 19(Suppl 1), 9–14. Retrieved from <http://157.86.113.86/index.php/vrrjournal/article/view/111%5Cnhttp://157.86.113.86/index.php/vrrjournal/article/view/111/101>
- Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
- Gillespie, J. J., Beier, M. S., Rahman, M. S., Ammerman, N. C., Shallom, J. M., Purkayastha, A., ... Azad, A. F. (2007). Plasmids and Rickettsial evolution: Insight from *Rickettsia felis*. *PLoS ONE*, 2(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000266>



- Gong, W., Xiong, X., Qi, Y., Jiao, J., Duan, C., & Wen, B. (2014). Identification of novel surface-exposed proteins of *Rickettsia rickettsii* by affinity purification and proteomics. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100253>
- González, V. M., Elena Martín, M., Fernández, G., & García-Sacristán, A. (2016). Use of aptamers as diagnostics tools and antiviral agents for human viruses. *Pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.3390/ph9040078>
- Hackstadt, T., Messer, R., Cieplak, W., & Peacock, M. G. (1992). Evidence for proteolytic cleavage of the 120-kilodalton outer membrane protein of rickettsiae: Identification of an avirulent mutant deficient in processing. *Infection and Immunity*, *60*(1), 159–165. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708962200>
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., & Coutte, L. (2004). Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.03.008>
- Jayasena, S. D. (1999). Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical Chemistry*.
- Jellinek, D., Lynott, C. K., Rifkin, D. B., & Janjic, N. (1993). High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(23), 11227–11231. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11227>
- Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A., & Polisky, B. (1994). High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science (New York, N.Y.)*, *263*(5152), 1425–1429. <https://doi.org/10.1126/science.7510417>
- Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Carroll, K. C., Landry, M. L., Funke, G., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (2015). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555816728>
- Joyce, G. F. (1994). In vitro evolution of nucleic acids. *Current Opinion in Structural Biology*, *4*(3), 331–336. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(94)90100-7)

- Leija-Montoya, A. G., Benítez-Hess, M. L., Toscano-Garibay, J. D., & Alvarez-Salas, L. M. (2014). Characterization of an RNA aptamer against HPV-16 L1 virus-like particles. *Nucleic Acid Therapeutics*, 24(5), 344–355. <https://doi.org/10.1089/nat.2013.0469>
- Levin, M. L., Snellgrove, A. N., & Zemtsova, G. E. (2016). Comparative value of blood and skin samples for diagnosis of spotted fever group rickettsial infection in model animals. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 1029–1034. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.05.011>
- Martinez, J. J., Seveau, S., Veiga, E., Matsuyama, S., & Cossart, P. (2005). Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell*, 123(6), 1013–1023. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.046>
- Minnear, T. D., & Buckingham, S. C. (2009). Managing Rocky Mountain spotted fever. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(9), 1131–1137. <https://doi.org/10.1586/eri.09.94>
- Mirian, M., Khanahmad, H., Darzi, L., Salehi, M., & Sadeghi-Aliabadi, H. (2017). Oligonucleotide aptamers: Potential novel molecules against viral hepatitis. *Research in Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.202447>
- Moon, J., Kim, G., Lee, S., & Park, S. (2013). Identification of salmonella typhimurium-specific DNA aptamers developed using whole-cell SELEX and FACS analysis. *Journal of Microbiological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.005>
- Ng, E. W. M., Shima, D. T., Calias, P., Cunningham, E. T., Guyer, D. R., & Adamis, A. P. (2006). Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd1955>
- Noriea, N. F., Clark, T. R., Mead, D., & Hackstadt, T. (2017). Proteolytic Cleavage of the Immunodominant Outer Membrane Protein rOmpA in *Rickettsia rickettsii*. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.00826-16>
- Paddock, C. D. (2013). Perspectives on the laboratory diagnosis of rickettsial diseases in the 21st century. *Acta Médica Costarricense*, 13–24. Retrieved from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-)

60022013000400005&lang=es

Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., ... Raoult, D. (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach.

*Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>

Pastor, F. (2016). Aptamers: A new technological platform in cancer immunotherapy.

*Pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.3390/ph9040064>

Regan, J. J., Traeger, M. S., Humpherys, D., Mahoney, D. L., Martinez, M., Emerson, G. L., ...

McQuiston, J. H. (2015). Risk factors for fatal outcome from rocky mountain spotted fever in a highly endemic area - Arizona, 2002-2011. *Clinical Infectious Diseases*.

<https://doi.org/10.1093/cid/civ116>

Roux, V., & Raoult, D. (2000). Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(4), 1449–1455.

<https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1449>

Sahni, A., Fang, R., Sahni, S. K., & Walker, D. H. (2018). Pathogenesis of Rickettsial Diseases:

Pathogenic and Immune Mechanisms of an Endotheliotropic Infection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. [https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-](https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012800)

[012418-012800](https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012800)

Sassanfar, M., & Szostak, J. W. (1993). An RNA motif that binds ATP. *Nature*, 364(6437), 550–

553. <https://doi.org/10.1038/364550a0>

Sun, H., & Zu, Y. (2015). A Highlight of recent advances in aptamer technology and its

application. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules200711959>

Thomas, S., Alexander, W., Gilligan, J., & Rikihisa, Y. (2016). The importance of Rickettsiales infections. In *Rickettsiales: Biology, Molecular Biology, Epidemiology, and Vaccine*

*Development* (pp. 3–21). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-46859-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-46859-4_1)

- Thorner, A. R., Walker, D. H., & Petri Jr., W. a. (1998). Rocky Mountain Spotted Fever. *Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)*, 27(6), 1353–1359. Retrieved from <http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/515037>
- Tombelli, S., Minunni, M., Luzi, E., & Mascini, M. (2005). Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein. In *Bioelectrochemistry* (Vol. 67, pp. 135–141). <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2004.04.011>
- Toscano-Garibay, J. D., Benítez-Hess, M. L., & Alvarez-Salas, L. M. (2011). Isolation and Characterization of an RNA Aptamer for the HPV-16 E7 Oncoprotein. *Archives of Medical Research*, 42(2), 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2011.02.005>
- Tsai, D. E., & Keene, J. D. (1993). In vitro selection of RNA epitopes using autoimmune patient serum. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 150(3), 1137–1145. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678618>
- Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4968), 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>
- Tuerk, Craig, & MacDougal-Waugh, S. (1993). In vitro evolution of functional nucleic acids: High-affinity RNA ligands of HIV-1 proteins. *Gene*, 137(1), 41–47. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90248-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90248-2)
- Valencia-Reséndiz, Palomino-Vizcaino, G., Tapia-Vieyra, J.V., Leija-Montoya, A. G., Valencia-Reséndiz, D. G., Benítez-Hess, M. L., & Alvarez-Salas, L. M. (2018). Inhibition of Human Papillomavirus Type 16 Infection Using an RNA Aptamer. *Nucleic Acid Therapeutics*. <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0687>
- Vorobyeva, M., Vorobjev, P., & Venyaminova, A. (2016). Multivalent aptamers: Versatile tools for diagnostic and therapeutic applications. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules21121613>
- Wang, K. Y., Zeng, Y. L., Yang, X. Y., Li, W. B., & Lan, X. P. (2011). Utility of aptamer-fluorescence

in situ hybridization for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30(2), 273–278.

<https://doi.org/10.1007/s10096-010-1074-0>

Wang, L., Wang, R., Wei, H., & Li, Y. (2018). Selection of aptamers against pathogenic bacteria and their diagnostics application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.

<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2528-2>

Wu, W. H., Li, M., Wang, Y., Ouyang, H. X., Wang, L., Li, X. C., ... Lu, J. X. (2012). Aptasensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium*. *Nanoscale Research Letters*.

<https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-658>

Zhou, J., & Rossi, J. (2016). Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), 181–202. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199>

Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., ... Zhang, B. (2017). Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*.

<https://doi.org/10.3390/ijms18102142>

XVI. ANEXO

I. Vector pCR4<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> SP5

