



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA
DIFERENCIACIÓN Y CÁNCER

Diseño de un aptámero de RNA combinando estrategias de selección in vitro e in silico como herramienta terapéutica en cáncer de próstata

TESIS
Biología del desarrollo
Opción de titulación

María Fernanda Cuevas Sánchez
fercuevas1996@gmail.com

ALUMNO

Dr. Carlos David Cruz Hernández
Cedars Sinai Medical Center
Carlos.Cruz2@cshs.org

DIRECTOR

Dr. Luis Sánchez Sánchez
FES Zaragoza, UNAM
luisss@unam.mx

SINODAL 1

Dr. Hugo López Muñoz
FES Zaragoza, UNAM
hugolm@comunidad.unam.mx

SINODAL 2





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MÉTODOS	15
Selección de un aptámero de referencia	15
<i>In vitro</i>	15
Retrotranscripción (RT)	16
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	17
Electroforesis	18
Purificación de PCR	18
Secuenciación de nueva generación	18
<i>In silico</i>	19
Filtración de las secuencias amplificadas desde la librería de aptámeros ...	19
Alineación de las secuencias candidatas con la secuencia del aptámero de referencia	19
Modelamiento de la estructura secundaria y cálculo de los parámetros termodinámicos	20
Modelamiento de la estructura terciaria	20
Acoplamiento molecular (Docking) entre los aptámeros y la proteína presente en CaP independiente de andrógenos	21
Análisis molecular	21
RESULTADOS	23
Secuenciación	25
Caracterización estructural y termodinámica de las secuencias candidatas	26
Acoplamiento molecular del aptámero 6N-M2 y las secuencias candidatas con la proteína PAP	28
Acoplamiento molecular del aptámero 6N-M2 y la proteína PAP	29

Determinación del acoplamiento molecular entre el aptámero 6N-M2 y la proteína PAP a partir de las distancias moleculares entre las dos horquillas del aptámero y los sitios activos de la proteína.....	29
Acoplamiento molecular entre el aptámero 6N-M2 y la proteína PAP	35
Determinación del acoplamiento entre el aptámero 6N-M2 y la proteína PAP a partir de las distancias moleculares entre las dos horquillas del aptámero y los sitios activos de la proteína	36
Acoplamiento molecular de las secuencias de los aptámeros candidatos con la proteína PAP usando PatchDock.....	40
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
CONCLUSIÓN.....	53
BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. BASES DE DATOS PARA LA BÚSQUEDA DE UN APTÁMERO DE REFERENCIA	15
TABLA 2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN PARA LA SELECCIÓN DE UN APTÁMERO DE REFERENCIA.....	15
TABLA 3. REACTIVOS PARA LA RETROTRANSCRIPCIÓN	16
TABLA 4. REACTIVOS PARA LA PCR.....	17
TABLA 5. SECUENCIAS OBTENIDAS DURANTE CADA FILTRADO.....	26
TABLA 6. PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LAS ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DEL APTÁMERO 6N-M2 Y DE LAS SECUENCIAS CANDIDATAS.....	28
TABLA 7. DISTANCIA ENTRE CADA NUCLEÓTIDO DE LA HORQUILLA 1 Y 2 Y LA HISTIDINA 12 LAS DISTANCIAS FUERON MEDIDAS EN ÅRMSTRONG	32
TABLA 8. DISTANCIA ENTRE CADA NUCLEÓTIDO DE LA HORQUILLA 1 Y 2 Y ASP 258. LAS DISTANCIAS FUERON MEDIDAS EN ÅRMSTRONG	35
TABLA 9. DISTANCIA ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS DE LA HORQUILLA 1 Y 2 Y LA HISTIDINA 12	38
TABLA 10. DISTANCIA ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS DE LA HORQUILLA 1 Y 2 Y ASP 258	40
TABLA 11. PUNTUACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE CADA APTÁMERO CANDIDATO CON LA PROTEÍNA PAP	42
TABLA 12. DISTANCIAS MEDIDAS DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL APTÁMERO A35619 Y PROTEÍNA PAP	44
TABLA 13. DISTANCIAS DE LOS PUENTES DE HIDRÓGENO ENTRE EL APTÁMERO A35619 Y LA PROTEÍNA PAP	47

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA COMBINACIÓN DE ESTRATEGIAS IN VITRO E IN SILICO.....	6
FIGURA 2. CONDICIONES DEL TERMOCICLADOR PARA REALIZAR LA RETROTRANSCRIPCIÓN.	16
FIGURA 3. CONDICIONES DEL TERMOCICLADOR.	17
FIGURA 4. ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL APTÁMERO 6N-M2.....	23
FIGURA 5. ESTRUCTURA CRISTALINA DE LA PROTEÍNA PAP COMPLETA.....	24
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN DE UNA DE LAS SECUENCIAS DE LOS APTÁMEROS PRESENTES EN LA LIBRERÍA DE APTÁMEROS.....	24
FIGURA 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 3% DE LA AMPLIFICACIÓN DE LA LIBRERÍA DE APTÁMEROS.....	25
FIGURA 8. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS CANDIDATAS Y EL APTÁMERO 6N-M2 MEDIANTE EL PROGRAMA WEB CLUSTAL OMEGA.	26
FIGURA 9. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LAS SECUENCIAS CANDIDATAS MEDIANTE RNASTRUCTURE	27
FIGURA 10. ACOPLAMIENTO MOLECULAR REALIZADO EN HEX Y ANALIZADO EN PYMOL	29
FIGURA 11. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL APTÁMERO 6N-M2 Y LA PROTEÍNA PAP...	30
FIGURA 12. DISTANCIA ENTRE EL URACILO 17 Y LA HISTIDINA 12.....	31
FIGURA 13. DISTANCIA ENTRE EL URACILO 40 Y LA HISTIDINA 12.....	31
FIGURA 14. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL APTÁMERO 6N-M2 Y LA PROTEÍNA PAP...	33
FIGURA 15. DISTANCIA ENTRE EL URACILO 17 Y EL ÁCIDO ASPÁRTICO 258.....	34
FIGURA 16. DISTANCIA ENTRE EL URACILO 40 Y EL ÁCIDO ASPÁRTICO 258.....	34
FIGURA 17. ACOPLAMIENTO MOLECULAR REALIZADO EN PATCHDOCK Y ANALIZADO EN PYMOL.....	35
FIGURA 18. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL APTÁMERO 6N-M2 Y LA PROTEÍNA PAP...	36
FIGURA 19. DISTANCIA ENTRE LA ADENINA 24 Y LA HISTIDINA 12.....	37
FIGURA 20. DISTANCIA ENTRE LA ADENINA 37 Y LA HISTIDINA 12.....	37
FIGURA 21. DISTANCIA ENTRE LA ADENINA 25 Y EL ÁCIDO ASPÁRTICO 258.....	39
FIGURA 22. DISTANCIA ENTRE LA ADENINA 37 Y EL ÁCIDO ASPÁRTICO.	39
FIGURA 23. ACOPLAMIENTOS MOLECULARES DE LOS APTÁMEROS CANDIDATOS CON LA PROTEÍNA PAP.	41
FIGURA 24. DISTANCIA ENTRE LA GUANINA 12 Y LA HISTIDINA 12.	43
FIGURA 25. DISTANCIA ENTRE LA GUANINA 12 Y EL ÁCIDO ASPÁRTICO.	43
FIGURA 26. DISTANCIA ENTRE EL URACILO 13 Y LA GLUTAMINA 40	44
FIGURA 27. DISTANCIA ENTRE LA ADENINA 15 Y EL ÁCIDO GLUTÁMICO 68.	45
FIGURA 28. DISTANCIA ENTRE LA ADENINA 21 Y LA TREONINA 243	46
FIGURA 29. DISTANCIA ENTRE LA ADENINA 21 Y LA TIROSINA 293.	46

RESUMEN

El desarrollo y progresión del cáncer de próstata (CaP) requiere de la presencia de andrógenos, es por ello que la terapia más utilizada en esta enfermedad es el bloqueo hormonal. Sin embargo, las células de CaP avanza hacia un punto en donde se vuelven independientes de andrógenos. Al igual que en otros tipos de cáncer, se ha investigado el uso de los aptámeros como tratamiento y/o diagnóstico en CaP. Desafortunadamente, la mayoría de estos aptámeros tienen como blanco molecular una proteína que no está presente en CaP independiente de andrógenos, además de presentar algunas dificultades que no garantizan al cien por ciento una selección exitosa. Por tal motivo, en este trabajo se seleccionó un aptámero dirigido a una proteína presente en CaP independiente de andrógenos con la combinación de dos estrategias de selección: *in vitro* e *in silico*. Este aptámero presenta mejores características de unión al blanco molecular que un aptámero ya registrado en la literatura. La combinación de ambas estrategias dio resultados favorables en la selección del aptámero, disminuyendo el costo y el tiempo de selección.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades en donde las células del cuerpo crecen sin control formando masas denominadas *tumores*. (Instituto Nacional del Cáncer, 2020; World Health Organization, 2020). El cáncer es la segunda causa principal de muerte a nivel mundial, siendo las cardiopatías la primera causa. El cáncer de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los tipos más comunes de cáncer en hombres, mientras que el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, el cáncer pulmonar, el cáncer cervical y el cáncer tiroideo son más comunes entre las mujeres. El cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo de cáncer más común en hombres a nivel mundial, y el cuarto tipo de cáncer más común entre hombres y mujeres alrededor del mundo (World Health Organization, 2020; Cancer Today, 2021).

Las tasas de incidencia de CaP ajustadas por edad han aumentado dramáticamente y esto se debe en gran parte a la mayor disponibilidad de pruebas de detección de antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés) en hombres sin síntomas de la enfermedad (WCRF, 2020). En el caso de México, el CaP es la primera causa de muerte en hombres mayores de 65 años y el 70% de los casos se detecta en etapas avanzadas. Es muy común que los síntomas del carcinoma prostático aparezcan en la fase tardía de su evolución y se debe habitualmente a la metástasis acompañada de infecciones urinarias (Ruiz López, 2017).

La testosterona es la hormona responsable del crecimiento de los tumores de la próstata. Una próstata normal procesa andrógenos como la testosterona y la di-hidrotestosterona (DHT) para regular su homeostasis celular. La síntesis de los andrógenos se regula por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, donde la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), es liberada desde el hipotálamo. Esta hormona estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) en la adenohipófisis, la cual posteriormente estimula a las células de Leydig para inducir la síntesis de testosterona. La próstata es uno de los órganos blanco en donde la testosterona

ejerce un papel importante en su desarrollo y crecimiento. En el citoplasma de las células prostáticas, la testosterona es convertida a DHT por la enzima 5-alfa-reductasa (Rojas Durán *et al.*, 2011).

Los efectos biológicos de la testosterona y la DHT son mediados a través del receptor de andrógenos (RA). El RA tiene efectos importantes durante el transcurso de la vida del hombre, que van desde el desarrollo de los caracteres masculinos en la pubertad, hasta alteraciones que conllevan a efectos no deseados como la calvicie o al desarrollo de patologías de la próstata como la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el CaP (Xing *et al.*, 2001).

El desarrollo del CaP pasa por dos etapas principales, la primera es una etapa dependiente de hormonas, de ahí que el tratamiento clásico sea bloquear la síntesis y la acción de los andrógenos sobre las células prostáticas. En el caso del bloqueo de la unión de los andrógenos al AR, se realiza usando fármacos conocidos como antiandrógenos, entre ellos la flutamida y/o bicalutamida. La mayoría de los pacientes que reciben estos tratamientos presentan una mejoría después de un tiempo; sin embargo, el efecto de la terapia hormonal es temporal y el cáncer se vuelve independiente de andrógenos. Se ha observado que más del 84% de los pacientes que desarrollan CaP independiente de andrógenos presentan metástasis a hueso. Así, el desarrollo de un cáncer dependiente de andrógenos a uno independiente es un paso crítico para la progresión del cáncer a un estado más agresivo (Rojas Durán *et al.*, 2011).

Desarrollar tratamientos dirigidos para pacientes de CaP independiente de andrógenos es prometedor. Los avances en investigación en este campo han sido enfocados principalmente hacia los conjugados de anticuerpos y fármacos (ADC, por sus siglas en inglés). Este tipo de terapia se probó por primera vez hace 30 años, y junto con el desarrollo de nuevos quimioterapéuticos y una mejora en la química de unión de anticuerpos y fármacos, ha llevado a la aprobación de los ADC por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés). Varios ADC se encuentran actualmente en ensayos clínicos para el CaP, incluidos un anticuerpo dirigido contra el antígeno de membrana específico de próstata

(PSMA, por sus siglas en inglés). En todos estos casos, el blanco molecular del anticuerpo es un receptor que tiene una expresión elevada en la célula cancerosa. Desafortunadamente, casi todos los antígenos que son reconocidos por los anticuerpos y los ADC no se expresan exclusivamente en las células cancerosas, sino que también se pueden expresar en tejidos normales. Por lo tanto, se pueden observar efectos adversos con este tipo de terapias (Gray *et al*, 2018).

Como una alternativa al uso de ADC basados en anticuerpos ha surgido un nuevo tipo de herramienta molecular basada en ácidos nucleicos conocida con el nombre de *aptámeros*. Los aptámeros son oligonucleótidos cortos de una sola cadena de DNA o RNA sintetizados químicamente que se unen con alta afinidad y especificidad a un blanco molecular (Xiangi *et al.*, 2015).

Los aptámeros pueden unirse a su blanco molecular actuando como un antagonista. Un ejemplo es el aptámero A9, sintetizado por Dassie *et al.*, (2014) el cual va dirigido hacia la proteína PSMA, reduciendo así la migración de las células de CaP en ensayos *in vitro*. Los aptámeros también pueden conjugarse con agentes terapéuticos y con vehículos de administración, incluidos pequeños fármacos, como el conjugado Aptámero-Doxorrubicina (Dox) que se ha usado en ensayos *in vivo*, donde el fármaco Dox inhibe el crecimiento tumoral de células de CaP positivas a PSMA. Existen también conjugados de aptámeros con oligonucleótidos como los RNA pequeño de interferencia (siRNA), los micro RNA (miRNA) y los anti-miRNA (antimiR). Estas moléculas son atractivas para ser usadas como agentes terapéuticos ya que los aptámeros pueden servir como vehículos para entregar moléculas de silenciamiento de genes específicos en cáncer, incluidos los oncogenes cuando se unen a un siRNA. (Hori *et al.*, 2018).

Los aptámeros han mostrado resultados prometedores en la investigación científica de los últimos 25 años, tanto en la investigación enfocada en la terapia como la investigación enfocada en el diagnóstico (de Almeida *et al.*, 2017).

El proceso de selección de aptámeros implica rondas iterativas de purificación y amplificación a través de una técnica denominada en inglés SELEX

(Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial, traducido al español de sus siglas en inglés). La técnica SELEX fue desarrollada por Tuerk & Gold en el año de 1990. El ensayo SELEX consiste en seleccionar mediante ciclos iterativos (aproximadamente 12 ciclos), una secuencia de aptámeros que es afín a un blanco molecular específico, a partir de una población de secuencias aleatorias, también conocida como *librería de aptámeros* (Tuerk & Gold, 1990).

Existe una amplia variedad de técnicas de SELEX. Sin embargo, se ha demostrado que el uso de técnicas *in silico*, tal como el uso de software reduce el tiempo y costo en la producción de un aptámero. En este tipo de ensayos, la selección de las secuencias se basa en el análisis de la estructura secundaria de las secuencias generadas, posteriormente se realiza un acoplamiento computacional para identificar las moléculas que se unen con afinidad y especificidad a la molécula blanco. Esto facilita la selección de una secuencia candidata para posteriormente ser probada en el laboratorio (Hsieh *et al.*, 2017; Chushak & Stone, 2009).

Tomando en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se propone una técnica que combine un enfoque *in vitro* con un enfoque *in silico* para obtener un aptámero candidato de RNA que reconozca a una proteína presente en células de CaP independiente de andrógenos, teniendo como referencia un aptámero ya registrado en la literatura (**Figura 1**). Al tener un aptámero de referencia será posible la selección de un aptámero candidato con una mayor afinidad hacia la proteína blanco.

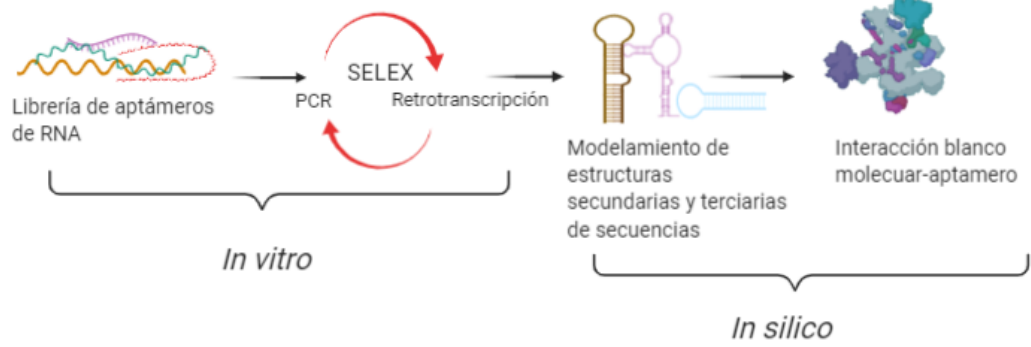


Figura 1. Esquema representativo de la combinación de estrategias *in vitro* e *in silico*

MARCO TEÓRICO

En el año 2020 en México, el CaP fue registrado en el quinto lugar de todos los tipos de cáncer con mayor mortalidad en hombres, con un 7.4 % y un 28.9 % de nuevos casos (Cancer Today, 2021).

Se conocen dos estadios del CaP, los cuales comienzan con un tumor localizado, éste es conocido como *cáncer de próstata dependiente de andrógenos*, seguido del *cáncer de próstata resistente a la castración o independiente de andrógenos*. Estos últimos tienen un diagnóstico letal para el paciente.

En el CaP dependiente de andrógenos las células de CaP conservan su capacidad de respuesta y dependencia de andrógenos por lo que se utiliza una terapia de privación de andrógenos (ADT) para bloquear la vía de señalización molecular a estas hormonas, la cual involucra al receptor de andrógenos (RA) (Wang *et al.*, 2018; Gelmann, 2002).

