



# UNIVERSITAT DE BARCELONA

## Obtención de aptámeros específicos para enzimas de la vía del metileritritol fosfato de microorganismos

Carlota Roca Martínez

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# TESIS DOCTORAL

## OBTENCIÓN DE APTÁMEROS ESPECÍFICOS PARA ENZIMAS DE LA VÍA DEL METILERITRITOL FOSFATO DE MICROORGANISMOS

Carlota Roca Martínez



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Año 2022

# TESIS DOCTORAL

## OBTENCIÓN DE APTÁMEROS ESPECÍFICOS PARA ENZIMAS DE LA VÍA DEL METILERITRITOL FOSFATO DE MICROORGANISMOS

Programa de doctorado en Nanociencias

**Alumna:** Carlota Roca Martínez

**Directores:** Santiago Imperial Ródenas y Xavier Fernàndez-Busquets

Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular, Facultad de Biología,  
Universidad de Barcelona.

Unidad Conjunta de Nanomalaria. Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC)  
e Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal).

***Dedicado a la memoria de mis padres,  
Sergio Aurelio Roca Bello y Carmen Luz Martínez Loayza***

*Mi aprecio y gratitud*

*A mi familia, Patricia, David, José, Diana, Sergio, José Francisco, Sofía, Luciana, Leticia, y José Fabian, por su amor y apoyo incondicional.*

*A mis mentores Santiago Imperial Ródenas y Xavier Fernàndez-Busquets, por la oportunidad de compartir con ellos el proyecto, su guía y consejos.*

*Al grupo NanoMalaria y a mis compañeros de doctorado Lucía Román, Arnau Biosca, Elena Lantero e Inés Bouzón, por sus consejos.*

*A mis amigos de siempre y los que hice en el camino, Hugo Valencia, Cristina Agrafojo, Andrea Tejera, Sara Manresa, David Padilla, Jordi Romero. Ariadna Iglesias, y Alexander Moreno por su compañía y apoyo.*

*A Marc González y Anna Cort, dept. Bioquímica y Biomedicina Molecular, Facultad de Biología.*

*A Isabel Crespo Torres, Plataforma Citometría IDIBAPS.*

*A Elisabeth Forge y Regina Hand, Fundación Schlumberger.*

*Al instituto de Bioingeniería de Cataluña e Instituto Salud Global de Barcelona.*

## OBTAINING SPECIFIC APTAMERS FOR ENZYMES OF THE METHYLERYTRITOL PHOSPHATE PATHWAY OF MICROORGANISMS

### Abstract

**Background:** Pathogenic microorganisms such as the bacteria *Mycobacterium tuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*, and the protozoa of the phylum Apicomplexa, including the causing agents of malaria and toxoplasmosis, synthesize the isoprenoid precursors isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP), by the methylerythritol phosphate (MEP) pathway. This pathway is essential for most bacteria and Apicomplexa, but it is not present in humans, which synthesize IPP and DMAPP by the alternative mevalonate pathway. The essential role of the MEP pathway and its distribution in different organisms make their enzymes attractive targets for the development of new anti-infective agents. Herein, we focus on the development of aptamers against key enzymes of the MEP pathway. Aptamers are single-stranded oligonucleotides which behave as “chemical antibodies” and can bind specifically and efficiently to a given target molecule. **Methods:** Several methods have been optimized, such as: (i) the production of MEP pathway enzymes, (ii) the development of aptamers through systematic evolution of ligands by exponential enrichment, an *in vitro* selection process based on iterative cycles of binding, partitioning, and amplification of oligonucleotides from a pool of variant sequences, (iii) the cloning of aptamers, (iv) the establishment of an electrophoretic motility shift assay for the identification of interactions between selected aptamers and their target enzymes, and (v) methods for the *in vitro* evaluation of enzymatic activity. **Results:** We report the identification of a DNA aptamer (D10) which specifically binds to the enzyme catalyzing the first committed step of the MEP pathway: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR). **Conclusions:** The results obtained suggest that the D10 DNA aptamer could be a potential candidate for the development of new therapeutic agents and for the design of novel diagnosis systems.

