

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**“IMPLEMENTACIÓN DE NUEVO MÉTODO DE DETECCIÓN DE RNA DE SARS-CoV-2 ALTERNATIVO A
RT-qPCR, BASADO EN LA PRODUCCIÓN DEL APTÁMERO DE VERDE DE MALAQUITA MEDIANTE
LIGACIÓN ENTABLILLADA DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS Y POSTERIOR TRANSCRIPCIÓN
IN VITRO”**

JUAN PABLO MARTÍNEZ HUAIQUIMILLA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICO

Director de Memoria:

Dr. Assaf Katz Zondek
Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante:

Dr. Carlos Santiviago Cid
Depto. Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile

2022

AGRADECIMIENTOS

A la pequeña parte de mi familia que me apoyó, a veces en la medida de lo posible, a veces incondicionalmente. A mis amigas y amigos que me apoyaron a seguir, aunque sin saberlo, yo no quería hacerlo. A los pocos compañeros de carrera que hoy puedo llamar amigos, que sin duda fueron pilar fundamental de contención en este “pasar”.

A todas las personas que forman y formaron parte del Laboratorio de Biología Celular y Molecular Bacteriana durante mi paso por éste y a cada una de las que hizo posible la realización de este trabajo. A mi director de memoria Dr. Assaf Katz y al Dr. Lorenzo Leiva por ofrecerme su ayuda desde un comienzo y guiarme en todo el proceso de la realización de esta memoria.

FINANCIAMIENTO

Esta memoria fue realizada en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Bacteriana del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue financiada por el Proyecto FONDECYT 1191074 a cargo del investigador responsable Dr. Assaf Katz Zondek.

PRESENTACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES

Martínez JP, Leiva LE, Katz A. “Detección de RNA viral a través de un método independiente de transcriptasa inversa y DNA polimerasa”. XLII Congreso Digital de la Sociedad Chilena de Microbiología, 2 al 4 de diciembre, 2020, Santiago, Chile.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | Página |
|--|--------|
| AGRADECIMIENTOS..... | i |
| FINANCIAMIENTO..... | iii |
| PRESENTACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES | iii |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS..... | iv |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | viii |
| ABREVIATURAS | ix |
| RESUMEN..... | x |
| ABSTRACT | xi |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 El nuevo coronavirus | 1 |
| 1.2 Generalidades del SARS-CoV-2..... | 1 |
| 1.3 Diseminación del COVID-19..... | 3 |
| 1.4 Detección de SARS-CoV-2..... | 4 |
| 1.5 Problemáticas de la Detección y Alternativas | 7 |
| 1.6 Fundamentos del método propuesto..... | 8 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 14 |
| 2.1 Hipótesis | 14 |
| 2.2 Objetivo General..... | 14 |
| 2.3 Objetivos Específicos | 14 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| 3.1 Reactivos..... | 15 |
| 3.2 Diseño de oligonucleótidos | 15 |
| 3.2.1 Diseño de RNA sintético. | 15 |
| 3.2.2 Diseño de oligonucleótidos de DNA. | 16 |
| 3.3 Ligación entablillada | 19 |
| 3.4 PCR convencional y electroforesis en gel de poliacrilamida | 21 |
| 3.5 Transcripción <i>in vitro</i> | 22 |

| | |
|--|----|
| 3.6 Mediciones fluorimétricas..... | 25 |
| 3.7 Extracción de RNA total humano | 26 |
| 3.8 Tratamiento de datos y análisis estadísticos..... | 27 |
| 3.8.1 Normalización de las mediciones fluorimétricas. | 27 |
| 3.8.2 Análisis estadísticos. | 28 |
| 4. RESULTADOS..... | 29 |
| 4.1 Validación inicial del método | 31 |
| 4.2 Estandarización de la reacción de transcripción <i>in vitro</i> | 33 |
| 4.2.1 Transcripción <i>in vitro</i> en presencia de verde de malaquita. | 33 |
| 4.2.2 Efectos del contraión del verde de malaquita y su concentración en los niveles de fluorescencia. | 34 |
| 4.2.3 Incidencia de la concentración de PT7. | 35 |
| 4.2.4. Aporte de la transcripción inespecífica de oligonucleótidos no ligados a los niveles basales de fluorescencia. | 37 |
| 4.2.5 Influencia del % de T7T remanente..... | 38 |
| 4.2.6 Detención de la reacción de transcripción..... | 40 |
| 4.2.7. Disponibilidad del inhibidor de RNasas. | 45 |
| 4.3 Estandarización de la reacción de ligación entablillada | 47 |
| 4.3.1 Determinación del límite de detección. | 47 |
| 4.3.2 Influencia del RNA inespecífico | 49 |
| 4.3.3 Determinación de la temperatura óptima de ligación. | 51 |
| 4.3.4. Efectos del tampón de hibridación..... | 52 |
| 4.3.5 Determinación de la concentración óptima de <i>SplintR</i> DNA ligasa. ... | 54 |
| 5. DISCUSIÓN | 57 |
| 5.1 Biosensores fluorescentes basados en la tecnología de aptámeros..... | 57 |
| 5.2 Optimización de la Reacción de ligación entablillada | 59 |
| 5.2.1 Rendimiento inicial de la ligación entablillada. | 59 |
| 5.2.2 Proteínas SSB. | 60 |
| 5.2.3 Diseño de oligonucleótidos. | 60 |
| 5.2.3 Etapa de hibridación previa..... | 61 |

| | |
|---|----|
| 5.2.4 Concentración óptima de enzima <i>SplintR</i> y temperatura de ligación. | 62 |
| 5.3 Optimización de la reacción de transcripción <i>in vitro</i> | 63 |
| 5.3.1 Transcripción <i>in vitro</i> en tiempo real en presencia de verde de malaquita. | 63 |
| 5.3.2 Concentración de PT7..... | 64 |
| 5.3.3 Opcionalidad del empleo de Inhibidores de RNasas..... | 64 |
| 5.3.4 Detención de la transcripción <i>in vitro</i> | 64 |
| 5.3.5 Efectos del aumento del RNA en reacción. | 65 |
| 5.4 Factibilidad del empleo de aptasensores fluorescentes en clínica | 67 |
| 5.5 Proyecciones..... | 68 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 69 |
| 7. REFERENCIAS | 70 |
| 8. ANEXOS..... | 78 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Esquema de las estructuras del verde de malaquita, aptámero y bolsillo de unión. | 10 |
| Figura 2. Esquema de reacción de ligación entablillada de oligonucleótidos específicos. | 12 |
| Figura 3. Esquema de reacción de transcripción in vitro y producción del aptámero fluorescente de verde de malaquita.. | 13 |
| Figura 4. Comparación de las estructuras secundarias predichas para el aptámero de verde de malaquita y transcrito esperado.. | 17 |
| Figura 5. La ligación entablillada de un templado de DNA permite detectar la presencia de un RNA que imita el genoma del SARS-CoV-2..... | 32 |
| Figura 6. Curva de progreso de la transcripción in vitro en presencia de verde de malaquita 10 μ M. | 33 |
| Figura 7. Incidencia del contraión de verde de malaquita y su concentración en los niveles de fluorescencia. | 34 |
| Figura 8. Efecto de la concentración de PT7 sobre la transcripción y producción de fluorescencia. | 36 |
| Figura 9. Aporte de los oligonucleótidos MGA-nsp9 y T7T-nsp9 a los niveles basales de fluorescencia. | 38 |
| Figura 10. Influencia del porcentaje de oligonucleótido T7T-nsp9 remanente no ligado en la transcripción in vitro de MGA. | 40 |
| Figura 11. Efectos del AcONH ₄ 0,5 M en la transcripción in vitro. | 43 |
| Figura 12. Cinética de estabilidad de la fluorescencia posterior a la adición de AcONH ₄ 0,5 M. | 44 |
| Figura 13. Influencia del empleo del Inhibidor de RNAsas en la transcripción in vitro. | 46 |
| Figura 14. Límite de detección del método. | 48 |
| Figura 15. Influencia del RNA externo en los niveles de fluorescencia. | 50 |
| Figura 16. Temperatura óptima de ligación. | 51 |
| Figura 17. Efectos de la etapa y tampón de hibridación sobre la eficiencia de la ligación y la fluorescencia en transcripción in vitro. | 53 |
| Figura 18. Ligación entablillada a distintas concentraciones de enzima SplintR DNA ligasa. | 55 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en ligación entablillada, transcripción <i>in vitro</i> y PCR convencional. | 18 |
| Tabla 2. Protocolo A de ligación entablillada y preparación de la mezcla de reacción cuando se incluyó la etapa de hibridación..... | 20 |
| Tabla 3. Protocolo B de ligación entablillada y preparación de la mezcla de reacción sin la etapa de hibridación. | 21 |
| Tabla 4. Mezcla de reacción utilizada para reacciones de PCR. | 21 |
| Tabla 5. Programa de temperaturas utilizado para los PCR de confirmación de ligación. | 22 |
| Tabla 6. Preparación de la mezcla de reacción de transcripción <i>in vitro</i> | 23 |
| Tabla 7. Concentraciones de oligonucleótido nsp9-T7T utilizadas en cada condición experimental y porcentaje de T7T remanente que representan. | 39 |

ABREVIATURAS

%FRN: Porcentaje de fluorescencia relativo al normalizador

2019-n-CoV: Nuevo coronavirus de 2019

AcONH₄: Acetato de amonio

cDNA: DNA complementario

Ctrl(-)_{LIG}: Control negativo de ligación

Ctrl(-)_{TIV}: Control negativo de transcripción

Ctrl(+)_{TIV}: Control positivo de transcripción

dsDNA: DNA doble hebra

gRNA: RNA genómico

H₂O_{uv}: Agua libre de nucleasas

kb: Kilobases

MERS-CoV: Coronavirus causante del Síndrome Respiratorio de Medio Oriente

MGA: Aptámero de verde de malaquita

MGCl: Cloruro de verde de malaquita

MGOx: Oxalato de verde de malaquita

Minsal: Ministerio de Salud de Chile

NSP: Proteína no estructural

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: Marco de lectura abierto

pb: Pares de bases

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa

SARS-CoV: Coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave

SARS-CoV-2: Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo grave

ssDNA: DNA de hebra simple

TIV: Transcripción *in vitro*

RESUMEN

A fines del año 2019 el brote de un nuevo coronavirus daría inicio a la pandemia originada por el SARS-CoV-2, agente etiológico de la enfermedad denominada COVID-19. Las políticas en salud pública fueron enfocadas a la toma de decisiones basadas en el número de casos confirmados, donde el RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) corresponde al test de preferencia para la detección, lo que generó una ola de desabastecimiento de insumos y la saturación de los laboratorios habilitados para el procesamiento de las muestras. Frente a la situación descrita, en este proyecto se propuso **generar una nueva metodología de detección de RNA viral a través de un método isotérmico e independiente de transcriptasa inversa y DNA polimerasa, empleando la tecnología de aptámeros fluorescentes**. Esta propuesta corresponde a un método que se basa en la capacidad de la *SplintR* ligasa de ligar dos hebras de DNA en heterodúplex con RNA. De este modo, se diseñaron dos oligonucleótidos de modo que al ser ligados en presencia de RNA viral, permiten la transcripción *in vitro* del RNA aptámero de verde de malaquita, el que fluoresce al unir este compuesto, permitiendo cuantificar el RNA con el que inicialmente los oligonucleótidos formaban el heterodúplex para ser ligado. En este trabajo fue posible generar una alternativa para la detección de RNA empleando la tecnología de aptámeros fluorescentes, relativamente sencilla y más económica al dispensar de algunos reactivos indicados por Yings y cols. (2018). La estandarización de la ligación entablillada, nos permitió determinar las condiciones óptimas de temperatura, tiempo de reacción, concentración de enzima y los efectos inhibitorios de los cationes monovalentes. Por otra parte, los resultados obtenidos muestran que es posible realizar la detección de forma isotérmica y se presenta la posibilidad del monitoreo en tiempo real de la transcripción *in vitro* y detención de la reacción, en vista a las limitaciones que puede generar el trabajo con un número elevado de muestras. El límite de detección del método estandarizado resultó ser del orden de los nM, muy por encima de la sensibilidad del RT-qPCR. Estos resultados, sumados a la revisión extensiva de la literatura, abren la posibilidad de optimizar las condiciones de reacción en la que se considera el diseño de los oligonucleótidos, reacción de ligación y transcripción *in vitro* acoplada, además de extender su empleo a la detección de DNA.

ABSTRACT

Implementation of a novel SARS-CoV-2 RNA detection method as an alternative to RT-qPCR based on the malachite green aptamer production by oligonucleotide-specific splinter ligation and subsequent *in vitro* transcription

By the end of 2019, a novel coronavirus outbreak started the COVID-19 pandemic. The etiological agent of the disease is now known as SARS-CoV-2. Public health policies were focused on making decisions based on the number of confirmed cases, where real-time RT-PCR (RT-qPCR) was and still is the preferred test for detection. This high demand generated shortages of supplies and saturated the laboratories enabled to process the samples. Considering this scenario, **this project proposes to generate a novel viral RNA detection method through an isothermal and reverse transcriptase/DNA polymerase-independent strategy, using fluorescent aptamer technology.** This proposal is based on the ability of *SplintR* ligase to ligate two DNA strands only when those strands are forming heteroduplexes with a RNA splint. Based on this, two oligonucleotides were designed so that they can be ligated only in the presence of viral RNA they. This ligation allows the *in vitro* transcription of the malachite green RNA aptamer. The fluorescent complex formed between malachite green and the malachite green aptamer, allows the quantification of the RNA that originally acts as splint for the DNA ligation. In this work it was possible to generate an alternative for RNA detection using fluorescent aptamer technology. This method is, relatively simple and cheaper than the standard PCR test, because it does not require some reagents as indicated by Yings et al. (2018). The standardization of the splint ligation allowed us to determine the optimal conditions of temperature, reaction time, enzyme concentration and the inhibitory effects of monovalent cations. Results obtained show that it is possible to carry out the RNA detection under isothermal conditions. It also allows the real-time monitoring of *in vitro* transcription and stopping of the reaction, An important advantage when considering the analysis of high numbers of samples. In addition, the detection limit of the standardized method turned out to be of the order of nM, higher than the sensitivity of RT-qPCR. These results, added to the extensive review of the literature, allow optimizing reaction conditions, the design of oligonucleotides, ligation reaction and coupled *in vitro* transcription, in addition to extending its use for the detection of DNA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El nuevo coronavirus

A fines del 2019 en la ciudad de Wu-Han en la República Popular de China, se reportaba el aumento en casos de afecciones respiratorias de lo que parecía ser neumonía viral, pero con agente causal desconocido (Zhu y cols., 2020). El número de pacientes aumentaba considerablemente debido a la rápida diseminación del hasta ese entonces, virus desconocido, donde dichos pacientes arrojaban resultados negativos para virus y bacterias comunes asociadas a enfermedades respiratorias. El virus fue rápidamente aislado e identificado mediante técnicas de secuenciación de siguiente generación (*Next generation sequencing*, NGS) el cual correspondía a la familia de los coronavirus del cual no se tenían registros, provisoriamente llamado 2019-n-CoV (*2019 novel coronavirus*, Nuevo Coronavirus 2019) (Chan y cols., 2020). Posteriormente fue renombrado como SARS-CoV-2 por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), ya que en términos taxonómicos este “nuevo” virus se encuentra relacionado al coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV por sus siglas en inglés) y no corresponde a un nuevo virus como tal. Cabe destacar que el SARS-CoV-2 no es descendiente del SARS-CoV y que los síntomas pueden diferir con respecto al SARS-CoV (Gorbalenya y cols., 2020).

1.2 Generalidades del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un virus con manto de entre 55-200 nm de diámetro, perteneciente a la familia de los *Coronaviridae* dentro del orden de los *Nidovirales*, específicamente al género *Betacoronavirus* (Rastogi y cols., 2020). En conjunto con los *Alfacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* conforman la subfamilia de los *Coronavirinae* (Cong y cols., 2017). Al igual que los virus pertenecientes a la familia de los *Coronaviridae*, el SARS-CoV-2 posee un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva de 29,8 kb, el cual comprende 14 marcos de lectura abiertos (*Open Reading Frames*, ORF; Wu y cols., 2020), que codifica

16 proteínas no estructurales (*Non-structural proteins*, Nsp), 4 proteínas estructurales llamadas *Spike* (S), *Envelope* (E), *Membrane* (M) y *Nucleocapsid* (N), y 9 proteínas accesorias (Harrison y cols., 2020).

Análisis filogenéticos de datos genómicos de muestras de SARS-CoV-2 obtenidas de 9 pacientes infectados en Wu-Han mostraron 88% de identidad con genomas de coronavirus que infectan murciélagos, cerca de 79% de identidad con SARS-CoV y un 50% con el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV por sus siglas en inglés), ambos coronavirus capaces de infectar humanos y los cuales causaron epidemias originadas en China el año 2002 y en Arabia Saudita el 2012, respectivamente. (Ahn y cols., 2020; Lu y cols., 2020).

Para principios de enero de 2020 se reportaban brotes de SARS-CoV-2 en toda China, el Sudeste Asiático y Europa (Lu y cols., 2020). El 21 de enero se notifica el primer caso confirmado en América, específicamente en Estados Unidos. El 30 de enero, el brote de SARS-CoV-2 originado en China es catalogado como “emergencia sanitaria de nivel global” por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Ahn cols., 2020; World Health Organization, 2020a). El 11 de febrero, la OMS llamaría “COVID-19” (acrónimo de *Coronavirus Disease 2019* o Enfermedad de Coronavirus 2019) a la enfermedad cuyo agente causal corresponde al SARS-CoV-2 (Casella y cols., 2020).

Sudamérica no estaría muy lejos de enfrentar la misma realidad. En Brasil el 25 de febrero se reporta el primer caso confirmado en la región (Rodríguez-Morales y cols., 2020) y en el caso de Chile, el Ministerio de Salud (Minsal) informaría el primer caso positivo de SARS-CoV-2 el día 3 de marzo de 2020 (Ministerio de Salud, 2020a), siendo el quinto país de la región en presentar un caso confirmado, precedido por Brasil, México, Ecuador y Argentina (Tariq y cols., 2020). El 11 de marzo de 2020 se registra un total nacional de 23 casos confirmados (5 nuevos casos aquel día) donde 17 de ellos correspondían a casos importados (Ministerio de Salud, 2020b). La OMS informaría la cifra de 4620 nuevos casos a nivel mundial, sumando así un total de 118.329 casos confirmados acumulados distribuidos en 114 países y con un saldo de 4.292 fallecidos, declarando así al COVID-19 como pandemia global (World Health Organization, 2020b).

1.3 Diseminación del COVID-19

COVID-19 es una enfermedad respiratoria, pero su espectro de síntomas es amplio, ocasionando desde infecciones asintomáticas hasta complicaciones respiratorias agudas que requieren suministro externo de oxígeno o incluso, esta puede ocasionar la muerte (Casella y cols., 2020). Síntomas comunes son: fiebre, tos seca (siendo estos los más frecuentes), pérdida del gusto y olfato, fatiga, mialgia y dolor de cabeza (Viner y cols., 2021).

Inicialmente se creía que los contagios ocurrían cuando se estaba en contacto con animales portadores, dado que los primeros casos reportados tenían en común haber asistido al mercado marisquero de Wu-han. Actualmente se sabe que la principal forma contagio ocurre a través del contacto con secreciones nasales u orales desprendidas por personas infectadas las cuales son expulsadas al toser, estornudar, hablar o espirar ya sea en forma de aerosol (menor a 5 micras) o como “gotas de Flügge” (mayores a 5 micras). El aerosol se mantiene en suspensión en el aire, mientras que las gotas Flügge al ser de mayor tamaño y por ende mayor masa, permanecen en suspensión durante solo unos minutos y tienden a no dispersarse más allá de 2 metros, para finalmente depositarse en diversas superficies. En base a lo expuesto, se ha propuesto que no sería necesario estar en contacto directo con personas contagiadas y que bastaría con estar en contacto con objetos contaminados y que las partículas virales alcancen una puerta de entrada (como por ejemplo las mucosas de los ojos, boca o nariz) para generar una infección (Lofti y cols., 2020; Rahman y cols., 2020). Basado en esto, se han adoptado diversas medidas de prevención como el lavado frecuente de manos, uso de mascarillas, distanciamiento físico, ventilación de espacios cerrados (y evitar estos espacios) o medidas drásticas como el cierre de fronteras y especialmente las cuarentenas que varios países implementaron (Manikandan, 2020). Esto se suma al rápido desarrollo y empleo de vacunas que pueden impedir la infección, enfermedad y/o transmisión. Una vacuna capaz de reducir cualquiera de estos elementos contribuye al manejo de la pandemia del SARS-CoV-2 (Hodgson y cols., 2021).

Debido a que el virus representa un grave peligro para la salud pública y la economía mundial, los países que rápidamente se veían afectados por la llegada del virus debieron adoptar medidas para mitigar los efectos socioeconómicos y sanitarios (Ugarov, 2020). Esto implicó el cierre de recintos donde se realizaran actividades consideradas como no esenciales o que pudieran llevarse a cabo de forma telemática, como recintos educacionales, recreacionales u oficinas (Manikandan, 2020). No obstante, las actividades económicas que pudieran realizarse en espacios abiertos o de primera necesidad (como la compra de suministros, insumos básicos o medicamentos), no podían presentar un cese en sus funciones, por lo que se debió reducir el aforo permitido en dichos espacios siempre en conjunto a las recomendaciones otorgadas por la OMS. Pese a esto, las medidas de testeo masivo y temprano, trazabilidad de contactos estrechos y el aislamiento de casos sospechosos y confirmados son esenciales para la prevención de nuevos contagios, debido a que se estima que las personas en etapas pre-sintomáticas o asintomáticas causan entre un 40% y 80% de los contagios de SARS-CoV-2 (Choi y Shim, 2021).

1.4 Detección de SARS-CoV-2

Inicialmente se empleó la tomografía computada de tórax o rayos X (cuando el virus aún no se había aislado), en las cuales se podían observar manchas en los pulmones. Si bien este método es fácil de emplear y no es invasivo, carece de especificidad. Posteriormente, una vez que se aisló el SARS-CoV-2, datos de genomas completos obtenidos por NGS y publicados tempranamente permitieron el desarrollo de partidores y oligonucleótidos específicos para la detección mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a Transcripción Inversa (RT-qPCR o PCR en tiempo real; Böger y cols., 2021).

Existen distintos métodos que pueden utilizarse para la detección de SARS-CoV-2, siendo las estrategias moleculares las de primera línea, de los casos sospechosos y asintomáticos (Ahn y cols., 2020). Además de la búsqueda de ácidos nucleicos, existen los métodos de testeo basados en serología que permiten evidenciar la presencia de antígenos o de anticuerpos en sangre.

Actualmente, los métodos de testeo más empleados son la detección de anticuerpos (conocido como “test rápido”) y RT-qPCR los cuales presentan varias diferencias, no solo en el tipo de muestra requerida, sino también en la macromolécula detectada. Debido a esto, su uso va a depender del requerimiento epidemiológico que se busca abordar (Shyu y cols., 2020). El “test rápido” detecta la presencia de anticuerpos IgG e IgM en sangre, que son producidos principalmente en contra de las proteínas *Spike (S)* o *Nucleocapsid (N)*. Su principal ventaja recae en que es una metodología sencilla, con acotado tiempo de espera (con resultados en aproximadamente 15 minutos) y que no requiere de instrumentación o capacitación especiales (Tang y cols., 2020; Uwamino y cols., 2021). Sin embargo, la producción de anticuerpos suficientes para la detección por este método se obtiene luego de transcurridos 5 a 7 días desde la aparición de los síntomas (conocido como periodo ventana). Previo a esto, el test rápido generalmente arroja falsos negativos. Además, debido a que los anticuerpos siguen estando presentes una vez cursada la infección (independiente de la presencia del SARS-CoV-2), la realización de estos test tendrá resultado falsos positivos cuando se realicen en periodos cortos posteriores al término de la infección (La Marca y cols., 2020). Por ello, este test puede asegurar que en algún momento hubo infección por SARS-CoV-2, pero no necesariamente al momento de la realización del test. Esto tiene gran utilidad para estudios epidemiológicos y la toma de decisiones que derivan de éstos, pero no para la detección temprana ni preventiva (Tang y cols., 2020; Böger y cols., 2021).

Por otra parte, el RT-qPCR detecta RNA genómico (gRNA) viral del SARS-CoV-2 en muestras salivales o hisopado nasal y faríngeo. Es una técnica altamente sensible la cual consiste en la extracción de RNA proveniente de la muestra, el cual es utilizado como templado para la producción de DNA complementario (cDNA) mediante transcripción inversa, catalizada por alguna transcriptasa inversa en presencia de partidores aleatorios o específicos para cierto tipo de transcritos (Nolan y cols., 2006; Yüce y col., 2021). Una vez producido el cDNA, éste es amplificado utilizando una DNA polimerasa termoestable en conjunto con partidores específicos para el gen o región de interés (basándose en la técnica de PCR convencional descrita por el grupo de investigación de Kary Mullis en 1985), en ciclos que comprenden 3 etapas: desnaturación, apareamiento y elongación. La etapa de desnaturación, que ocurre cerca de 95°C, permite la

separación del DNA doble hebra (dsDNA). Cabe destacar que el cDNA corresponde a DNA monohebra o ssDNA. La etapa de apareamiento permite que los partidores hibriden con la secuencia blanco del cDNA (o DNA) aproximadamente entre 40°C-60°C. Finalmente, la etapa de extensión se lleva a cabo a una temperatura cercana a 72°C y permite que una vez reconocido el híbrido cDNA-partidor por la DNA polimerasa, ésta polimerice en sentido 5'->3' produciendo una hebra complementaria al templado utilizado. Así, una vez terminada esta etapa, se inicia un nuevo ciclo con la etapa de desnaturación. Al final de la etapa de elongación se obtiene un dsDNA. Posterior al primer ciclo, la amplificación del cDNA resulta ser exponencial, pues cada nuevo producto obtenido sirve también como templado permitiendo así la detección de cantidades muy pequeñas de RNA en la muestra (Nolan y cols., 2006; Garibyan y cols., 2013).