El gen que codifica para la expresión del RA es expresado en CaP primario, sin embargo, se han encontrado alteraciones en el gen después de la privación de andrógenos. Estas alteraciones conducen a una mayor sensibilidad del receptor a niveles bajos de andrógenos circulantes y también a la capacidad del receptor para reconocer un espectro ampliado de ligandos como potentes agonistas de la acción del RA. Por tal motivo, CaP dependiente de andrógenos progresa hacia el estadio independiente de andrógenos. (Gelmann, 2002).

Un tratamiento para combatir el CaP que ha sido bien estudiado es el uso de anticuerpos monoclonales debido a su capacidad de unión con otras moléculas, por ejemplo, los fármacos para quimioterapia o moléculas pequeñas para radioterapia. Desafortunadamente los anticuerpos tienen efectos adversos en el paciente ya que la mayoría de las veces el blanco molecular es un antígeno que se expresa también en las células sanas y no es una molécula con alta afinidad, por lo que se considera la investigación de tratamientos alternos.

En los últimos 30 años, se ha investigado a los aptámeros como terapias dirigidas prometedoras para el cáncer.

Los aptámeros son secuencias cortas de DNA o RNA de una sola cadena con nucleótidos ordenados de forma aleatoria que les permite adoptar formas tridimensionales únicas. Los aptámeros son capaces de unirse a moléculas específicas con gran afinidad con constantes de disociación dentro del rango picomolar (pM) y nanomolar (nM) (Kinghorn *et al.*, 2017; Ospina, 2020). Aunque el papel de los aptámeros es similar al de los anticuerpos, los aptámeros tienen varias ventajas:

- 1-. Son sintetizados químicamente
- 2-. Se pueden conjugar químicamente con reactivos secundarios (por ejemplo, fármacos o RNA de interferencia)
- 3-. Tienen baja inmunogenicidad
- 4-. Tienen alta afinidad por su blanco molecular (Thiel *et al.*, 2015).

En el año 1990, Tuerk & Gold desarrollaron un método conocido como SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial, por sus siglas en inglés) para seleccionar un aptámero de RNA afín a la DNA polimerasa del bacteriófago T4 (gp43).

En el proceso SELEX se comienza con un grupo de oligonucleótidos aleatorios flanqueados en cada extremo por secuencias definidas de unión a cebadores, operando sobre la hipótesis de que una unión de alta afinidad está contenida en alguna secuencia de este grupo. Durante este proceso una librería de aptámeros, que consiste aproximadamente de 1×10^{16} secuencias diferentes aleatorias es incubada con una molécula diana de interés. Posteriormente, las secuencias unidas a la molécula blanco son recuperadas y amplificadas por PCR o RT-PCR, ya sea el caso de DNA o de RNA respectivamente. Este proceso conlleva en la mayoría de los casos hasta 12 rondas de selección y es en la última ronda de selección donde comúnmente los aptámeros enriquecidos son secuenciados. Múltiples rondas de enriquecimiento dan como resultado un aumento exponencial

de los ligandos más aptos para la unión hasta que dominan la población de secuencias más afines por el blanco molecular (Ohuchi *et al.*, 2012; Xiang *et al.*, 2015; Tuerk & Gold. 1990).

En el trabajo de Tuerk & Gold, un grupo de secuencias de ARN que son completamente aleatorizados se sometieron a selección para unirse a gp43 en filtros de nitrocelulosa. La librería de aptámeros se incubó con la gp43, posteriormente las secuencias unidas amplificaron mediante PCR resultando secuencias de ADN bicatenario que son competentes para una transcripción. Este ARN recién transcrito fue sometido al siguiente ciclo de selección. El hacer múltiples ciclos de selección, aumenta exponencialmente las secuencias candidatas afines al blanco molecular.

Siguiendo la misma técnica de SELEX, Svobodova *et al.*, (2013) seleccionaron un aptámero de RNA dirigido a la proteína PSA, presente en CaP. El enriquecimiento de las secuencias de RNA fue obtenido durante 13 ciclos de selección y a partir del ciclo 6, el incremento de secuencias enriquecidas es notorio a comparación de la librería inicial. Las secuencias del último ciclo se secuenciaron y se predijo la estructura secundaria de cada una para separarlas por familias, sin embargo, todas los aptámeros se plegaron en diferentes formas a excepción de 4, los cuales tenían estructuras similares. Estos aptámeros fueron elegidos como los candidatos. Finalmente se realizó un ensayo de afinidad de unión con la proteína PSA, demostrando que el aptámero que lleva por nombre S2 es el que presenta mayor afinidad a dicha proteína.

El equipo de Kong & Byun (2015) sintetizó un aptámero, el cual lleva por nombre 6N-M2. La longitud del aptámero es de 50 nucleótidos. Este aptámero fue seleccionado para reconocer el dominio extracelular de la proteína fosfatasa ácida prostática (PAP), ya que ahí se encuentra el sitio catalítico. Se usó la técnica SELEX y aisló la proteína de la línea celular PC-3 debido a que es del tipo de CaP resistente a la castración y representa un nivel de malignidad alto. Posteriormente la proteína fue incubada con una librería de aptámeros de DNA y se seleccionó el aptámero 6N, el cual en el ensayo de unión con células positivas a PAP mostró tener afinidad a estas. Finalmente se predijo la estructura secundaria del aptámero y se realizaron

4 versiones truncadas de este debido a que el tamaño de las secuencias dentro de la librería era de 92 nucleótidos. La versión final del aptámero que se nombró 6N-M2, demostró tener mayor afinidad de unión a la proteína PAP que las otras tres versiones. Los resultados sugirieron que el aptámero es unido a la membrana celular mediante las horquillas de la estructura secundaria.

Para mejorar la técnica de SELEX y agilizar el proceso y disminuir el costo de selección de un aptámero, en el año 2017 Hsieh y colaboradores reportaron la combinación de enfoques computacionales como el algoritmo genético, análisis de estructura secundaria y docking para evaluar la interacción de un aptámero con una proteína. El objetivo de tal trabajo fue obtener un aptámero con mayor capacidad de unión y afinidad a la proteína PSA en comparación con los aptámeros ya registrados. El resultado fue un aptámero con una unión casi 3 veces mayor que la del aptámero de unión a PSA reportado previamente, concluyendo así que el enfoque computacional es valioso en el procedimiento de selección de aptámeros posterior al ensayo SELEX.

En el año 2020, Campos-Fernández y colaboradores modificaron el aptámero A4, el cual fue reportado con éxito en el año 2016 para unirse a células de CaP (Souza *et al.*, 2016). La modificación consistió en agregar desoxirribonucleótidos a la secuencia para hacerla más estable a las RNAasas, siendo el producto final el aptámero mA4 con 59 nucleótidos. Mediante un algoritmo informático de alineamiento de secuencias de ácidos nucleicos se confirmó que las dos secuencias son homologas, lo que indica que ambas tienen afinidad de unión para un mismo blanco molecular. Con trabajo *in silico* se predijeron las estructuras secundarias y terciarias de los aptámeros A4 y mA4. Basados en la forma de las estructuras predichas de mA4, se pudieron definir 3 dominios de unión potenciales hacia un blanco molecular y mediante ensayos de unión, se confirmó la especificidad del aptámero hacia las células de CaP, misma que presenta el aptámero A4.

Los trabajos anteriores demuestran la importancia de los ensayos *in silico* como una estrategia práctica y prometedora para la selección de aptámeros, debido

a que con ellos es posible conocer la estabilidad y motivos de unión mediante las características termodinámicas de las secuencias.

Tomando en cuenta los antecedentes, en este proyecto de investigación se propuso una técnica que combine el enfoque *in vitro* con el enfoque *in silico* para obtener un aptámero candidato de RNA que reconozca a la proteína PAP, la cual está presente en células de CaP independiente de andrógenos y es un biomarcador para conocer el estadio del tumor, esto, teniendo como referencia un aptámero previamente registrado en la literatura (Kong & Byun. 2015). Al tener un aptámero de referencia será posible la selección de un aptámero candidato con una mayor afinidad hacia la proteína blanco.

La proteína PAP es importante para este proyecto debido a que los aptámeros registrados en CaP, van dirigidos a proteínas que solo se encuentran en CaP dependiente de andrógenos, por lo tanto, es importante la investigación de blancos moleculares presentes en CaP independiente de andrógenos.

La proteína PAP es una glicoproteína con un peso molecular de 100 kDa y consta de dos subunidades con un peso molecular de 50 kDa cada una y es sintetizada en los lisosomas de las células epiteliales prostáticas. Existen dos isoformas de esta proteína: 1) forma celular, expresada altamente en células prostáticas y 2) forma secretora, liberada en el fluido seminal (Xu Huan *et al.*, 2019).

La actividad de la proteína PAP en suero es mayor en pacientes con CaP, especialmente si presentan metástasis ósea, comparado con su actividad en pacientes sanos. Por esta razón es que la proteína PAP es de gran interés ya que su concentración en hombres es proporcional a la progresión del CaP y está correlacionada con las características del tumor. La PAP es importante como factor pronóstico para los pacientes con CaP de riesgo intermedio a alto (Kong & Byun. 2015).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo y la progresión del CaP requiere de la presencia de los andrógenos. La terapia utilizada para tratar la enfermedad es el bloqueo hormonal; sin embargo, las células de CaP avanzan hacia un estado en el que se vuelven independientes de andrógenos y/o resistentes a la castración. En este punto, las células de CaP no necesitan de los andrógenos por completo para seguir creciendo, y se observan eventos de metástasis. Al igual que en otros tipos de cáncer, el uso de anticuerpos monoclonales como terapia dirigida ha sido estudiado en cáncer. Los anticuerpos resultan una buena estrategia terapéutica debido a que éstos pueden conjugarse con algún otro tipo de molécula para mejorar su eficiencia. Desafortunadamente, en la mayoría de los casos, los anticuerpos se unen a antígenos que no solo están presentes en las células cancerosas, sino que también se expresan en células sanas. Esto llega a producir los efectos adversos que se observan en los pacientes cuando reciben este tipo de terapia. Los científicos están explorando e intentando desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en cáncer enfocándose en evitar la toxicidad por unión inespecífica de los fármacos. Una de las nuevas estrategias terapéuticas que se están investigando en cáncer, es el uso de aptámeros, los cuales han mostrado *in vitro* tener grandes ventajas sobre los anticuerpos. En cuanto a los aptámeros utilizados en CaP, ha sucedido algo similar a lo expuesto acerca de la inespecificidad. Los aptámeros que se unen a la proteína PSMA han sido los más estudiados para inhibir la proliferación celular. Sin embargo, la proteína PSMA no se expresa en todos los tipos de CaP como es el caso de los tumores que tienen expresión elevada de la fusión TMPRSS2-ERG. Este tipo de problemas se siguen intentando resolver mediante el diseño de nuevos aptámeros más específicos por su blanco molecular. Si bien el uso de los aptámeros como terapia resulta prometedora en cáncer, existen algunas dificultades a considerar al momento de su selección. Algunas dificultades en la selección de aptámeros son: posible contaminación cruzada, degradación por nucleasas, elevado costo de materiales y tiempos prolongados que no garantizan al cien por ciento obtener un aptámero funcional al final del proceso de selección. En este trabajo, se propuso un

modelo de selección combinando estrategias *in vitro* e *in silico* para obtener un aptámero con potencial de reconocimiento de una proteína presente en células de CaP independientes de andrógenos. La importancia de los ensayos *in silico* se debe a que con ellos es posible predecir algunas de las características termodinámicas de los aptámeros, y con ello, conocer la afinidad aparente que tienen cuando se unen a su blanco molecular. De este modo, la selección del aptámero puede ser más precisa y permite ahorrar significativamente tiempo y dinero. Este trabajo contribuye a la comprensión y a la posible implementación de este tipo de estudios *in vitro* e *in silico* en la selección de aptámeros. Su aplicación podría contribuir a futuro al desarrollo de nuevas terapias dirigidas basadas en aptámeros para el tratamiento del CaP resistente a la castración.

JUSTIFICACIÓN

Los aptámeros son moléculas con gran potencial terapéutico, sin embargo, su selección sigue siendo complicada y costosa. Esto ha sido uno de los factores que limitan su introducción por completo en la clínica. Actualmente existen aptámeros dirigidos hacia células de CaP, pero muchos de ellos todavía son susceptibles de ser mejorados. Tomando en cuenta lo anterior, la combinación de estrategias *in vitro* e *in silico* se vuelve viable. Este tipo de estrategias podría ayudar a acelerar la investigación en el campo de los aptámeros para posteriormente, aumentar su presencia en aplicaciones terapéuticas.

HIPÓTESIS

Si se realiza la combinación de ensayos *in vitro* e *in silico*, se obtendrá un aptámero candidato con capacidad de unión a una proteína presente en CaP resistente a la castración.

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar mediante trabajo *in vitro* e *in silico* un aptámero de RNA que reconozca a una proteína presente en CaP resistente a la castración y que tenga mejores características de afinidad que un aptámero de referencia en CaP.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar de la literatura científica un aptámero de referencia que reconozca a una proteína presente en cáncer de próstata resistente a la castración.
- Obtener los aptámeros candidatos usando una librería de aptámeros de RNA
- Analizar las secuencias de RNA obtenidas para la elección de los aptámeros candidatos.
- Caracterizar termodinámica y estructuralmente los aptámeros candidatos
- Predecir la interacción molecular de los aptámeros candidatos con la proteína objetivo.
- Determinar las características de afinidad de la interacción de los aptámeros con la proteína objetivo.
- Seleccionar el aptámero que tenga mejor afinidad hacia la proteína objetivo.

MÉTODOS

Selección de un aptámero de referencia

Se realizó una búsqueda en tres bases de datos para la selección de un aptámero que se une a una proteína presente en CaP resistente a la castración (**Tabla 1**). Este aptámero se utilizó como referencia para la elección de un aptámero presente en la librería de aptámeros con mayor afinidad a la proteína objetivo.

Tabla 1. Bases de datos para la búsqueda de un aptámero de referencia.

Base de datos	Dirección URL
PubMed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
Elsevier	https://www.elsevier.com/es-mx
Scielo	https://scielo.org/

Los criterios de inclusión y exclusión para la selección del aptámero se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de un aptámero de referencia.

Inclusión	Exclusión
Desarrollo y obtención para CaP	Desarrollo y obtención para un tipo de cáncer que no es de próstata
Afinidad y unión a una proteína presente en CaP resistente a la castración	Ensayos en células de CaP resistente a la castración sin una proteína específica como objetivo
Secuencia de RNA	Secuencia de DNA

In vitro

Se usó una librería de aptámeros de RNA a concentración de 100 nM (Rodríguez-Dorantes *et al.*, 2021). La siguiente secuencia representa los aptámeros presentes en la librería:

5' UAGGGAAGAGAAGGACAUUGAU ————— UGACUAGUACAUGACCACUUGA 3'

Retrotranscripción (RT)

La RT se realizó para generar una cadena de cDNA a partir de la librería de aptámeros de RNA (100 nM). Para esto se utilizó el kit (paquete comercial) “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, Foster City, CA. EUA). Los reactivos que se utilizaron para un volumen de 20 μ l se muestran en la **Tabla 3** y las condiciones del termociclador en las que se realizó la RT se muestran en la **Figura 2**.

Tabla 3. Reactivos para la RT.

Reactivos	Volumen
10x Buffer	2 μ l
25x DNTPs (100 nM)	0.8 μ l
Oligo T7RV (10 nM)	2 μ l
Enzima Multiscribe RT	1 μ l
Inhibidor de RNAasa	1 μ l
H ₂ O libre de nucleasas	3.2 μ l
RNA	9 μ l
H ₂ O Grado Biología Molecular	1 μ l

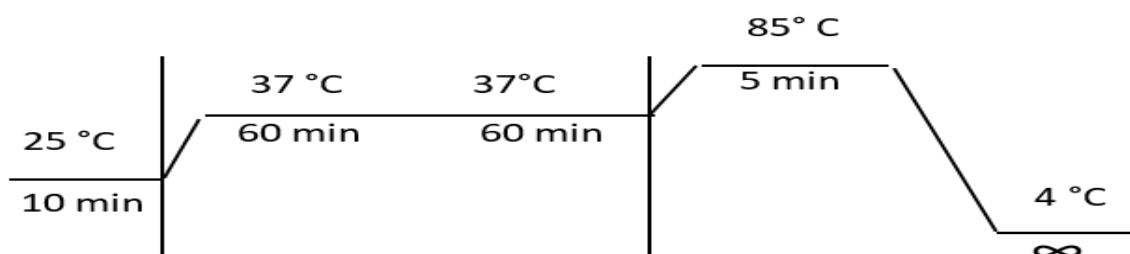


Figura 2. Condiciones del termociclador para realizar la retrotranscripción.

Oligonucleótidos para la RT: T7RV (10 nM)

5'ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTTCAAGTGGTCATGTACTAGTCAA3'

Sintetizado por T4 OLIGO (Irapuato, Guanajuato, México).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del cDNA obtenido de la RT, se realizó una PCR de 40 ciclos a una T_m de 60° C. Esto se realizó con la muestra de estudio (+), es decir, la que contiene el cDNA y con el control negativo (-). Para amplificar la cadena de DNA se utilizó el kit “AmpliTaq Gold DNA Polymerase con buffer Gold y $MgCl_2$ ” (ThermoFisher Applied Biosystems, Foster City, CA. EUA). Los reactivos utilizados para un volumen de 50 μ l se muestran en la **Tabla 4** y las condiciones del termociclador en las que se realizó la PCR se muestran en la **Figura 3**.

Tabla 4. Reactivos para la PCR.

