



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**APTÁMEROS COMO ANTÍDOTOS PARA EL VENENO
DE LA ARAÑA DE RINCÓN (*Loxosceles laeta*).
PRIMER ACERCAMIENTO
A UN MEDICAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE RNA
PARA EL LOXOSCELISMO**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

CARLOS ALBERTO CONSTENLA MUÑOZ

Patrocinante y Directora de la Memoria

Dra. Amalia Sapag Muñoz de la Peña

LUGAR DE REALIZACIÓN:
Laboratorio de Farmacoterapia Génica
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile
2012

ÍNDICE GENERAL

| | Pág. |
|--|------|
| ÍNDICE GENERAL | i |
| ÍNDICE DE TABLAS | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iv |
| ABREVIATURAS | v |
| RESUMEN | vi |
| SUMMARY | vii |
| | |
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2 HIPÓTESIS | 11 |
| 3 OBJETIVOS | 11 |
| 3.1 Objetivo General | 11 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 11 |
| 4 MATERIALES | 12 |
| 4.1 Reactivos químicos | 12 |
| 4.2 Enzimas | 13 |
| 4.3 Oligonucleótidos | 13 |
| 5 MÉTODOS | 16 |
| 5.1 Métodos generales | 16 |
| 5.1.1 Electroforesis | 16 |
| 5.1.2 Precipitación de ácidos nucleicos | 17 |
| 5.1.3 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α competentes | 17 |
| 5.1.4 Sondeo de clones mediante preparación rápida de plásmidos | 18 |
| 5.1.5 Preparación de plásmidos por lisis alcalina | 18 |
| 5.1.6 Secuenciación | 18 |
| 5.1.7 Digestión con enzimas de restricción | 19 |
| 5.2 Síntesis del cDNA de la isoforma LI1 de la esfingomielinasa D de <i>Loxosceles laeta</i> mediante PCR | 19 |
| 5.3 Clonación del cDNA de la SMD-LI1 en un vector de expresión | 22 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.3.1 | Construcción de pCC-1 | 22 |
| 5.3.2 | Construcción de pCC-2 | 23 |
| 5.3.3 | Construcción de pCC-3 | 25 |
| 5.3.4 | Construcción de pCC-8 | 27 |
| 5.4 | Preparación de la SMD-LI1 | 29 |
| 5.4.1 | Producción de la SMD-LI1 en <i>E. coli</i> Origami B (DE3) | 29 |
| 5.4.2 | Purificación de la SMD-LI1 | 30 |
| 5.4.3 | Cuantificación y medición de la actividad de la SMD-LI1 purificada | 32 |
| 5.5 | Síntesis del conjunto inicial de moléculas de RNA | 32 |
| 5.5.1 | Diseño de los oligonucleótidos para generar el cDNA molde | 32 |
| 5.5.2 | Generación de las moléculas de DNA molde | 34 |
| 5.5.3 | Transcripción <i>in vitro</i> y purificación del RNA | 35 |
| 5.6 | Selección iterativa o proceso SELEX | 36 |
| 5.7 | Medición del efecto del RNA seleccionado sobre la actividad de la SMD-LI1 | 39 |
| 6 | RESULTADOS | 41 |
| 6.1 | Síntesis del cDNA de la SMD-LI1 y su clonación en un vector de expresión | 41 |
| 6.2 | Obtención de la SMD-LI1 pura y activa | 43 |
| 6.3 | Obtención de los conjuntos de moléculas seleccionadas | 43 |
| 6.4 | Efecto de los conjuntos de RNA seleccionado sobre la actividad de la SMD-LI1 | 45 |
| 6.5 | Análisis estadístico de los datos de inhibición | 47 |
| 7 | DISCUSIÓN | 51 |
| 7.1 | Síntesis y clonación del cDNA de la SMD-LI1 | 51 |
| 7.2 | Producción de la SMD-LI1 recombinante | 54 |
| 7.3 | Producción de las moléculas de RNA | 55 |
| 7.4 | Selección y efecto del RNA seleccionado sobre la SMD-LI1 | 56 |
| 8 | CONCLUSIONES | 60 |
| 9 | REFERENCIAS | 61 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág |
|--|-----|
| Tabla 1 Oligonucleótidos utilizados para sintetizar el cDNA de la SMD-LI1..... | 14 |
| Tabla 2 Oligonucleótidos utilizados en el proceso de selección..... | 15 |
| Tabla 3 Partidores utilizados para secuenciar plásmidos..... | 15 |
| Tabla 4 Diferencias entre los ciclos de cada proceso de selección | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág |
|---|-----|
| Figura 1 Sustratos y productos de la actividad de la esfingomielinasa D..... | 3 |
| Figura 2 Mecanismo catalítico de la esfingomielinasa D | 4 |
| Figura 3 Principales efectos del veneno de las arañas <i>Loxosceles</i> y su tratamiento | 6 |
| Figura 4 Alineamiento múltiple de las esfingomielinasas D de <i>Loxosceles laeta</i> | 8 |
| Figura 5 Proceso de selección iterativa | 10 |
| Figura 6 Síntesis del cDNA de la SMD-LI1 | 21 |
| Figura 7 Esquema de clonación del cDNA de la SMD-LI1 en el vector pCC-2 | 24 |
| Figura 8 Esquema de clonación del cDNA de la SMD-LI1 en el vector pCC-8 | 28 |
| Figura 9 Preparación de la SMD-LI1 recombinante | 31 |
| Figura 10 Oligonucleótidos para generar el DNA molde | 33 |
| Figura 11 Esquema del proceso de selección iterativa | 37 |
| Figura 12 Esfingomielinasa D LI1 recombinante purificada | 44 |
| Figura 13 Actividad de la esfingomielinasa D LI1 recombinante en presencia de los RNAs de los procesos de selección E y F | 48 |