Una variación de esta técnica es el qPCR o PCR cuantitativo en tiempo real, en la cual se le añade un intercalante fluorescente de dsDNA o sondas fluorescentes específicas a la reacción previamente descrita. La adición de estos reactivos fluorescentes permite el monitoreo en tiempo real de la aparición de producto de amplificación (amplicón) y también permite realizar la cuantificación de gRNA en la muestra de partida (Nolan y cols., 2006; Yüce y col., 2021). Las ventajas del RT-qPCR son su elevada sensibilidad y especificidad, con un límite de detección cercano a 100 copias de RNA viral por ml (Arnaut y cols., 2020) lo que permite la detección del RNA viral en etapas muy tempranas de la infección, incluso cuando aún no hay presencia de síntomas (Chiok y cols., 2011). Dado que permite la detección de gRNA viral, el RT-qPCR corresponde a un test directo (a diferencia del test rápido que no detecta el virus ni algún blanco asociado a éste) y por ende, un resultado positivo indica que al momento de la toma de muestra, muy probablemente se esté cursando una infección por SARS-CoV-2 (o al menos hay presencia de gRNA viral). Por otra parte, la principal desventaja del RT-qPCR radica en requerir personal especializado en todas las etapas del proceso, desde la toma de muestra hasta la interpretación de los resultados, incluido el trabajo con RNA, el cual se degrada con facilidad. Adicionalmente, se requiere infraestructura e instrumentación especializados para el procesamiento de las muestras y los tiempos de procesamiento son considerablemente más extensos que para el test rápido (La Marca y cols., 2020).

1.5 Problemáticas de la detección y alternativas

Durante el primer semestre de 2020, los esfuerzos por lograr la detección rápida del virus llevaron a un quiebre en el stock de reactivos, insumos y a la saturación de los laboratorios capaces de procesar las muestras a nivel mundial (Pabbaraju y cols., 2020). Localmente no sería muy diferente. A modo de ejemplo, el diario La Tercera informaría el día 12 de mayo de 2020: “*Quiebre de stock nacional de reactivo para PCR y clínicas suspenden examen por “problemas de capacidad técnica”*” (La Tercera, 2020). El problema de la ausencia de reactivos no solo tiene efectos logísticos y sanitarios en la detección de potenciales pacientes infectados con SARS-CoV-2 (y con esto el aislamiento con el fin de detener la propagación de dicho virus), sino también en el testeo de otro tipo de infecciones, como las ITS (infecciones de transmisión sexual), respiratorias, nosocomiales y parasitarias (American Society for Microbiology, 2021). Además, a esta problemática se le suma que la toma de decisiones de políticas públicas para enfrentar la pandemia, recae principalmente en los parámetros sanitarios (Canals, 2020).

Debido al desabastecimiento de suministros, inicialmente fue necesario priorizar o jerarquizar quiénes debían tener prioridad para la realización del testeo. Esto generó que se emplearan distintas alternativas para la realización de RT-qPCR, como la compra de suministros de otros proveedores y adaptación de los insumos a la instrumentación que cada laboratorio poseía o la producción local de reactivos (Pabbaraju y cols., 2020). Otra alternativa fue la optimización de los reactivos y testeo, como la detección directa sin extracción de RNA (Beltrán-Pavez y cols., 2020), o bien, la mezcla de múltiples muestras (creando así un *pool* de muestras) para ir filtrando *pools* negativos y positivos. En el caso que un *pool* arrojase un resultado positivo, se realiza el análisis individual para cada muestra que conforma este grupo (Pabbaraju y cols., 2020).

Al momento de la llegada del SARS-CoV-2 a Chile, solo existían 12 laboratorios clínicos capaces de realizar RT-qPCR (Colegio Médico de Chile, 2020) y esta capacidad aumentó a 65 laboratorios para el día 30 de abril de 2020. Este aumento se debió a la creación de la denominada “Red Integrada

de Salud”, la que incluye servicios de salud y universidades privadas y públicas (o estatales) (Ministerio de Salud, 2020c).

Dado que existe la necesidad o la oportunidad de buscar alternativas al RT-qPCR, este proyecto nace con el propósito de desarrollar y adaptar las condiciones para la generación de un protocolo alternativo de detección de RNA, que sea independiente de transcriptasa inversa y DNA polimerasa y, por ende, de los reactivos necesarios para la realización de RT-qPCR. Además, se pretenderá generar un método isotérmico y de fácil implementación, sin la necesidad de instrumentación sofisticada y que no resulte laboriosa su realización. Este método se basa en el empleo de la tecnología de aptámeros inductores de fluorescencia (aptasensores fluorescentes).

1.6 Fundamentos del método propuesto

La tecnología de aptámeros consiste en polímeros de DNA o RNA pequeños o relativamente cortos, de una sola hebra, cuya secuencia y su compleja estructura terciaria, permite unir moléculas blanco específicas con alta selectividad y afinidad (Adachi y Nakamura, 2019). Se ha informado que pueden unir o reconocer un amplio espectro de blancos, desde moléculas pequeñas como sales y metales, biopolímeros como proteínas u otros como RNA; reconocer partículas virales o incluso unirse a células bacterianas, cancerígenas o bien ser tejido específicos (Ning y cols., 2020). Debido a su amplia gama de blancos es que se han propuesto como potencial alternativa frente a los anticuerpos y aplicaciones en clínica e investigación como el transporte de fármacos, cromatografía, detección de biomarcadores, biosensores, e incluso en imagenología y diagnóstico debido a propiedades colorimétricas o fluorogénicas que presentan el complejo formado entre el aptámeros y su molécula blanco (Tan y cols., 2011; Vázquez-González y Willner, 2021). Tal es el caso del aptámero de verde de malaquita (MGA), el cual fue uno de los primeros aptámeros inductores de fluorescencia descritos en la literatura (Grate y Wilson, 1999; Babendure y cols., 2003). Este corresponde a un aptámero RNA de 38 nt que tiene como blanco el catión verde de malaquita, pigmento orgánico perteneciente a la familia de los trifenilmetanos empleado como antifúngico y antiséptico en la industria de la acuicultura y para

tinciones en la industria textil (Pérez-Estrada y cols., 2008) (**Figura 1A**). Si bien inicialmente MGA fue seleccionado mediante evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) con el fin de ser utilizado como un inhibidor de la expresión génica a nivel post-transcripcional inducido por láser (Grate y Wilson., 1999), posteriormente se demostró que el complejo formado entre el verde de malaquita y el MGA aumenta la fluorescencia del verde de malaquita unas 2000 veces.

La unión del verde de malaquita a su aptámero ocurre por inserción de los grupos aromáticos N,N-dimetilaminofenil entre el apareamiento de bases formado por los nucleótidos C7-G29 y G8-C28 en un *loop* asimétrico compuesto por una tétrada conformada por las bases G24-A31-G29-C7, el que genera el bolsillo de unión (donde la interacción G24-A31 conectan las caras del surco mayor y menor). Los nucleótidos de conexión (A9, U25, A30) interaccionan por encima y por debajo del anillo fenólico para completar el bolsillo de unión (Baugh y cols., 2000; Flinders y cols., 2004; Santosh y Yadav, 2014; NDB ID: [1Q8N](#)) (**Figura 1B-C**). El verde de malaquita libre presenta muy bajo nivel de fluorescencia, ya que libera la energía acumulada por un proceso de desexcitación vibracional debido a la flexibilidad que le otorga la unión de sus anillos aromáticos al centro de carbono. En cambio, cuando éste forma el complejo con el MGA, el bolsillo de unión impide la rotación de los anillos, formando una estructura planar que cuando es excitada, libera la energía acumulada en forma de fluorescencia cercana al rojo en el espectro electromagnético, con una longitud de onda máxima de emisión (λ_{max}) de 650 nm (Babendure y cols., 2003).

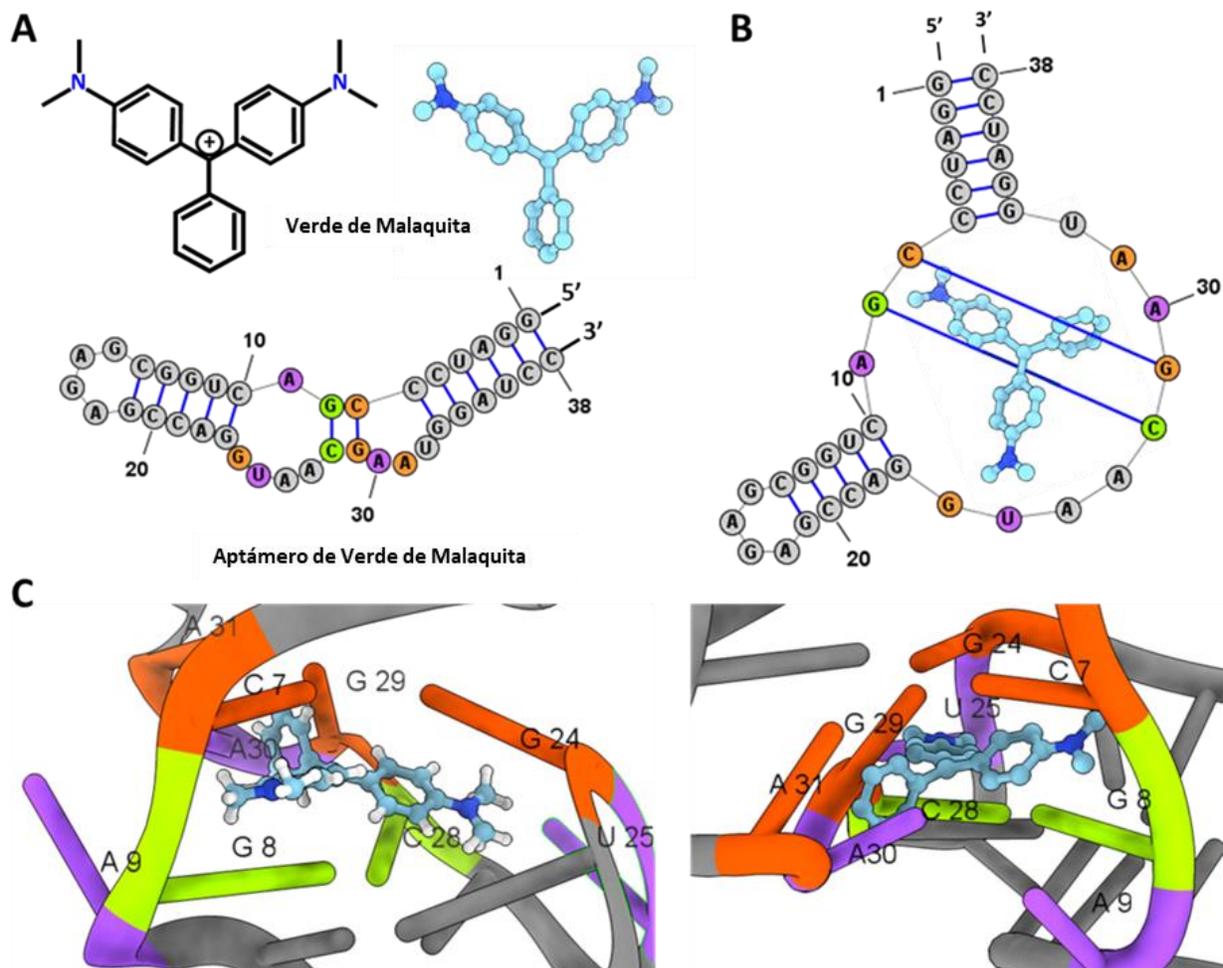


Figura 1. Esquema de las estructuras del verde de malaquita, aptámero y bolsillo de unión. Para cada uno de los esquemas se destacan los nucleótidos fundamentales para la formación del bolsillo de unión: tétrada C7-G29-G24-A31 (naranja), G8-C28 es el sitio de intercalamiento (verde) y A9, U25, A30 (violeta) nucleótidos de conexión. Para el caso de las estructuras en dos dimensiones las líneas azules representan apareamiento *Watson-Crick*. **A)** Estructuras esquemáticas del catión de verde de malaquita (2D y 3D) y estructura secundaria predicha del aptámero de verde de malaquita. **B)** Representación en 2 dimensiones de la unión del verde de malaquita a su aptámero en el bolsillo de unión. **C)** Representación en 3 dimensiones del verde de malaquita inserto en el bolsillo de unión en base al cristal reportado en Baugh y cols (2000). Las estructuras predichas fueron modeladas utilizando el programa *Structure Editor 1.0* (Mathews Labs) y las representaciones tridimensionales utilizando el programa *ChimeraX 1.1*. Estructuras basadas en la información de los artículos publicados por Baugh y cols. (2000) y Santosh y Yadav (2014) y estructura en solución del aptámero de verde de malaquita (PDB ID: [1Q8N](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1Q8N)).

El año 2018, Ying y cols. propusieron una metodología que permite producir aptámeros MGA solamente en presencia de RNA pequeños. El método se basaba en la generación de un templado que codifique el aptámero de verde de malaquita, y que sea sustrato para la enzima RNA polimerasa T7. El templado solo puede ser formado en presencia de la secuencia blanco que se busca detectar mediante la ligación de oligonucleótidos específicos. Este proceso comprende dos etapas: ligación entablillada de oligonucleótidos de DNA específicos y una posterior transcripción *in vitro*; Ying y cols., 2018). La primera etapa es conocida como ligación entablillada, dado que en ella una pareja de oligonucleótidos se liga solamente si hibridan con un ácido nucleico, el cual acerca los extremos de los dos oligonucleótidos (**Figura 2**), al igual que una tablilla acerca los extremos de un hueso roto. Para ello se emplea la DNA ligasa PBCV-1 o del virus *Chlorella* (comercialmente conocida como *SplintR*[®] ligasa, **Figura 2**). Esta enzima liga los extremos de DNA contiguo, siempre y cuando se encuentren hibridando con otra hebra, ya sea formando un híbrido DNA-DNA o RNA-DNA (Lohman y cols., 2014). Para esto, se selecciona la secuencia de RNA blanco y se diseñan dos oligonucleótidos de DNA que hibriden contiguamente formando un héteroduplex. Basados en la hebra a ligar, río arriba del sitio de ligación se encuentra el promotor de la RNA polimerasa del fago T7, mientras que río abajo de este sitio se encuentra el gen que codifica el aptámero de verde de malaquita (MGA). Se realiza la hibridación llevando la muestra y los oligonucleótidos a 95°C y enfriando rápidamente. Una vez realizada la hibridación, la enzima *SplintR*[®] DNA ligasa realiza la ligación entablillada, la que ocurre solamente si está formado el héteroduplex. De este modo, se obtiene como producto de ligación un DNA que codifica el aptámero de verde de malaquita controlado por el promotor de la RNA polimerasa T7 (Wee y Trau, 2016; Ying y cols., 2018) (**Figura 2**).

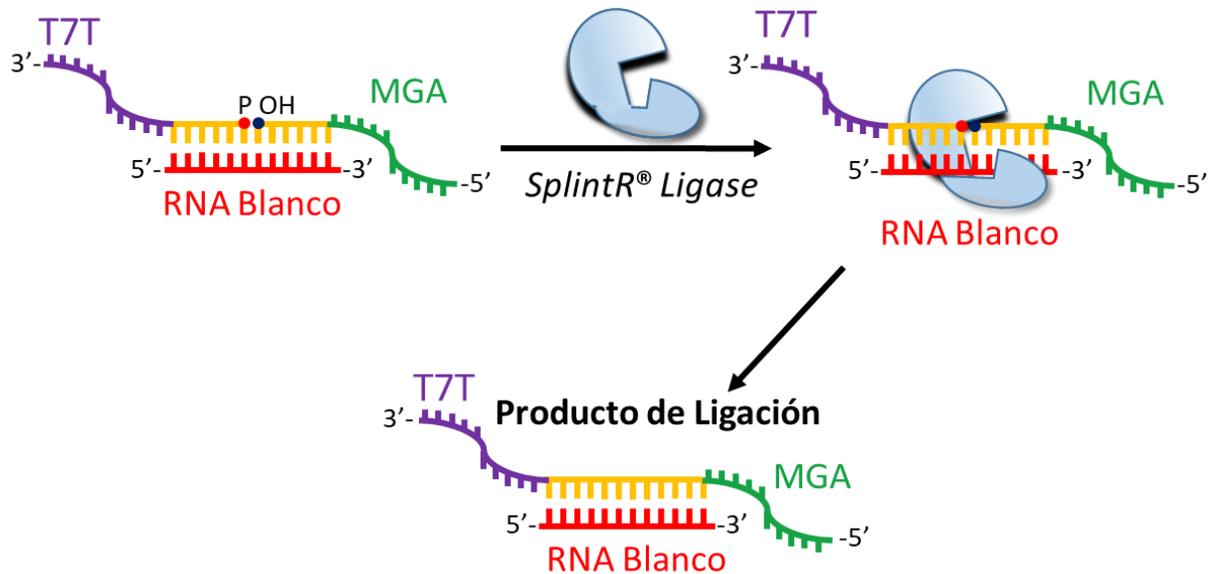


Figura 2. Esquema de reacción de ligación entablillada de oligonucleótidos específicos. Se esquematiza la primera etapa del método, donde los oligonucleótidos T7T (violeta) y MGA (verde) hibridan con la secuencia de RNA blanco (roja) y ambos oligonucleótidos poseen parte de la secuencia complementaria a la región de empalme (amarilla). Posteriormente la ligación entablillada es catalizada por la enzima *SplintR* DNA ligasa, obteniéndose, así como producto de ligación el transcrito regulado por el promotor T7 que codifica el aptámero de verde de malaquita. Esquema basado en el artículo publicado por Ying y cols. (2018).

La segunda etapa corresponde a la transcripción *in vitro* (TIV) catalizada por la enzima RNA polimerasa T7, la cual es una enzima proveniente del fago T7 que cataliza todos los pasos de la transcripción (iniciación, elongación y terminación), sin requerir la ayuda de proteínas activadoras (Tabor, 1990). La RNA polimerasa T7 es una enzima muy activa y altamente selectiva para el reconocimiento de su promotor (PT7), el cual corresponde a una secuencia conocida de 23 pb, que fue identificada en base a los genes codificados en el genoma del fago. Si bien la enzima puede reconocer la secuencia del promotor en una hebra simple, solamente es eficiente cuando la región del promotor corresponde a un DNA de doble hebra (Sousa y Mukherjee, 2003). Debido a esto es que al producto de ligación se le añade la hebra complementaria del promotor T7 (PT7) para así formar un promotor doble hebra funcional para que la transcripción *in vitro* sea catalizada con alta eficiencia. Finalmente, una vez terminada la transcripción y cuyo producto corresponde al aptámero de verde de malaquita, se le añade la sal de verde de malaquita y se mide la formación del complejo a través de técnicas fluorimétricas (Ying y cols., 2018) (**Figura 3**).

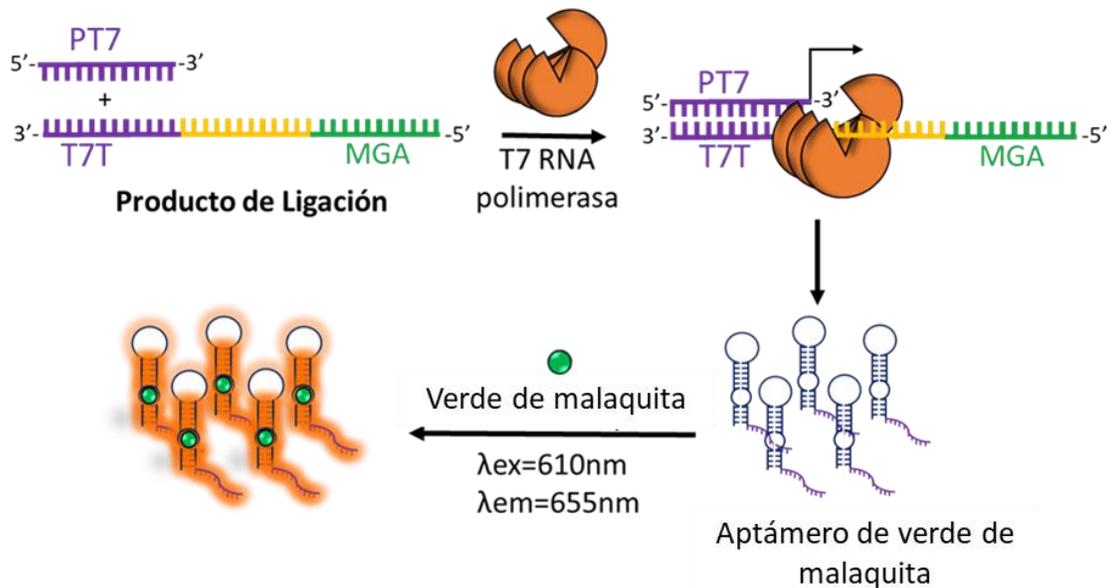


Figura 3. Esquema de reacción de transcripción *in vitro* y producción del aptámero fluorescente de verde de malaquita. Al producto de ligación se le añade el oligonucleótido PT7 (violeta) el cual posee la secuencia complementaria al promotor a la región T7T para así formar el promotor T7 doble hebra funcional. La RNA polimerasa T7 reconoce este promotor e inicia la transcripción *in vitro*, obteniéndose así copias del aptámero de verde de malaquita. El aptámero une el verde de malaquita y al ser excitado a 610 nm el complejo emite fluorescencia a 655 nm. Figura basada en el esquema publicado por Ying y cols. (2018).

Si bien Ying y cols (2018) demostraron la factibilidad del uso de esta técnica para la detección de RNA pequeños utilizando verde de malaquita, dicho protocolo comprende una etapa de purificación del aptámero generado posterior a la transcripción *in vitro*. Esta etapa adicional, extiende los tiempos de procesado, aumenta el precio por reacción y resulta más laborioso. Además, el límite de detección de su método es muy alto como para ser utilizado para la detección de genomas virales en muestras clínicas. En este proyecto se propone que la estandarización e implementación de este método puede proporcionar una alternativa potencial para la detección de RNA genómico de SARS-CoV-2 en muestras clínicas. Por ello, el principal objetivo de esta memoria de título es adaptar el método propuesto por Ying y sus colaboradores, para desarrollar un método de detección de SARS-CoV-2 que sea independiente de los reactivos utilizados para el RT-qPCR. Esto con el fin que resulte sencillo de implementar y que permita a los laboratorios disponer un método alternativo en caso que se produzcan nuevos problemas en el acceso a reactivos.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

“La ligación entablillada de oligonucleótidos específicos para la producción de un templado que codifique el aptámero de verde de malaquita y su producción mediante transcripción *in vitro* presenta una alternativa de detección de RNA de SARS-CoV-2 en condiciones isotérmicas”.

2.2 Objetivo general

Implementar un método de detección de RNA genómico de SARS-CoV-2 basado en la producción del aptámero de verde de malaquita mediante ligación entablillada de oligonucleótidos específicos y posterior transcripción *in vitro*.

2.3 Objetivos específicos

-Estandarizar las condiciones de reacción de transcripción *in vitro* catalizada por la RNA polimerasa T7, para la producción del aptámero de verde de malaquita empleando un DNA modelo.

-Estandarizar las condiciones de reacción de ligación entablillada de oligonucleótidos específicos de DNA para la formación del templado que codifique el aptámero de verde de malaquita utilizando un RNA modelo que imite el genoma de SARS-CoV-2 como secuencia blanco.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

De Agilent se obtuvo: *Paq 5000* DNA polimerasa.

De Fermentas se obtuvo: Ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) 0,5 M.

De Integrated DNA Technologies (IDT) se obtuvo: oligonucleótido de DNA “PT7”, RNA sintético “gRNA-nsp9-mimic”.

De invitrogen se obtuvo: Agua libre de nucleasas *Ultrapure™*, ditioneitol (DTT) 0,1 M, inhibidor de RNasas *RNaseOUT* 40 U/μl, tinción de ácidos nucleicos en gel *SYBR™ Gold*, *TRIzol™*.

De Macrogen Korea se obtuvo: Oligonucleótidos de DNA “Ctrl-(+)-MGA-T7T”, “MGA-nsp9” y “T7T-nsp9”

De Merck se obtuvo: Acetato de amonio (AcONH₄), acrilamida, bis-acrilamida, cloroformo, cloruro de potasio (KCl), etanol, isopropanol.

De New England Biolabs (NEB) se obtuvo: NTPs 25 mM c/u, RNA polimerasa T7, *SplintR®* DNA ligasa.

De Sigma-Aldrich se obtuvo: oxalato de verde de malaquita (MGOx), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), persulfato de amonio (PSA).

De Thermofisher se obtuvo: Estándar de peso molecular de DNA *Generuler Low Range* y *100bp Plus*, colorante de carga en gel para DNA 6X.

De USBiological se obtuvo: ácido bórico, cloruro de verde de malaquita (MGCl), EDTA sal disódica.