Reactivos			(+)	(-)
H ₂ O	Grado	Biología	22 μ l	27 μ l
Molecular				
PCR 10x Buffer			5 μ l	5 μ l
25 MgCl			3 μ l	3 μ l
DNTPs			4 μ l	4 μ l
Oligo FWD (10 μ M)			5 μ l	5 μ l
Oligo T7RV (10 μ M)			5 μ l	5 μ l
cDNA			5 μ l	---
Enzima Amplitaq			1 μ l	1 μ l

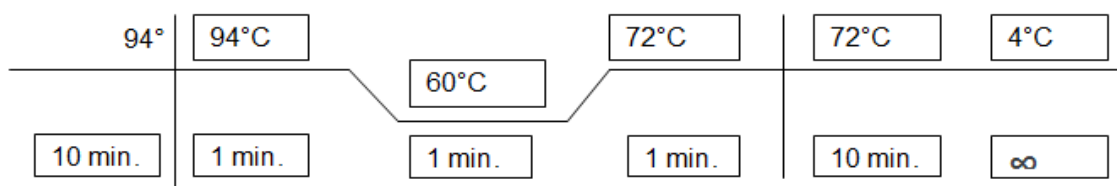


Figura 3. Condiciones del termociclador. 40 ciclos, T_m : 60°

Oligonucleótidos para PCR: Sintetizados por T4 OLIGO (Irapuato, Guanajuato, México).

Forward (FWD):

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCAAGTGGTCATGTACTA
GTCAA3' Escala: 100 nM Purificación: DST.

Reverse (RVD):

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTAGGGAAGAGAAGGAC
ATATGAT3' Escala: 100 nM Purificación: DST.

Electroforesis

Para verificar la amplificación del producto de PCR, se realizó un gel de agarosa al 3 %, corrido a 150 V durante 1 hora con buffer TBE (Tris, Borato y EDTA, por sus siglas en inglés). Las muestras resultantes de la PCR (positivo y negativo) se prepararon de la siguiente manera:

Marcador: 1 µl de ultralow + 5 µl de buffer de carga 6x+ 2 µl de red gel

PCR (+): 10 µl de muestra + 4 µl de buffer de carga 6x+ 2 µl de red gel

PCR (-): 10 µl de muestra + 4 µl de buffer de carga 6x+ 2 µl de red gel

Purificación de PCR

Para eliminar los desoxinucleótidos (DNTPs) y los demás reactivos que no fueron usados dentro de la reacción de PCR, se realizó una purificación del producto de PCR. Esta purificación fue realizada con el kit MinElute PCR Purification (QIAGEN, Hilden, Alemania).

Secuenciación de nueva generación

Posterior a la amplificación, una muestra de PCR de 15 ng/µl se entregó al área de secuenciación del INMEGEN donde se llevó a cabo todo el proceso de secuenciación. La secuenciación se realizó con la plataforma MySeq, síntesis a 30 ciclos y una profundidad de 70, 000 lecturas.

In silico

Filtración de las secuencias amplificadas desde la librería de aptámeros

- Depuración de secuencias presentes en la librería del aptámeros.

Para seleccionar únicamente las secuencias que cuentan con 30 nucleótidos y para posteriormente pasarlas a un lenguaje de RNA, se utilizó la línea de comandos del sistema operativo LINUX versión 5.11.

- Cálculo de la energía libre mínima (MFE) de los aptámeros.

Para calcular la MFE de cada aptámero, se utilizó el programa RNAfold versión 2.1.8 mediante la línea de comandos del sistema operativo LINUX, posteriormente, se eligieron las secuencias candidatas, es decir, las secuencias con una MFE de entre -14.00 y -14.99.

Alineación de las secuencias candidatas con la secuencia del aptámero de referencia

La alineación de las secuencias de los aptámeros candidatos con la secuencia del aptámero de referencia se realizó con la herramienta de internet Clustal Omega: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Esta herramienta realiza un cladograma que agrupa a las secuencias por familias. El agrupamiento se basa en la similitud que existe entre cada una de las secuencias.

Se realizó un análisis del cladograma resultante donde se representaron las secuencias de los aptámeros de la librería de aptámeros y la secuencia del aptámero de referencia. Se seleccionaron las 4 secuencias que estaban dentro del mismo grupo que el aptámero de referencia. Estas secuencias son de los aptámeros candidatos que se utilizaron para los análisis posteriores.

Modelamiento de la estructura secundaria y cálculo de los parámetros termodinámicos

Desde el programa de internet de RNAstructure se calcularon las estructuras secundarias de los 4 aptámeros candidatos.

La liga de la página de internet se muestra a continuación:

<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>.

Para las características termodinámicas de la estructura secundaria de cada aptámero se utilizó la herramienta de internet RNAfold.

El cálculo de los datos termodinámicos se realizó con la siguiente página web: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>. Las características calculadas fueron MFE, diversidad de conjuntos y frecuencia de la estructura MFE de conjuntos.

Modelamiento de la estructura terciaria

Desde la página de internet de RNAcomposer, que se muestra a continuación <http://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/> se hicieron los modelamientos de las estructuras terciarias de los aptámeros candidatos y del aptámero de referencia para posteriormente realizar los acoplamientos moleculares.

El modelamiento de la estructura terciaria de cada secuencia fue predicho por separado. Una vez obtenidas las estructuras terciarias, se descargaron en formato PDB.

La estructura terciaria de la proteína que se utilizó como blanco molecular en los ensayos siguientes, se obtuvo de la página de internet Protein Data Bank <https://www.rcsb.org/structure/1CVI> en formato PDB.

Acoplamiento molecular (Docking) entre los aptámeros y la proteína presente en CaP independiente de andrógenos

Se utilizó el programa HEX 8.0.0 para el acoplamiento del aptámero de referencia y la proteína objetivo, ambas moléculas en formato PDB, previamente obtenidas.

Posteriormente, se utilizó el servidor de internet PatchDock versión β -1.3 <https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/> para realizar el acoplamiento entre el aptámero de referencia y la proteína objetivo y los aptámeros candidatos y dicha proteína, respectivamente.

Análisis molecular

Para elegir cuál de las herramientas anteriores predice el acoplamiento molecular de manera más parecida a lo reportado en la literatura, se realizó un análisis molecular de los acoplamientos moleculares del aptámero de referencia y la proteína objetivo realizados con estas herramientas mediante el programa PyMOL versión 4.50.

Se midieron las distancias entre los nucleótidos de las horquillas del aptámero y los aminoácidos del sitio activo de la proteína. Una vez conociendo estos datos, se eligió la herramienta bioinformática por la cual hay una mejor predicción de acoplamiento. Dicha herramienta fue utilizada para los acoplamientos moleculares de los aptámeros candidatos y la proteína objetivo.

Una vez que se hizo la elección del aptámero candidato, siendo el de mejor afinidad, se procedió a hacer el análisis molecular, midiendo la distancia que hay entre los aminoácidos del sitio activo de la proteína y el nucleótido del aptámero más cercano a éste. Se midió la distancia entre el aminoácido y el nucleótido más cercano entre sí y para conocer el tipo de unión que hay entre ambas moléculas, se buscaron los puentes de hidrógeno.

Al conocer las distancias del acoplamiento en PatchDock del aptámero de referencia con la proteína y del aptámero candidato con la misma proteína, se pudo elegir cuál de los dos aptámeros es más afín a la proteína.

RESULTADOS

Se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos para obtener un aptámero diseñado para unirse a células de CaP resistente a la castración, que sirva de referencia. Después de una búsqueda sistemática, en la base de datos PubMed se seleccionó un aptámero que cumple con todos los criterios de inclusión y exclusión antes propuestos. El aptámero elegido fue el aptámero 6N-M2 (Kong y Byun, 2015). Una característica importante para este trabajo fue la MFE del aptámero, la cual es de -11.90 kcal/mol (**Figura 4**). Este aptámero tiene como objetivo molecular la PAP, particularmente, el aptámero se dirige al dominio extracelular (Jakob, 1999) (**Figura 14**).

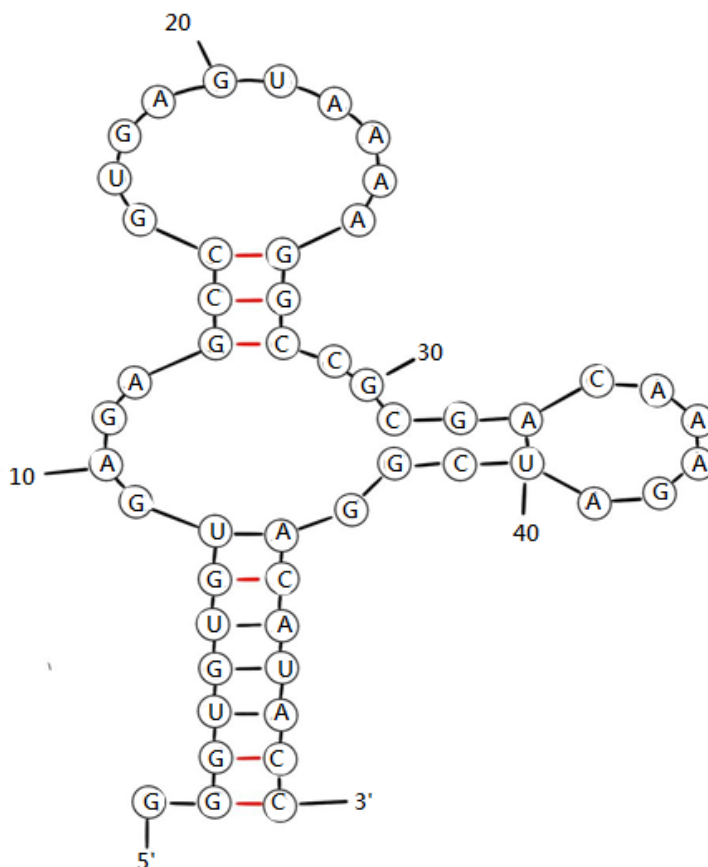


Figura 4. Estructura secundaria del aptámero 6N-M2. La MFE del aptámero es de -11.90 kcal/mol. Imagen tomada de Kong y Byun, 2015 y modificada con Procrate.

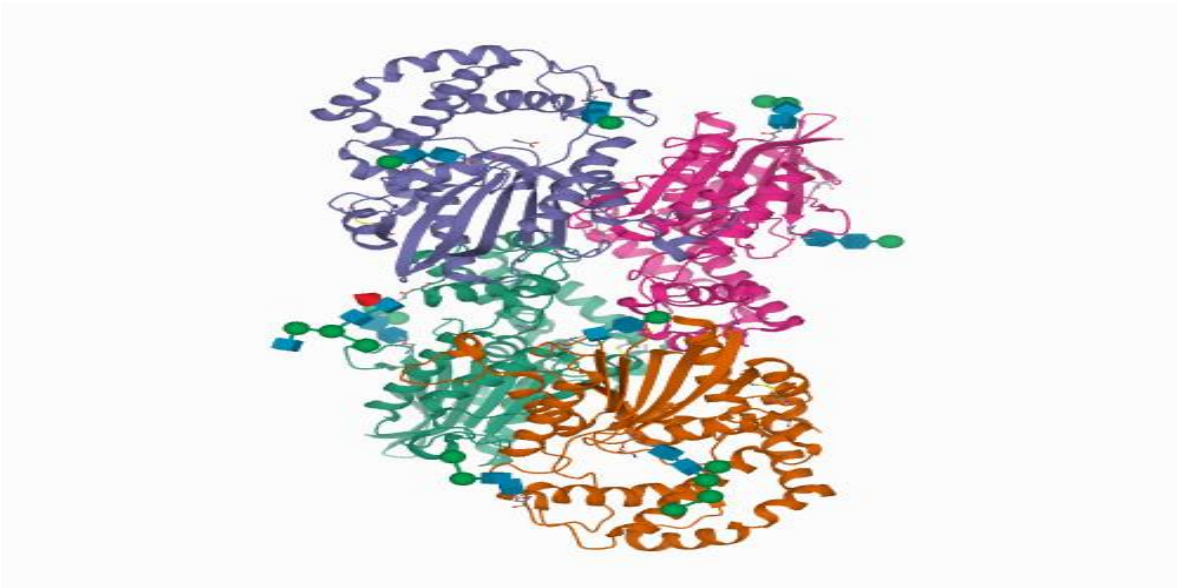


Figura 5. Estructura cristalina de la proteína PAP completa, vista en 3D. El formato de descarga seleccionado fue PDB (Jakob, 1999).

Se amplificó un volumen de 9 μ l a una concentración de 100 nM de la librería de aptámeros de RNA que fue previamente diseñada en el laboratorio. La librería tiene las características que se muestran en la **Figura 6**.

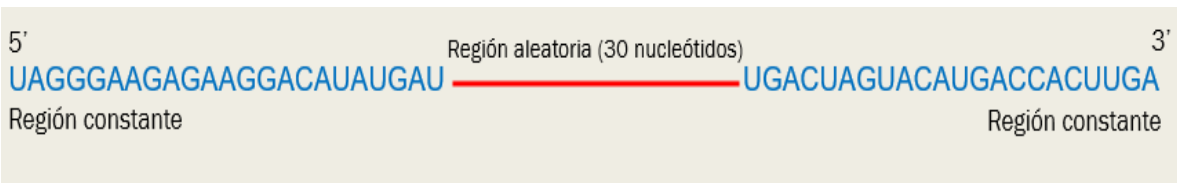


Figura 6. Representación de una de las secuencias de los aptámeros presentes en la librería de aptámeros. Cada secuencia contiene dos regiones constantes de unión a cebadores en los extremos 5' y 3' y una región aleatoria central (línea de color rojo). La región central corresponde a los aptámeros y tiene una porción de 25 % de cada uno de los nucleótidos: A, U, G y C.

La librería de RNA consta de 76 nucleótidos. En los extremos 5' y 3' se encuentran dos regiones constantes de 23 nucleótidos cada una. En estas regiones se unen los oligos utilizados en la PCR. En el centro se encuentra una región aleatoria de 30 nucleótidos, la región que cambia en cada una de las secuencias presentes en la librería de aptámeros, es decir, la que corresponde a los aptámeros.

Mediante RT-PCR y electroforesis, se verificó la obtención de los aptámeros los cuales tienen un peso molecular de 143 nucleótidos (**Fig 7**).

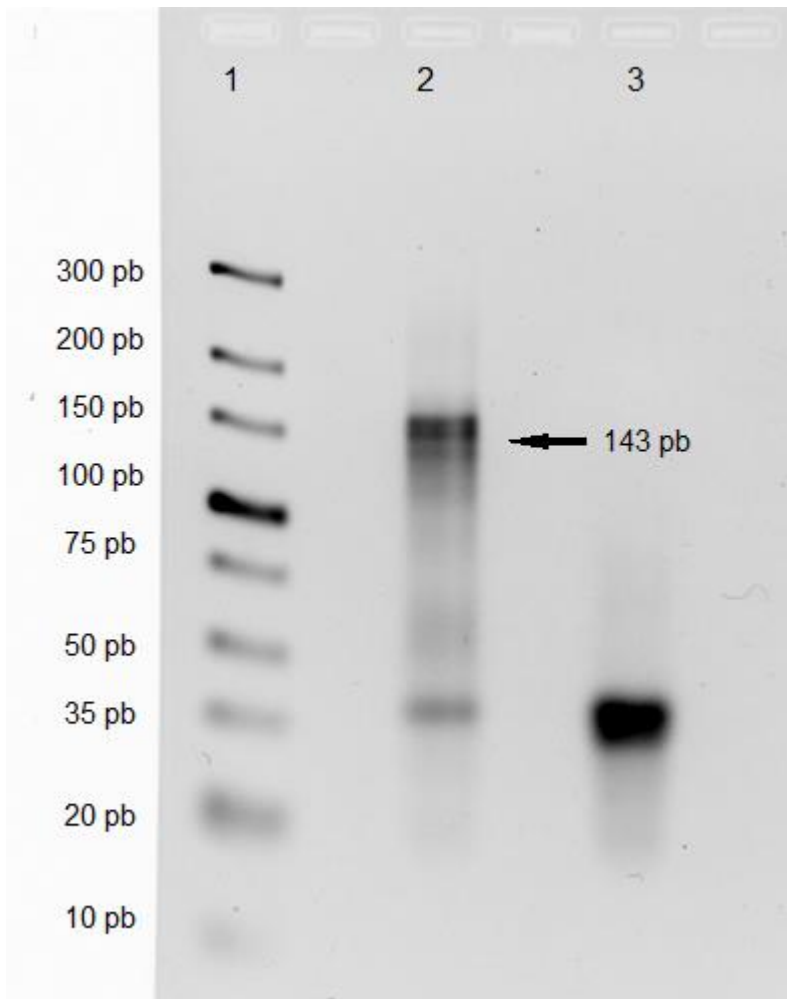


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de la amplificación de la librería de aptámeros. Carril 1: marcador de peso molecular Carril 2: PCR con muestra (positiva) Carril 3: PCR sin muestra (negativa). Se señala con una flecha la banda del carril 2 que corresponde al producto esperado de 143 pb.

Secuenciación

Posterior a la amplificación de la librería, se realizó una secuenciación de nueva generación a partir de los productos de PCR purificados para conocer las secuencias de los aptámeros. Se obtuvo un total de **77,735** secuencias diferentes de DNA y se realizó un filtrado de las secuencias obtenidas de la librería de aptámeros a partir de la secuenciación para obtener la región aleatoria de la librería de aptámeros, esta tiene una extensión de 30 nucleótidos. En este paso se obtuvo un total de **15,793** secuencias de DNA, las cuales fueron transformadas a lenguaje de RNA. Posteriormente, se calculó la MFE de cada secuencia a partir de su

estructura secundaria. La MFE fue calculada con el programa RNAfold. Este filtrado permitió establecer un rango de selección de secuencias a partir de sus valores de MFE. Debido a que la MFE del aptámero 6N-M2 es de -11.90 kcal/mol, el rango de valores para la filtración fue de -14.00 a -14.99 kcal/ mol. Este filtrado se realizó usando una línea de comandos en el sistema operativo LINUX 5.11. Al finalizar los filtrados, se obtuvieron **17** secuencias candidatas (**Tabla 5**).

Tabla 5. Secuencias obtenidas durante cada filtrado.

Secuencias totales	77,735
Secuencias con 30 nucleótidos	15,793
Secuencias con una MFE entre -14.00 y -14.99 kcal/ mol	17

Se eligieron las cuatro secuencias candidatas más cercanas al aptámero de referencia, para la caracterización estructural y termodinámica de cada una (**Figura 8**).

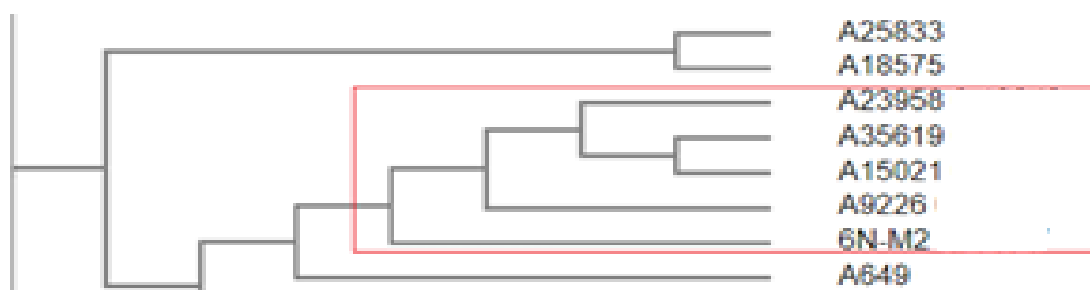


Figura 8. Alineamiento de las secuencias candidatas y el aptámero 6N-M2 mediante el programa web Clustal Omega. El recuadro rojo enmarca las secuencias candidatas seleccionadas que tienen mayor similitud con la secuencia del aptámero de referencia.

Caracterización estructural y termodinámica de las secuencias candidatas

Las características termodinámicas de las estructuras secundarias de las cuatro secuencias candidatas, se modelaron mediante el software RNAstructure (**Figura 9 a-d**). De acuerdo con los datos termodinámicos, la estructura secundaria

de la secuencia A15021 mostró ser la secuencia con mayor estabilidad ya que su MFE es menor en comparación con las demás estructuras (**Tabla 6**).

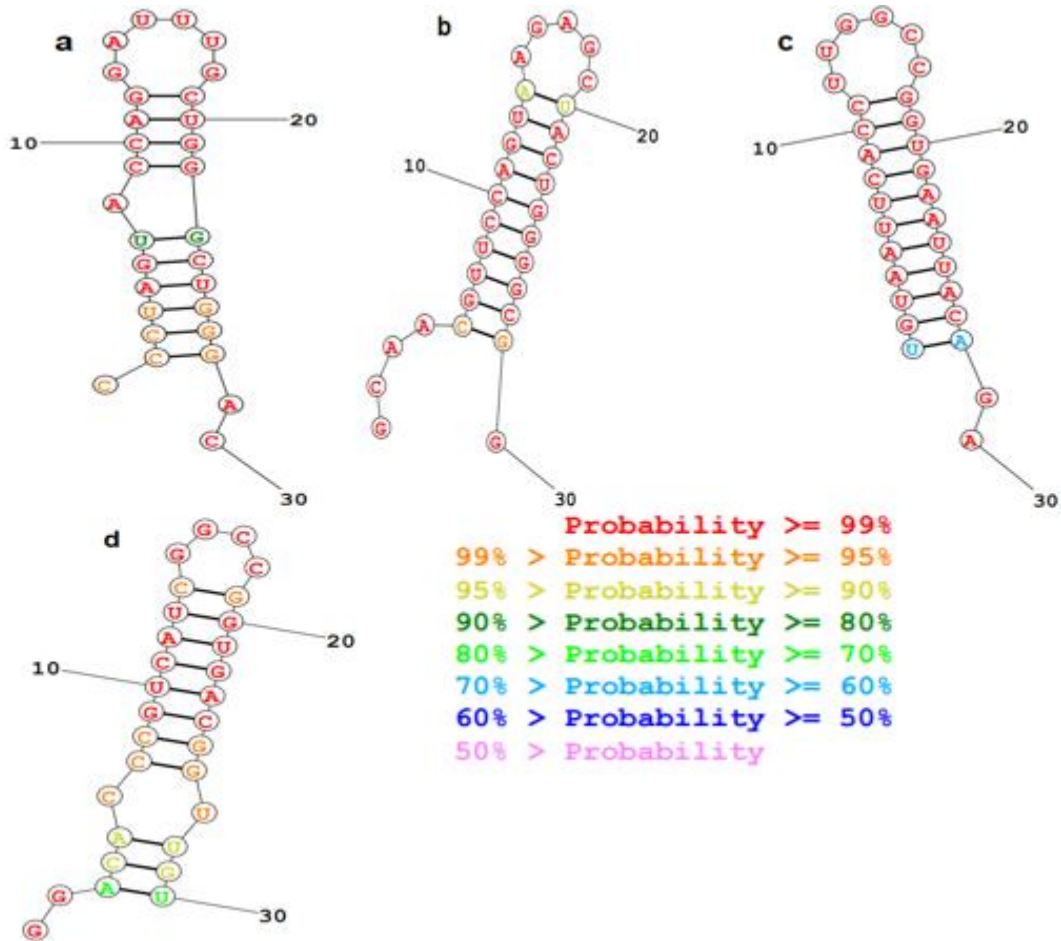


Figura 9. Predicción de la estructura secundaria de las secuencias candidatas mediante RNAstructure. El panel de colores representa la probabilidad de emparejamiento de bases. a) Secuencia A23958 b) Secuencia A35619 c) Secuencia A15021 d) Secuencia A9226.

Los datos termodinámicos de cada secuencia (MFE, diversidad de conjuntos y frecuencia de la estructura de conjuntos) se obtuvieron mediante el programa web RNAfold.

Tabla 6. Parámetros termodinámicos de las estructuras secundarias del aptámero 6N-M2 y de las secuencias candidatas.

Aptámero	MFE kcal/mol	Diversidad de conjuntos	Frecuencia de la estructura MFE de conjuntos
6N-M2	-11.90	7.52	49.66 %
A23958	-14.50	0.78	83.30 %
A35619	-14.30	0.16	92.26 %
A15021	-14.80	0.33	80.37 %
A9226	-14.20	0.61	76.80 %

La secuencia A15021 tiene una MFE con un valor de -14.80 kcal/ mol, menor a la MFE del aptámero 6N-M2. La diversidad de conjuntos de este aptámero es de 0.33, el aptámero con una diversidad de conjuntos más baja es el aptámero A35619, siendo de 0.16, mientras que la frecuencia de la estructura MFE de conjuntos de ambos aptámeros es de 80.37 % y 92.26 % respectivamente.

Acoplamiento molecular del aptámero 6N-M2 y las secuencias candidatas con la proteína PAP

Previo al acoplamiento molecular (docking), se obtuvo la estructura terciaria de cada secuencia candidata y del aptámero 6N-M2 con la plataforma de internet RNA Composer. Un paso fundamental fue determinar qué software de docking puede predecir mejor el acoplamiento molecular aptámero-proteína, por lo tanto, se analizaron los resultados del docking entre el aptámero de referencia y la proteína PAP obtenidos de los programas HEX y PatchDock. Con base a los resultados de ambos programas, se seleccionó uno de ellos para realizar los acoplamientos posteriores. Cada docking fue analizado mediante el programa PyMOL.

Acoplamiento molecular del aptámero 6N-M2 y la proteína PAP

Se realizó el acoplamiento molecular entre el aptámero 6N-M2 con la proteína PAP con el programa HEX y posteriormente se analizó con el programa PyMOL (Figura 10).

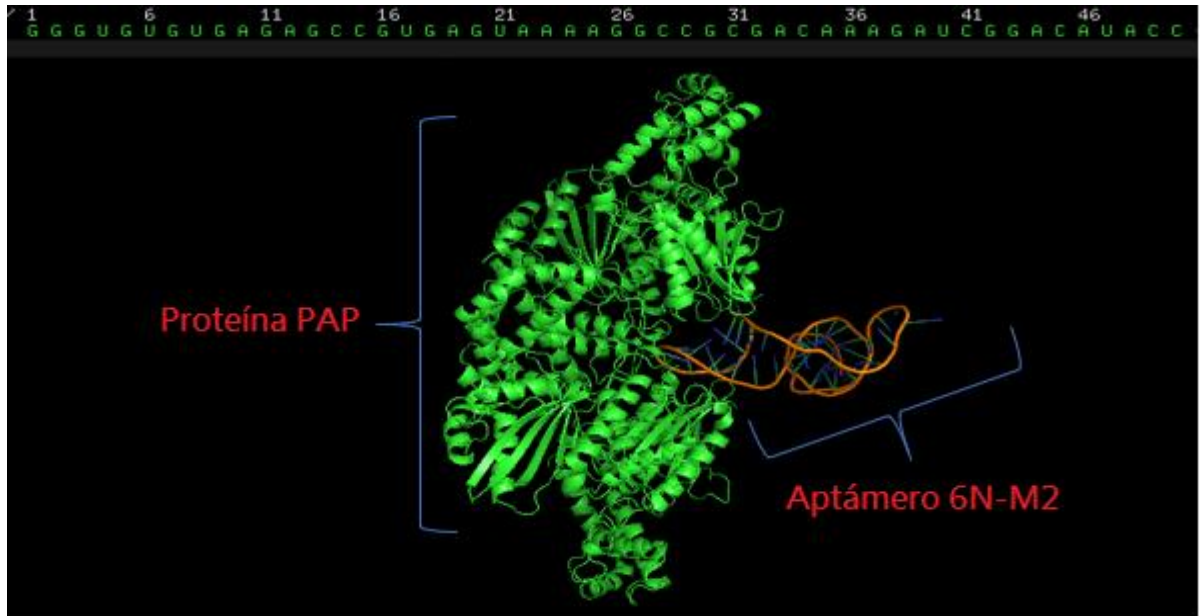


Figura 10. Acoplamiento molecular realizado en HEX y analizado en PyMOL. El aptámero 6N-M2 se observa en color naranja y la proteína PAP en color verde. En la parte superior de la imagen se muestra la secuencia del aptámero.

El acoplamiento tiene una energía total de -525 kcal/mol. Esto indica que es un sistema estable, por lo tanto, tiene una gran probabilidad de acoplamiento.

Determinación del acoplamiento molecular entre el aptámero 6N-M2 y la proteína PAP a partir de las distancias moleculares entre las dos horquillas del aptámero y los sitios activos de la proteína

La estructura del aptámero 6N-M2 contiene 2 horquillas: la horquilla 1, conformada desde la citocina 15 (C15) hasta la guanina 26 (G26) y la horquilla 2, conformada desde la adenina 33 (A33) hasta el uracilo 40 (U4) (Figura 11).

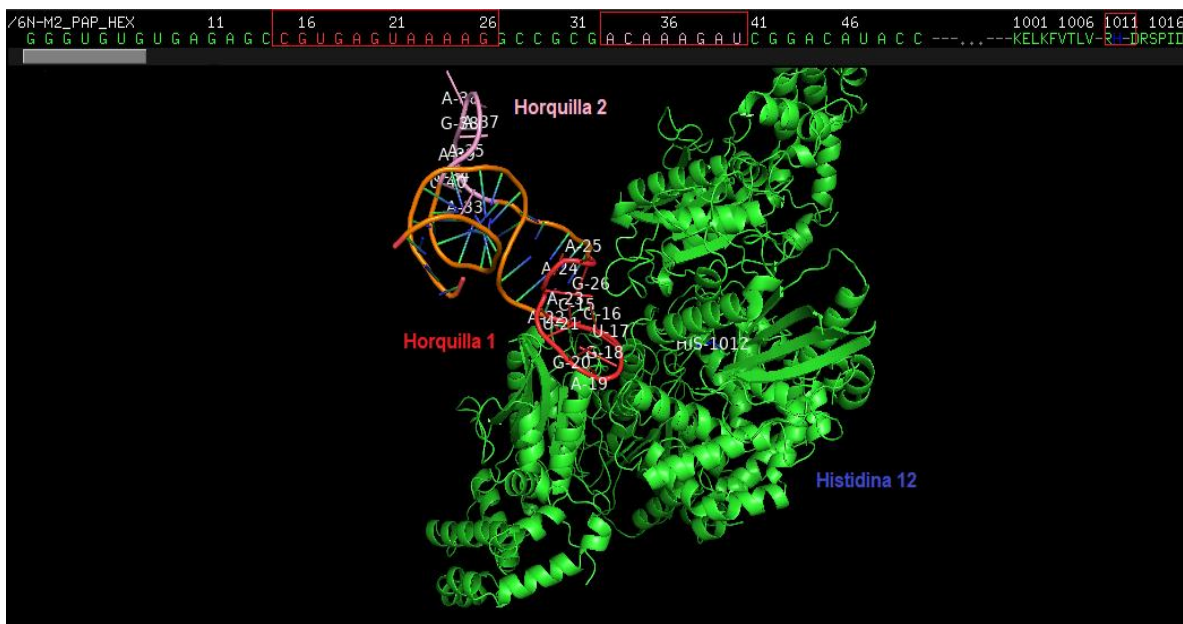


Figura 11. Acoplamiento molecular del aptámero 6N-M2 y la proteína PAP. Se muestra la horquilla 1 en color rojo y la horquilla 2 en color rosa. El aminoácido histidina 12 se marca en azul. En la parte superior de la imagen se observa la secuencia del aptámero y remarcado en un cuadro rojo los nucleótidos de la horquilla 1 y 2.

Para conocer la proximidad entre ambas moléculas, se midió la distancia que existe entre los nucleótidos de cada horquilla con el aminoácido histidina 12 (His 12), debido a que las horquillas son los posibles puntos de unión con el blanco molecular y la his 12 es uno de los sitios activos de la proteína. Los nucleótidos más cercanos a la his12 fue el uracilo 17 (U17) ubicado en la horquilla 1 y el uracilo 40 (U4) de la horquilla 2, con una distancia de 16.6 Å y 53.7 Å respectivamente (**Fig 12-13**). Los nucleótidos más alejados del aminoácido son la adenina 24 (A24), de la horquilla 1, con una distancia de 30.5 Å y la adenina 36 (A36), de la horquilla 2, con una distancia de 64.0 Å (**Tabla 7**).

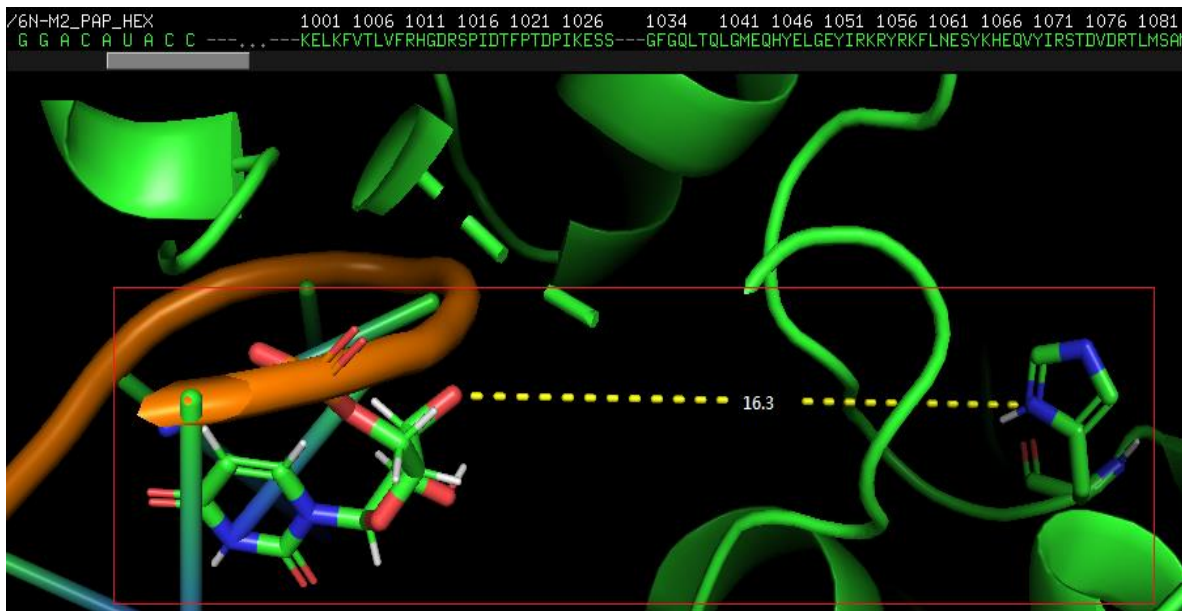


Figura 42. Distancia entre el uracilo 17 y la his 12. La distancia entre el uracilo 17 (izquierda) y la his 12 (derecha) fue de 16.3 Å. La distancia entre las dos moléculas fue entre un átomo de oxígeno (rojo) del U17 y un átomo de nitrógeno (azul) de la his 12. En la parte superior de la imagen se observa la secuencia de los aminoácidos de la proteína PAP. Se remarca en un cuadro rojo la unión entre el aminoácido y el nucleótido mencionados.