3.2 Diseño de oligonucleótidos

3.2.1 Diseño de RNA sintético

Para el diseño del RNA sintético utilizado como secuencia blanco para la estandarización de la reacción de ligación entablillada, se tomó como referencia las secuencias blancos utilizadas para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR informadas por el *Institut Pasteur*.

Específicamente, se utilizó la región flanqueada por el par de partidores nCoV-IP2 (Corman y cols., 2020). Finalmente, se seleccionó la secuencia que comprende los nucleótidos 12682-12707 del genoma de SARS-CoV-2 (GenBank ID: [MT358402](#)), partiendo en el codón 4142 del gen ORF1ab, específicamente dentro de la región que codifica la proteína Nsp9. Se denominó a esta construcción “gRNA-nsp9-mimic” (**Tabla 1**).

3.2.2 Diseño de oligonucleótidos de DNA

Se diseñaron dos oligonucleótidos de DNA con parte de la secuencia complementaria al RNA blanco sintetizado, de tal forma que cada oligonucleótido hibridara con un igual número de bases formando parte de este apareamiento DNA-RNA y que ambos oligonucleótidos hibridaran contiguamente.

El primer oligonucleótido, se denominó “MGA-nsp9”, fue diseñado de modo que río abajo del sitio de ligación posea la secuencia que codifica el aptámero de verde de malaquita basada en la secuencia informada por Grate y Wilson (1999) con la siguiente modificación: al extremo 5’ se le añadieron dos nucleótidos (5’-GC...) que podrían aparearse con los últimos 2 nucleótidos correspondientes a la secuencia seleccionada del gen *nsp9* en el transcrito, similar a lo informado por Yings y cols (2018). La estructura secundaria predicha del transcrito esperado en base a la construcción diseñada fue calculada y evaluada utilizando el servidor *RNAfold* (Gruber y cols., 2008; Lorenz y cols., 2011) y comparada con respecto a la estructura secundaria predicha en base a la secuencia informada por Grate y Wilson (1999) y el cristal reportado (Baugh y cols., 2000). Estos análisis sugirieron que la estructura secundaria del aptámero no se vería alterada (**Figura 4**).

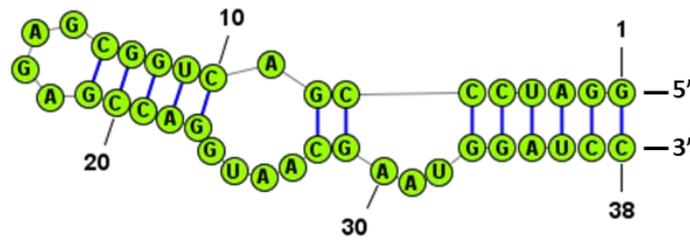
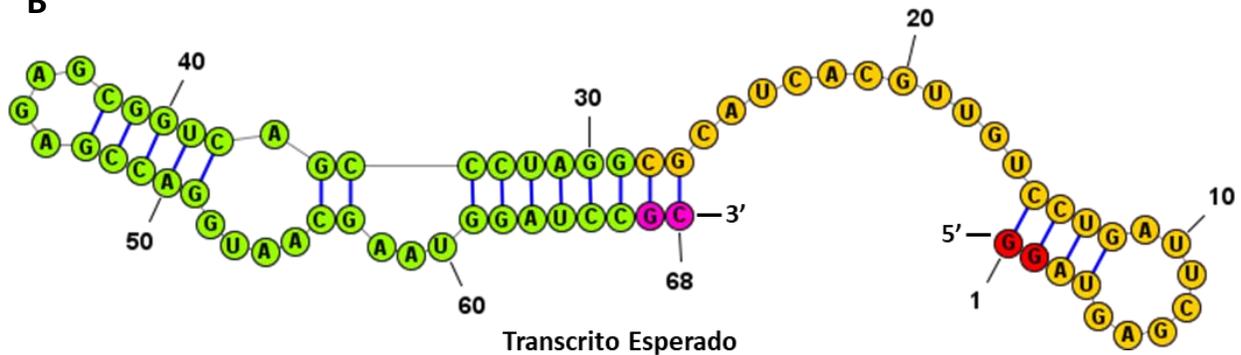
A**Aptámero de Verde de Malaquita****B****Transcrito Esperado**

Figura 4. Comparación de las estructuras secundarias predichas para el aptámero de verde de malaquita y transcrito esperado. Las estructuras predichas fueron modeladas utilizando el programa *Structure Editor 1.0* (Mathews Labs). **A)** Estructura secundaria correspondiente al aptámero de verde de malaquita informada por Gate y Wilson (1999). **B)** Estructura secundaria predicha para el transcrito esperado posterior a la transcripción *in vitro* del producto de ligación. En rojo se señalan los nucleótidos añadidos desde +1 de transcripción provenientes del oligonucleótido T7T-nsp9, en amarillo se señala la secuencia correspondiente al sitio de empalme (gen *nsp9*), en verde se señala la secuencia correspondiente al aptámero de verde de malaquita de Gate y Wilson (1999) y en fucsia se señala los nucleótidos añadidos a la secuencia. Las líneas azules corresponden al apareamiento *Watson-Crick* o *Wobble*.

Al oligonucleótido restante, al cual se denominó "T7T-nsp9" (*T7 Template*), se le añadió río arriba de la hebra a ligar la secuencia del promotor de la RNA polimerasa T7 informada por Martin y Coleman; (1987), añadiendo un nucleótido entre dicha secuencia y el sitio de empalme. Este oligonucleótido debe poseer su extremo 5' fosforilado tal como es requerido para el caso del DNA en la reacción de ligación, según lo indicado por el fabricante de la DNA ligasa *SplintR* utilizada en este trabajo (NEB) (**Tabla 1**).

Como control positivo de transcripción, se diseñó también un oligonucleótido de DNA que posee la secuencia de ambos oligonucleótidos previamente descritos (MGA-nsp9 y T7T-nsp9)

correspondiente al producto de ligación esperado (**Tabla 1**). Este oligonucleótido fue denominado “Ctrl-(+)-MGA-T7T” y posee la secuencia complementaria completa del sitio de hibridación, río arriba la secuencia que codifica el MGA y río abajo la secuencia del promotor de la RNA polimerasa T7.

Para formar un promotor doble hebra de la RNA polimerasa T7, se sintetizó un oligonucleótido con la secuencia complementaria a la región correspondiente al promotor de la RNA polimerasa T7 en el oligonucleótido T7T-nsp9, al cual se denominó “PT7” (promotor T7) (**Tabla 1**).

Con el fin de confirmar mediante PCR la obtención de producto de ligación, se diseñó una pareja de partidores que hibrida zonas que flanquean el sitio de ligación esperado y localizado en los extremos 3’ de cada hebra de DNA, denominados “LG_MGA_FW” al partidor directo y “LG_T7T_RV” al partidor inverso (**Tabla 1**).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en ligación entablillada, transcripción *in vitro* y PCR convencional.

| Nombre | Secuencia | Molécula | Nucleótidos |
|------------------|--|----------|-------------|
| gRNA-nsp9-mimic | 5'-AAUGAGCUUAGUCCUGUUGCACUACG-3' | RNA | 26 |
| MGA-nsp9 | 5'-GCGGATCCATTCGTTACCTGGCTCTCGCCAGT CGGGAT CCGCGTAGTGCAACAG-3' | DNA | 54 |
| T7T-nsp9 | 5'-PO ₃ - GACTAAGCTCATCCTATAGTGAGTCGTATTA CATATGT-3 | DNA | 38 |
| Ctrl-(+)-MGA-T7T | 5'- GCGGATCCATTCGTTACCTGGCTCTCGCCAGTCG GGAT CCGCGTAGTGCAACAGGACTAAGCTCATCCTATA GTGAGTCGTATTACATATGT-3' | DNA | 92 |
| PT7 | 5'-ACATATGTAATACGACTCACTATAGG-3' | DNA | 26 |
| LG_MGA_Fw | 5'-GCGGATCCATTCGTTACCTG-3 | DNA | 20 |
| LG_T7T_Rv | 5'-ACATATGTAATACGACTCACTATAGG-3' | DNA | 26 |

3.3 Ligación entablillada

El protocolo de ligación entablillada se basó en lo propuesto por Ying y cols. (2018). Brevemente, se preparó y mantuvo en hielo la siguiente mezcla: MGA-nsp9 200 nM, T7T-nsp9 200 nM, gRNA-nsp9-mimic 10 nM o 20 nM (según corresponda), tampón de hibridación 1X (Tris-HCl 3,5 mM, KCl 17,5 mM, EDTA 35 μ M) o agua libre de nucleasas (H_2O_{LN}). Una vez preparadas, las mezclas fueron incubadas a 95°C durante 3 minutos e inmediatamente colocadas en hielo donde se dejaron enfriar.

Una vez enfriadas las muestras se les añadió 1 μ l de *SplintR 10X Reaction Buffer* (NEB) y 2 μ l de *SplintR* DNA ligasa (NEB) por cada 7 μ l de mezcla. Los controles negativos de ligación (Ctrl(-)_{Lig}) corresponden a la mezcla de ligación donde el volumen utilizado por el RNA sintético que imita el genoma viral (gRNA-nsp9-mimic) es reemplazado por un volumen equivalente de H_2O_{LN} . Adicionalmente, se preparó como control positivo de la transcripción (Ctrl(+)_{TIV}), una mezcla similar a la mezcla de reacción para cada experimento donde se reemplazaron los oligonucleótidos MGA-nsp9 y T7T-nsp9 por el oligonucleótido Ctrl-(+)-MGA-T7T a concentración de 200 nM. Esta mezcla se sometió a los mismos procedimientos que las muestras experimentales y controles negativos. En los casos en que haya sido necesaria la adición o ausencia de algún reactivo, el volumen correspondiente fue descontado o completado con volúmenes de H_2O_{LN} , según corresponda. Para los casos en que la concentración de algún reactivo fue modificada para su estudio, se prepararon soluciones madres, de modo que variara la concentración del reactivo sin alterar el volumen de la mezcla de reacción. Por ejemplo, en los experimentos donde la mezcla de ligación no contuvo tampón de hibridación, este volumen fue reemplazado con H_2O_{LN} . En este caso, no se realizó la etapa de hibridación a 95°C durante 3 minutos, preparando así la mezcla completa de 10 μ l.

Una vez preparadas las muestras, se realizó la reacción de ligación entablillada en el termociclador *Eppendorf® Mastercycler Personal*, incubando durante 1 hora a 37°C. Salvo para el caso exclusivo donde se testeó las siguientes temperaturas 25°C, 30°C, 37°C en paralelo. Para este experimento

la reacción fue realizada en el termociclador *Axygen® Maxigene II*. Finalmente, la ligación se detuvo incubando la mezcla a 95°C durante 10 minutos. En las **Tablas 2 y 3** se presentan a modo de ejemplo los protocolos utilizados en este trabajo.

Tabla 2. Protocolo A de ligación entablillada y preparación de la mezcla de reacción cuando se incluyó la etapa de hibridación.

| Componentes de la reacción | gRNA-nsp9-mimic | Ctrl(-) _{LIG} | Ctrl(+) _{TIV} | Concentración Final |
|--|-----------------|------------------------|------------------------|--|
| Ctrl-(+)-MGA-T7T 2 µM | - | - | 1,0 µl | 200 nM |
| MGA-nsp9 2 µM | 1,0 µl | 1,0 µl | - | 200 nM |
| T7T-nsp9 2 µM | 1,0 µl | 1,0 µl | - | 200 nM |
| gRNA-nsp9-mimic* | | | | |
| -66,666 nM | | | | 10 nM |
| -133,333 nM | | | | 20 nM |
| -1,3 µM | 1,5 µl | - | 1,5 µl | 200 nM |
| -133,333 nM con 2,666 µg de RNA total humano | | | | 20 nM con 40 ng/µl de RNA total humano |
| Tampón de Hibridación (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM) | 3,5 µl | 3,5 µl | 3,5 µl | Tris-HCl 3,5 mM, KCl 17,5 mM, EDTA 35 µM |
| H ₂ O _{LN} | - | 1,5 µl | 1,0 µl | |
| Hibridación a 95°C durante 3 minutos** | | | | |
| <i>SplintR 10X Reaction Buffer</i> | 1,0 µl | 1,0 µl | 1,0 µl | 1X |
| <i>SplintR DNA ligasa 10,5 µM</i> | 2,0 µl | 2,0 µl | - | 2,1 µM |
| H ₂ O _{LN} | - | - | 2,0 µl | - |
| Total | 10 µl | 10 µl | 10 µl | - |

*En rojo y cursiva se indica la variación de concentraciones en las soluciones madres y su respectiva concentración final y que no necesariamente fueron utilizadas en paralelo en un mismo experimento.

** La etapa de hibridación se realizó utilizando los 7 µl indicados hasta antes de ese punto. Posteriormente, y siempre en hielo, se añadió el resto de los reactivos indicados hasta completar los 10 µl para luego realizar la ligación entablillada.

Tabla 3. Protocolo B de ligación entablillada y preparación de la mezcla de reacción sin la etapa de hibridación.

| Componentes de la reacción | gRNA-nsp9-mimic | Ctrl(-) _{LIG} | Ctrl(+) _{TIV} | Concentración Final |
|------------------------------------|-----------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| Ctrl(+)-MGA-T7T 2 µM | - | - | 1,0 µl | 200 nM |
| MGA-nsp9 2 µM | 1,0 µl | 1,0 µl | - | 200 nM |
| T7T-nsp9 2 µM | 1,0 µl | 1,0 µl | - | 200 nM |
| gRNA-nsp9-mimic 133,333 nM | 1,5 µl | - | 1,5 µl | 20 nM |
| <i>SplintR 10X Reaction Buffer</i> | 1,0 µl | 1,0 µl | 1,0 µl | 1X |
| <i>SplintR DNA ligasa*</i> | | | | |
| <i>-10,5 µM</i> | | | | <i>-2,1 µM</i> |
| <i>-5,25 µM</i> | 2,0 µl | 2,0 µl | - | <i>-1,05 µM</i> |
| <i>-2,175 µM</i> | | | | <i>-525 nM</i> |
| H ₂ O _{LN} | 3,5 µl | 5,0 µl | 6,5 µl | - |
| Total | 10 µl | 10 µl | 10 µl | - |

*En rojo y cursiva se indica la variación de concentraciones en las soluciones madres y su respectiva concentración final y que no necesariamente fueron utilizadas en paralelo en un mismo experimento.

3.4 PCR convencional y electroforesis en gel de poliacrilamida

La reacción de PCR convencional se realizó utilizando como templado una alícuota correspondiente a cada uno de los productos de ligación entablillada obtenidos, incluidos los controles Ctrl(+)_{TIV} y Ctrl(-)_{LIG}. En el caso del control negativo de PCR, el volumen de templado es remplazado por H₂O. La reacción se realizó en el termociclador *Eppendorf® Mastercycler Personal*, utilizando la siguiente mezcla de reacción (**Tabla 4**) y programa de temperaturas que se detalla en la **Tabla 5**:

Tabla 4. Mezcla de reacción utilizada para reacciones de PCR.

| Componentes de la reacción | Volumen | Concentración Final |
|---------------------------------|--------------|---------------------|
| Producto de ligación (templado) | 0,5 µl | - |
| LG_MGA_FW 10 µM | 0,2 µl | 200 nM |
| LG_T7T_RV 10 µM | 0,2 µl | 200 nM |
| dNTPS 10 mM c/u | 0,2 µl | 0,20 mM c/u |
| <i>Buffer 10X Paq 5000</i> | 1,0 µl | 1X |
| H ₂ O | 7,7 µl | - |
| Paq 5000 (DNA pol.) [5 U/µL] | 0,2 µl | 0,10 U/µl |
| Volumen Final | 10 µl | - |

Tabla 5. Programa de temperaturas utilizado para los PCR de confirmación de ligación.

| Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|-------------|--------|-----------|
| 95°C | 2 min | 1 ciclo |
| 95°C | 20 s | 35 ciclos |
| 52°C | 20 s | |
| 72°C | 30 s | |
| 72°C | 2 min | 1 ciclo |
| 4°C | ∞ | - |

Los productos de PCR fueron resueltos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Se preparó el gel de 1,5 mm de espesor con las siguientes concentraciones finales: poliacrilamida 10% (proporción de acrilamida:bisacrilamida 19:1), tampón TBE 0,5X (45 mM Tris, 45 mM borato, 1 mM EDTA), PSA 0,085%, TEMED 0,171% v/v. La electroforesis se realizó utilizando como tampón de corrida TBE 0,5X. El gel fue pre-corrido a 135 Volts durante 20 minutos. Paralelamente, se mezclaron 10 µl de cada muestra de PCR con 2 µl de solución de carga para DNA 6X (concentración final 1X) para luego cargarlos en el gel pre-corrido. Como estándar de peso molecular para DNA se utilizó *GeneRuler 100 bp Plus* (100-3000 pb) y/o *GeneRuler Low Range* (25-700 pb). Se realizó la electroforesis durante 1 hora y 15 minutos a 135 Volts y posteriormente se tiñó el gel con una dilución 1/10.000 de *SYBR™ Gold 10.000X* en tampón TBE 0,5X durante 30 minutos. Finalmente, el gel fue fotografiado sobre un transiluminador UV con una cámara digital *Olympus* modelo C-5060 utilizando el programa *Doc-It 2.4.3* (*UltraViolet Products*) y una exposición de 1 segundo.

3.5 Transcripción *in vitro*

A lo largo de esta memoria se utilizaron dos protocolos de transcripción *in vitro*, uno destinado a la estandarización de la TIV (protocolo TIV-A) y otro destinado a la transcripción de productos de ligación (protocolo TIV-B). En ambos protocolos, la reacción de transcripción *in vitro* tiene una composición similar, la que fue preparada con las siguientes concentraciones finales: oligonucleótido PT7 500 nM, cloruro de verde de malaquita 10 µM, *T7 RNAPol reaction buffer 10X* (NEB) 1X, RNA polimerasa T7 (NEB) 100 U, DTT 1 mM, inhibidor de RNasas *RNaseOUT* 0,5 U,

NTPs 7,5 mM c/u y H₂O_{LN} y mezcla de pseudoligación 20 nM en función al templado de DNA Ctrl-(+)-MGA-T7T o dilución 1:10 de producto de ligación, para un volumen final de 20 µl (**Tabla 6**). Se decidió nombrar como “mezcla de pseudoligación” ya que esta mezcla contiene todos los reactivos necesarios para la ligación entablillada, exceptuando la enzima *SplintR* DNA ligasa, pero no se realizó esta reacción. Además, se rempazan los oligonucleótidos MGA-nsp9 y T7T-nsp9 por la construcción Ctrl-(+)-MGA-T7T.

Tabla 6. Preparación de la mezcla de reacción de transcripción *in vitro*.

| Componente de la reacción | Producto de ligación o Ctrl(-) _{LIG} | Ctrl-(+)-MGA-T7T o Ctrl(+) _{TIV} | Ctrl(-) _{TIV} | Concentración final |
|--|---|---|------------------------|------------------------|
| Mezcla de pseudoligación (Ctrl-(+)-MGA-T7T 200 nM) | - | 2,0 µl | 2,0 µl | Ctrl-(+)-MGA-T7T 20 nM |
| Producto de Ligación | 2,0 µl | - | - | - |
| PT7 * | | | | |
| -20 µM | | | | -1000 nM |
| -15 µM | 1,0 µl | 1,0 µl | 1,0 µl | -750 nM |
| -10 µM | | | | -500 nM |
| -5 µM | | | | -250 nM |
| -2 µM | | | | -100 nM |
| 10X RNA Pol Reaction Buffer | 2,0 µl | 2,0 µl | 2,0 µl | 1X |
| DTT (20 mM) | 1,0 µl | 1,0 µl | 1,0 µl | 1 mM |
| Inhibidor RNasas(40 U/µl) | 0,25 µl | 0,25 µl | 0,25 µl | 0,5 U/µl |
| NTPs (10 mM c/u) | 1,5 µl | 1,5 µl | 1,5 µl | 0,75 mM |
| T7 RNA Pol 50000 U/ml | 2,0 µl | 2,0 µl | - | 5000 U/ml |
| H ₂ O _{LN} | 6,25 µl | 6,25 µl | 8,25 µl | |
| Verde de malaquita* | | | | |
| -50 µM | 4,0 µl | 4,0 µl | 4,0 µl | -10 µM |
| -100 µM | | | | -20 µM |
| Vol Final | 20 µl | 20 µl | 20 µl | |

*En rojo y cursiva se indica la variación de concentraciones en las soluciones madres y su respectiva concentración final y no necesariamente fueron utilizadas en paralelo en un mismo experimento.

Protocolo TIV-A: para la estandarización de la reacción de transcripción *in vitro* se utilizó el oligonucleótido de DNA Ctrl-(+)-MGA-T7T como templado. Este oligonucleótido se encontraba a 200 nM en una mezcla previamente preparada o mezcla de “pseudoligación”, la cual contenía todos los reactivos necesarios para la realización de la ligación entablillada a excepción de la enzima *SplintR* DNA ligasa y los oligonucleótidos MGA-nsp9 y T7T-nsp9 (volumen reemplazado por H₂O_{LN}), salvo en el caso en que fue necesario ocupar concentraciones crecientes de oligonucleótido T7T-nsp9. Finalmente, los controles negativos de transcripción (Ctrl(-)_{TIV}) se prepararon de igual manera que la mezcla de reacción, pero éstos no incluían la RNA polimerasa T7, volumen que fue reemplazado por H₂O_{LN}.

Protocolo TIV-B: para el caso de la TIV de productos de ligación se utilizó como templado una alícuota de cada una de las muestras sometidas a ligación entablillada (incluidos los controles Ctrl(-)_{LIG} y Ctrl(+)_{TIV}) y donde el Ctrl(-)_{TIV}, esta vez fue preparado utilizando como templado una alícuota proveniente del Ctrl(+)_{TIV} pero sin la adición de RNA polimerasa T7. La muestra Ctrl(+)_{TIV} es utilizada como control positivo, ya que este control desde un inicio fue preparado en la mezcla de pseudoligación, pero a diferencia de la estandarización de la TIV, éste es sometido a todo el tratamiento de ligación.

En los casos en que es necesaria la adición o ausencia de algún reactivo, dicho volumen fue descontado o completado respectivamente con volúmenes de H₂O_{LN}. Todas las variaciones de la concentración de alguno de los componentes de la mezcla de reacción general, siempre realizaron variando un solo reactivo por experimento y dejando el resto de los reactivos a concentraciones fijas. Para los casos en que la concentración de algún reactivo fue modificada para su estudio, se prepararon soluciones madres de tal modo que lo variable fuera la concentración del reactivo y no el volumen utilizado para la preparación de la mezcla de reacción. Para los casos en que fue necesaria la adición de algún reactivo posterior a la preparación de la mezcla de reacción (con esto aumentando el volumen de reacción, el cual en dichos casos siempre fue 25 µl), se utilizó una segunda muestra como control de volumen, en la que se igualó el nuevo volumen con agua H₂O_{LN} en vez del reactivo añadido. Todas las mezclas de reacción y las muestras

fueron preparadas y distribuidas a tubos de PCR de 0,2 ml mantenidas en hielo o en su defecto, en placas de PCR de fondo cónico de 96 pocillos (*Axygen*) cuando fue necesario realizar ensayos cinéticos de transcripción.

La reacción de transcripción *in vitro* fue realizada a 37°C y en los casos en que ésta se llevara a cabo en tubos de PCR de 0,2 ml, la incubación se llevó a cabo en un termociclador *Eppendorf® Mastercycler Personal*. De forma alternativa, si la reacción se efectuó en placas de PCR, ésta fue realizada en el lector de placas *Tecan® Infinity 200 PRO*. Para ambos casos, la reacción se llevó a cabo durante al menos 2 horas, según se indica en la sección de resultados. En los casos en que fue necesario, una vez finalizado el tiempo de reacción, la mezcla fue traspasada de los tubos de PCR de 0,2 ml a placas de 96 pocillos para la medición fluorimétrica.

3.6 Mediciones fluorimétricas

Todas las mediciones fluorimétricas se realizaron en un lector de placas *Tecan® Infinity 200 PRO* utilizando el programa i-control 1.2 del proveedor y utilizando placas transparentes de PCR de 96 pocillos con fondo cónico (*Axygen*). Los parámetros de medición fueron a $\lambda=610$ nm para la excitación con un ancho de banda de 9 nm y $\lambda=655$ nm para la emisión con un ancho de banda de 20 nm, 15 flashes con un tiempo de establecimiento de 0 ms, tiempo de integración de 50 μ s y 0 ms de tiempo de retardo. Las mediciones se realizaron haciendo incidir el flash en el centro del pocillo. En el caso de las cinéticas de transcripción *in vitro* la reacción se incubó a 37°C en el lector de placas sin agitación durante el tiempo indicado en cada experimento, con mediciones cada 10 o 15 minutos. En estos casos, las placas fueron cubiertas utilizando tapas ópticas para tubos de qPCR de modo de evitar la evaporación del agua. Para independizar los valores brutos de los efectos de la ganancia utilizada en cada la medición, ya que se debió utilizar distintas ganancias para el caso de mediciones puntuales y cinéticas de transcripción, se normalizaron los datos promedio respecto al promedio del control positivo Ctrl(+)_{TIV}.

3.7 Extracción de RNA total humano

La muestra de sangre se obtuvo de un voluntario, el cual fue seleccionado utilizando los siguientes criterios de inclusión: ser mayor de 18 años y no presentar síntomas de COVID-19. A demás presentar alguna patología o afección diagnosticada se utilizó como criterio de exclusión (**Anexo 1**). El RNA se purificó utilizando el método descrito por Lui y cols. (2015). Brevemente, la muestra de sangre humana se colectó en un tubo *vacutainer* con EDTA como anticoagulante y se invirtió el tubo en 10 ocasiones. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml de muestra y se transfirió a un nuevo tubo. A la muestra de sangre humana se le añadió 3 volúmenes de TRIzol™ y se realizó la lisis celular mediante pipeteo repetido. Posteriormente, la muestra fue sometida a vórtex hasta que el lisado se tornó homogéneo. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a $12000 \times g$ a 4°C , y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la correcta disociación de los complejos nucleoprotéicos. Posteriormente, se añadió 0,2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol™ utilizado, se mezcló por inversión y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó por 15 minutos a $12000 \times g$ a 4°C . La fase acuosa (incolora) se transfirió a un nuevo tubo, al que se añadió 0,5 ml de isopropanol por ml de TRIzol™ utilizado. La mezcla se incubó 10 minutos a 4°C y, posteriormente, se centrifugó 15 minutos a $12000 \times g$ a 4°C para precipitar el RNA. Luego, se descartó el sobrenadante con cuidado de no suspender el sedimento formado. El sedimento se resuspendió en 1 ml de etanol 75% por cada mL de TRIzol™. Se mezcló mediante vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a $7500 \times g$ a 4°C . Luego, se descartó el sobrenadante y se dejó evaporando el etanol residual durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 100 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$. Se cuantificó el RNA en un espectrofotómetro de microplacas *Epoch Biotek*, cargando 2 μl del RNA extraído y se realizó mediciones a $\lambda = 260 \text{ nm}$. Estos datos fueron tratados por el programa *Gen5* el cual calcula directamente la concentración de RNA aplicando en la ley de Lambert-Beer, utilizando el coeficiente de extinción promedio para RNA paso óptico corregido (Biotek, 2006).

3.8 Tratamiento de datos y análisis estadísticos

3.8.1 Normalización de las mediciones fluorimétricas

Las mediciones fluorimétricas se realizaron en triplicado para cada condición, y los resultados brutos (entregados por el programa en unidades arbitrarias de fluorescencia, u.a.) se tabularon en planillas de *Microsoft Excel*. Para independizar los valores brutos de los efectos de la ganancia utilizada en cada la medición, luego de restar el blanco, todos los datos se normalizaron respecto al promedio de Ctrl(+)_{TIV} o en su defecto Ctrl-(+)-MGA-T7T, obtenido a las 2 horas de iniciada la TIV del experimento correspondiente (normalizador) y los valores fueron expresados como porcentaje de fluorescencia relativa al normalizador o %FRN (**Fórmula 1**):

$$\%FRN = 100 * \left(\frac{\text{Valor experimental}}{\text{Promedio del Normalizador}} \right) \quad (1)$$

donde en la **Fórmula 1**, el “valor experimental” corresponde al valor bruto de cada uno de triplicados (no al promedio), incluido cada uno los valores de florescencia en triplicado asociados al normalizador. Los datos normalizados de los triplicados fueron importados al programa *GraphPad Prism* versión 8.0.2, programa utilizado para el análisis estadístico y generación de gráficos. Los valores se graficaron con su respectiva desviación estándar expresada en FRN(%). Para el caso en que no se utilizó el oligonucleótido Ctrl-(+)-MGA-T7T, se presentan los valores en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a).

3.8.2 Análisis estadísticos

Para evaluar si presentaban o no distribución normal, se realizó la prueba de *Shapiro-Wilk* (Shapiro y Wilk, 1965) a todos los datos. Como criterio de igualdad o diferencia entre varianzas se empleó la prueba F de *Fisher*. Aquellos datos que presentaron distribución normal y varianzas semejantes, se analizaron mediante *t-test* para datos no pareados y para datos que presentaron distribución normal y varianzas distintas, se examinaron mediante *t-test* con corrección de *Welch* (Welch 1947). En cambio, los datos que no presentaron distribución normal, al ser una muestra pequeña ($n=3$), fueron estudiados mediante la prueba no paramétrica U de *Mann-Whitney* (Mann y Whitney, 1947). Para analizar varios grupos de datos cuya distribución era normal y sus varianzas semejantes, se utilizó ANOVA de una vía y posterior test de *Dunnnett* para comparaciones múltiples (Dunnnett 1964). Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

Como se mencionó en la introducción, en este trabajo se propuso el uso de la ligación entablillada acoplada a la generación de un aptámero fluorescente por transcripción *in vitro* para la detección de gRNA de SARS-CoV-2. El nombre de la ligación entablillada, corresponde a una analogía con el proceso de entablillado de huesos rotos.

Con el fin de estandarizar las condiciones para las reacciones de ligación entablillada y transcripción *in vitro*, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos, que serán utilizados a lo largo de esta memoria de título:

gRNA-nsp9-mimic: RNA sintético que imita un segmento del gen *nsp9* del SARS-CoV-2, el cual se utiliza como blanco de amplificación mediante qRT-PCR en algunos de los sistemas comerciales de detección del virus en muestras clínicas.

T7T-nsp9: oligonucleótido de DNA que hibrida con una región del RNA sintético gRNA-nsp9-mimic y, río arriba del sitio de ligación, tiene la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7.

MGA-nsp9: oligonucleótido de DNA que hibrida con una región del RNA sintético gRNA-nsp9-mimic contigua al sitio de hibridación de T7T-nsp9 y, río abajo del sitio de ligación, tiene la secuencia del gen que codifica el aptámero de verde de malaquita (MGA).

PT7: oligonucleótido de DNA complementario al promotor del fago T7 del oligonucleótido T7T-nsp9. Al hibridar con T7T-nsp9 forma el promotor T7 doble hebra funcional, el cual es reconocido por la RNA polimerasa T7.

Ctrl-(+)-MGA-T7T: la secuencia de este oligonucleótido es equivalente al producto de ligación esperado entre los oligonucleótidos MGA-nsp9 y T7T-nsp9. Este DNA es utilizado como control positivo de ligación.

Para el diseño de **gRNA-nsp9-mimic**, se tomó como referencia las secuencias blanco utilizadas para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR informadas por el *Institut Pasteur* específicamente la región que flanqueaba el par de partidores nCoV-IP2 (Corman y cols., 2020).

En general, las reacciones se realizaron preparando la mezcla de ligación o pseudoligación en hielo. La mezcla de “pseudoligación” contiene todos los reactivos necesarios para la ligación entablillada, exceptuando la enzima *SplintR* DNA ligasa, y esta reacción no es realizada. Además, se rempazan los oligonucleótidos MGA-nsp9 y T7T-nsp9 por la construcción Ctrl-(+)-MGA-T7T. Para el caso de la mezcla de ligación, previo a la adición de la enzima *SplintR* y su respectivo tampón, se realizó la etapa de hibridación de oligonucleótidos a 95°C durante 3 minutos. Posteriormente se añadió la ligasa de DNA *SplintR* y su tampón de reacción y se realizó la ligación a 37°C durante 1 hora (la mezcla de pseudoligación se sometió directamente a la reacción de transcripción *in vitro*). Una vez realizada la ligación, se tomó una alícuota de cada muestra y se realizó la transcripción *in vitro* catalizada por la RNA polimerasa T7, durante 2 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se efectuó las mediciones fluorimétricas a $\lambda=610$ nm para la excitación y emisión $\lambda=655$ nm. Cualquier variación a este protocolo general es detallada en particular en cada experimento.

Adicionalmente, para cada reacción se utilizó un control negativo de ligación (Ctrl(-)_{Lig}), además de un control negativo (Ctrl(-)_{TIV}) y uno positivo (Ctrl(+)_{TIV}) de la transcripción *in vitro*. El Ctrl(-)_{TIV} se preparó de igual manera que la mezcla de reacción, pero no se incluyó la RNA polimerasa T7. A cambio, el volumen correspondiente a la enzima fue reemplazado por H₂O_{LN}. El Ctrl(-)_{Lig} correspondía a una mezcla de ligación que no incluyó el RNA sintético gRNA-nsp9-mimic correspondiente, reemplazando el volumen con H₂O_{LN}. El Ctrl(+)_{TIV} se realizó con la misma mezcla de reacción utilizada para cada experimento, pero se reemplazó la pareja de oligonucleótidos MGA-nsp9/T7T-nsp9 por el oligonucleótido Ctrl-(+)-MGA-T7T (que equivale a la versión ligada de los oligonucleótidos) a concentración de 200 nM. Esta mezcla se sometió a los mismos procedimientos que las muestras experimentales y los controles negativos

4.1 Validación inicial del método

Para la validación del método propuesto, se realizó la ligación entablillada bajo las condiciones indicadas en Yings y cols (2018) sin incluir las proteínas SSB utilizadas por Wee y Trau (2016) con el fin de reducir los costos por reacción. Las proteínas SSB son proteínas capaces de unirse y estabilizar el ssDNA impidiendo la formación de estructuras secundarias, protegiendo el DNA de nucleasas en procesos de replicación o reparación del DNA (Lennarz y Lane, 2013). La reacción de ligación entablillada se realizó empleando 10 nM del oligonucleótido gRNA-nsp9-mimic y 200 nM de la pareja de oligonucleótidos MGA-nsp9/T7T-nsp9 (condición gRNA-nsp9-mimic) o del oligonucleótido Ctrl-(+)-MGA-T7T (Ctrl(+)_{TIV}). Utilizando 10 minutos de reacción de ligación (como sugieren Wee y Trau (2016)) no fue suficiente para detectar fluorescencia a 2 horas de transcripción *in vitro* de los productos de ligación (resultados no mostrados). En base a lo anterior, se decidió realizar la ligación con los tiempos que propone el proveedor de la DNA ligasa *SplintR* (1 hora). Se realizó la transcripción *in vitro* de los productos de ligación durante 2 horas a 37°C utilizando 500 nM de PT7, luego de lo cual, a cada muestra se le añadió verde de malaquita (10 µM final) y se midió la fluorescencia en una placa de 96 pocillos (**Figura 5A**). Basado en estos resultados, 1 hora de ligación entablillada fue suficiente para permitir la ligación y producir el templado para la transcripción *in vitro*. Sin embargo, la señal obtenida es solo un 0,36% de la observada usando el control positivo (Ctrl(+)_{TIV}), aunque estadísticamente superior a ambos controles negativos (Ctrl(-)_{TIV} y Ctrl(-)_{Lig}). Además, a los productos de ligación y a los controles se le realizó PCR para la confirmación de la ligación mediante un método alternativo, utilizando el protocolo y programa de temperatura descritos en las **Tablas 4A y 4B**, respectivamente.

Dado que la fluorescencia obtenida en el experimento que contenía el RNA que imita al genoma viral es cercana a lo observado en ambos controles negativos, se realizó un PCR convencional para confirmar que la ligación de los oligonucleótidos ocurre solamente en presencia de la enzima *SplintR* y la tablilla de RNA (gRNA-nsp9-mimic). Aunque hay algunas bandas inespecíficas, los resultados del PCR mostrados en la **Figura 5B** indican claramente que el producto esperado de 92 pb se forma solamente en el Ctrl(+)_{TIV} (carriles 10-12) o en la reacción realizada en presencia

de la ligasa y el RNA tablilla (carriles 6-8). En cambio, el producto de 92 pb no se observa en los experimentos donde no se utilizó la DNA ligasa (Ctrl(-)_{TIV}), o el RNA de tablilla (Ctrl(-)_{Lig}). Por otra parte, la intensidad de banda en los carriles 6-8 (reacción de ligación) es menor a la observada en los carriles 10-12 Ctrl(+)_{TIV}. Al igual que en los experimentos de transcripción *in vitro* (Figura 5A), estos experimentos sugieren que un porcentaje importante de los oligonucleótidos no se ligó.

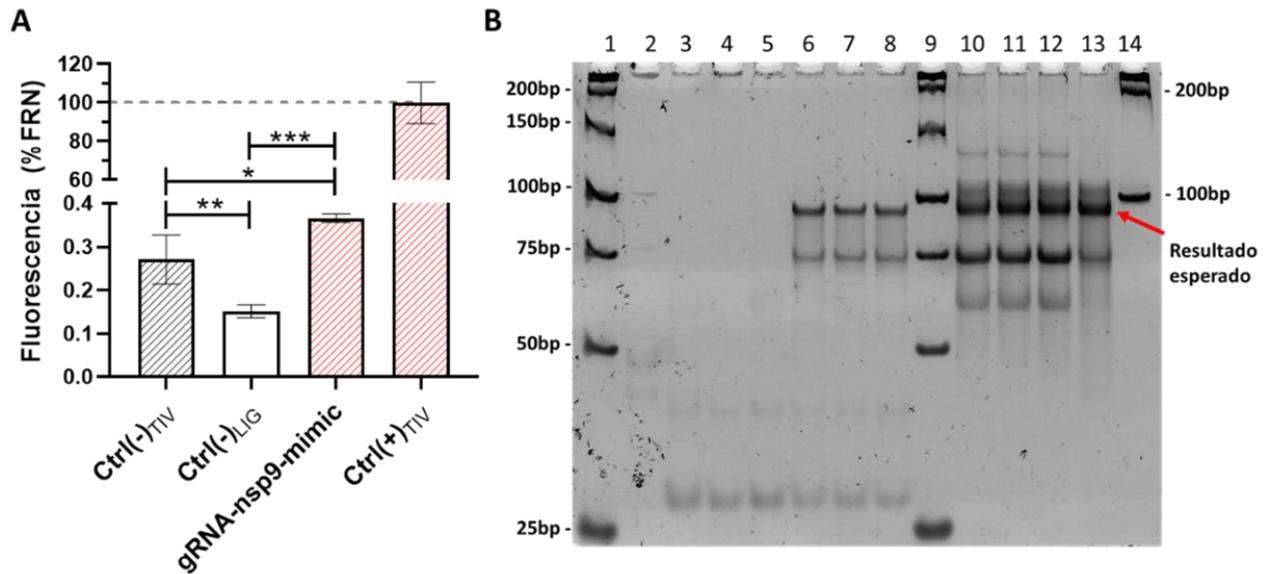


Figura 5. La ligación entablillada de un template de DNA permite detectar la presencia de un RNA que imita el genoma del SARS-CoV-2. A) Fluorescencia a las 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* de los productos de ligación. Los valores se muestran como porcentaje del valor obtenido usando el Ctrl(+)_{TIV} (Línea gris segmentada). *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p < 0,05$, ANOVA de una vía con test de *Dunnnett* para comparaciones múltiples (n=3). **B)** Electroforesis en gel de poliacrilamida de productos de PCR realizados a los productos de ligación entablillada. Carril 1 y 9: estándar de peso molecular DNA *GeneRuler Low Range*; carril 2: control negativo de PCR sin template; carriles 3-5: Ctrl(-)_{Lig}, carriles 6-8: gRNA-nsp9-mimic; carriles 10-12: Ctrl(+)_{TIV}; carril 13: control positivo de PCR correspondiente al oligonucleótido Ctrl(-)-MGA-T7T 2 nM, carril 14: estándar de peso molecular DNA *GeneRuler 100bp Plus*. Se señala banda la correspondiente al producto de ligación esperado (flecha roja).

4.2 Estandarización de la reacción de transcripción *in vitro*

Una vez validado el método propuesto y en consideración a los bajos rendimientos de ligación obtenidos (menores al 1% en relación al Ctrl(+)_{TIV}), se estandarizó la reacción de transcripción *in vitro* con el fin de generar un protocolo en las condiciones óptimas de trabajo, disminuyendo en lo posible la manipulación de las muestras para así optimizar los tiempos y límite de detección

4.2.1 Transcripción *in vitro* en presencia de verde de malaquita

En el ensayo descrito, el verde de malaquita fue añadido posterior a la finalización de la reacción de TIV, lo que genera un paso adicional. En la literatura se ha reportado la posibilidad de realizar dicha reacción en presencia de verde de malaquita (Furukawa y cols., 2008). Para evaluar si es factible en las condiciones trabajadas, se añadió verde de malaquita a una concentración final de 10 μM en la mezcla de reacción. Utilizando 20 nM del oligonucleótido Ctrl(+)-MGA-T7T como templado para la reacción (preparado en la mezcla de pseudoligación que contiene 10 nM de gRNA-nsp9-mimic) y empleando 500 nM de PT7 (**Figura 6**).

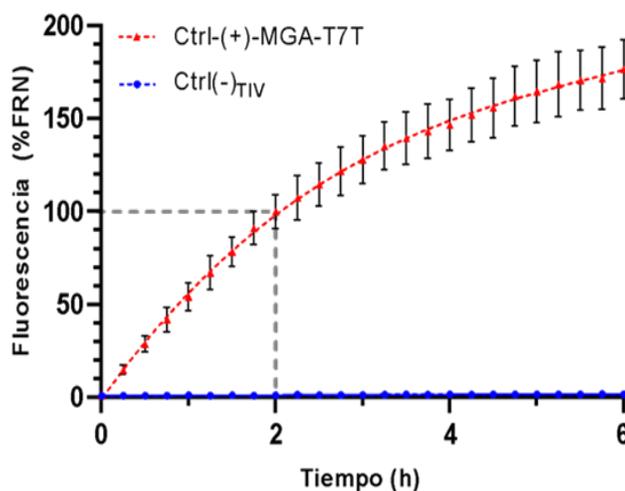


Figura 6. Curva de progreso de la transcripción *in vitro* en presencia de verde de malaquita 10 μM . Cambio de la fluorescencia en el tiempo de reacción de transcripción *in vitro* de los templados Ctrl-(+)-MGA-T7T y Ctrl(-)_{TIV} (control negativo sin RNA polimerasa T7). Los valores de fluorescencia se expresan como porcentajes normalizados respecto al valor promedio de la condición Ctrl-(+)-MGA-T7T al tiempo 2 horas (línea gris segmentada, %FRN).

Basado en estos resultados, se confirma que es posible realizar el monitoreo en tiempo real de la TIV y, además, extender la reacción al menos durante 6 horas sin haber alcanzado la saturación del sistema.

4.2.2 Efectos del contraíón del verde de malaquita y su concentración en los niveles de fluorescencia

Dado que el verde de malaquita es comercializado como cloruro de verde de malaquita (MGCl) y oxalato de verde de malaquita (MGOx), se decidió evaluar el efecto del contraíón en la producción de fluorescencia. Para esto, se realizó la transcripción *in vitro* en condiciones similares a las descritas anteriormente: 20 nM del oligonucleótido Ctrl-(+)-MGA-T7T como templado para la reacción (preparado en la mezcla de pseudoligación utilizando 10 nM de gRNA-nsp9-mimic), 500 nM de PT7 y utilizando 10 μ M de MGCl (sal utilizada hasta este punto) o 10 μ M de MGOx. Además, se evaluó los efectos de dos concentraciones de ambas sales, 10 μ M (concentración indicada en Ying y cols. 2018) y 20 μ M. Los datos se presentan como porcentaje de la fluorescencia observada en la condición en presencia de MGCl 10 μ M, la cual corresponde a la sal y concentración previamente utilizada. Así mismo, y para la condición Ctrl(-)_{TIV} se utilizó también MGCl 10 μ M, pero sin enzima RNA polimerasa T7 (Figura 7).

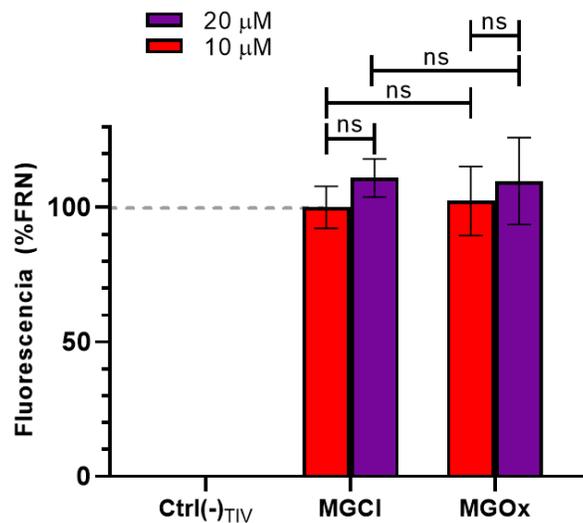


Figura 7. Incidencia del contraíón de verde de malaquita y su concentración en los niveles de fluorescencia. Utilizando ambas sales: cloruro de verde de malaquita (MGCl) y oxalato de verde de malaquita (MGOx), se presentan sus respectivos valores de fluorescencia en porcentajes con respecto al valor promedio de la condición MGCl 10 μ M posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada). “ns” indica estadísticamente no significativo ($p > 0,05$) utilizando *t-test* para datos con distribución normal ($n=3$).

Los resultados muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de fluorescencias asociados al uso de diferentes concentraciones para el verde de malaquita. Por otra parte, duplicar la concentración de la sal de verde de malaquita (20 μM) no representa un aumento significativo en el nivel de fluorescencia. En consecuencia, en las siguientes reacciones de transcripción *in vitro*, se seguirá utilizando cloruro de verde de malaquita a una concentración final de 10 μM .

4.2.3 Incidencia de la concentración de PT7

La eficiencia de la reacción de transcripción depende fuertemente de la formación de una doble hebra en la región promotora del templado que es reconocida por la RNA polimerasa T7. Se espera que a la T_m se encuentre el 50% de PT7 hibridado al oligonucleótido templado. Dado que la T_m predicha entre PT7 y T7T es de aproximadamente 69,7°C, es posible que aun considerando la alta concentración de PT7, a la temperatura de reacción (37 °C) exista un porcentaje del templado que no esté formando la doble hebra, disminuyendo la velocidad de transcripción. Por ello, se estudiaron los efectos de aumentar la concentración de PT7 de modo de evaluar si al trabajar con 500 nM de promotor PT7 la reacción se encuentra saturada respecto de PT7. Se realizó la transcripción *in vitro* utilizando el oligonucleótido Ctrl(+)-MGA-T7T como templado para la reacción (preparado en la mezcla de pseudoligación utilizando 10 nM de gRNA-nsp9-mimic) a concentración de 20 nM y se estudió el efecto de concentraciones crecientes de PT7. Los datos fueron normalizados respecto a la condición PT7 500 nM la cual corresponde concentración previamente utilizada. El Ctrl(-)_{TIV} fue preparado con PT7 500 nM y sin RNA polimerasa T7 (**Figura 8**). Es posible observar que a medida que aumenta la concentración de PT7 aumenta el nivel de fluorescencia, acercándose pero no alcanzando una concentración saturante de P7T a 1 μM para el sistema en las condiciones trabajadas. Estos resultados sugieren que, si bien es posible disminuir la concentración de PT7 5 veces a la utilizada hasta este punto (500 nM) sin ver mermada la fluorescencia más allá de un 35%, aumentar la concentración al doble genera un aumento cercano al 50% de la fluorescencia a 500 nM. Por ende, presentan un rango de concentraciones útil para el empleo de PT7. Además, se evidencia que la transcripción *in vitro*

catalizada por la RNA polimerasa T7 puede ocurrir aunque no se forme el promotor doble hebra (0 nM PT7, recuadro rojo) lo que ya había sido reportado (Sousa y Mukherjee, 2003). Si bien solo permite producir un 2,3% de la fluorescencia alcanzada cuando el ensayo contiene con 500 nM de PT7, representa ~ 10 veces los niveles del $\text{Ctrl}(-)_{\text{TIV}}$ (Figura 8).

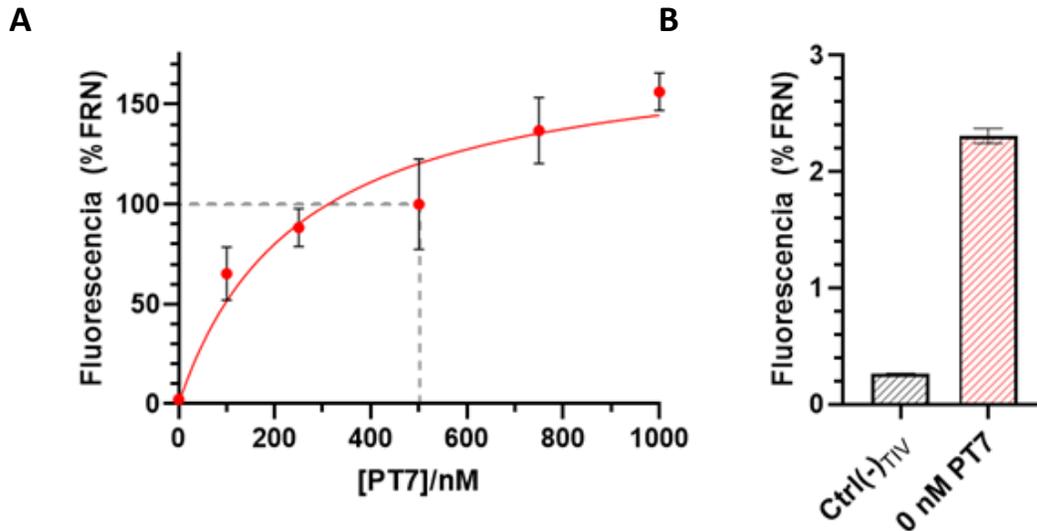


Figura 8. Efecto de la concentración de PT7 sobre la transcripción y producción de fluorescencia.

A) Se presentan los valores de fluorescencia observados al realizar la transcripción *in vitro* a concentraciones crecientes de PT7 y a concentración fija de templado $\text{Ctrl}(+)\text{-MGA-T7T}$ (20 nM). Los valores de fluorescencia se expresan como porcentajes respecto al valor promedio de la condición 500 nM PT7 posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada). La línea roja continua corresponde a la representación gráfica con ajuste de los datos a la curva de *Michaelis-Menten*. **B)** Datos de las condiciones $\text{Ctrl}(-)_{\text{TIV}}$ (preparada con 500 nM PT7, barra achurada gris) y de 0 nM PT7 (barra achurada roja).