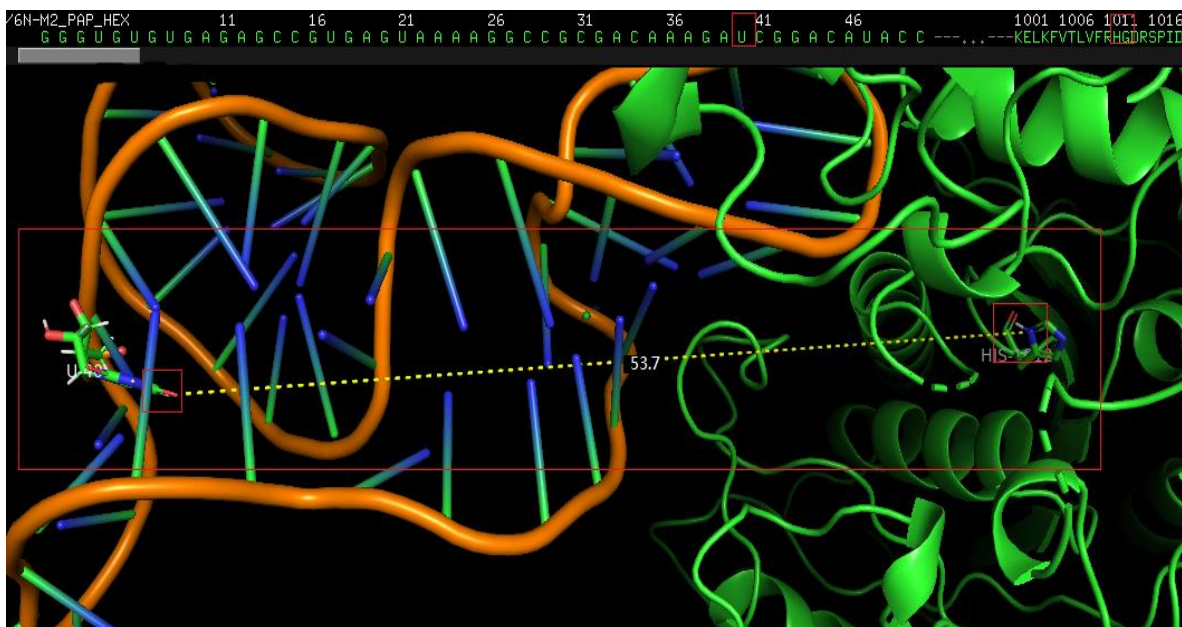


Figura 13. Distancia entre el uracilo 40 y la his12. La distancia entre el uracilo 40 y la his12 fue de 53.7 Å. La distancia entre las dos moléculas fue entre un átomo de oxígeno (rojo) del U40 y un átomo de nitrógeno (azul) de la His 12. En la parte superior de la imagen se observa la secuencia de los nucleótidos del aptámero, remarcando en un cuadro rojo el nucleótido y el aminoácido.

Tabla 7. Distancia entre cada nucleótido de la horquilla 1 y 2 y la his 12 Las distancias fueron medidas en Armstrong.

Nucleótido (horquilla 1)	Distancia	Nucleótido (horquilla 2)	Distancia
#15 C	25.8 Å	#33 A	54.0 Å
#16 G	19.9 Å	#34 C	54.7 Å
#17 U	16.6 Å	#35 A	57.5 Å
#18 G	17.0 Å	#36 A	64.0 Å
#19 A	22.2 Å	#37 A	59.8 Å
#20 G	20.6 Å	#38 G	58.2 Å
#21 U	22.8 Å	#39 A	54.7 Å
#22 A	29.7 Å	#40 A	53.7 Å
#23 A	22.8 Å		
#24 A	30.5 Å		
#25 A	29.6 Å		
#26 G	24.4 Å		
\bar{x}	23.5 Å	\bar{x}	57.0 Å

Debido a que el aminoácido ácido aspártico 258 (Asp 258) también es uno de los sitios activos de la proteína PAP, se midió la distancia que hay entre cada nucleótido de ambas horquillas y este aminoácido. El acoplamiento se muestra en la **Figura 14**.

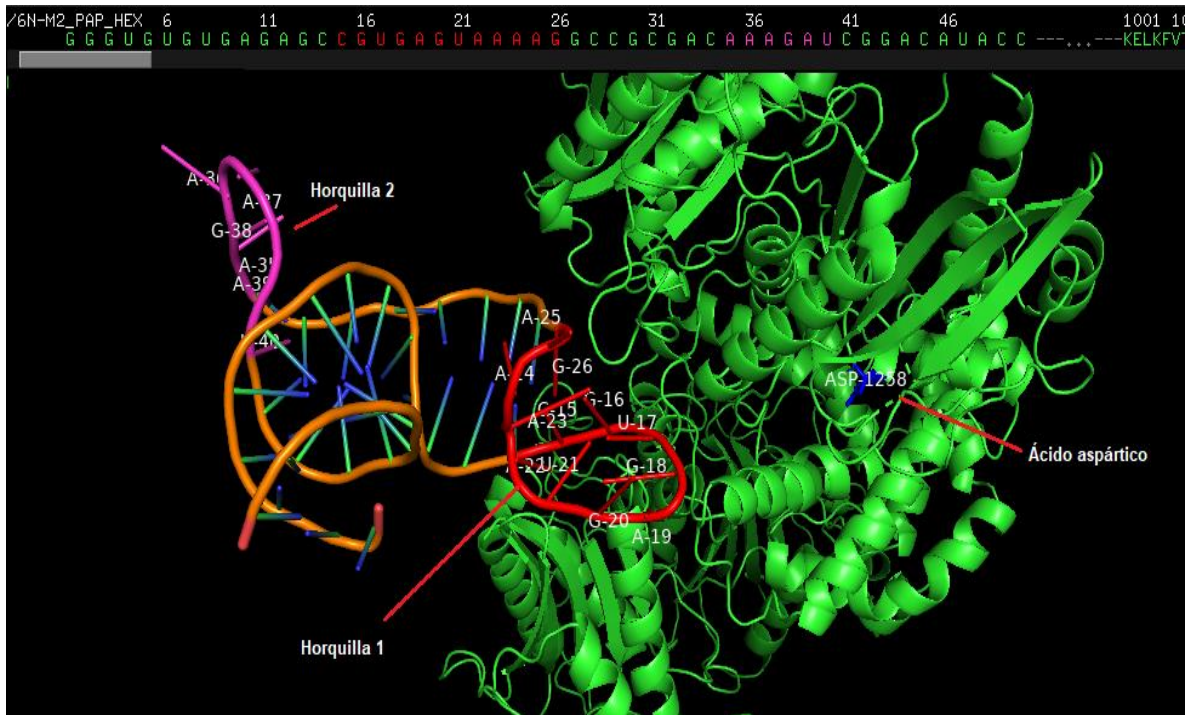


Figura 14. Acoplamiento molecular del aptámero 6N-M2 y la proteína PAP. Se indica la horquilla 1 en color rojo, la horquilla 2 en color rosa. El aminoácido asp 258 se muestra en color azul. En la parte superior de la imagen se muestra la secuencia del aptámero marcando los nucleótidos que forman parte de las horquillas.

El nucleótido de la horquilla 1 más cercano al Asp 258 es el uracilo 17 (U17), con una distancia de 21.1 Å, mientras que el nucleótido más cercano de la horquilla 2 es el uracilo 40 (U40), con una distancia de 59.8 Å (**Figura 15-16**). La adenina 24 (A24), que pertenece a la horquilla 1 tiene una distancia entre el Asp 258 de 36.6 Å, mientras que la adenina 36 (A36), de la horquilla 2, tiene una distancia de 71.3 Å, siendo estos los nucleótidos más alejados al Asp 258 (**Tabla 8**).

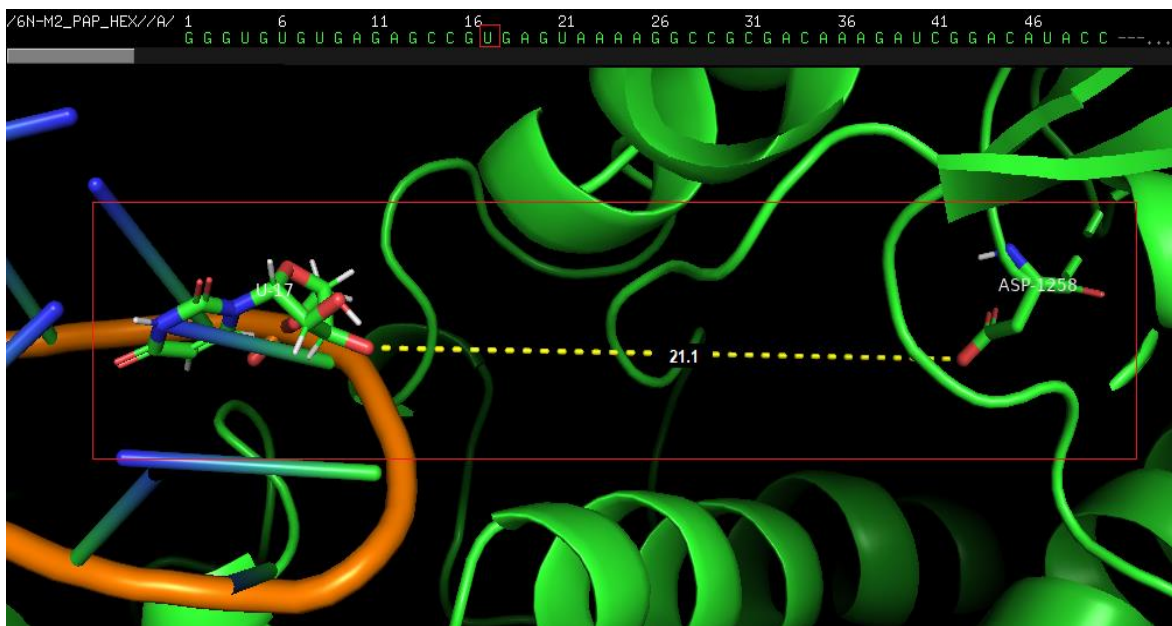


Figura 15. Distancia entre el uracilo 17 y el asp 258. La distancia entre el uracilo 17 (izquierda) y el Asp 258 (derecha) fue de 21.1 Å. La distancia entre las dos moléculas fue entre un átomo de oxígeno (rojo) del nucleótido U17 y un átomo de oxígeno (rojo) del aminoácido Asp 258. En la parte superior de la imagen se observa la secuencia de los nucleótidos del aptámero, remarcando en un cuadro rojo el nucleótido U17.

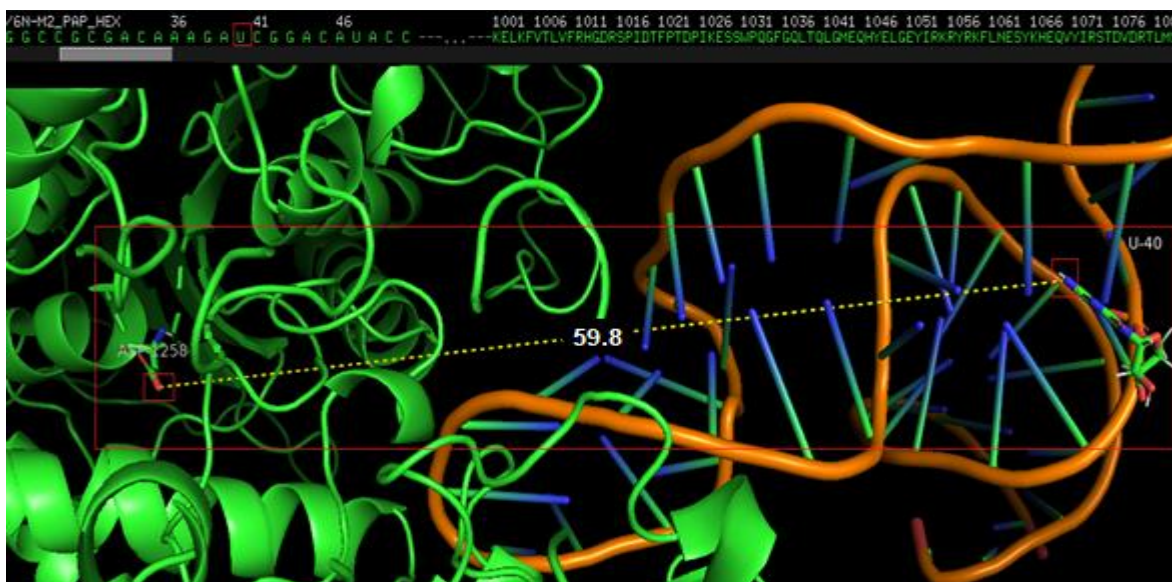


Figura 16. Distancia entre el uracilo 40 y el asp 258. La distancia entre el uracilo 40 (derecha) y el Asp 258 (izquierda) fue de 59.8 Å. La distancia entre las dos moléculas fue entre un átomo de nitrógeno (azul) del nucleótido U40 y un átomo de oxígeno (rojo) del Asp 258. En la parte superior de la imagen se observa la secuencia de los nucleótidos del aptámero remarcando en un cuadro rojo el nucleótido U40.

Tabla 8. Distancia entre cada nucleótido de la horquilla 1 y 2 y Asp 258. Las distancias fueron medidas en Armstrong.

Nucleótido (horquilla 1)	Distancia	Nucleótido (horquilla 2)	Distancia
#15 C	31.3 Å	#33 A	61.0 Å
#16 G	25.4 Å	#34 C	61.3 Å
#17 U	21.1 Å	#35 A	64.4 Å
#18 G	21.6 Å	#36 A	71.3 Å
#19 A	24.5 Å	#37 A	65.6 Å
#20 G	25.5 Å	#38 G	66.0 Å
#21 U	28.5 Å	#39 A	62.5 Å
#22 A	34.6 Å	#40 A	59.8 Å
#23 A	29.1 Å		
#24 A	36.6 Å		
#25 A	34.6 Å		
#26 G	31.9 Å		
\bar{x}	26.5 Å	\bar{x}	63.9 Å

Acoplamiento molecular entre el aptámero 6N-M2 y la proteína PAP

Se realizó un acoplamiento entre el aptámero 6N-M2 y la proteína PAP mediante el programa de internet PatchDock (**Figura 17**) y posteriormente se analizó para conocer la proximidad de las dos moléculas y conocer la interacción de ambas moléculas en el programa.

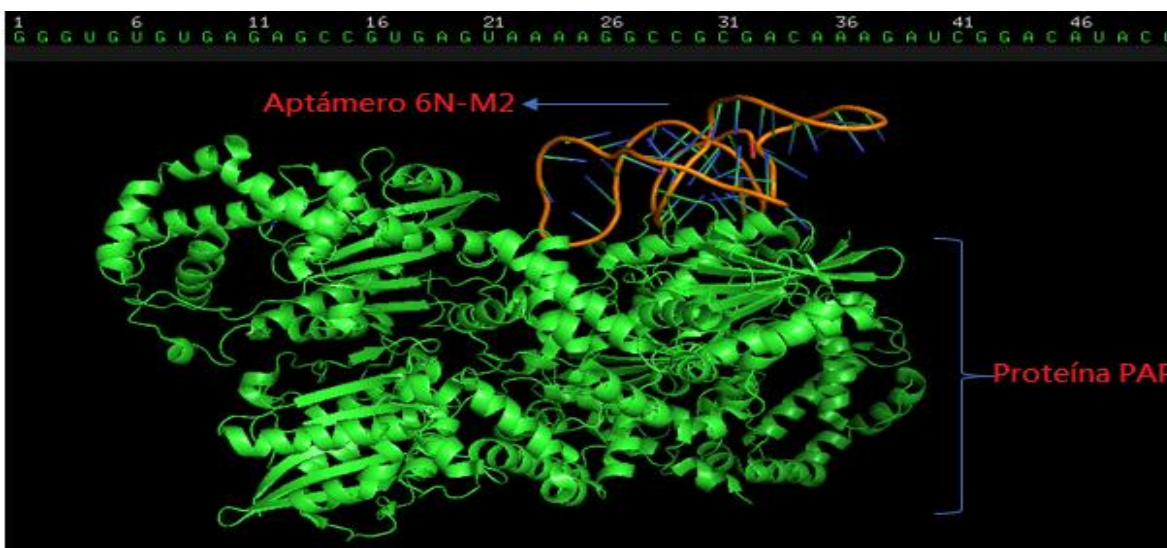


Figura 17. Acoplamiento molecular realizado en PatchDock y analizado en PyMOL. El aptámero 6N-M2 se observa en color naranja y la proteína PAP en color verde. En la parte superior de la imagen se muestra la secuencia del aptámero.

El programa evaluó todas las interacciones posibles entre las dos moléculas y las clasificó de acuerdo con un puntaje de complementariedad de forma geométrica. Este puntaje obtenido del acoplamiento fue de 15,696, el cual se tomó en cuenta para la elección del docking.

Determinación del acoplamiento entre el aptámero 6N-M2 y la proteína PAP a partir de las distancias moleculares entre las dos horquillas del aptámero y los sitios activos de la proteína

Para conocer qué tan preciso es el acoplamiento molecular entre el aptámero y la proteína mediante PatchDock, se midió la distancia entre los nucleótidos que forman parte de la horquilla 1 y 2 y la his 12, ya que es uno de los sitios activos de la proteína PAP. Los nucleótidos que van desde la citosina 15 (C15) a la guanina 26 (G26) forman parte de la horquilla 1 y los nucleótidos desde la adenina 33 (A33) al uracilo 40 (U40) son parte de la horquilla 2 (**Figura 18**).

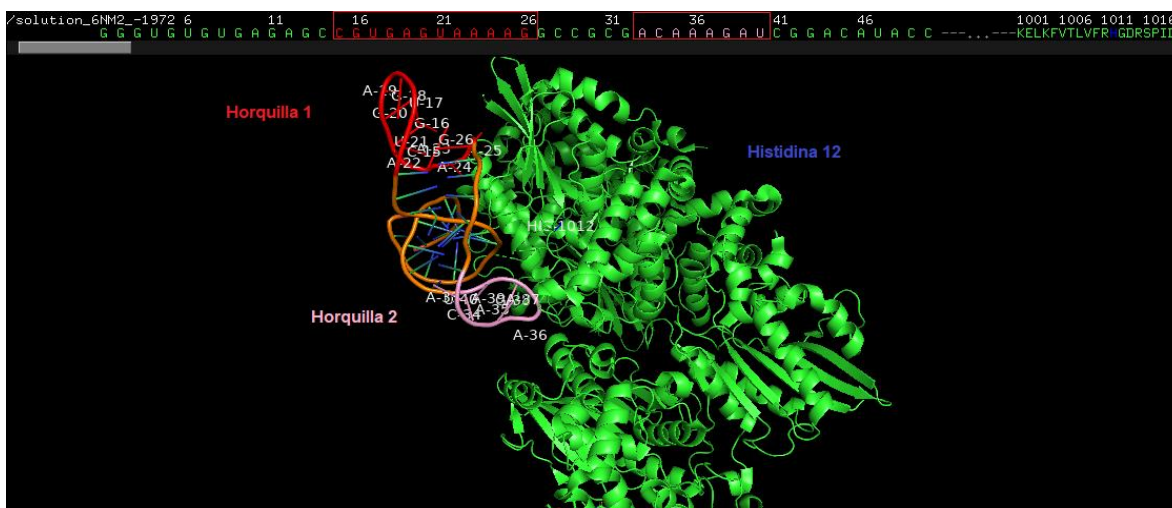


Figura 18. Acoplamiento molecular del aptámero 6N-M2 y la proteína PAP. Se muestra la horquilla 1 en color rojo y la horquilla 2 en color rosa. El aminoácido his 12 se marca en azul. En la parte superior de la imagen se muestra la secuencia del aptámero y remarcado en un cuadro rojo los nucleótidos de la horquilla 1 y 2.