Para los siguientes experimentos se siguió trabajando con 500 nM de PT7, ya que es el punto intermedio de las concentraciones evaluada y corresponde a la concentración indicada en Ying y cols., (2018).

4.2.4. Aporte de la transcripción inespecífica de oligonucleótidos no ligados a los niveles basales de fluorescencia

Existe la posibilidad de que la transcripción *in vitro* se inicie de forma inespecífica, aunque de manera menos eficiente la RNA polimerasa T7 puede iniciar la transcripción utilizando un promotor de hebra simple **Figura 8** y Sousa y Mukherjee (2003). Adicionalmente, podría iniciar la transcripción desde sitios que carecen de un promotor, generando productos no deseados. El transcrito generado por la potencial transcripción del oligonucleótido MGA-nsp9 (transcripción sin promotor) tendría como resultado el aptámero de verde de malaquita que podría contribuir a los niveles basales de fluorescencia. Con el fin de evaluar si la transcripción no deseada tiene incidencia en la fluorescencia basal, se realizó la transcripción *in vitro* de cada uno de los oligonucleótidos por separado y de ambos en conjunto. Se preparó cada una de las condiciones en una mezcla de pseudoligación sin DNA ligasa *SplintR*, para cada oligonucleótido a concentración de 20 nM en la reacción TIV (equivalente a los 200 nM utilizadas en ligación entablillada) y 500 nM PT7. Los datos fueron normalizados respecto a la condición que contenía como templado Ctrl-(+)-MGA-T7T a concentración de 20 nM y la condición Ctrl(-)_{TIV} contenía 20 nM Ctrl-(+)-MGA-T7T, pero sin RNA polimerasa T7 (**Figura 9**). En los resultados obtenidos no se detectó transcripción inespecífica. Tampoco se observaron diferencias significativas entre la transcripción de cada uno de los oligonucleótidos por sí solos ni en conjunto por sobre la condición sin transcripción Ctrl(-)_{TIV}. Estos datos indican que en caso de haber transcripción inespecífica de los oligonucleótidos ésta se encuentra bajo del ruido (**Figura 9**).

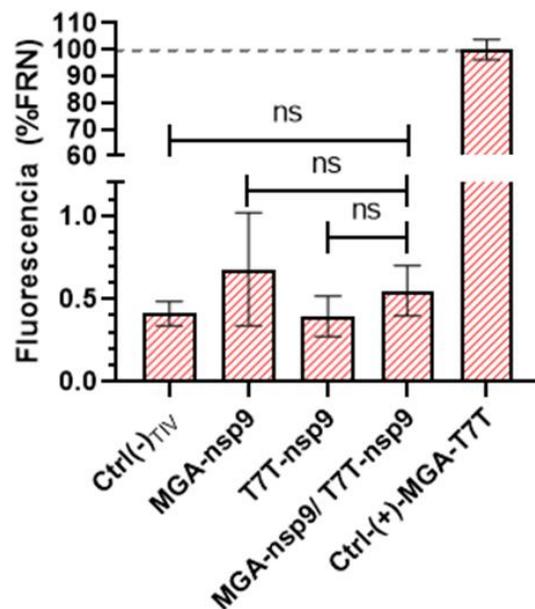


Figura 9. Aporte de los oligonucleótidos MGA-nsp9 y T7T-nsp9 a los niveles basales de fluorescencia. Se presentan los valores de fluorescencia de las transcripciones de 20 nM en presencia de cada uno de los oligonucleótidos utilizados para la ligación por separado (MGA-nsp9, T7T-nsp9) o en conjunto, pero no ligados (MGA-nsp9/T7T-nsp9). La mezcla de reacción no contenía templados reconocidos por el promotor T7 que codifique el aptámero de verde de malaquita. Los datos se expresan como porcentajes del valor promedio de la condición “Ctrl(+)-MGA-T7T” posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada). “ns” indica estadísticamente no significativo ($p > 0,05$), utilizando ANOVA y posterior test de *Dunnnett* para comparaciones múltiples ($n=3$).

4.2.5 Influencia del porcentaje de T7T remanente

Considerando que el rendimiento de la ligación entablillada nunca es del 100% (Lohman y cols., 2014), siempre quedará oligonucleótido nsp9-T7T remanente no ligado en la solución. Al poseer el sitio complementario al oligonucleótido PT7 puede formar el promotor doble hebra funcional en presencia de PT7. Esto podría ocasionar que la RNA polimerasa T7 reconozca este sitio, inicie la transcripción *in vitro* y genere un transcrito que no codifica un aptámero de verde de malaquita, pero que compite por la enzima RNA polimerasa T7 en la reacción y como consecuencia disminuiría los niveles de fluorescencia en función del aptámero transcrito. Para estudiar la incidencia de la competencia generada por el oligonucleótido nsp9-T7T remanente sobre la fluorescencia, se diseñó un ensayo, donde a concentraciones fijas

de Ctrl-(+)-MGA-T7T (utilizado como templado), se varió el porcentaje de la región T7T remanente que no codifica el aptámero de verde de malaquita en reacción (%T7T_R) respecto a la concentración de DNA que presentan la región T7T. El porcentaje de oligonucleótido T7T remanente se calculó como se indica en la **Fórmula (2)**:

$$\% \text{ T7T}_R = 100 * \frac{[\text{T7T-nsp9}]}{[\text{Ctrl-(+)-MGA-T7T}] + [\text{T7T-nsp9}]} \quad (2)$$

En esta fórmula [T7T-nsp9] y [Ctrl-(+)-MGA-T7T] representan las concentraciones finales en la reacción de transcripción *in vitro* indicadas en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Concentraciones de oligonucleótido nsp9-T7T utilizadas en cada condición experimental y porcentaje de T7T remanente que representan.

| Ctrl-(+)-MGA-T7T | T7T-nsp9 | T7T _R |
|------------------|----------|------------------|
| 20 nM | 0 nM | 0% |
| 20 nM | 6,7 nM | 25% |
| 20 nM | 20 nM | 50% |
| 20 nM | 60 nM | 75% |
| 20 nM | 180 nM | 90% |

En base a las concentraciones indicadas en la **Tabla 7**, se realizó la transcripción *in vitro* utilizando el protocolo TIV-, y se estudió en paralelo %T7T_R crecientes. Los datos fueron normalizados respecto a la condición 0%T7T_R, la cual es equivalente a las condiciones previamente utilizada para la estandarización de la TIV (sin oligonucleótido T7T-nsp9). Además, corresponde a la condición en que no existe templado regulado por el promotor T7 que codifique el aptámero de verde de malaquita. Para el caso de la condición Ctrl(-)_{TIV}, ésta se preparó sin incluir el oligonucleótido T7T-nsp9 y sin enzima RNA polimerasa T7. Se observa que todos los valores de fluorescencia oscilan entre 88%-108% aproximadamente respecto a la condición 0% T7T_R (cuando no hay presencia de oligonucleótido T7T-nsp9 en la reacción). Si bien es cierto que algunos datos presentan cambios estadísticamente significativos, en conjunto los resultados sugieren que a pesar que el oligonucleótido T7T-nsp9 remanente no ligado posee la región que puede formar el

promotor T7, su presencia incluso a altas concentraciones no incide en la eficiencia de la transcripción *in vitro* (Figura 10).

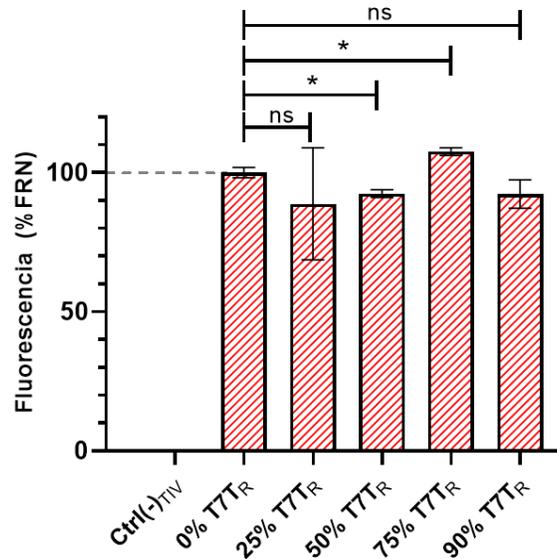


Figura 10. Influencia del porcentaje de oligonucleótido T7T-nsp9 remanente no ligado en la transcripción *in vitro* de MGA. Se presentan los valores de fluorescencia de TIV realizadas con porcentajes crecientes de oligonucleótidos que presenta la región T7T y no codifican el aptámero de verde de malaquita (%T7T_R). La reacción se llevó a cabo a concentración fija de templado Ctrl-(+)-MGA-T7T (20 nM). Los valores se expresan como porcentajes respecto al valor promedio de la condición 0% T7T_R posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada). * $p < 0,05$, “ns” indica estadísticamente no significativo ($p > 0,05$), se utilizó ANOVA de una vía y posterior test de *Dunnnett* para comparaciones múltiples ($n=3$).

4.2.6 Detención de la reacción de transcripción

El trabajar con un número elevado de muestras genera un desfase temporal entre la primera muestra y la última muestra tratada. Si a esto se suma a la disponibilidad limitada de los equipos de medición o la capacidad máxima de muestras que pueden medir simultáneamente dichos equipos, generará que las muestras de un mismo grupo sean medidas a diferentes tiempos. Estas limitaciones pueden generar desfases en la cantidad de producto obtenido entre los ensayos, por ende, los resultados de cada medición no serán comparables entre sí. En base a lo anterior, se propuso buscar algún reactivo que interfiera en la reacción de transcripción *in vitro*, que no altere

la estructura del RNA para así mantener los niveles de fluorescencia constantes a medida que transcurre el tiempo, permitiendo comparar entre mediciones no simultáneas.

En la literatura se ha reportado que la adición de acetato de amonio a concentración final de 0,5 M se utiliza para detener reacciones de transcripción *in vitro*, pero ésta está acoplada a algún método de purificación de RNA como la purificación fenólica (Milburn y cols., 1993). Para estudiar los efectos de este reactivo en la TIV, se preparó una solución de acetato de amonio (AcONH_4), de modo que una vez añadidos 5 μl de esta sal la concentración final fuese 0,5 M del catión amonio. Se evaluaron los efectos de la adición de 0,5 M de AcONH_4 en la reacción de transcripción *in vitro* en dos casos: al inicio de la reacción, una vez transcurridas las 2 horas de reacción y, además se estudió sus efectos en el tiempo posterior a la adición de dicho agente 1 hora después de iniciada la reacción (cinética de decaimiento). Para esto, se realizaron tres ensayos independientes de transcripción *in vitro* utilizando el protocolo TIV-A.

Inicialmente se añadió el AcONH_4 inmediatamente después de preparar las muestras para la transcripción *in vitro*, alcanzando así un volumen final de 25 μl (Ctrl-(+)-MGA-T7T + AcONH_4 [0,5 M]). El objetivo de este ensayo fue confirmar que este reactivo detiene la reacción evitando completamente la aparición de fluorescencia. Al hacer esto, aumentaría el volumen de cada muestra. En paralelo se realizó un control de volumen al cual se le añadió 5 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ (Ctrl-(+)-MGA-T7T + $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$) equivalente al volumen añadido de la solución de AcONH_4 , para descartar que los efectos se deban al aumento de volumen de reacción y no por efectos de la adición del AcONH_4 . Como control de la reacción se realizó la TIV como de costumbre y en las condiciones descritas previamente (20 μl de volumen de reacción y sin la adición inicial de algún agente adicional), al igual que con el control sin la enzima RNA polimerasa T7 (Ctrl-(+)-MGA-T7T y Ctrl(+)-TIV respectivamente). Una vez finalizadas las 2 horas de reacción, a ambas condiciones se les añadió 5 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ para igualar el volumen de las condiciones “Ctrl-(+)-MGA-T7T + AcONH_4 [0,5 M]” y “Ctrl-(+)-MGA-T7T + $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ ” con el fin de realizar las mediciones en un mismo volumen. El valor de fluorescencia del control Ctrl-(+)-MGA-T7T obtenido a las 2 horas se utilizó para realizar la normalización de los valores (**Figura 11A**).

Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de AcONH_4 0,5 M inhibe la reacción de TIV, dado que no fue posible detectar fluorescencia sobre los niveles basales ($\text{Ctrl}(-)_{\text{TIV}}$) cuando se encontraba desde el inicio de la reacción ($\text{Ctrl}(+)_{\text{-MGA-T7T}} + \text{AcONH}_4$ [0,5 M]), por ende no habría formación de aptámero. Además, cuando la reacción se ensayó con 5 μl adicionales de $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$, lo que representa una dilución a 0,8 veces las concentraciones utilizadas previamente ($\text{Ctrl}(+)_{\text{-MGA-T7T}} + \text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$), se aprecia que la fluorescencia corresponde al 89,8% de una reacción normal ($\text{Ctrl}(+)_{\text{-MGA-T7T}}$). Esta diferencia resultó no ser estadísticamente no significativa. Por ello se descarta que los efectos se deban al aumento de volumen o dilución de los reactivos (**Figura 11A**).

Otro factor importante a evaluar es si el AcONH_4 genera una variación significativa en el nivel de fluorescencia del aptámero de verde de malaquita ya transcrito. Para esto se efectuó la transcripción sin AcONH_4 durante 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó la medición fluorimétrica e inmediatamente se añadió AcONH_4 a concentración final de 0,5 M y se repitió la medición. Como control de volumen se repitió el experimento añadiendo 5 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ en vez de AcONH_4 . El valor promedio de fluorescencia de la condición control $\text{Ctrl}(+)_{\text{-MGA-T7T}}$ obtenida a las 2 horas previo a la adición de $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ se utilizó para la normalización de los valores (**Figura 11B**). Los resultados obtenidos muestran que la adición de AcONH_4 a concentración final de 0,5 M a las 2 horas de iniciada la TIV, provoca el descenso cercano al 40% de los niveles de fluorescencia respecto a cuando este reactivo no es añadido. Además estos efectos no se deben al aumento del volumen, ya que cuando se le añadió 5 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ a la reacción, no es posible evidenciar variación en los niveles de fluorescencia con respecto a la condición control $\text{Ctrl}(+)_{\text{-MGA-T7T}}$ (**Figura 11B**).

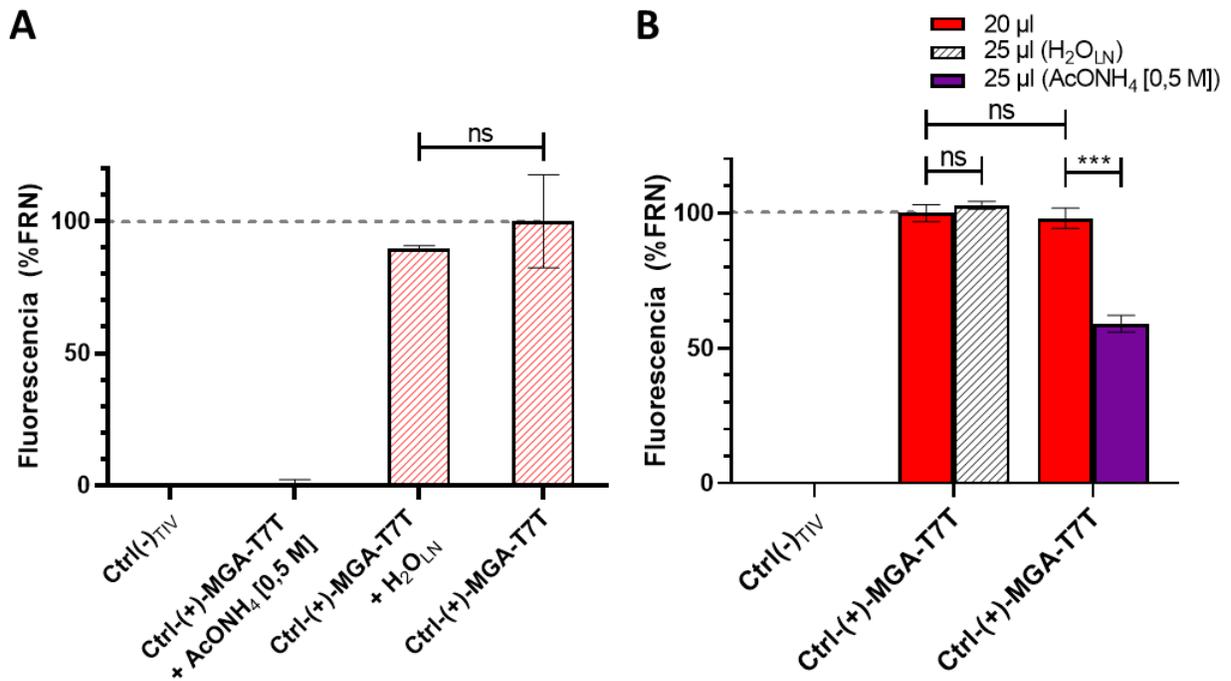


Figura 11. Efectos del AcONH₄ 0,5 M en la transcripción *in vitro*. (A) AcONH₄ 0,5 M añadido al inicio del ensayo de transcripción *in vitro*. Para las condiciones “Ctrl(+)-MGA-T7T + AcONH₄ [0,5 M]” y “Ctrl(+)-MGA-T7T + H₂O_{LN}” se añadió 5 µl de AcONH₄ o H₂O_{LN} respectivamente previo al inicio de la reacción. Para las condiciones “Ctrl(+)-MGA-T7T” y “Ctrl(-)TIV” 5 µl de H₂O_{LN} se añadió a las 2 horas de reacción, realizando las mediciones al mismo volumen de reacción. Se presentan sus respectivos valores de fluorescencia expresados como porcentajes respecto al valor promedio de la condición Ctrl(+)-MGA-T7T posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada). “ns” indica estadísticamente no significativo ($p > 0,05$), utilizando *t-test* con corrección de *Welch* para datos con distribución normal y varianzas muy distintas o test no paramétrico U de *Mann-Whitney* para datos que no presentaban distribución normal ($n=3$). (B) AcONH₄ 0,5 M añadidos transcurridas 2 horas de reacción y sus efectos sobre los niveles de fluorescencia. Las barras rojas (20 µl) representan medición inicial a 2 horas de reacción sin adición de agentes. Las barras achurada y morada, 25 µl (H₂O_{LN}) o 25 µl (AcONH₄ [0,5 M]) respectivamente, indican la medición posterior a la adicción de los 5 µl del agente indicado entre paréntesis. Se presentan los valores de fluorescencia expresados como porcentajes respecto al valor promedio de la condición Ctrl(+)-MGA-T7T 20 µl previo a la adicción de H₂O_{LN} (línea gris segmentada). *** $p \leq 0,001$, “ns” indica estadísticamente no significativo ($p > 0,05$), utilizando: *t-test* con para datos con distribución normal y varianzas semejantes ($n=3$).

Finalmente, no solo es necesario determinar si el AcONH_4 interfiere con la reacción desde el inicio, si no también si detiene eficientemente la TIV una vez que ya iniciada la reacción, así como determinar si altera la vida media o estabilidad estructural del aptámero de verde de malaquita. Cualquiera de estas alteraciones podría impedir que la fluorescencia se mantenga constante a medida que transcurre el tiempo. Para esto se realizó la TIV sin AcONH_4 durante 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, se le añadió 5 μl de AcONH_4 a concentración final de 0,5 M y se siguió la reacción hasta alcanzar las 4 horas (**Figura 12**). En paralelo, se añadió 5 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ a las condiciones “Ctrl(+)-MGA-T7T + $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ ” y al control sin enzima RNA polimerasa T7 “Ctrl(-)_{TIV}”. Como control positivo de la reacción (Ctrl(+)-MGA-T7T) se realizó la TIV en las condiciones descritas previamente (20 μl de volumen de reacción y sin la adición de algún agente o volumen adicional). Se siguió la reacción durante 3 horas más desde la adición de los 5 μl de alguno de los agentes en los casos correspondientes. El valor promedio obtenido a las 2 horas de la condición “Ctrl(+)-MGA-T7T + $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ ” se utilizó para realizar la normalización de los valores (**Figura 12**).

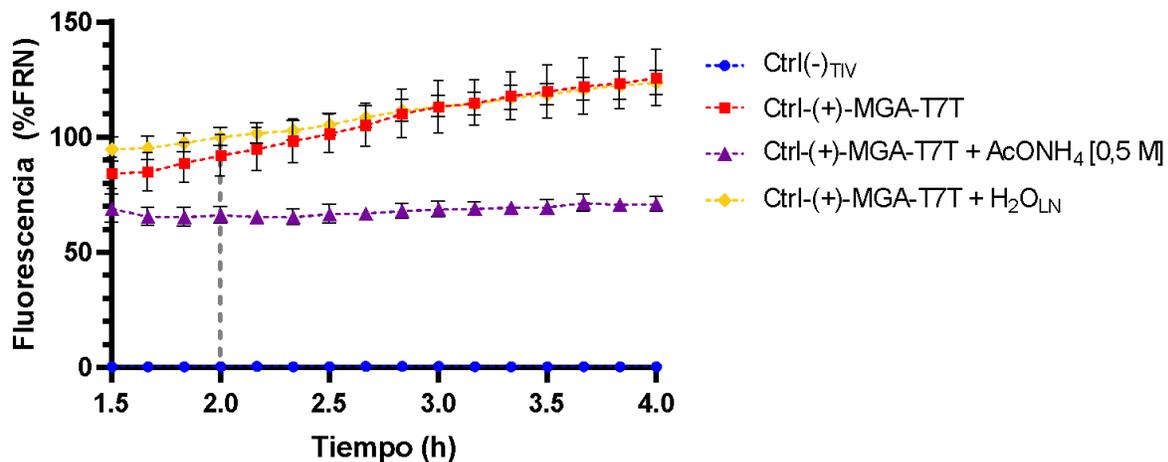


Figura 12. Cinética de estabilidad de la fluorescencia posterior a la adición de AcONH_4 0,5 M. En el gráfico se indica el tiempo transcurrido desde que se inició la reacción de transcripción *in vitro*. Se añadió 5 μl de AcONH_4 a la condición “Ctrl(+)-MGA-T7T + AcONH_4 [0,5 M]” una vez transcurrida 1 hora de reacción (triángulos morados), o 5 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ para “Ctrl(+)-MGA-T7T + $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ ” (rombos amarillos) y Ctrl(-)_{TIV} (círculos azules). Para el caso de Ctrl(+)-MGA-T7T (cuadrados rojos) no se le añadió ningún agente y se utilizó como control positivo de la reacción. Se presentan los valores de fluorescencia expresados como porcentajes respecto al valor promedio de la condición “Ctrl(+)-MGA-T7T + $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ ” posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada).

Es posible observar que a pesar de reducir la intensidad de fluorescencia a un 60% del valor inicial, la presencia de AcONH_4 0,5 M permite estabilizar los valores de fluorescencia manteniéndose constantes al menos hasta 3 horas posterior a su adición (Ctrl-(+)-MGA-T7T + AcONH_4 [0,5 M]). Por el contrario, para las condiciones “Ctrl-(+)-MGA-T7T” y “Ctrl-(+)-MGA-T7T + $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$ ” los niveles de fluorescencia a medida que transcurre el tiempo siguen aumentando (**Figura 12**). Basados en estos resultados, se presenta el AcONH_4 como un agente capaz de detener la reacción de TIV cuando sea necesario, aunque se debe considerar que reduce en un 40% los niveles de fluorescencia, disminuyendo la sensibilidad de la técnica.

4.2.7. Disponibilidad del inhibidor de RNAsas

El trabajo con RNA requiere extremar las precauciones debido a la facilidad con que se degrada, en parte por la ubicuidad de las RNAsas. Como consecuencia, se requiere material y reactivos que certifiquen ser libres de RNAsas. Adicionalmente, se pueden utilizar inhibidores de RNAsas que se adquieren comercialmente. En los protocolos descritos por el fabricante de la RNA polimerasa T7 utilizada (NEB) y por el grupo de Ying (2018), se indica que el uso de 0,5 unidades de inhibidor de RNAsas en la reacción de transcripción *in vitro* es opcional. Dado que el MGA corresponde a un RNA muy plegado y probablemente de mayor estabilidad, se evaluó si la presencia de inhibidor de RNAsas en la reacción tiene incidencia significativa en los niveles de fluorescencia. Para esto, se ensayó la transcripción *in vitro* utilizando el protocolo de transcripción TIV-A y se estudiaron dos condiciones en paralelo. En una de las condiciones la mezcla contenía 0,5 U de inhibidor de RNAsas (*RNaseOUT* 40 U/ μl) y la otra condición no contenía este inhibidor en la reacción. Los datos fueron normalizados respecto al promedio de la condición Ctrl-(+)-MGA-T7T (0,5 U de Inhibidor de RNAsas) la cual corresponde la condición previamente utilizada para la estandarización de la TIV. Para el caso de las condiciones Ctrl(-)_{TIV}, éstas se prepararon sin enzima RNA polimerasa T7 y en presencia o ausencia de 0,5 U de inhibidor de RNAsas (**Figura 13**).

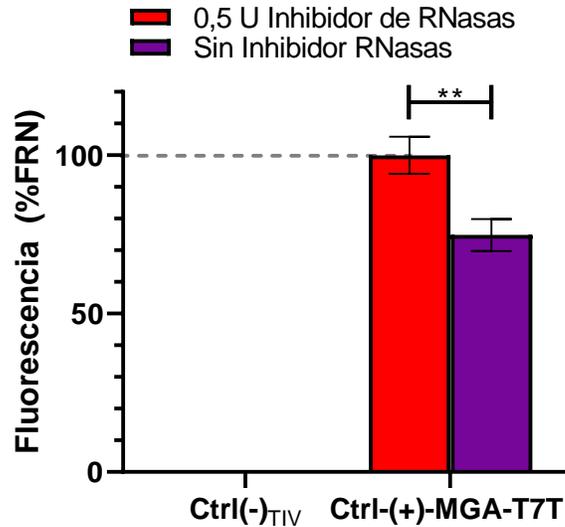


Figura 13. Influencia del empleo del Inhibidor de RNAsas en la transcripción *in vitro*. Se presentan los valores de fluorescencia cuando la TIV se suplementa con 0,5 U de inhibidor de RNAsas o en ausencia de éste. Los valores se expresan como porcentajes respecto al valor promedio de la condición “Ctrl-(+)-MGA-T7T 0,5 U Inhibidor de RNAsas” posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada). ** $p \leq 0,01$, “ns” indica estadísticamente no significativo ($p > 0,05$), utilizando *t-test* para datos con distribución normal ($n=3$).

Se observa que cuando la reacción de TIV no contiene inhibidor de RNAsas se obtiene cerca de un 25% menos de fluorescencia a las 2 horas de iniciada la reacción para la condición Ctrl-(+)-MGA-T7T (barra morada) respecto a la que sí contenía el inhibidor (barra roja). Estos resultados sugieren que existe degradación del aptámero. En los niveles basales no es posible observar cambios significativos (Ctrl(-)_{TIV}) (Figura 13). Estos resultados sugieren que la ausencia del inhibidor no impide que ocurra la reacción, pero se obtiene mayor fluorescencia cuando éste está presente. Es un punto a tener en cuenta ya que, si bien la ausencia de este reactivo puede afectar la intensidad de la fluorescencia en relación al producto esperado, podría permitir realizar la reacción en condiciones de limitación de suministros. Dado que hasta este punto se estandarizó la reacción de transcripción *in vitro* utilizando 0,5 U de inhibidor de RNAsas, decidimos seguir utilizando este reactivo en los siguientes ensayos.

4.3 Estandarización de la reacción de ligación entablillada

4.3.1 Determinación del límite de detección

Si bien Ying y cols. (2018) reportan un límite de detección de 10 nM de RNA, los resultados obtenidos utilizando dicha concentración de RNA, demuestran que nos encontramos cerca del límite de detección en las condiciones de reactivos e instrumentos utilizados en esta memoria (**Figura 5**). Con el fin de determinar el límite de detección del método, se realizó la ligación entablillada durante 1 hora a 37°C utilizando el protocolo A de ligación entablillada (**Tabla 2**). Para ello, se aumentó la concentración de gRNA-nsp9-mimic al doble y veinte veces, trabajando así con las siguientes concentraciones finales: 10 nM, 20 nM y 200 nM de gRNA-nsp9-mimic. La condición Ctrl(-)_{LIG} no contenía gRNA-nsp9-mimic y el Ctrl(+)_{TIV} contenía 10 nM de gRNA-nsp9-mimic, 200 nM de oligonucleótido Ctrl(+)-MGA-T7T y no incluía la enzima *SplintR* DNA ligasa en la mezcla de pseudoligación, siendo tratada de igual forma que el resto de las condiciones. La reacción de TIV se efectuó siguiendo el protocolo TIV-B (**Figura 14**).

A diferencia de lo observado en la **Figura 5**, el trabajar con el gRNA-nsp9-mimic 10 nM no se observaron diferencias significativas respecto al control sin RNA blanco (Ctrl(-)_{LIG}) ni el Ctrl(-)_{TIV}. Sin embargo, con gRNA-nsp9-mimic 20 nM se obtuvo un 10,75% de señal de fluorescencia, lo que representa cerca de 2,5 veces la señal de la condición trabajada con 10 nM de RNA blanco. En base a esto, con 20 nM es posible obtener un valor cercano a un 11% de la señal del oligonucleótido control Ctrl(+)-MGA-T7T. Cuando se utilizó 200 nM de gRNA-nsp9-mimic, la señal fue 2,25 veces mayor que el control Ctrl(+)_{TIV}, resultado que se contrapone a lo esperado y que sugiere que el RNA estaría aumentando la eficiencia de la reacción de transcripción *in vitro* o aumentando la fluorescencia del verde de malaquita, o bien ambos efectos en paralelo generando un efecto sinérgico (**Figura 14**).

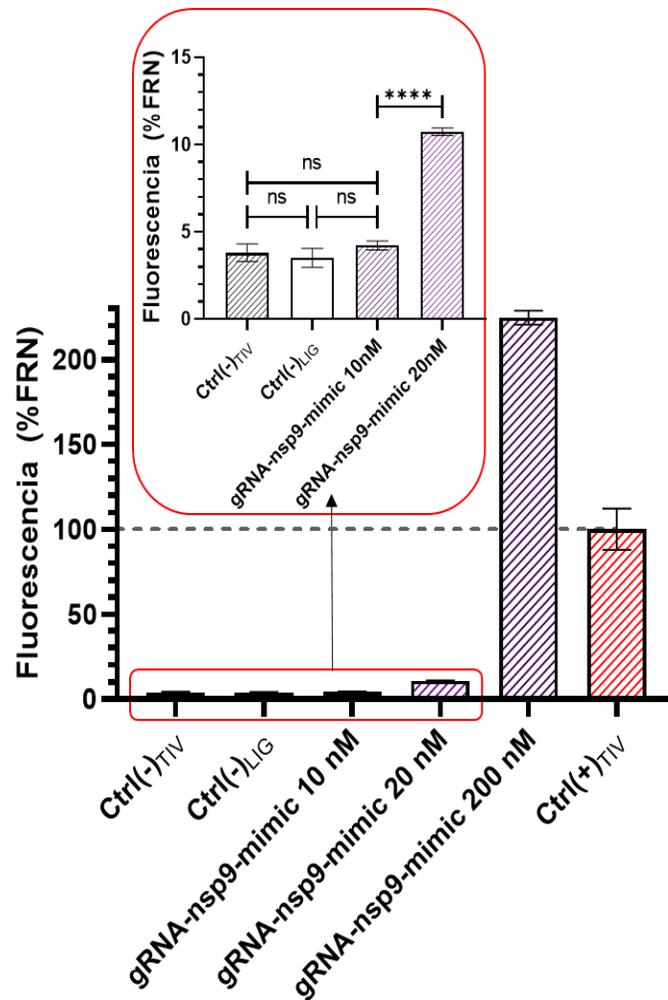


Figura 14. Límite de detección del método. Se presentan los valores de fluorescencia de las muestras sometidas a ligación entablillada en concentraciones crecientes de RNA blanco gRNA-nsp9-mimic, expresadas como porcentajes con respecto al valor promedio de la condición “Ctrl(+)_{TIV}” posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada). El recuadro rojo presenta una ampliación de la escala para las condiciones Ctrl(-)_{TIV}, Ctrl(-)_{UG}, gRNA-nsp9-mimic 10 nM, gRNA-nsp9-mimic 20 nM. **** $p \leq 0,0001$, “ns” indica estadísticamente no significativo ($p > 0,05$), utilizando ANOVA de una vía con test de *Dunnnett* para comparaciones múltiples.

Para las siguientes estandarizaciones, se realizó la ligación entablillada con gRNA-nsp9-mimic a una concentración de 20 nM en la mezcla de ligación, así como en la mezcla de pseudoligación.

4.3.2 Influencia del RNA inespecífico

Como se mencionó, en presencia de concentraciones elevadas de RNA, aparentemente aumentaría la eficiencia de la transcripción *in vitro* (**Figura 14**), o bien aumentaría en la fluorescencia ya sea estabilizando la interacción entre el aptámero y la verde de malaquita, o uniéndose de algún modo de forma inespecífica al verde de malaquita. En consideración a que se propone utilizar este método con muestras que contendrán RNA de los pacientes además del RNA viral, es importante determinar qué efectos genera la presencia de RNA externo en la técnica. Para esto, se realizó la reacción de ligación entablillada de la pareja de oligonucleótidos MGA-nsp9/T7T-nsp9 sin el RNA blanco gRNA-nsp9-mimic (Ctrl(-)_{LIG}) en dos condiciones, suplementado con 400 ng de RNA total humano (RNA Humano (+)) o bien sin RNA humano externo (RNA Humano (-)). De la misma forma, el oligonucleótido Ctrl(+)-MGA-T7T fue preparado en la mezcla de pseudoligación (Ctrl(+)_{TIV}) en presencia o ausencia de RNA humano. Todas las condiciones fueron sometidas al protocolo A de ligación entablillada (**Tabla 2**) e incubadas durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se realizó transcripción *in vitro* de todas las muestras previamente sometidas a la ligación entablillada, empleando el protocolo TIV-B en presencia de 2 ng/μl de RNA humano. Para la preparación del Ctrl(-)_{TIV} se tomó una alícuota de la condición Ctrl(+)_{TIV} RNA Humano (-) a una concentración final de 20 nM de oligonucleótido Ctrl(+)-MGA-nsp9 (**Figura 15**).

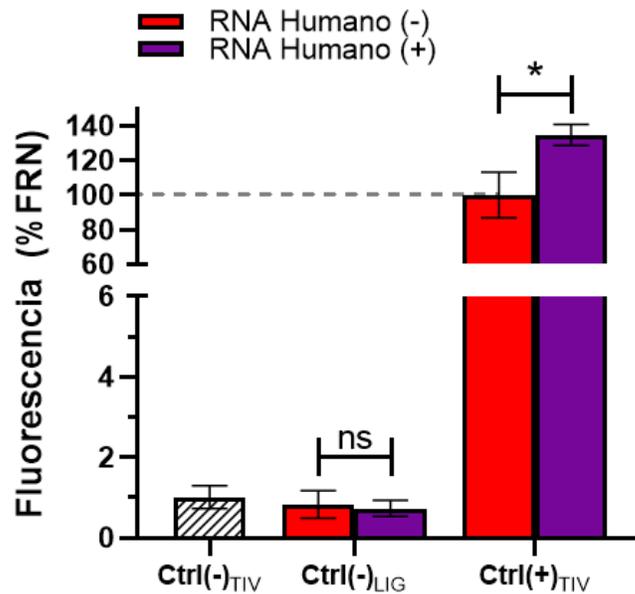


Figura 15. Influencia del RNA externo en los niveles de fluorescencia. Se presentan los valores de fluorescencia de las muestras controles sometidas al protocolo de ligación indicando si fueron suplementadas con RNA total humano (RNA Humano (+)) o no (RNA Humano (-)). Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor promedio de la condición “Ctrl(+)_{TIV} RNA Humano (-)” posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada). * $p \leq 0,05$, “ns” indica estadísticamente no significativo ($p > 0,05$), utilizando *t-test* para datos con distribución normal ($n=3$).

Los resultados muestran que en presencia de 2 ng/ μ l de RNA total humano, el nivel de fluorescencia producida en la TIV aumenta casi un 35% cuando hay síntesis de aptámero (Ctrl(+)_{TIV}), pero no se observa aumento en los niveles de fluorescencia cuando no hay gRNA-nsp9-mimic y, por consiguiente, no existe templado que codifique el aptámero de verde de malaquita (Ctrl(-)_{LIG}). Esto indicaría que la sola presencia del RNA externo no generaría un aumento en los niveles basales de fluorescencia o una ligación inespecífica (**Figura 15**). Los resultados muestran que en presencia de RNA se producen aumentos de la fluorescencia, indicando que el RNA podría mejorar el rendimiento de la reacción de transcripción *in vitro*, o favorecer la interacción del aptámero de verde de malaquita con su blanco. Sin embargo, estos incrementos no son tan grandes como los observados en la **Figura 14**, sugiriendo que existen efectos de la secuencia de los RNA involucrados.

4.3.3 Determinación de la temperatura óptima de ligación

En el protocolo suministrado por el fabricante de la *SplintR* DNA ligasa, si bien indican que la enzima puede catalizar la reacción en el rango de temperaturas de entre 16°C y 37°C, recomiendan realizar los ensayos 25°C. Yings y cols. (2018) sugieren realizar la ligación a 37°C. Con el fin de determinar la temperatura óptima de ligación, se realizaron ligaciones entablilladas en paralelo durante 1 hora a 3 temperaturas: 25°C, 30°C y 37°C, utilizando el protocolo A de ligación entablillada (**Tabla 2**) con 20 nM de gRNA-nsp9-mimic. La condición Ctrl(-)_{LIG} no contenía gRNA-nsp9-mimic y el Ctrl(+)_{TIV} contenía 200 nM de oligonucleótido Ctrl(+)-MGA-T7T pero no *SplintR* DNA ligasa en la mezcla de pseudoligación, siendo tratada de igual forma que el resto de las muestras y en este caso ambas se incubaron a 37°C. La TIV se realizó siguiendo el protocolo TIV-B. Para la preparación del Ctrl(-)_{TIV} se tomó una alícuota de la condición Ctrl(+)_{TIV} preparada y tratada tal cual como una reacción de ligación a concentración final de 20 nM de oligonucleótido Ctrl(+)-MGA-T7T (**Figura 16**).

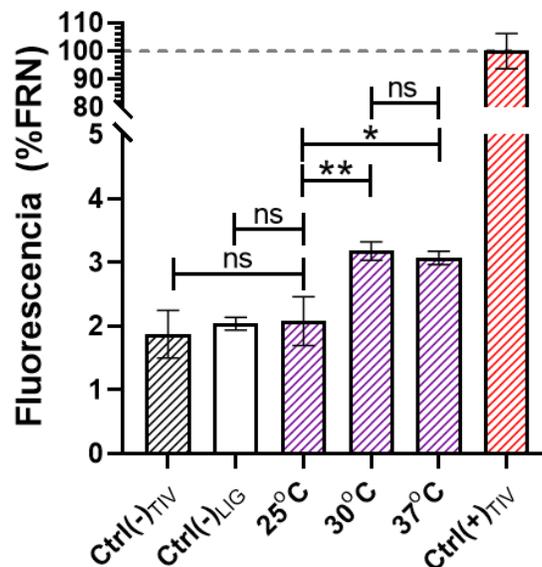


Figura 16. Temperatura óptima de ligación. Se presentan los valores de fluorescencia obtenidos para incubación de ligación entablillada a 3 temperaturas: 25°C, 30°C y 37°C, expresadas en porcentajes con respecto al valor promedio de la condición “Ctrl(+)_{TIV}” posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada). ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, “ns” indica estadísticamente no significativo ($p > 0,05$), usando ANOVA de una vía con test de *Dunnett* para comparaciones múltiples ($n=3$).

Solamente se observa fluorescencia al utilizar temperaturas superiores a los 30°C para la ligación entablillada. Sin embargo, no existe diferencia significativa entre realizar la ligación entablillada a temperaturas de 30°C o 37°C. Ambas señales resultan ser 1,5 veces mayores a las condiciones controles Ctrl(-)_{TIV}, Ctrl(-)_{LIG} (**Figura 16**). En base al resultado obtenido, se optó por seguir realizando la ligación entablillada a 37°C ya que coincide con la temperatura de la transcripción *in vitro*, posibilitando efectuar todo el ensayo a una misma temperatura.

4.3.4. Efectos del tampón de hibridación

Previo a la adición de la enzima *SplintR* DNA ligasa, hay una etapa de hibridación, en la cual las muestras son calentadas a 95°C y luego se enfrían rápidamente en hielo, con el fin de desplegar el RNA, puesto que al perder su estructura terciaria se favorecería la hibridación con los oligonucleótidos a ligar. Para esta etapa, se emplea el tampón de hibridación (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM) (Ying y cols., 2018). Se ha reportado que concentraciones superiores a 100 mM de cationes monovalentes como (Na⁺ o K⁺) pueden inhibir fuertemente la actividad enzimática de la enzima *SplintR*, recomendando concentraciones cercanas o menores a 50 mM (Lohman y cols., 2014). Considerando las sales del tampón de almacenamiento de la enzima *SplintR* (300 mM de NaCl) y el aporte de la solución de hibridación, la mezcla de reacción de ligación presenta 77,5 mM de cationes monovalentes en solución (NaCl 60 mM y KCl 17,5 mM). Por lo tanto, si bien la etapa de hibridación puede mejorar la eficiencia al aumentar el porcentaje de templado que se puede ligar, también puede disminuir la eficiencia de la ligación al aumentar el contenido de iones monovalentes en la reacción. Para evaluar el efecto de ejecutar el paso de hibridación, se realizó la ligación entablillada con 20 nM de gRNA-nsp9-mimic durante una hora pero dispensando de la etapa de hibridación (Hibridación (-)). En este caso, la preparación de las muestras no contempló la adición de tampón de hibridación ni la incubación a 95°C (protocolo B de ligación, **Tabla 3**) para evaluar si el tampón de hibridación afecta el proceso de ligación al formar parte de la mezcla de reacción de ese ensayo (Hibridación (+), protocolo A, **Tabla 2**). Comparativamente y en paralelo, se preparó el oligonucleótido Ctrl-(+)-MGA-T7T en presencia y ausencia de tampón de hibridación en mezcla de pseudoligación para la condición Ctrl(+)_{TIV} a

concentración de 200 nM y tratado de igual forma que la condición correspondiente, para evaluar si dicho tampón tiene incidencia significativa en la posterior transcripción. Se realizó la TIV utilizando el protocolo TIV-B. Para la preparación de las condiciones Ctrl(-)_{TIV} (Hibridación (+) o Hibridación (-)), se tomó una alícuota de la muestra experimental Ctrl(+)_{TIV} asociada a cada condición y se trataron en idénticas condiciones a una reacción de ligación a concentración final de 20 nM de oligonucleótido Ctrl-(+)-MGA-T7T (**Figura 17**).

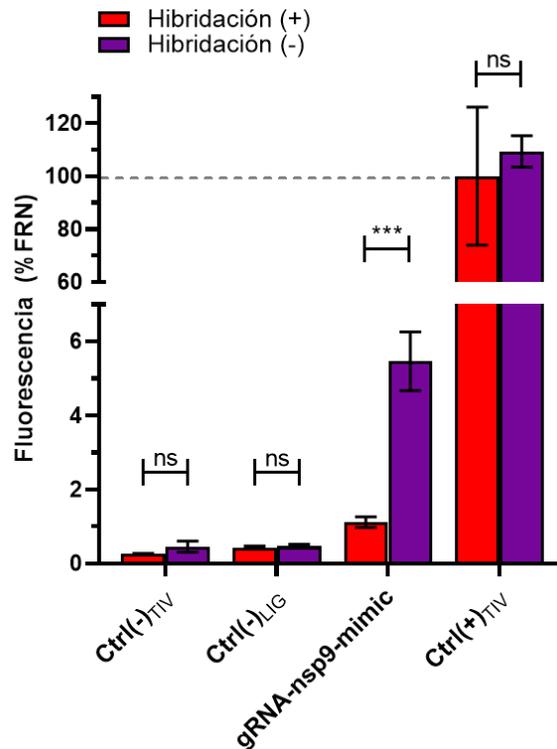


Figura 17. Efectos de la etapa y tampón de hibridación sobre la eficiencia de la ligación y la fluorescencia en transcripción *in vitro*. Se presentan los valores de fluorescencia de las muestras sometidas a la etapa de hibridación (Hibridación (+)) y de las que no fueron sometidas a la etapa de hibridación (Hibridación (-)) en la ligación entablillada, expresadas como porcentajes con respecto al valor promedio de la condición “Ctrl(+)_{TIV} –Hibridación (+)” posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada). $p \leq 0,001$, “ns” indica estadísticamente no significativo ($p > 0,05$), utilizando *t*-test para datos con distribución normal y varianza semejante o *t*-test con corrección de *Welch* para datos con distribución normal y diferentes varianzas (n=3).

Se observa que cuando no se realiza la etapa de hibridación se genera un aumento de cerca de cinco veces en la eficiencia de ligación con respecto a cuándo esta etapa se realiza (gRNA-nsp9-mimic, 5,6% versus 1,1% respectivamente). Además, la presencia del tampón de hibridación no tiene incidencia significativa sobre la transcripción del Ctrl(+)_{TIV}, por lo que el resultado sugiere que la transcripción no se ve afectada por esta etapa (**Figura 17**). Si bien no realizar de esta etapa puede tener beneficios directos en el rendimiento de la ligación, es necesario considerar la importancia de desnaturar el RNA si se pretende llevar a cabo este ensayo con un RNA altamente estructurado. Debido a esto, es necesario evaluar el aporte del tampón de almacenamiento de la enzima *SplintR*.

4.3.5 Determinación de la concentración óptima de *SplintR* DNA ligasa

Como se mencionó, la enzima se comercializa en un tampón de almacenamiento que contiene 300 mM de NaCl. Para trabajar con un máximo de 50 nM de NaCl, el proveedor (NEB) recomienda trabajar con concentraciones de enzima menores a 1,05 μ M. En este trabajo, basados en lo recomendado en Yings y cols (2018) se ha utilizado hasta este momento el doble de esta concentración (2,1 μ M) para la reacción de ligación entablillada. Para evaluar si disminuyendo la concentración de la enzima mejora el rendimiento de la ligación entablillada al disminuir el contenido de sal, ésta se realizó durante 1 hora utilizando 20 nM de gRNA-nsp9-mimic y las siguientes concentraciones de *SplintR* DNA ligasa: 2,01 μ M, 1,05 μ M y 0,525 μ M. La preparación de las condiciones Ctrl(-)_{LIG} no contempló la adición de RNA blanco. La preparación de las muestras tampoco contempló la adición de tampón de hibridación, ni fueron calentadas a 95°C (protocolo B de ligación, **Tabla 3**). En paralelo, se utilizó el oligonucleótido Ctrl-(+)-MGA-T7T en la mezcla de pseudoligación para la condición Ctrl(+)_{TIV} a concentración de 200 nM, sometiénolo a los mismos procedimientos que las muestras experimentales. La TIV se realizó utilizando el protocolo TIV-B. Para la preparación de la condición Ctrl(-)_{TIV}, se tomó una alícuota de la condición Ctrl(+)_{TIV} asociada a cada condición que fue preparada y tratada como una reacción de ligación a concentración final de 20 nM de oligonucleótido Ctrl-(+)-MGA-T7T (**Figura 18**).

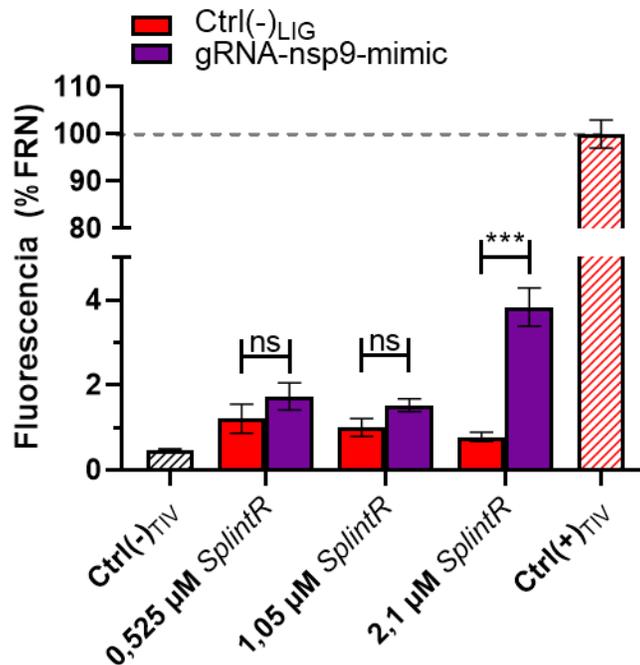


Figura 18. Ligación entablillada a distintas concentraciones de enzima *SplintR* DNA ligasa. Se presentan los valores de fluorescencia de las ligaciones realizadas a distintas concentraciones de *SplintR* DNA ligasa (0,525 µM, 1,05 µM y 2,01 µM), expresadas como porcentajes con respecto al valor promedio de la condición “Ctrl(+)_{TIV}” posterior a 2 horas de iniciada la transcripción *in vitro* (línea gris segmentada).*** $p \leq 0,005$, “ns” indica no significativo ($p > 0,05$), utilizando *t-test* para datos con distribución normal o test no paramétrico U de *Mann-Whitney* para datos que no presentan distribución normal (n=3).

A pesar de trabajar con el doble de la concentración de enzima recomendada (por ende 10 nM de cationes monovalente por encima de lo recomendado), los resultados muestran que al disminuir la concentración de *SplintR* DNA ligasa no hay aumento en el rendimiento de la ligación entablillada, si no por el contrario, no se observa la formación de aptámero mediante detección de fluorescencia. Al utilizar 0.525 µM y 1,05 µM los valores resultaron ser similares entre sí (1,7% y 1,5%, respectivamente), pero representan una disminución de aproximadamente 2,3 veces respecto a la señal obtenida al utilizar 2,1 µM de enzima (3,8%) (**Figura 18**).

Si bien mejoró el rendimiento de la ligación al obviar de la etapa de hibridación, no fue posible evidenciar mejoras en el rendimiento cuando se reduce la concentración de enzima. Actualmente nuestro método presenta un límite de detección de 20 nM, siendo el doble de lo reportado por Ying y cols, (2018).