La distancia entre cada nucleótido de la horquilla 1 y 2 y la his 12 fue medida. La adenina 24 (A24), que pertenece a la horquilla 1 y la adenina 37 (A37), que forma parte de la horquilla 2 fueron los nucleótidos más cercanos, con una distancia de 21.7 Å y 15.1 Å respectivamente (**Figura 19-20**). Los nucleótidos más lejanos a la his 12, fueron la adenina 19 (A19), perteneciente a la horquilla 1, con una distancia

de 44.7 Å y la adenina 33 (A33) de la horquilla 2, con una distancia de 26.1 Å (Tabla 9).

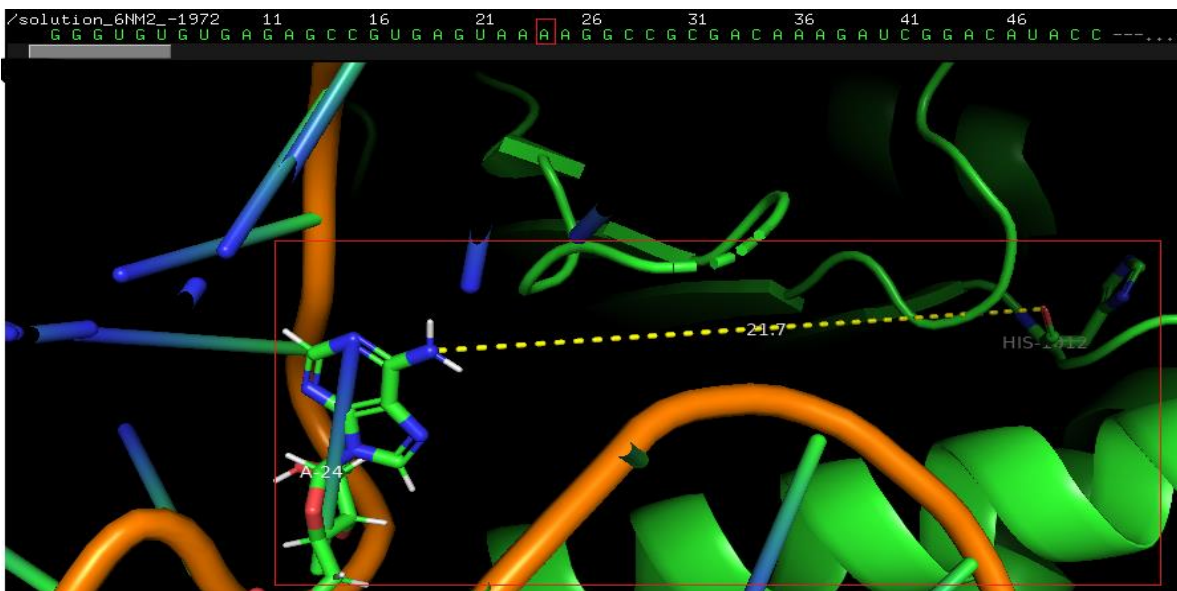


Figura 19. Distancia entre la adenina 24 y la his 12. La distancia entre la adenina 24 (izquierda) y la his 12 (derecha) es de 21.7 Å. La distancia entre las dos moléculas fue entre un átomo de nitrógeno (azul) del nucleótido A24 y un átomo de oxígeno (rojo) de la His 12. En la parte superior de la imagen se observa la secuencia de los nucleótidos del aptámero, remarcando con un cuadro rojo el nucleótido A24.

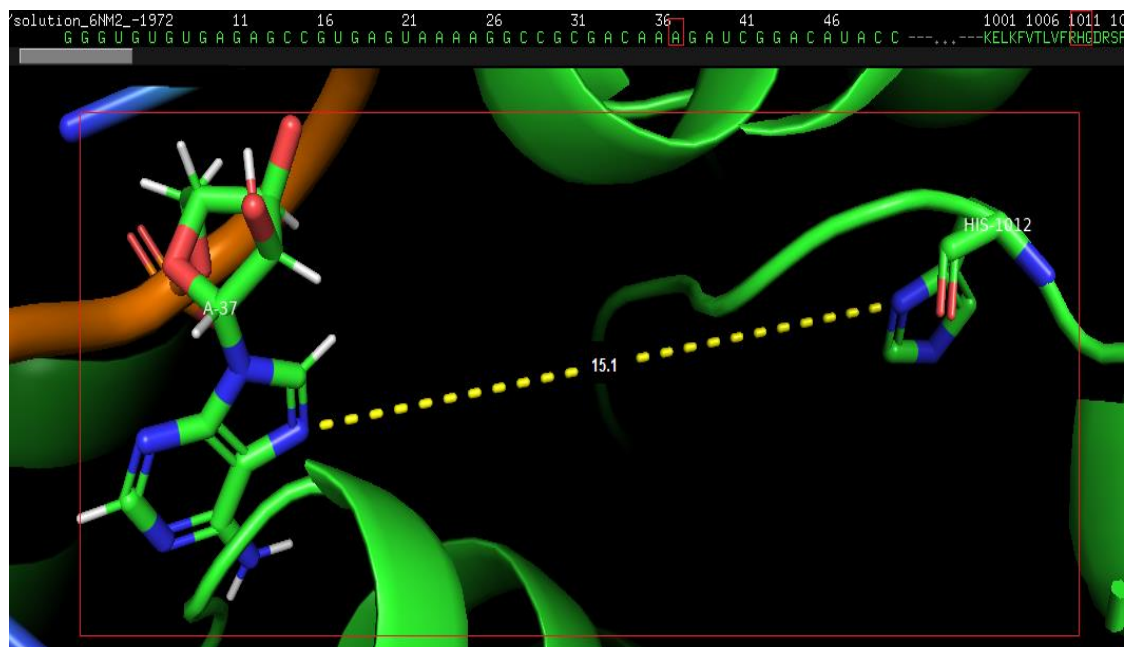


Figura 20. Distancia entre la adenina 37 y la his 12. La distancia entre la adenina 37 (izquierda) y la his 12 es de 15.1 Å. La distancia entre las dos moléculas fue entre un átomo de nitrógeno (azul) del nucleótido A37 y un átomo de nitrógeno (azul) de la His 12. En la parte superior de la imagen se muestra la secuencia del aptámero, remarcando en un cuadro rojo el nucleótido A37.

Tabla 9. Distancia entre los nucleótidos de la horquilla 1 y 2 y la his 12.

Nucleótido (horquilla 1)	Distancia	Nucleótido (horquilla 2)	Distancia
#15 C	35.7 Å	#33 A	26.1 Å
#16 G	32.0 Å	#34 C	25.1 Å
#17 U	38.3 Å	#35 A	20.6 Å
#18 G	40.5 Å	#36 A	19.2 Å
#19 A	44.7 Å	#37 A	15.1 Å
#20 G	39.1 Å	#38 G	16.6 Å
#21 U	34.4 Å	#39 A	20.3 Å
#22 A	32.5 Å	#40 A	24.7 Å
#23 A	27.7 Å		
#24 A	21.7 Å		
#25 A	25.4 Å		
#26 G	25.5 Å		
\bar{x}	33.1 Å	\bar{x}	20.9 Å

Para determinar qué nucleótido era el más cercano al Asp 258, se midió la distancia entre cada nucleótido y el Asp 258, siendo adenina 25 (A25) de la horquilla 1 y adenina 37 (A37) de la horquilla 2 los más cercanos a dicho aminoácido, con una distancia de 23.2 Å y 18.5 Å respectivamente (**Figura 21-22**). La adenina 19 (A19) de la horquilla 1 y la adenina 40 (A40) de la horquilla 2, fueron los nucleótidos más alejados del Asp 258, con una distancia de 43.6 Å y 28.3 Å respectivamente (**Tabla 10**).

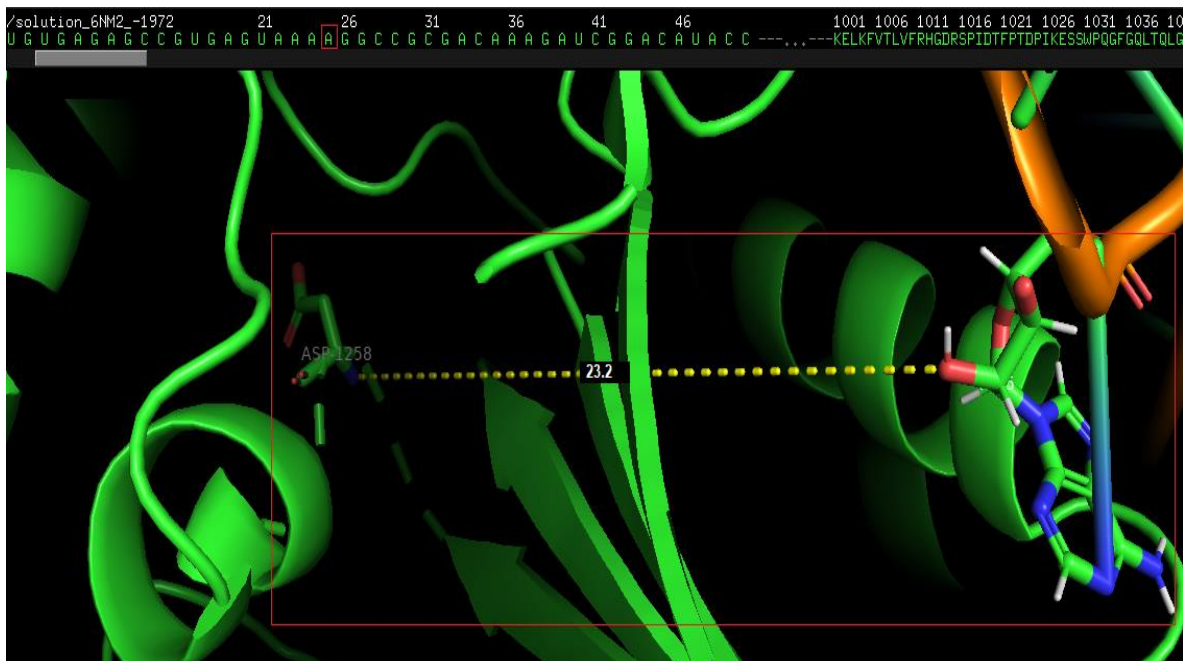


Figura 21. Distancia entre la adenina 25 y el asp 258. La distancia entre la adenina 25 (derecha) y el Asp 258 es de 23.2 Å. La distancia entre las dos moléculas fue entre un átomo de oxígeno (rojo) del nucleótido A25 y un átomo de nitrógeno (azul) del Asp 258. En la parte superior de la imagen se observa la secuencia de los nucleótidos del aptámero, remarcando en un cuadro rojo el nucleótido A25.

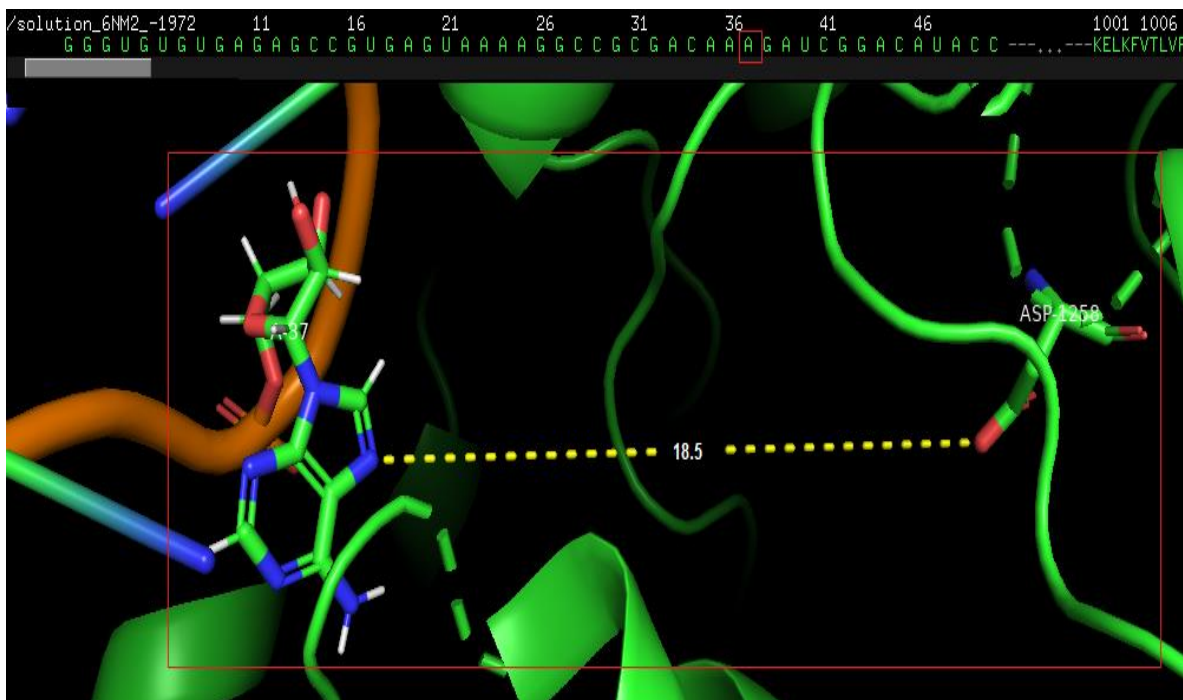


Figura 22. Distancia entre la adenina 37 y el asp 258 . La distancia entre la adenina 37 (izquierda) y el Asp 258 es de 18.5 Å. La distancia entre las dos moléculas fue entre un átomo de nitrógeno (azul) del nucleótido A37 y un átomo de oxígeno (rojo) del asp 258. En la parte superior de la imagen se observa la secuencia de los nucleótidos del aptámero, remarcando en un cuadro rojo el nucleótido A37.

Tabla 10. Distancia entre los nucleótidos de la horquilla 1 y 2 y Asp 258.

Nucleótido (horquilla 1)	Distancia	Nucleótido (horquilla 2)	Distancia
#15 C	35.6 Å	#33 A	26.1 Å
#16 G	34.7 Å	#34 C	23.8 Å
#17 U	37.9 Å	#35 A	22.8 Å
#18 G	40.7 Å	#36 A	22.9 Å
#19 A	43.6 Å	#37 A	18.5 Å
#20 G	40.8 Å	#38 G	23.0 Å
#21 U	37.0 Å	#39 A	23.4 Å
#22 A	35.2 Å	#40 A	28.3 Å
#23 A	30.6 Å		
#24 A	24.9 Å		
#25 A	23.2 Å		
#26 G	26.8 Å		
\bar{x}	34.2 Å	\bar{x}	23.6 Å

El análisis en PyMOL indicó que el acoplamiento del aptámero 6N-M2 y la proteína PAP se predice con mayor precisión utilizando el software PatchDock, debido a que las distancias entre ambas moléculas son menores con dicho programa como se menciona en la literatura. Es por ello por lo que las secuencias de los aptámeros candidatos se sometieron al acoplamiento molecular mediante PatchDock. Posteriormente, se eligió el complejo con la mejor puntuación de acoplamiento para los análisis siguientes.

Acoplamiento molecular de las secuencias de los aptámeros candidatos con la proteína PAP usando PatchDock

Se realizó un acoplamiento molecular de cada aptámero candidato con la proteína PAP para conocer cuál de ellos es el que tiene mayor afinidad por la proteína. Para la elección del aptámero, se tomó en cuenta la puntuación de cada acoplamiento dada por el programa (**Figura 23 a-d**).

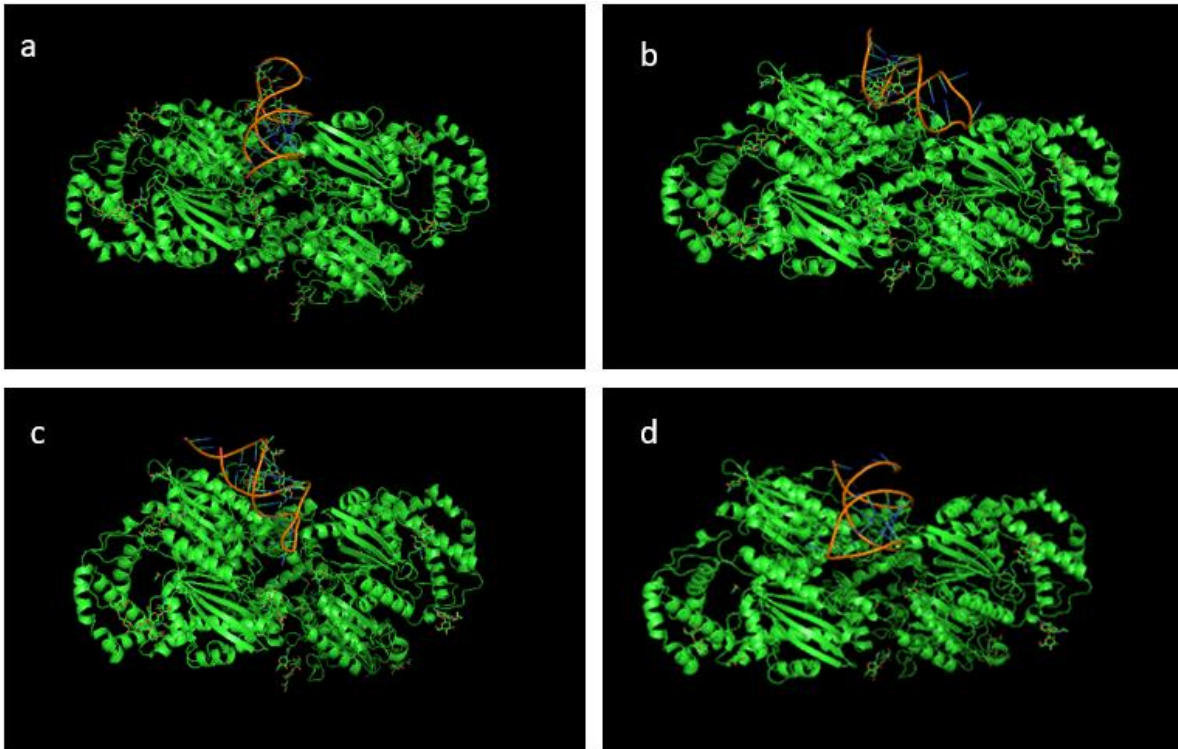


Figura 23. Acoplamiento molecular de los aptámeros candidatos con la proteína PAP. Se muestran los aptámeros de color naranja y la proteína PAP de color verde. a) Acoplamiento molecular del aptámero A23958 b) Acoplamiento molecular del aptámero A35619 c) Acoplamiento molecular del aptámero A15021 d) Acoplamiento molecular del aptámero A9226.

Dados los resultados del acoplamiento molecular de los aptámeros candidatas mediante PatchDock, se seleccionó el complejo del aptámero A35619 como el de mayor potencial debido a la puntuación de acoplamiento, la cual es de 20,978. El complejo del aptámero A9226 con la proteína PAP tuvo una puntuación de 18,136, siendo el complejo con menor potencial (**Tabla 11**).

Tabla 11. Puntuación del acoplamiento molecular de cada aptámero candidato con la proteína PAP.

Aptámero-PAP	Puntuación
A23958	19,050
A35619	20,978
A15021	19,612
A9226	18,136

Para saber si el aptámero A35619 es más afín a la proteína PAP que el aptámero 6N-M2, se realizó un análisis mediante PyMOL midiendo las distancias entre los nucleótidos del aptámero con los aminoácidos que forman el sitio activo de la proteína PAP.

El nucleótido guanina 12 (G12) fue el más cercano a la his 12, con una distancia de 14.0 Å y también es el más cercano al asp 285 con una distancia de 20.4 Å (**Figura 24-25**) (**Tabla 12**).

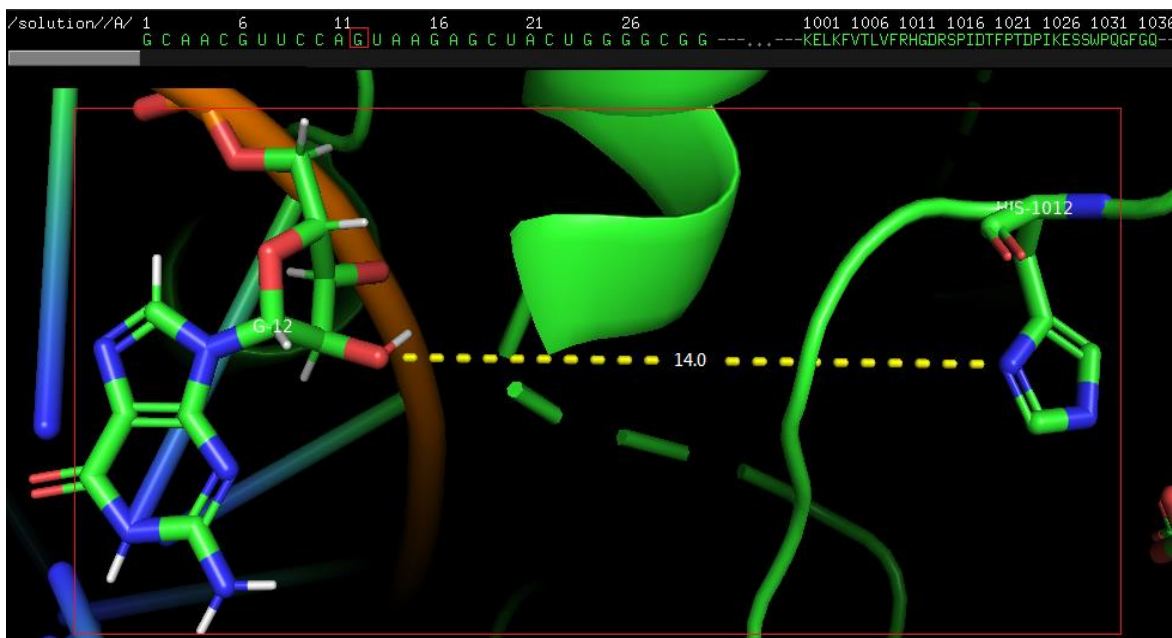


Figura 24. Distancia entre la guanina 12 y la his 12. La distancia entre la guanina 12 (izquierda) y la His 12 fue de 14.0 Å. La distancia entre las dos moléculas fue entre un átomo de oxígeno (rojo) del nucleótido G12 y un átomo de nitrógeno (azul) de la his 12. En la parte superior de la imagen se observa la secuencia de los nucleótidos del aptámero, remarcando en un cuadro rojo el nucleótido G12.

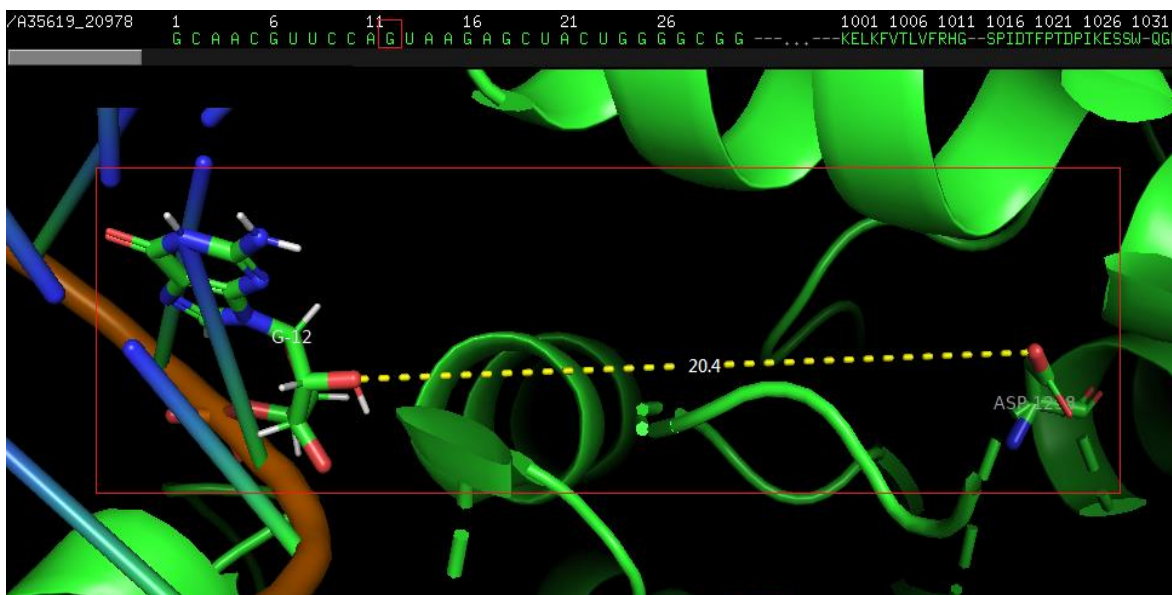


Figura 25. Distancia entre la guanina 12 y el asp 258. La distancia entre la guanina 12 (izquierda) y el Asp 258 fue de 20.4 Å. La distancia entre las dos moléculas fue entre un átomo de oxígeno (rojo) del nucleótido G12 y un átomo de oxígeno (rojo) del Asp 258. En la parte superior de la imagen se observa la secuencia del aptámero, remarcando en un cuadro rojo el nucleótido G12.

Para conocer el aminoácido y el nucleótido por los cuales existe una posible unión del aptámero A35619 con la proteína PAP, se buscó el aminoácido y el nucleótido más cercanos entre sí y se midió la distancia que existe entre ellos. Entre

el uracilo 13 (U13) y el aminoácido Glutamina 40 (Gln 40) hubo una distancia de 1.1 Å, siendo éstos los más cercanos entre sí (**Figura 26**) (**Tabla 12**).

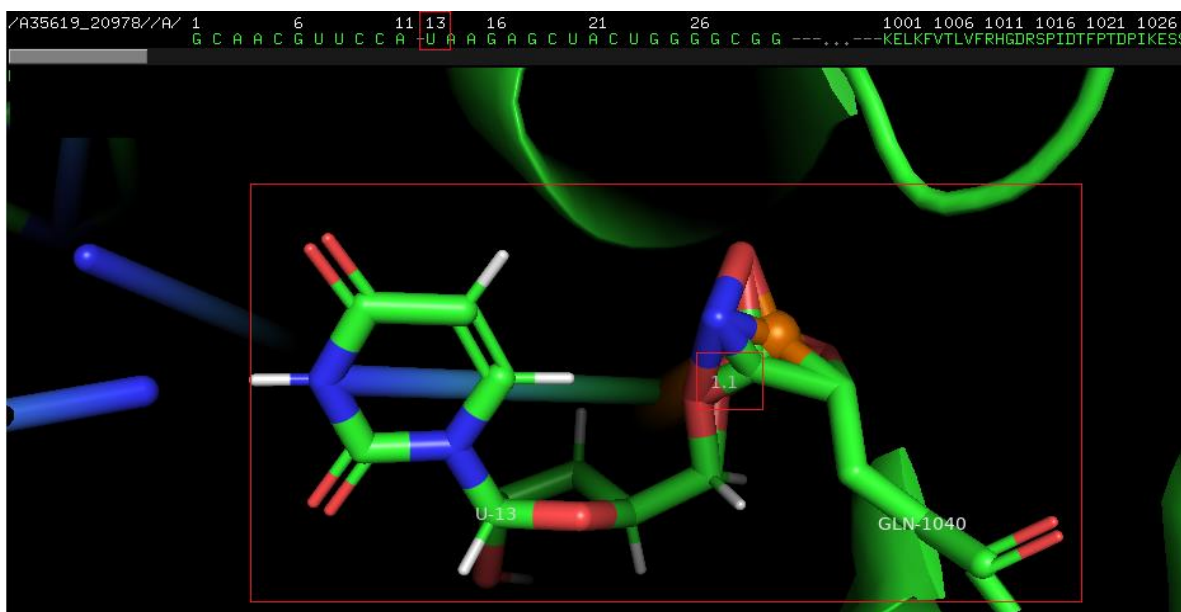


Figura 26. Distancia entre el uracilo 13 y la glutamina 40. La distancia entre el uracilo 40 (izquierda) y el Gln 40 (derecha) es de 1.1 Å. La distancia entre las dos moléculas fue entre un átomo de oxígeno (rojo) del nucleótido U13 y un átomo de oxígeno (rojo) del aminoácido Gln 40. En la parte superior de la imagen se observa la secuencia del aptámero remarcando en un cuadro rojo el nucleótido U13.

Tabla 12. Distancias medidas del acoplamiento molecular del aptámero A35619 y proteína PAP.

Nucleótido, Aminoácido	Distancia (Å)
#12 G, his 12	14.0
#12 G, asp 258	20.4
#13 U, Glutamina 40	1.1

Para determinar si la interacción entre ambas moléculas está dada por puentes de hidrógeno, se analizaron los puentes de hidrógeno encontrados en el acoplamiento. El aptámero A35619 y la proteína PAP están unidos mediante 3

puentes de hidrógeno, los cuales se encuentran entre la adenina 15 (A15) y ácido glutámico 68 (Glu 68) teniendo una distancia de 1.6 Å entre ellos. La adenina 21 (A21) y la treonina 243 (Thr 243) habiendo una distancia entre sí de 2.3 Å y este mismo nucleótido y la tirosina 293 (Tyr 293) teniendo una distancia de 2.7 Å (**Figura 27-29**) (**Tabla 13**).

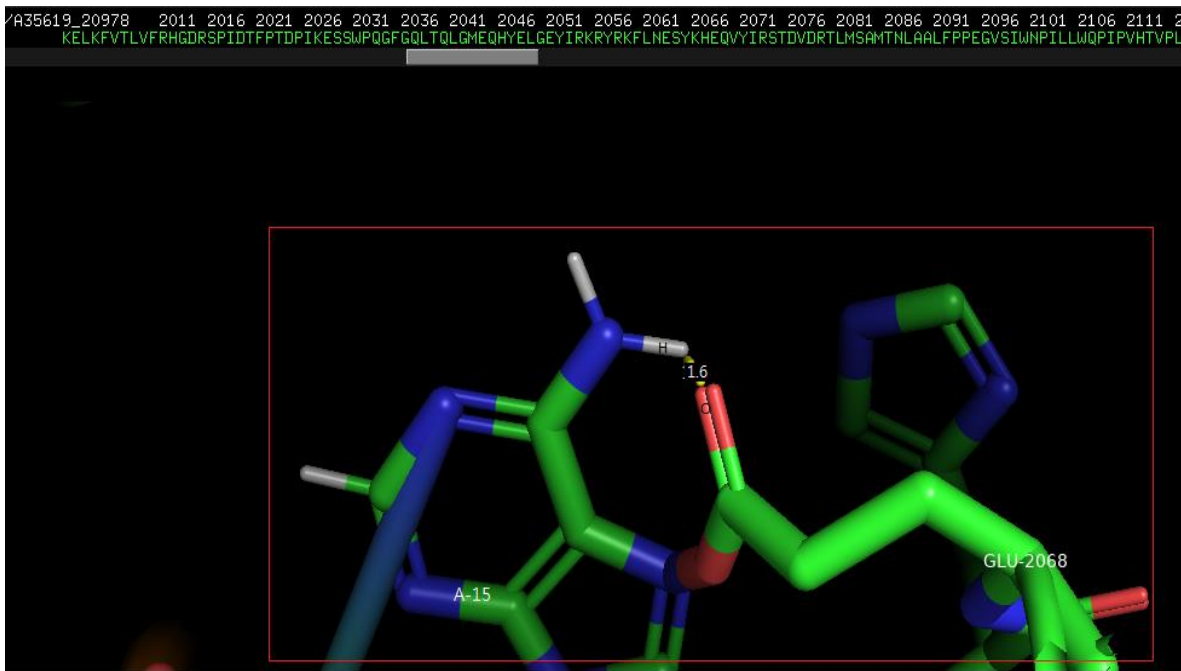


Figura 27. Distancia entre la adenina 15 y el ácido glutámico 68. La distancia entre la adenina 15 (izquierda) y el Glu 68 (derecha) es de 1.6 Å. La unión entre ambas moléculas es entre un átomo de hidrógeno de la A15 y un átomo de oxígeno del Glu 68, siendo éste un puente de hidrógeno.

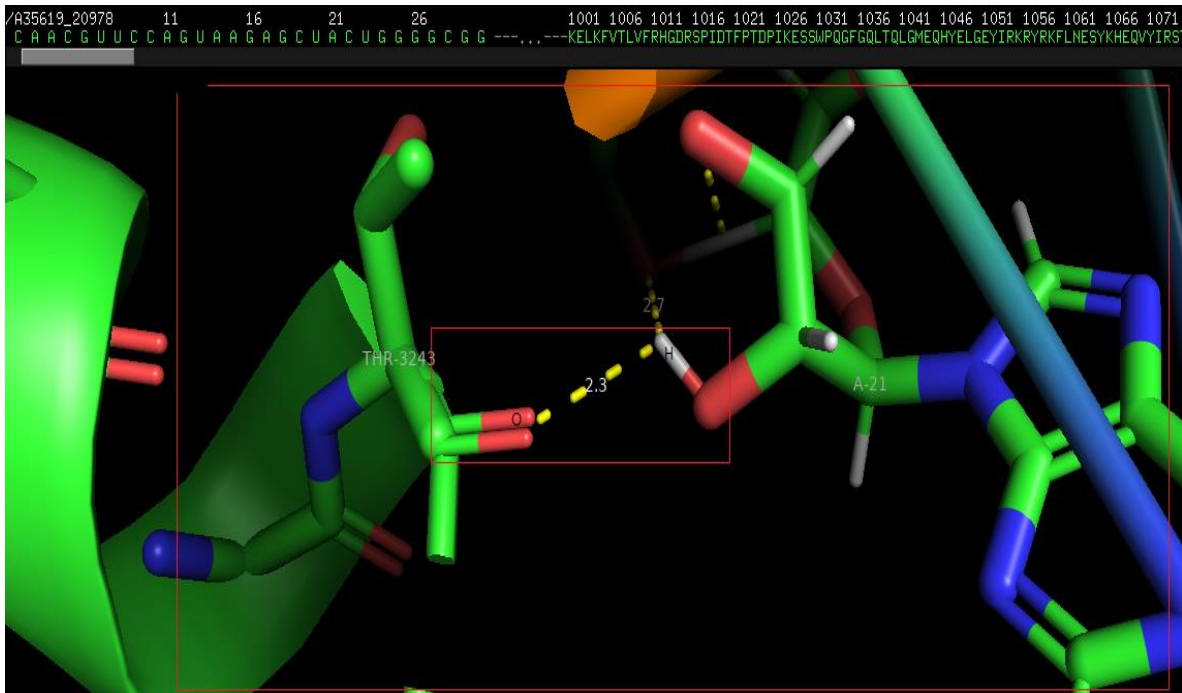


Figura 28. Distancia entre la adenina 21 y la treonina 243. La distancia entre la adenina 21 (derecha) y la Thr 243 (izquierda) es de 2.3 Å. La unión entre ambas moléculas es entre un átomo de hidrógeno de la A21 y un átomo de oxígeno de la Thr 243, siendo éste un puente de hidrógeno.