Habiendo probado la influencia de la temperatura, son pocas las variables que puedan inducir una mejora en el límite de detección, como lo son el tiempo de ligación o variar la concentración de oligonucleótidos, en los que el aumento en cualquiera de esos factores iría en contra del objetivo inicial de este proyecto de memoria de título. Finalmente, en consideración de los resultados obtenidos, no se logró aumentar la sensibilidad del método, obteniendo como límite de detección 20 nM de RNA blanco. Si bien se logró aumentar la diferencia entre los controles negativos y las condiciones experimentales al excluir el tampón de hibridación, ésta nunca logró ser más allá de un 6% la intensidad obtenida con el control positivo Ctrl-(+)-MGA-T7T. Debido a estas limitaciones, se presenta una alternativa relativamente más sencilla y económica para el empleo de la ligación entablillada y posterior transcripción *in vitro* propuesto por Ying y cols (2018). A continuación, se discutirán las posibles optimizaciones del método.

5. DISCUSIÓN

5.1 Biosensores fluorescentes basados en la tecnología de aptámeros

En el último tiempo, el empleo de aptámeros ha ido ganando terreno para la detección de moléculas ya que su afinidad y selectividad por su blanco resulta comparable con los anticuerpos, además poseen ventajas de un diseño más sencillo, mayor estabilidad térmica, menor tamaño y química más versátil (Keefe y cols, 2010). Debido al amplio abanico de blancos que presentan y a las propiedades intrínsecas de dichas moléculas, los métodos de detección del blanco pueden ser electroquímicos, ópticos, colorimétricos, sensibles a masa o fluorescentes. Los métodos basados en fluorescencia deben su popularidad a su fácil manipulación y alta sensibilidad (Sun y cols., 2018). Estos biosensores fluorescentes pueden dividirse en dos clases: con etiqueta (*labeled*) o sin etiqueta (*label-free*). Los biosensores con etiqueta requieren de un fluoróforo y/o un apagador (*quencher*) unido covalentemente al aptámero, lo que resulta laborioso, aumentando los tiempos y costos de producción. Si bien esta tecnología se basa en que la unión del blanco induzca un cambio en la estructura del aptámero y esto altere la “transferencia de energía de resonancia de fluorescencia” (FRET), la presencia del fluoróforo y/o el apagador puede generar que el aptámero pierda afinidad por la molécula blanco (Wang y cols., 2011). Por otra parte, los biosensores fluorescentes sin etiqueta evidentemente no requieren de modificaciones covalentes en los ácidos nucleicos utilizados como aptámeros y su fluorescencia radica en las propiedades intrínsecas de la molécula blanco, que en combinación con la unión a motivos o estructuras específicas presentes en los ácidos nucleicos generan un incremento en la fluorescencia, como es el caso de tinciones orgánicas e intercalantes (Xu y Li, 2011; Sun y cols., 2018).

Actualmente existen diversas técnicas que permiten la detección de ácidos nucleicos (principalmente de miRNA) al inducir la formación del aptámero de verde de malaquita en presencia de su blanco. Para ello, existen diferentes estrategias. Una de éstas, consiste en el empleo de dos sondas de RNA, las que forman el MGA al hibridar de forma contigua sobre el RNA blanco (Kolpashchikov, 2005). Otra estrategia corresponde a los denominados “*malaswitches*” (malainterruptores) para la detección de miRNA. Estos aptámeros están basados en los

ribointerruptores. En ellos se modifica la secuencia del *loop* del MGA, agregando una secuencia complementaria al miRNA para que no se una el verde de malaquita. Cuando esta secuencia hibrida con la secuencia blanco, induce un cambio en la estructura secundaria que estabiliza el aptámero permitiendo que una al verde de malaquita (Sett y cols., 2020).

En contraste con los métodos descritos, que dependen en la detección directa del RNA blanco, otros grupos han diseñado sistemas basados en la amplificación de un aptámero fluorescente mediante transcripción *in vitro*. Para ello, se diseña un oligonucleótido de DNA que hibride en el extremo 3' del miRNA blanco. Róo arriba de la zona de hibridación, el oligonucleótido presenta el promotor de la RNA polimerasa T7 y la secuencia que codifica el aptámero de verde de malaquita. Al formarse el híbrido miRNA- oligonucleótido DNA, se realiza una amplificación utilizando la DNA polimerasa *Bst* la que utiliza el miRNA como primer. De este modo se obtiene un dsDNA que posee el promotor doble hebra funcional de la RNA polimerasa T7 que permite transcribir el aptámero de verde de malaquita (Wang y cols., 2018). Otra alternativa es el empleo de oligonucleótidos ssDNA circulares que codifiquen el MGA, diseñados de tal forma que el sitio de empalme que contiene la secuencia complementaria al miRNA blanco, hibride parcialmente con el promotor T7 ocluyendo parte de éste. En presencia del miRNA blanco se favorece la hibridación de este RNA con el sitio de empalme, dejando el promotor libre para que en presencia de la secuencia complementaria al PT7 se inicie la transcripción *in vitro* (*promotor switch*). Al ser circular, este templado genera la transcripción de repeticiones en tándem del aptámero de verde de malaquita, mediante transcripción en círculo rotatorio (RCT) (Li y cols., 2015).

Otra técnica corresponde a la obtención del templado que codifique el MGA regulado por el promotor T7 mediante la ligación de oligonucleótidos de DNA específicos por ligación entablillada (Yings y cols., 2018), método en el cual se basa esta memoria de título. En una variante de esta estrategia, se ha reportado también el empleo de solo un oligonucleótido que en sus extremos posea las secuencias que hibriden con la secuencia blanco. La ligación entablillada de este oligonucleótido genera un templado circular que codifica el MGA el cual puede ser amplificado mediante repeticiones en tándem a través de RCT (Furukawa y cols., 2008).

Basado en la tecnología de aptámeros fluorescentes, el objetivo de esta de memoria de título fue adaptar las reacciones que comprenden el método de Ying y cols. (2018) para la detección de RNA genómico del virus SARS-CoV-2, mediante un método libre de DNA polimerasas y que fuera simple de implementar.

5.2 Optimización de la Reacción de ligación entablillada

5.2.1 Rendimiento inicial de la ligación entablillada

En un principio no fue posible detectar fluorescencia cuando se realizaba la ligación durante 15 minutos replicando los tiempos sugeridos en Ying y cols. (2018) por lo que se debió extender los tiempos de ligación entablillada a 1 hora. En dicho ensayo al utilizar 10 nM de gRNA-nsp9-mimic y durante 1 hora de ligación, la señal se encontraba cerca del nivel del ruido (**Figura 5A**). Posteriormente al evaluar la sensibilidad del método, se determinó que al menos en ese ensayo, no fue posible detectar señal a los 10 nM de gRNA-nsp9-mimic, pero sí para 20 nM (**Figura 14**).

Uno de los grupos de investigación que proponen la utilización de la enzima *SplintR* DNA ligasa para la detección de miRNA obtuvieron resultados similares al utilizar 10 nM de RNA blanco, indicando que la eficiencia de la ligación se podría ver afectada por la hibridación inespecífica de los oligonucleótidos, resultando en ligación inespecífica (Wee y Trau, 2016). Sin embargo, mediante PCR convencional, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que no existe ligación inespecífica, ya que no hay aparición de bandas correspondientes a los productos de ligación y todos los productos amplificados, también están presentes en los carriles correspondientes al oligonucleótido control Ctrl(+)_{TIV} a su respectivo tamaño molecular. La aparición de bandas que no corresponden a 92 pb aproximadamente (como las obtenidas aproximadamente de 75 pb), pueden deberse a los tiempos de extensión utilizados (30 segundos) o a la alta concentración del templado, lo que favorece la unión a sitios inespecíficos (**Figura 5B**).

Sin considerar los errores que son inherentes al trabajo en laboratorio, se presentan variables que podrían afectar el rendimiento de la ligación entablillada: ligación inespecífica, identidad de las bases en los extremos que se pretende ligar y el tampón de hibridación (o su concentración de cationes monovalentes). Si bien nuestros bajos rendimientos de ligación no parecen ir en la

línea de una posible ligación inespecífica, se debe tener en cuenta los factores modificables en vista del diseño del método.

5.2.2 Proteínas SSB

Uno de los componentes de reacción que se decidió no utilizar debido a que implicaría un aumento en los costos por reacción y en el número de reactivos, corresponde a las proteínas SSB, las cuales son utilizadas en el método de ligación entablillada para detección de miRNA propuesto por Wee y Trau (2016), donde se demuestra un aumento del rendimiento en las ligaciones cuando se añaden estas proteínas. Se ha demostrado que las proteínas SSB pueden mejorar la eficiencia de PCR por estabilización de sustratos mono hebra (Rapley, 1994), también se ha reportado la mejora en los rendimientos de ligaciones catalizadas por la DNA ligasa T4 (Troll y cols., 2019). Además, estas proteínas son utilizadas en un método de ligación entablillada recientemente publicado basado en el método de Ying y cols.; 2018, el cual será discutido más adelante (Woo y cols., 2020). Por consiguiente, no emplear estas proteínas puede generar una disminución en el costo total, pero podría tener efectos en el rendimiento de la ligación, lo que vimos reflejado al menos parcialmente en los resultados presentados.

5.2.3 Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos, se indica que el sitio de hibridación debe ser de al menos 20 nt y que el rendimiento de la reacción aumenta a medida que aumenta el largo del sitio de hibridación, evaluado entre 20 nt y 50 nt (Lohman y cols., 2014). Además, se reporta que la reacción es más eficiente cuando se emplean oligonucleótidos de 24 pb (largo total del oligonucleótido) respecto a utilizar oligonucleótidos de 30 pb (Wee y Trau 2016). Otro factor a considerar en el diseño de los oligonucleótidos es la influencia de la identidad de las bases en los extremos 3' y 5' que son ligados, ya que se reportó el rendimiento de ligación de las 16 posibles combinaciones de bases que formen parte de los extremos que se pretenden ligar. El menor rendimiento en la ligación ocurre cuando se emplea la pareja G-3'/5'-G y G-3'/5'-C y se obtiene el mejor rendimiento cuando se emplea la pareja de bases T-3'/5'-A (Lohman y cols., 2014).

En esta memoria de título se utilizó un sitio de empalme de un largo total de 24 nt (12 nt abarcados por cada oligonucleótido). No obstante, nuestros oligonucleótidos poseían un tamaño de 38 nt y 54 nt (T7T-nsp9 y MGA-nsp9). En el oligonucleótido T7T-nsp9, el promotor T7 abarca un mínimo de 18 nt, mientras que en MGA-nsp9 la secuencia que codifica el MGA posee 38 nt. Por lo tanto, sumado a la secuencia de empalme para cada oligonucleótido se estaría excediendo el número de nucleótidos recomendado por Wee y Trau (2016) para cada oligonucleótido y disminuir esta cantidad no sería una opción. La pareja de bases en los oligonucleótidos diseñados que formarán parte de los extremos que se pretende ligar corresponden a G-3'/5'-G, lo que explicaría en parte los bajos rendimientos obtenidos en nuestros ensayos. Es meritorio el análisis de las 16 posibles combinaciones de bases para evidenciar el comportamiento de la reacción en las condiciones en las cuales nos encontramos trabajando. Además, experimentos realizados por otros miembros del grupo de investigación, en los cuales se modificó el sitio de ligación y se utilizó la pareja T-3'/5'-A, mostraron un importante aumento en la eficiencia de la reacción de ligación. Estos resultados demuestran el impacto que tienen los cambios en la pareja de nucleótidos a ligar, pudiendo mejorar el rendimiento de la ligación en las condiciones trabajadas.

5.2.3 Etapa de hibridación previa

Al estudiar la influencia del tampón de hibridación sobre el rendimiento de la ligación, se observó que aumentaba cerca de 5 veces cuando no se utiliza este tampón. Probablemente, este aumento se pueda atribuir a la disminución de la concentración de cationes monovalentes en la reacción, que en la mezcla original alcanzaba los 77,5 mM (**Figura 17**). Como se comentó, en la literatura se describe mención a la importante inhibición que ocurre al elevar las concentraciones de cationes monovalentes por sobre los 50 mM cuando se utiliza la enzima *SplintR* DNA ligasa (Lohman y cols., 2014) por lo que parte del rendimiento de nuestra reacción se pudo haber visto mermado por el uso del tampón de hibridación.

Eliminar el uso del tampón de hibridación que comprende calentar las muestras durante 3 minutos a 95°C cuando la mezcla de ligación aún no está completa, y por ende no utilizar el tampón de hibridación, nos presenta tres ventajas en la realización del ensayo: menos reactivos necesarios, menos pasos involucrados, lo que facilita la preparación y tratamiento de las muestras

y eliminar una de las 2 etapas que requiere ser realizada a 95°C. No obstante, al pretender trabajar con muestras de RNA total, o el mismo gRNA viral, hay que considerar que éstos son altamente estructurados. El gRNA viral forma horquillas que presentan un contenido G+C elevado, generando una estructura termodinámicamente estable que dificulta o impide la interacción con DNA. Alternativamente, debido a su plegamiento, se forma una estructura terciaria tal que el sitio blanco se encuentre oculto (Fratczak y cols., 2009; Strobel y cols., 2018). Por ello es importante considerar la estructura del RNA en la elección del sitio blanco, así como la necesidad de la etapa de hibridación. Otra alternativa sería disminuir la concentración de sales presentes en el tampón de reacción suministrado con la enzima o bien, en el tampón de almacenamiento. Esto nos permitiría efectuar la etapa de hibridación a bajas concentraciones de cationes monovalentes.

No obstante, es necesario evaluar los rendimientos de ligación en muestras de RNA totales sin el empleo del tampón de hibridación, o bien que la preparación no contenga el KCl 50 mM. Esto último, debido a si se pretende calentar a 95°C se debe considerar que el RNA tiende a hidrolizarse a temperatura elevadas y a pH alcalinos. Por eso que esta solución debe estar tamponada con Tris-HCl en conjunto con el empleo de EDTA, el cual impide que el Mg^{2+} catalice la degradación del RNA, al secuestrar éste y otros cationes divalentes (El-Ashram y cols., 2016; Jin y cols., 2018). Existe la alternativa del empleo de dimetil sulfóxido (DMSO) o polietilenglicol (PEG) en concentraciones de entre 1-8% debido a que pueden generar la desestructuración del RNA, además de mejorar el rendimiento de enzimas que catalizan reacciones de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se ha observado que estos agentes mejoran el rendimiento de las ligaciones catalizadas por la DNA ligasa T4 (Pheiffer y Zimmerman, 1983; Kestemont y cols., 2018).

5.2.4 Concentración óptima de enzima SplintR y temperatura de ligación

En los protocolos informados por Wee y Trau (2016) y Jins y cols. (2016), se indica que es posible cuantificar mediante qPCR del producto de ligación para templados RNA:DNA, de reacciones de ligación entablillada llevadas a cabo a 16°C, 25°C y 37°C. En nuestro caso resultó ser indetectable el aumento en la fluorescencia realizando ligaciones a 25°C, mientras que al realizar la reacción a 30°C o 37°C sí fue posible detectar un aumento, aunque no se observaron diferencias significativas entre ambas temperaturas (**Figura 16**). Lo anterior es coherente con lo reportado

por Lohman y cols (2014), quienes indican que la temperatura óptima es de 37°C; sin embargo, los mismos autores recomiendan usar 1,05 μM como máximo de la concentración de enzima. Nuestros mejores resultados fueron obtenidos empleando 2,1 μM de dicha enzima tal como se indica en Ying y cols. (2018). Si bien, se desea diseñar un método isotérmico el factor temperatura no sería modificable, por lo que valdría la pena evaluar la concentración de enzima, después de optimizar el diseño de oligonucleótidos en base a los criterios discutidos previamente.

5.3 Optimización de la reacción de transcripción *in vitro*

A pesar que no pudimos generar cambios sustanciales en la reacción, se generó un protocolo para la producción y detección del aptámero de verde de malaquita mediante transcripción *in vitro*, el cual presenta alternativas para el seguimiento de la reacción, detención de la misma o bien rango de concentraciones de PT7 en el cual es posible realizar la reacción, donde la elección de cómo realizar el método dependerá de la disponibilidad de reactivos o del factor monetario.

5.3.1 Transcripción *in vitro* en tiempo real en presencia de verde de malaquita.

En las condiciones ensayadas, se presenta la alternativa del seguimiento en tiempo real de la reacción de transcripción *in vitro* en presencia de verde de malaquita 10 μM (**Figura 6**), confirmando lo informado en Furukawa y cols. (2008). El protocolo propuesto facilita la preparación de las muestras, permite seguir la reacción en tiempo real y evita la manipulación innecesaria de los tubos posterior a la reacción, lo que podría generar variación entre muestras. Esto claramente tiene la ventaja de poder acortar o alargar los tiempos de reacción, sin necesidad de manipular la muestra, pudiendo monitorear la aparición de producto incluso antes de las 2 horas.

Observamos además que no es necesario aumentar la concentración de verde de malaquita por sobre 10 μM , ya que duplicar la concentración no se visualizó un aumento proporcional en la fluorescencia, al menos cuando se realizaron las mediciones a las 2 horas. Por otra parte, se demostró que no se presentan diferencias significativas en los niveles de fluorescencia inducidos por el contraíón del verde de malaquita, ya sea al utilizar cloruro de verde de malaquita u oxalato

de verde de malaquita. Por esta razón lo que la decisión de cuál elegir va a depender del costo del reactivo (**Figura 7**).

5.3.2 Concentración de PT7

Si bien en el método de referencia se indica 500 nM de oligonucleótido PT7, pero nosotros mostramos que se puede utilizar un rango de concentraciones más amplio de este oligonucleótido (100 nM-1000 nM, con una K_m de aproximadamente 257 nM), aunque esto impacta la eficiencia de producción de MGA (**Figura 8**). Cabe destacar que una posible alternativa consiste en añadir una secuencia *linker* y la secuencia complementaria PT7 que ríe abajo de la secuencia T7T en el mismo oligonucleótido, para la formación de una horquilla que genere el promotor doble hebra (Woo y cols., 2020). Al ser una formación de doble hebra intramolecular, se aseguraría que un porcentaje importante del templado tuviera un promotor funcional.

5.3.3 Opcionalidad del empleo de Inhibidores de RNasas

Se comprobó que el empleo de 0,5 U de inhibidor de RNasas puede ser opcional (**Figura 13**). Aun así, consideramos que en un laboratorio clínico es recomendable su utilización, además de trabajar siempre en condiciones libres de RNasas para evitar la degradación del RNA en la muestra y disminuir la probabilidad de falsos negativos. Se ha reportado que el ácido polivinilsulfónico puede actuar como inhibidor de RNasas de bajo costo, sin afectar los rendimientos de reacciones de transcripción *in vitro* (Earl y cols., 2018). El uso de este reactivo podría ser una alternativa con el fin de reducir costos sin afectar la integridad del RNA por ausencia de inhibidores de RNasas. Sin embargo, no hemos probado los efectos de este compuesto sobre la ligación y la transcripción *in vitro*.

5.3.4 Detención de la transcripción *in vitro*

Dado que muchos laboratorios no cuentan con suficiente equipamiento para medir la generación de fluorescencia en tiempo real, se buscaron alternativas que permitan la detención de la reacción. Esto se ensayó mediante el empleo de AcONH_4 a una concentración final de 0,5 M. Esto permite la realización de un gran número de ensayos que se pueden detener para medir

posteriormente. Si bien nuestros datos muestran que existe una disminución de aproximadamente un 40% en los niveles de fluorescencia previo a la adición de AcONH_4 (**Figura 11**), estos valores mantienen estables por durante al menos 3 horas (**Figura 12**) lo que permitiría comparar reacciones que no se realizaron simultáneamente.

5.3.5 Efectos del aumento del RNA en reacción

Los resultados más inesperados se obtuvieron cuando se utilizó la concentración de 200 nM de gRNA-nsp9-mimic. La fluorescencia resultó ser aún mayor que la del $\text{Ctrl}(+)_{\text{TIV}}$ (oligonucleótido $\text{Ctrl}(+)\text{-MGA-T7T}$), resultado que en un inicio era sugerente de que la transcripción *in vitro* resultaba más eficiente a medida que aumentaba la concentración de RNA total (**Figura 14**). Cuando la TIV se efectuó en presencia de 2 ng/ μl de RNA total humano en la reacción de transcripción, los resultados mostraron un aumento cercano al 40% en la intensidad de fluorescencia a las 2 horas con respecto al control $\text{Ctrl}(+)_{\text{TIV}}$ sin RNA externo. Esto no era un resultado esperado en el contexto de otros resultados, significaría que concentraciones elevadas de RNA en el sistema generarían un aumento en la fluorescencia del verde de malaquita o en la eficiencia de la transcripción *in vitro*.

El verde de malaquita se une a su aptámero en el bolsillo de unión que contiene una tétrada específica G-A-G-C y además, requiere otras bases que interaccionen con los anillos aromáticos. Se ha descrito que puede unirse a ciertas estructuras conformadas por una tétrada de guaninas (4Gs) o en estructuras formada por el apilamiento de las tétradas de guanina, conocidas como cuádruplex-G (GQs). Estas son 4Gs un motivo común en los aptámeros inductores de fluorescencia (Trachman III y Ferré-D'Amaré, 2019). El verde de malaquita incluso puede unirse a DNA monohebra con secuencias ricas en guanina que forman dichos GQs, donde la unión del verde de malaquita genera la estabilización de esta conformación aumentando la temperatura de *melting* (Uda y cols., 2017).

Las tétradas y los cuádruplex de guanina son estructuras no canónicas formadas en DNA o RNA por cuatro guaninas que interacción mediante el apareamiento *Hoogsten*. Se ha discutido y cuestionado la formación y función *in vivo* de estas estructuras para el caso de los RNA.

Actualmente se ha documentado y validado su existencia y formación *in vitro*. Estas estructuras pueden formarse por una sola cadena de ácidos nucleicos (intermolecular), o por interacciones con otras cadenas (intramolecular) (Banco y Ferré-D'Amaré, 2021). En consideración a la heterogeneidad de transcritos en extractos de RNA total, es posible que transcritos presenten secuencias que formen los 4Gs o GQs. Por ende, sugiriendo que el verde de malaquita se uniría a una población de RNA que potencialmente formen estas estructuras, independientemente de la presencia del aptámero de verde de malaquita.

El aumento de la fluorescencia evidenciado cuando se realiza la transcripción del templado Ctrl-(+)-MGA-T7T en presencia de 40 ng de RNA total podría ser respondido por la presencia hipotética de estructuras 4Gs o GQs, sería esperable que este RNA externo genere un aumento en los niveles basales de fluorescencia. Sin embargo, este evento no ocurrió en los controles negativos (Ctrl(-)_{LIG}) de dicho ensayo, por lo que el RNA humano por sí solo no estaría generando el aumento de la fluorescencia ni actuando como tablilla para ligación inespecífica (**Figura 15**). Por otra parte, al realizar la ligación con 200 nM de gRNA-nsp9-mimic se obtuvo incluso mayor fluorescencia que la correspondiente al Ctrl(+)_{TIV} (**Figura 14**). Aparentemente el único factor común en estos resultados de TIV pareciera ser el aumento de cantidad total de RNA en solución.

El aumento de la cantidad de macromoléculas, en este caso de RNA, en un mismo volumen reduce el espacio físico donde puede existir cada molécula (volumen excluido) y la disponibilidad del solvente, alterando el equilibrio entre RNA estructurado y RNA no estructurado, favoreciendo el plegamiento del RNA (Kilburn y cols., 2010). El aumento de las macromoléculas en condiciones *in vitro* genera un efecto que imita el *crowding* molecular, alterando la viscosidad local alrededor de las macromoléculas (microviscosidad), disminuyendo las necesidades salinas para la formación de estructuras y estabilizando estas mismas (Fiorini y cols., 2015; DasGupta, 2020).

En la literatura se reporta que la fluorescencia del verde de malaquita puede ser afectada directamente por la viscosidad del medio, pues el aumento de la viscosidad reduce la libertad rotacional de los anillos aromáticos, impidiendo la desexcitación vibracional, aumentando su fluorescencia, lo que incluso se está utilizando como sensor de viscosidad local (Funada y cols., 2015, Trachman y cols, 2017). Además, se ha reportado que el aumento de la

viscosidad genera el incremento en la tasa de polimerización de la RNA polimerasa T7, en concentraciones entre 5%-30% de glicerol; por el contrario, concentraciones cercanas al 50% de glicerol reducen la tasa de polimerización luego de una hora de reacción (Moon y cols., 2021).

De esta forma, una posible explicación al aumento de los niveles de fluorescencia frente al aumento de la concentración de RNA en el sistema, sería que el aumento de este RNA en solución podría generar un efecto sinérgico: favoreciendo la estructuración y formación de tétradas que puedan unir al verde de malaquita (en el caso del RNA externo), estabilizando la interacción entre el verde de malaquita y el MGA, mejorando los rendimientos de la transcripción *in vitro*. Ésta es una hipótesis aventurada que requiere de mucho más análisis, pero resulta interesante al considerar el potencial empleo que tiene el aptasensor de verde de malaquita para detección en clínica.

5.4 Factibilidad del empleo de aptasensores fluorescentes en clínica

Cabe destacar que al momento de desarrollar esta memoria de título (abril-diciembre 2020), no existían métodos publicados que apuntaran a la detección de SARS-CoV-2 utilizando aptámeros fluorescentes mediante ligación entablillada y posterior transcripción *in vitro*. El día 4 de diciembre de 2020 se publicó un artículo basado en el método Ying y cols (2018) con una propuesta similar a la de este trabajo, aunque con algunas diferencias (Woo y cols., 2020). Al igual que en Ying y cols. (2018), en el artículo mencionado se emplean dos oligonucleótidos de DNA, pero en la construcción que se encuentra el promotor de la RNA polimerasa T7, se extiende esta región añadiendo un *linker* y la secuencia complementaria al promotor (equivalente al oligonucleótido PT7 de este trabajo). La adición de esta secuencia a la construcción permite la generación de una horquilla para formar así directamente el promotor T7 de doble hebra. Otra de las optimizaciones que reportan es la realización de la ligación entablillada de los oligonucleótidos y posterior transcripción *in vitro* en paralelo (acoplada) en el mismo volumen de reacción, lo que reduce considerablemente los tiempos necesarios. Finalmente, los investigadores reportan la factibilidad de su técnica en la detección directamente en muestras clínicas con solo un tratamiento previo de lisis térmica o química, pero sin extracción de RNA con un límite de detección del orden de los aM (Woo y cols., 2020).