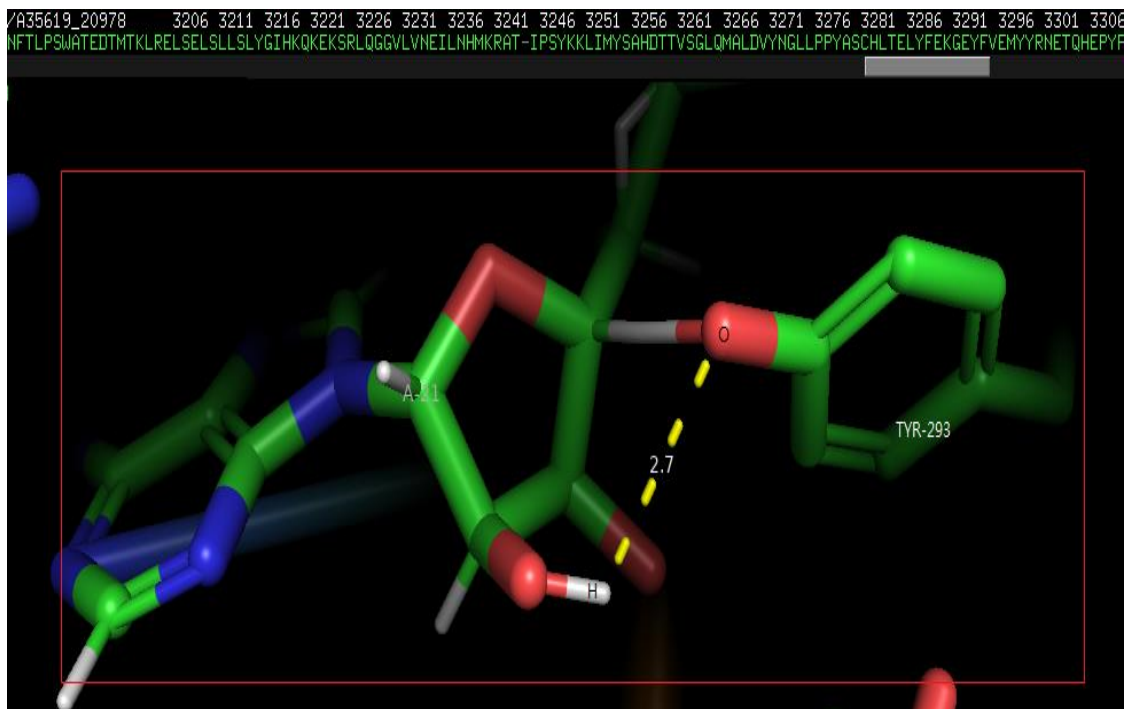


Figura 29. Distancia entre la adenina 21 y la tirosina 293. La distancia entre la adenina 21 (izquierda) y la Tyr 293 (derecha) es de 2.7 Å. La unión entre ambas moléculas es entre un átomo de hidrógeno de la A21 y un átomo de oxígeno de la Tyr 293, siendo éste un puente de hidrógeno.

Tabla 13. Distancias de los puentes de hidrógeno entre el aptámero A35619 y la proteína PAP.

Nucleótido, Aminoácido	Distancia (Å)
#15 A, Glu 68	1.6
#21 A, Thr 243	2.3
#21 A Tyr 293	2.7

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La proteína PAP es un biomarcador de CaP presente tanto en fase intermedia, así como una fase caracterizada en la mayoría de los casos por ser resistente a la castración. En este trabajo se obtuvo un aptámero dirigido a la proteína PAP mediante trabajo *in vitro* e *in silico*, tomando como referencia las características estructurales y de acoplamiento del aptámero de RNA 6N-M2 con la proteína PAP.

El aptámero 6N-M2 fue sintetizado por Kong y Byun en el año 2015. Se trata de un aptámero el cual para su selección utilizaron la línea celular PC-3 ya que es un modelo celular de CaP resistente a la castración y que expresa PAP y representa un nivel de malignidad alto. Este aptámero fue diseñado para reconocer el dominio extracelular de la proteína ya que ahí se encuentra el sitio catalítico (el aminoácido his 12 y asp 258). La selección del aptámero 6N-M2 fue mediante trabajo *in vitro* usando una librería de aptámeros de DNA modificados con 2'-fluoropirimidinas para evitar su degradación y aumentar su estabilidad en fluidos biológicos. La longitud del aptámero es de 50 nucleótidos y para fines del presente trabajo, se calculó la MFE, la cual fue de -11.90 kcal/ mol.

Posterior a la selección de un aptámero de referencia, se realizó el trabajo *in vitro*, que consistió en la amplificación de la librería de aptámeros mediante PCR. Esta librería contiene una región constante en 5' y 3' y una región aleatoria de 30 nucleótidos. La región aleatoria corresponde a los aptámeros y contiene 25% de cada una de las bases nitrogenadas ordenadas al azar en cada secuencia presente en la librería. Finalmente, para conocer las secuencias presentes, se realizó una secuenciación de nueva generación en la cual se obtuvieron 77,735 secuencias diferentes. A partir de estas secuencias, se comenzó el trabajo *in silico*, este consistió en el cálculo de la MFE de las secuencias, filtración de estas, su obtención de la estructura secundaria y terciaria, selección de los aptámeros candidatos y el acoplamiento molecular de los aptámeros candidatos con la proteína PAP. Al finalizar el filtrado, se obtuvieron 4 aptámeros candidatos, los cuales fueron nombrados de la siguiente manera: A23958, A35619, A15021 y A9226.

La probabilidad de obtener una estructura de RNA concreta depende de la cantidad de energía que se libere, es decir, la energía libre o la cantidad de energía necesaria para formar los pares de bases de la estructura secundaria. Mientras más energía se necesite para la formación de los pares de bases, menos probable será la estructura (González, 2015). Es importante destacar que, para una secuencia dada, existen diferentes estructuras compatibles, con enlaces y pares de bases distintos y cada estructura está asociada a una energía libre (Dotu *et al.*, 2018), esta característica le confiere estabilidad a la estructura secundaria.

Gray *et al.*, (2018) seleccionaron un aptámero de RNA mediante Cell-SELEX para dirigirse a células de CaP positivas para PSMA, el cual denominaron E3. Este aptámero fue truncado ya que inicialmente tenía una longitud de 83 nucleótidos. El truncamiento dio como resultado un aptámero de 36 nucleótidos que permite la predicción de una estructura secundaria estable con una MFE de -11.60 kcal/ mol. En el año 2016, Souza *et al.*, obtuvieron un aptámero de RNA que se dirige de manera exitosa a células de CaP resistente a la castración, al cual denominaron A4; este aptámero tiene una MFE de -17.6 kcal/ mol y consta de 28 pares de bases (Souza *et al.*, 2016).

En este trabajo se predijo la estructura secundaria del aptámero de referencia y de los 4 aptámeros candidatos para conocer la de mayor estabilidad estructural, basándose en su MFE. La estructura secundaria del aptámero 6N-M2 tiene una MFE de -11.90 kcal/ mol, sin embargo, la estructura del aptámero A15021 presentó una MFE de -14.80 kcal/ mol. Estos resultados indican que dentro de la librería de aptámeros inicial, podría haber un aptámero con mayor estabilidad a la del aptámero de referencia. El tamaño de los aptámeros candidatos es de 30 nucleótidos, mientras que el aptámero 6N-M2 tiene un tamaño de 50 nucleótidos.

Los resultados anteriores sugieren que una característica importante que influye en la estabilidad de la estructura secundaria además de la MFE es su longitud.

El siguiente paso fue la elección de un programa de predicción del acoplamiento molecular. Este es un método computacional que predice la formación

de un complejo aptámero-objetivo basado en la energía de enlace más pequeña (la herramienta computacional predice todos los modos de acoplamiento posibles entre ambas moléculas, seleccionando el que utiliza la menor energía) y determina la fuerza de unión entre el ligando (aptámero) y el receptor (blanco molecular) (Navien *et al.*, 2020). Se utilizó el programa HEX y el servidor web PatchDock para el acoplamiento entre el aptámero 6N-M2 y la proteína PAP.

Kong & Byun proponen que el aptámero se une al sitio activo de la proteína, es decir, a la his 12 y al asp 258. Ellos plantean que las horquillas que forman la estructura secundaria del aptámero son necesarias para la unión de esta molécula al sitio activo de la proteína PAP y que probablemente son las horquillas las que se unen a los aminoácidos del sitio activo. Por este motivo se realizó un análisis molecular de los acoplamientos midiendo la distancia entre cada nucleótido que comprenden las dos horquillas y los aminoácidos del sitio activo en cada acoplamiento molecular de ambos programas.

Los resultados obtenidos demuestran que el servidor web PatchDock predice el acoplamiento molecular entre el aptámero 6N-M2 y la proteína PAP de una manera más acertada a lo que está registrado en la literatura debido a que las distancias entre los nucleótidos y aminoácidos son menores con dicho programa. Por este motivo los acoplamientos moleculares de los aptámeros candidatos fueron realizados con esta herramienta.

PatchDock utiliza un algoritmo molecular basado en geometría que emplea principios de complementariedad de formas de moléculas rígidas (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005). Las moléculas suelen sufrir cambios conformacionales al asociarse entre ellas, por lo que uno de los factores que utiliza el algoritmo de PatchDock es enfocar el ajuste inicial de la superficie molecular en parches de superficies localizados. Los parches complementarios identificados se emparejan para formar transformaciones candidatas y éstas son clasificadas de acuerdo con una puntuación de complementariedad de formas geométricas (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005; Duhovny *et al.*, 2002). Esta puntuación se tomó en cuenta como característica importante en los acoplamientos de los aptámeros candidatos

para elegir el complejo aptámero-PAP con mayor complementariedad. Este acoplamiento es el del aptámero A35619 y la proteína PAP, con una puntuación de 20,978. El aptámero A35619 tuvo el acoplamiento con mayor puntuación, lo que significa una mayor complementariedad de este aptámero con la proteína PAP en comparación con los otros aptámeros candidatos.

Una vez conociendo el aptámero que se une con una mejor afinidad aparente con la proteína, se realizó el análisis de dicho acoplamiento teniendo como referencia los aminoácidos del sitio activo para medir el acercamiento entre ambas moléculas y además se midió la distancia entre el aminoácido y el nucleótido más cercano entre sí de este complejo.

Al hacer una comparación de las distancias medidas del acoplamiento del aptámero A35619 y los dos acoplamientos del aptámero 6N-M2 con ambas herramientas computacionales, es posible visualizar que el aptámero A35619 es aparentemente más afín a la proteína PAP debido a la cercanía de ambas moléculas.

Dentro de los procesos biológicos ocurren interacciones intermoleculares, es decir, la unión de dos moléculas. Estos procesos están controlados por reglas que rigen el reconocimiento molecular de un ligando hacia su receptor (Muñoz O. 2015), como lo es la unión de un aptámero con su blanco molecular. Por esta razón es importante conocer la unión intermolecular por la cual interactúa el aptámero con la proteína PAP.

Los puentes de hidrógeno son un tipo de fuerza intermolecular, el cual ocurre entre grupos polares de diferentes moléculas, caracterizados como un tipo de unión química débil. Comparado con los enlaces covalentes y iónicos, los puentes de hidrógeno son débiles, sin embargo, son más fuertes que las fuerzas de unión de van der Waals (Tsai & Ng, 2017). Este tipo de enlace es fundamental debido a que desempeña un papel importante en la formación de la estructura de las proteínas y los ácidos nucleicos, además de su importancia en la formación de complejos biológicos. En este contexto, Kandasamy *et al.*, (2020), obtuvieron dos aptámeros de RNA de manera *in silico* dirigido al receptor de glucocorticoides. En donde se

encontraron de 12-14 puentes de hidrógeno, explicando que son suficientes para tener un complejo estable, comparando con otro complejo de otro aptámero, en él se encontraron únicamente de 3-4 puentes de hidrógeno, mencionando que no son suficientes para mantener la estabilidad del complejo.

En el complejo del aptámero A35619 con la proteína PAP se encontraron 3 puentes de hidrógeno: un puente de hidrógeno de unión moderada (1.6 Å) y dos de unión débil (2.3 Å y 2.7 Å), a diferencia del complejo del aptámero 6N-M2 que solo hay un puente de hidrógeno y es de unión moderada (1.7 Å). Estos resultados sugieren que la cantidad de puentes de hidrógeno en el complejo del aptámero A35619 no son suficientes para tener una unión tan fuerte, sin embargo, este complejo es mejor que el que forma el aptámero 6N-M2.

Si bien, el trabajo *in vitro* es una parte fundamental para la obtención de un aptámero, hacer la combinación con una estrategia *in silico* puede ayudar a tener mejores resultados en la selección, ya que es posible interpretar la interacción del aptámero con su proteína como blanco molecular. Además, al conocer las características termodinámicas de las secuencias se puede entender la estabilidad de éstas y del complejo aptámero-proteína, siendo esto un punto a favor para dicha estrategia. Recalcando el ahorro económico y de tiempo que la técnica SELEX conlleva.

Con el fin de validar el aptámero obtenido, será necesario realizar trabajo *in vitro*, utilizando un modelo celular de CaP e incluso la proteína aislada, en donde se podrá dilucidar la afinidad del aptámero hacia su blanco molecular. El paso final antes de la prueba clínica será el trabajo *in vivo*, utilizando un modelo animal para conocer el comportamiento del aptámero en un sistema biológico y afrontar las limitaciones que éste podría presentar.

CONCLUSIÓN

El objetivo principal planteado en este trabajo fue la selección de un aptámero que reconociera a una proteína presente en CaP resistente a la castración. Este aptámero debía tener mejores características de afinidad que un aptámero tomado como referencia, ya publicado hacia el mismo blanco molecular, combinando dos estrategias de selección: *in vitro* e *in silico*.

Al tener las características estructurales y termodinámicas de la secuencia de un aptámero de referencia y las características del acoplamiento molecular con su proteína blanco, es posible la selección de otro aptámero hacia la misma proteína. Debido a los puntos antes mencionados, se logró la obtención de un aptámero con capacidad de reconocimiento hacia la proteína PAP, además teniendo mayor afinidad aparente que el aptámero tomado como referencia.

La combinación de estrategias dio resultados favorables en la selección del aptámero, disminuyendo el costo y el tiempo de selección, además evitando rondas repetitivas de SELEX, sin embargo, es necesaria la validación mediante trabajo *in vitro*, interactuando con la proteína purificada o con células y con trabajo *in vivo* para conocer las limitaciones que podría presentar el aptámero en fluidos biológicos. Es recomendable también la modificación química de la secuencia para aumentar la resistencia a las nucleasas.

Hasta donde hemos investigado, a la fecha este es un nuevo abordaje que podría ayudar en el proceso de selección de aptámeros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chushak, Y., & Stone, M. O. (2009). In silico selection of RNA aptamers. *Nucleic Acids Research*, *37*(12), 1–9.
2. de Almeida, C. E. B., Alves, L. N., Rocha, H. F., Cabral-Neto, J. B., & Missailidis, S. (2017). Aptamer delivery of siRNA, radiopharmaceuticals and chemotherapy agents in cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, *525*(2), 334–342.
3. Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, *78*, 857–902.
4. Gelmann, E. P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *20*(13), 3001–3015.
5. Gray, B. P., Kelly, L., Ahrens, D. P., Barry, A. P., & Kratschmer, C. (2018). Tunable cytotoxic aptamer-drug conjugates for the treatment of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Science*, *115*(18), 4761–4766.
6. Hsieh, P. C., Lin, H. T., Chen, W. Y., Tsai, J. J. P., & Hu, W. P. (2017). The Combination of Computational and Biosensing Technologies for Selecting Aptamer against Prostate Specific Antigen. *BioMed Research International*, *2017*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2017/5041683>
7. Jeffrey, G. A. (1997). *An Introduction to Hydrogen Bonding* (Ilustrada ed., Vol. 1) [Libro electrónico]. Oxford University Press. https://books.google.com.mx/books/about/An_Introduction_to_Hydrogen_Bonding.html?id=ZRAFifo37QsC&redir_esc=y
8. Kandasamy, T., Sudhamalla, B., & Naskar, D. (2020). Designing of RNA aptamer against DNA binding domain of the glucocorticoid receptor: A response element- based in silico approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–8.
9. Kinghom, A., Fraser, L. A., Liang, S., Shiu, S. C., & Tanner, J. A. (2017). Aptamer Bioinformatics. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(12).
10. Muñoz, Otero. V. (2015). Lecturas de apoyo para comprender mejor la química. Capítulo 2. UNAM.

11. Navien, T. N., Thevendran, R., Hamdani, H. Y., Tang, T. H., & Citartan, M. (2021). In silico molecular docking in DNA aptamer development. *Biochimie*, 180, 54–67.
12. Ohuchi, S. (2012). Cell-SELEX Technology. *BioResearch open access*, 1(6), 262–272.
13. Ospina, J. D. (2020). Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomédica*, 40(1), 146–166.
14. Rojas Durán, F., Denes, J. M., Soto-Cid, A. H., Aranda-Abreu, G. E., Juárez Aguilar, E., Coria-Ávila, G. A., Toledo-Cárdenas, R., Locia Espinoza, J., & Hernández Aguilar, M. E. (2007). *El receptor de andrógenos en la fisiopatología prostática*. *Eneurobiología*.
<https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2011/4/Rojas-et-al/HTML.html>
15. Ruiz López, A. I., Pérez Mesa, J., Cruz Batista, Y., & González, L. (2017). Actualización sobre cáncer de próstata. *Correo Científico Médico*, 21(3), 876–887.
16. Schneidmam-Duhovny, D., Yuval, I., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2005). PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Reserch*, 33.
17. Svobodova, M., Bunka, D. H. J., Nadal, P., Stockley, P. G., & O'Sullivan, C. K. (2013). Selection of 2'F-modified RNA aptamers against prostate-specific antigen and their evaluation for diagnostic and therapeutic applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(28), 9149–9157
18. Tsai, J., & NG, K. (2017). *Computational Methods With Application in Bioinformatics Analysis* (Vol. 2) [Libro electrónico]. Word Scientific.
https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=2gQrDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA98&ots=DXYBRN58kK&sig=zWMXegLPoiusib8QHA5B1-iD_Kw&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
19. Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & DePinho, R. A. (2018). Generics and biology of prostate cancer. *Genes & Development*, 32(17), 1105–1140.
20. Xiang, D., Shigdar, S., Qiao, G., Wang, T., Kouzani, A. Z., Zhou, S. F., Kong, L., Li, Y., Pu, C., & Duan, W. (2015). Nucleic Acid Aptamer-Guided Cancer Therapeutics and Diagnostics: the Next Generation of Cancer Medicine. *Theranostics*, 5(1), 23–42.
21. Xing, N., Chen, Y., Young, C. Y., & Mitchell, S. H. (2001). Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 22(3), 409–414.