En esta memoria de título se barajaron varias de las alternativas previamente descritas, como la amplificación mediante RCT, la realización de las reacciones acopladas, o la formación del promotor T7 doble hebra mediante la generación de una horquilla; pero creíamos primordial el conocimiento y optimización de ambas reacciones por separado para luego explorar ambas reacciones en conjunto. Existen diversas posibilidades de optimización del método descrito, pero en vista del avance de la pandemia, se necesitan métodos altamente sensibles para la detección de RNA genómico. Creemos que en base a los antecedentes discutidos, se presenta una optimización o bien una alternativa relativamente más sencilla al método descrito por Ying y cols (2018), que no requiere de purificaciones posteriores a la transcripción *in vitro*, con un límite de detección de 20 nM equivalente a 6.022×10^{14} copias del RNA por ml. Aún estamos lejos del límite de detección del RT-qPCR, cercano a 100 copias de RNA viral por ml (Arnaut y cols., 2020) o del método de Woo y cols. (2020) del orden de lo aM.

5.5 Proyecciones

Los resultados obtenidos en esta memoria de título en conjunto con la revisión bibliográfica desarrollada en la discusión, presentan la oportunidad de optimización del método propuesto. La optimización de esta metodología puede permitir ampliar su empleo en la detección de diversos tipos de RNA, como por ejemplo mRNA o tRNA y no solo gRNA o RNA pequeños. Cabe destacar, por ejemplo, la producción de cDNA mediante transcripción inversa de los tRNA resulta ser deficiente debido a su estructura y especialmente debido a las modificaciones post-transcripcionales de los mismos (Zheng y cols., 2015). Por ello, este método podría presentarse como una alternativa para la detección de estos ácidos nucleicos. Además, considerando de que la enzima *SplintR DNA ligase* puede ligar fragmentos de DNA cuando otra hebra ssDNA actúa como tablilla (Takahashi y cols., 2018), es posible extender el uso de esta metodología a la detección de DNA. Finalmente, el empleo de tablillas sintéticas permite la generación de sondas, la adición de etiquetas o adaptadores a secuencias de interés de DNA.

6. CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados en esta memoria de título:

- Se estandarizó las condiciones de transcripción *in vitro*, generando un protocolo de reacción que permite el monitoreo de la producción del aptámero de verde de malaquita en tiempo real y detención de la reacción.
- Se estandarizó la reacción de ligación entablillada, alcanzando un límite de detección de 20 nM de RNA blanco. No utilizar el tampón de hibridación en la mezcla de reacción permite aumentar en aproximadamente 5 veces los niveles de fluorescencia
- Se logró generar un método de detección de RNA independiente de DNA polimerasa y transcriptasa inversa, que debido a su límite de detección alcanzado es difícilmente aplicable en el área clínica. No obstante, reportes en la bibliografía indican que es posible disminuir los límites de detección mediante la optimización del diseño de oligonucleótidos de DNA y la realización de reacciones acopladas.

7. REFERENCIAS

- Adachi, T., & Nakamura, Y. (2019).** Aptamers: A review of their chemical properties and modifications for therapeutic application. *Molecules*, 24(23), 4229-4242.
- Ahn, D. G., Shin, H. J., Kim, M. H., Lee, S., Kim, H. S., Myoung, J., Kim S. J., & Kim, S. J. (2020).** Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Journal of microbiology and biotechnology*, 30(3), 313-324.
- American Society For Microbiology. (2021).** Supply Shortages Impacting COVID-19 and Non-COVID Testing. <https://asm.org/>. Recuperado de: <https://asm.org/Articles/2020/September/Clinical-Microbiology-Supply-Shortage-Collecti-1>.
- Arnaut, R., Lee, R. A., Lee, G. R., Callahan, C., Yen, C. F., Smith, K. P., Arora, R., & Kirby, J. E. (2020).** SARS-CoV2 Testing: The Limit of Detection Matters. *bioRxiv*: [2020.06.02.131144](https://doi.org/10.1101/2020.06.02.131144).
- Babendure, J. R., Adams, S. R., & Tsien, R. Y. (2003).** Aptamers switch on fluorescence of triphenylmethane dyes. *Journal of the American Chemical Society*, 125(48), 14716-14717.
- Banco, M. T., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2021).** The emerging structural complexity of G-quadruplex RNAs. *RNA*, 27(4), 390-402.
- Baugh, C., Grate, D., & Wilson, C. (2000).** 2.8 Å crystal structure of the malachite green aptamer. *Journal of molecular biology*, 301(1), 117-128.
- Beltrán-Pavez, C., Márquez, C. L., Muñoz, G., Valiente-Echeverría, F., Gaggero, A., Soto-Rifo, R., & Barriga, G. P. (2020).** SARS-CoV-2 detection from nasopharyngeal swab samples without RNA extraction. *Biorxiv*: [2020.03.28.013508](https://doi.org/10.1101/2020.03.28.013508).
- Biotek. (2006).** Gen5 Sample Protocols & Experiments Guide. <https://www.biotek.com/>. Recuperado de: https://bme.columbia.edu/files/seasdepts/biomedical-engineering/pdf-files/Sample_Protocols_and_Experiments_Guide.pdf.
- Böger, B., Fachi, M. M., Vilhena, R. O., Cobre, A. F., Tonin, F. S., & Pontarolo, R. (2021).** Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *American journal of infection control*, 49(1), 21-29.
- Canals, M. (2020).** Conceptos para una buena toma de decisiones en la pandemia COVID-19 en Chile. *Revista chilena de infectología*, 37(2), 170-172.
- Cascella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2020).** Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19). En: *Statpearls [Internet]*. StatPearls Publishing. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>

Chan, J. F. W., Yuan, S., Kok, K. H., To, K. K. W., Chu, H., Yang, J., Xing, F., Liu, J., Yip, C. C., Poon R. W., Tsoi, H., Lo, S. K., Chan, K., Poon, V. K., Chan, W., Ip, J. D., Cai, J. C., Cheng, V. C., Chen, H., Hui, C. K., & Yuen, K. Y. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*, 395(10223), 514-523.

Chiok, K. L., Manchego, A., Rivera, H., Ch, N. S., & Ramírez, M. (2011). Standardization and validation of qualitative real time RT-PCR for detection of Classical Swine Fever virus. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(4), 377-387.

Choi, W., & Shim, E. (2021). Optimal strategies for social distancing and testing to control COVID-19. *Journal of theoretical biology*, 512, 110568-110579.

Colegio Médico De Chile. (2020). Información relevante para el personal sanitario. www.colegiomedico.cl. Recuperado de: [http://www.colegiomedico.cl/wp-content/uploads/2020/03/Informacion relevante personal sanitario.pdf](http://www.colegiomedico.cl/wp-content/uploads/2020/03/Informacion_relevante_personal_sanitario.pdf).

Cong, Y., Verlhac, P., & Reggiori, F. (2017). The interaction between nidovirales and autophagy components. *Viruses*, 9(7), 182-195.

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M. P., & Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 25(3), 2000045-2000052.

DasGupta, S. (2020). Molecular crowding and RNA catalysis. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18(39), 7724-7739.

Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20(3), 482-491.

El-Ashram, S., Al Nasr, I., & Suo, X. (2016). Nucleic acid protocols: Extraction and optimization. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 12, 33-39.

Earl, C. C., Smith, M. T., Lease, R. A., & Bundy, B. C. (2018). Polyvinylsulfonic acid: A Low-cost RNase inhibitor for enhanced RNA preservation and cell-free protein translation. *Bioengineered*, 9(1), 90-97.

Fiorini, E., Börner, R., & Sigel, R. K. (2015). Mimicking the in vivo environment—The effect of crowding on RNA and biomacromolecular folding and activity. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 69(4), 207-212.

Flinders, J., DeFina, S. C., Brackett, D. M., Baugh, C., Wilson, C., & Dieckmann, T. (2004). Recognition of planar and nonplanar ligands in the malachite green–RNA aptamer complex. *ChemBioChem*, 5(1), 62-72.

Fratczak, A., Kierzek, R., & Kierzek, E. (2009). LNA-modified primers drastically improve hybridization to target RNA and reverse transcription. *Biochemistry*, *48*(3), 514-516.

Funada, T., Hirose, T., Tamai, N., & Yao, H. (2015). Organic nanoparticles of malachite green with enhanced far-red emission: size-dependence of particle rigidity. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *17*(16), 11006-11013.

Furukawa, K., Abe, H., Abe, N., Harada, M., Tsuneda, S., & Ito, Y. (2008). Fluorescence generation from tandem repeats of a malachite green RNA aptamer using rolling circle transcription. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *18*(16), 4562-4565.

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*, *133*(3), 1–4.

Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R., Groot, R. J. D., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L., Samborskiy, D., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*, *5*(4), 536-544.

Grate, D., & Wilson, C. (1999). Laser-mediated, site-specific inactivation of RNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(11), 6131–6136.

Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic acids research*, *36*, 70–74.

Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in immunology*, *41*(12), 1100–1115.

Hodgson, S. H., Mansatta, K., Mallett, G., Harris, V., Emary, K., & Pollard, A. J. (2021). What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. *The Lancet. Infectious diseases*, *21*(2), e26–e35.

Jin, L., Engelhart, A. E., Zhang, W., Adamala, K., & Szostak, J. W. (2018). Catalysis of template-directed nonenzymatic RNA copying by Iron (II). *Journal of the American Chemical Society*, *140*(44), 15016-15021.

Jin, J., Vaud, S., Zhelkovsky, A. M., Posfai, J., & McReynolds, L. A. (2016). Sensitive and specific miRNA detection method using SplintR Ligase. *Nucleic acids research*, *44*(13), e116-e116.

Keefe, A. D., Pai, S., & Ellington, A. (2010). Aptamers as therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, *9*(7), 537-550.

Kestemont, D., Renders, M., Leonczak, P., Abramov, M., Schepers, G., Pinheiro, V. B., Rozenski, J., & Herdewijn, P. (2018). XNA ligation using T4 DNA ligase in crowding conditions. *Chemical Communications*, *54*(49), 6408-6411.

Kilburn, D., Roh, J. H., Guo, L., Briber, R. M., & Woodson, S. A. (2010). Molecular crowding stabilizes folded RNA structure by the excluded volume effect. *Journal of the American Chemical Society*, 132(25), 8690-8696.

Kolpashchikov, D. M. (2005). Binary malachite green aptamer for fluorescent detection of nucleic acids. *Journal of the American Chemical Society*, 127(36), 12442-12443.

La Marca, A., Capuzzo, M., Paglia, T., Roli, L., Trenti, T., & Nelson, S. M. (2020). Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in vitro diagnostic assays. *Reproductive biomedicine online*, 41(3), 483-499.

La Tercera. (12 de mayo de 2020). Hospital Clínico U. de Chile informa “quiebre de stock nacional” de reactivo para PCR y clínicas suspenden examen por “problemas de capacidad técnica”. www.latercera.com. Recuperado de: <https://www.latercera.com/nacional/noticia/hospital-clinico-u-de-chile-suspende-toma-de-muestras-para-pcr-por-quiebre-de-stock-nacional-de-reactivo-de-laboratorio/43RABHW7TZGPBKR6IC5MAZXTHE/>.

Lennarz, W. J., & Lane, M. D. (2013). En: *Encyclopedia of biological chemistry* (2da. Ed.). Academic Press.

Li, X., Zheng, F., & Ren, R. (2015). Detecting miRNA by producing RNA: a sensitive assay that combines rolling-circle DNA polymerization and rolling circle transcription. *Chemical Communications*, 51(60), 11976-11979.

Liu, X., Li, Q., Wang, X., Zhou, X., Liao, Q., He, X., Zhang, J., Sun, J., Wu, J., Cheng, L., & Zhang, Y. (2015). Comparison of six different pretreatment methods for blood RNA extraction. *Biopreservation and biobanking*, 13(1), 56-60.

Lohman, G. J., Zhang, Y., Zhelkovsky, A. M., Cantor, E. J., & Evans, T. C., Jr (2014). Efficient DNA ligation in DNA-RNA hybrid helices by Chlorella virus DNA ligase. *Nucleic acids research*, 42(3), 1831-1844.

Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner Zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for molecular biology*, 6(1), 1-14.

Lotfi, M., Hamblin, M. R., & Rezaei, N. (2020). COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 508, 254-266.

Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W. J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E. C., Gao, G. F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 395(10224), 565-574.

Manikandan N. (2020). Are social distancing, hand washing and wearing masks appropriate measures to mitigate transmission of COVID-19?. *Vacunas*, 21(2), 136-137.

Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The annals of mathematical statistics*, 18(1), 50-60.

Martin, C. T., & Coleman, J. E. (1987). Kinetic analysis of T7 RNA polymerase-promoter interactions with small synthetic promoters. *Biochemistry*, 26(10), 2690-2696.

Ministerio de Salud. (2020a). Ministerio de Salud confirma primer caso de coronavirus en Chile. Recuperado de: <https://www.minsal.cl/ministerio-de-salud-confirma-primer-caso-de-coronavirus-en-chile/>.

Ministerio de Salud. (2020b). Informe de situación COVID-19. N° 6. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud de Chile. Recuperado de: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2020/03/Informe_2_COVID_19_Chile.pdf.

Ministerio de Salud. (2020c). Informe epidemiológico por enfermedad de SARS-CoV-2 (COVID-19). 01-05-2020. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud de Chile. Recuperado de: https://www.minsal.cl/wpcontent/uploads/2020/05/Informe_EPI_01_05_2020.pdf.

Moon, S., Kim, H., Kim, D., & Lee, J. B. (2021). Viscosity-Regulated Control of RNA Microstructure Fabrication. *Polymers*, 13(3), 454-462.

Ning, Y., Hu, J., & Lu, F. (2020). Aptamers used for biosensors and targeted therapy. *Biomedecine & pharmacotherapie*, 132, 110902-110923.

Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3), 1559-1582.

Pabbaraju, K., Wong, A. A., Douesnard, M., Ma, R., Gill, K., Dieu, P., Fonseca, K., Zeiyas, N., & Tipples, G. A. (2020). A public health laboratory response to the pandemic. *Journal of clinical microbiology*, 58(8) e01110-e01120.

Pérez-Estrada, L. A., Agüera, A., Hernando, M. D., Malato, S., & Fernández-Alba, A. R. (2008). Photodegradation of malachite green under natural sunlight irradiation: kinetic and toxicity of the transformation products. *Chemosphere*, 70(11), 2068-2075.

Pheiffer, B. H., & Zimmerman, S. B. (1983). Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribooligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions. *Nucleic acids research*, 11(22), 7853–7871.

Rahman, H. S., Aziz, M. S., Hussein, R. H., Othman, H. H., Salih Omer, S. H., Khalid, E. S., Abdulrahman, N. A., Amin, K., & Abdullah, R. (2020). The transmission modes and sources of COVID-19: A systematic review. *International Journal of Surgery Open*, 26, 125–136.

Rapley, R. (1994). Enhancing PCR amplification and sequencing using DNA-binding proteins. *Molecular biotechnology*, 2(3), 295-298.

Rastogi, M., Pandey, N., Shukla, A., & Singh, S. K. (2020). SARS coronavirus 2: from genome to infectome. *Respiratory Research*, 21(1), 1-15.

Rodriguez-Morales, A. J., Gallego, V., Escalera-Antezana, J. P., Méndez, C. A., Zambrano, L. I., Franco-Paredes, C., Suárez, J. A., Rodriguez-Encinso, H. D., Balbin-Ramon, G. J., Savio-Larriera, E., Risquez, A., & Cimerman, S. (2020). COVID-19 in Latin America: The implications of the first confirmed case in Brazil. *Travel medicine and infectious disease*, *35*, 101613-191616.

Santosh, B., & Yadava, P. K. (2014). Nucleic acid aptamers: research tools in disease diagnostics and therapeutics. *BioMed research international*, *2014*, 540451-540463.

Sett, A., Zara, L., Dausse, E., & Toulme, J. J. (2020). Engineering light-up aptamers for the detection of RNA hairpins through kissing interaction. *Analytical Chemistry*, *92*(13), 9113-9117.

Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, *52*(3/4), 591-611.

Shyu, D., Dorroh, J., Holtmeyer, C., Ritter, D., Upendran, A., Kannan, R., Dandachi, D., Rojas-Moreno, C., Whitt, S. P., & Regunath, H. (2020). Laboratory Tests for COVID-19: A Review of Peer-Reviewed Publications and Implications for Clinical Use. *Missouri medicine*, *117*(3), 184–195.

Sousa, R., & Mukherjee, S. (2003). T7 RNA polymerase. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, *73*, 1-41.

Strobel, E. J., Angela, M. Y., & Lucks, J. B. (2018). High-throughput determination of RNA structures. *Nature Reviews Genetics*, *19*(10), 615-634.

Sun, C., Su, R., Bie, J., Sun, H., Qiao, S., Ma, X., Sun, R., & Zhang, T. (2018). Label-free fluorescent sensor based on aptamer and thiazole orange for the detection of tetracycline. *Dyes and Pigments*, *149*, 867-875.

Tabor, S. (1990). Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. *Current protocols in molecular biology*, *11*(1), 16-2.

Tan, W., Wang, H., Chen, Y., Zhang, X., Zhu, H., Yang, C., Yang, R., & Liu, C. (2011). Molecular aptamers for drug delivery. *Trends in biotechnology*, *29*(12), 634–640.

Tang, Y. W., Schmitz, J. E., Persing, D. H., & Stratton, C. W. (2020). Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *Journal of clinical microbiology*, *58*(6), e00512-e00520.

Tariq, A., Undurraga, E. A., Laborde, C. C., Vogt-Geisse, K., Luo, R., Rothenberg, R., & Chowell, G. (2021). Transmission dynamics and control of COVID-19 in Chile, March-October, 2020. *PLoS neglected tropical diseases*, *15*(1), e0009070-e0009089.

Trachman III, R. J., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2019). Tracking RNA with light: selection, structure, and design of fluorescence turn-on RNA aptamers. *Quarterly reviews of biophysics*, *52*, e8-e41.

Trachman, R. J., 3rd, Truong, L., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2017). Structural Principles of Fluorescent RNA Aptamers. *Trends in pharmacological sciences*, *38*(10), 928–939.

Troll, C. J., Kapp, J., Rao, V., Harkins, K. M., Cole, C., Naughton, C., Morgan, J. M., Shapiro, B., & Green, R. E. (2019). A ligation-based single-stranded library preparation method to analyze cell-free DNA and synthetic oligos. *BMC genomics*, 20(1), 1-14.

Uda, R. M., Matsui, T., & Takei, M. (2017). Binding of malachite green promotes stability and shows preference for a human telomere DNA G-quadruplex. *Supramolecular Chemistry*, 29(8), 553-560.

Ugarov, A. (2020). Inclusive costs of NPI measures for COVID-19 pandemic: three approaches. *medRxiv*: [2020.03.26.20044552](https://doi.org/10.1101/2020.03.26.20044552).

Uwamino, Y., Wakui, M., Aoki, W., Kurafuji, T., Yanagita, E., Morita, M., Nagata, M., Inose, R., Noguchi, M., Yokota, H., Hasegawa, N., Saya, H., Murata, M., & Keio Donner Project Team (2021). Evaluation of the usability of various rapid antibody tests in the diagnostic application for COVID-19. *Annals of clinical biochemistry*, 58(3), 174-180.

Vázquez-González, M., & Willner, I. (2021). Aptamer-Functionalized Hybrid Nanostructures for Sensing, Drug Delivery, Catalysis and Mechanical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1803-1834.

Viner, R. M., Ward, J. L., Hudson, L. D., Ashe, M., Patel, S. V., Hargreaves, D., & Whittaker, E. (2021). Systematic review of reviews of symptoms and signs of COVID-19 in children and adolescents. *Archives of disease in childhood*, 106(8), 802-807

Wang, H., Wang, H., Zhang, M., Jia, Y., & Li, Z. (2019). A label-free aptamer-based biosensor for microRNA detection by the RNA-regulated fluorescence of malachite green. *RSC advances*, 9(56), 32906-32910.

Wee, E. J., & Trau, M. (2016). Simple isothermal strategy for multiplexed, rapid, sensitive, and accurate miRNA detection. *ACS Sensors*, 1(6), 670-675.

Welch, B. L. (1947). The generalization of 'STUDENT'S' problem when several different population variances are involved. *Biometrika*, 34(1-2), 28-35.

Woo, C. H., Jang, S., Shin, G., Jung, G. Y., & Lee, J. W. (2020). Sensitive fluorescence detection of SARS-CoV-2 RNA in clinical samples via one-pot isothermal ligation and transcription. *Nature biomedical engineering*, 4(12), 1168–1179.

World Health Organization. (2020a). Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report, 10. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330775/nCoVsitrep30Jan2020-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

World Health Organization. (2020b). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 51. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331475/nCoVsitrep11Mar2020-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., & Jiang, T. (2020). Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell host & microbe*, 27(3), 325-328.

Ying, Z. M., Tu, B., Liu, L., Tang, H., Tang, L. J., & Jiang, J. H. (2018). Spinach-based fluorescent light-up biosensors for multiplexed and label-free detection of microRNAs. *Chemical Communications*, 54(24), 3010-3013.

Yüce, M., Filiztekin, E., & Özkaya, K. G. (2021). COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosensors & bioelectronics*, 172, 112752-112766.

Zheng, G., Qin, Y., Clark, W. C., Dai, Q., Yi, C., He, C., Lambowitz, A. M., & Pan, T. (2015). Efficient and quantitative high-throughput tRNA sequencing. *Nature methods*, 12(9), 835–837.

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine* 382(8), 727–733.

8.ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO

“IMPLEMENTACIÓN DE NUEVO MÉTODO DE DETECCIÓN DE RNA DE SARS-CoV-2 ALTERNATIVO A RT-qPCR, BASADO EN LA PRODUCCIÓN DEL APTÁMERO DE VERDE DE MALAQUITA MEDIANTE LIGACIÓN ENTABLILLADA DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS Y POSTERIOR TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*”

Nombre del Investigador principal: Assaf Katz Zondek
Institución: **Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile**
Teléfono: 562-29786073

La estamos invitando a participar en el proyecto de investigación: Implementación de nuevo método de detección de RNA de SARS-CoV-2 alternativo a RT-qPCR, basado en la producción del aptámero de verde de malaquita mediante ligación entablillada de oligonucleótido específicos y posterior transcripción *in vitro*.

Objetivos: Esta investigación tiene por objetivo la implementación de un nuevo método de detección de SARS-CoV-2 alternativo a RT-qPCR.

Procedimientos: Si Ud. acepta participar, el procedimiento consiste en la toma de sangre venosa (tomada de alguna de las extremidades del paciente por personal con experiencia para el procedimiento), la cual será utilizada para la extracción de ácido ribonucleico (RNA) en un momento posterior en un laboratorio de ciencias biomédicas. No se guardarán muestras para estudios posteriores y serán desechadas según el protocolo para eliminación de material biológico de la “Unidad de Prevención de Riesgos” de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El laboratorio cuenta con la certificación de bioseguridad requerida.

Riesgos: La toma de la muestra representa un riesgo bajo. Esta se efectuará por personal capacitado y bajo condiciones de seguridad y de asepsia rigurosa.

En el caso de la toma de muestra sanguínea, puede producirse un mínimo hematoma en la zona del pinchazo, por lo que será conveniente que después se realice presión sobre la zona puncionada.

Complicaciones: En algunos pacientes, por sus características individuales, resulta difícil extraer la muestra de sangre, por lo que tal vez sea preciso puncionarle repetidas veces hasta obtener la muestra de sangre.

Costos: El estudio que se realizará con la muestra sanguínea no tiene costo para usted ya que todos los procedimientos que se efectuarán posteriormente a la toma de la misma.

Beneficios: La participación en este proyecto permitirá estudiar los efectos generados en el método de detección que se busca implementar, por la presencia de RNA proveniente de muestras humanas. Sin embargo, no hay beneficios para quienes participen en esta investigación.

Compensación: Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

Confidencialidad: Toda la información derivada de su participación en este estudio será tratada con estricta privacidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Adicionalmente, usted puede rehusar participar y puede cambiar de opinión después que ha aceptado donar sangre.

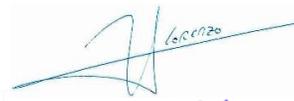
Derechos del participante: Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado.

Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a:

Director del Proyecto: Dr. Assaf Katz: 562-29789584

Conclusión: Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto

Dr. Lorenzo Leiva Araya
Nombre del Participante



Firma

26/10/2020

Fecha

Juan Pablo Martínez Huaiquimilla
Nombre del informante



Firma

26/10/2020

Fecha

Juan Pablo Martínez Huaiquimilla
Nombre del investigador



Firma

26/10/2020

Fecha

Dr. Assaf Katz Zondek
Nombre del director del proyecto



Firma

26/10/2020

Fecha

Este formulario de "Consentimiento informado" se firmará en triplicado para que el participante, investigador responsable y director de proyecto posean las copias correspondientes.