## Glosario de abreviaturas

ACP: *Acyl Carrier Protein*

ADNdc: ADN bicatenario

ADNsc: ADN monocatenario

AEGIS-SELEX: Sistemas de información genética expandidos artificialmente-SELEX

AFM-SELEX: Microscopía de fuerza atómica-SELEX

APT: Translocador de fosfato de apicoplasto

ATP: Trifosfato de adenosina

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CDP-ME: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol o CDP-metileritritol

CDP-MEP: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfato

CE-SELEX: Electroforesis capilar-SELEX

CMK o IspE: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa o CDP-ME quinasa

CMP: Monofosfato de citidina

CMS o IspD: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa o CDP-metileritritol sintasa o CDP-ME sintasa

CTP: Trifosfato de citidina

DMAPP: Dimetilalil pirofosfato

DMB: Bromuro de domifeno

DTT: Ditiotreitol

DXP: 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato

DXR o IspC: 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa

DXS: 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa

*E. coli: Escherichia coli*

ECEEM: Electroforesis capilar de equilibrio de mezclas

EIS: Espectroscopia de impedancia electroquímica

ELISA: Inmunoensayo enzimático

EMB: Etambutol

FET: Transistor de efecto de campo

FOS: Fosmidomicina: FR-31564; ácido 3-(N-formil-N-hidroxi-amino)

FRET: Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia

G3P: Gliceraldehído 3-fosfato

GCE: Electrodo de carbono vítreo

GDH: Glutamato deshidrogenasa

GTP: Trifosfato de guanosina

HDR o IspH: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato reductasa

HDS o IspG: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintasa o HMBPP sintasa

HMBPP: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato

HRP: Peroxidasa de rábano picante

HRP-2: Proteína II rica en histidina

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IMAC: Cromatografía de afinidad por cationes metálicos inmovilizados

IPP: Isopentenil pirofosfato

Kd: Constante de disociación

LB: Medio Luria-Bertani (LB)

LD: Límite de detección

LDH: Lactato deshidrogenasa

ManLAM: Lipoarabinomanano de manosa

MCS o IspF: 2-C-metil-D-eritritol 2-4-difosfato sintasa o MEcPP sintasa

MEcPP: 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato

MEP: Metileritrol fosfato o 2-C-metileritritol 4-fosfato

M-SELEX: Selección micromagnética

MVA: Mevalonato

NECEEM: La electroforesis capilar sin equilibrio de mezclas de equilibrio

NPs: Nanopartículas

NSM: Caproato de N-succinimidil-6-maleimida

OMS: Organización Mundial de la Salud

PABP: Proteína de unión poli(A)

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PDR: Pruebas de diagnóstico rápido

PEG: Polietilenglicol

PfEMP1: *Erythrocyte Membrane Protein-1 from P. falciparum*

PfTPxGI: Tiorredoxina peroxidasa semejante a la glutation peroxidasa (*Glutathion peroxidase-like*)

Pi: Fosfato inorgánico

POC: Punto de atención en campo

PPasa: Pirofosfatasa inorgánica

PPi: Pirofosfato inorgánico

pRBC: Glóbulo rojo infectado con *P. falciparum*

PVDF: Membrana de difluoruro de polivinilideno

RBC: Glóbulo rojo

SBAS: *Single Bead Aptamer Selection*

SEA: Enterotoxina estafilocócica A

SELEX: *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*

SPR: Resonancia de plasmón de superficie

SPR-SELEX: Resonancia de plasmón superficial-SELEX

TA: Temperatura ambiente

TCA: Terapia combinada de artemisinina con otros fármacos antimaláricos

TPP: Pirofosfato de tiamina

UFC: Unidades formadoras de colonias

VIH/AIDS: Virus de inmunodeficiencia humana

## Índice

1. INTRODUCCIÓN.	12
1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS.	13
1.2. MARCO TEÓRICO.	14
1.2.1. PATOLOGÍA DE ESTUDIO: LA MALARIA.	14
1.2.1.1. CICLO BIOLÓGICO.	18
1.2.1.2. EL APICOPLASTO.	21
1.2.1.3. TRATAMIENTO.	28
1.2.1.4. RESISTENCIA.	30
1.2.1.5. DIAGNÓSTICO.	34
1.2.1.6. BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES.	40
1.2.1.6.1. La vía del metileritritol fosfato (MEP).	45
1.2.1.6.1.1. DXP reductoisomerasa (DXR).	50
1.2.1.6.1.1.1. La Fosmidomicina.	51
1.2.1.6.1.2. La enzima CDP-metileritritol sintasa (CMS/IspD).	56
1.2.1.6.1.3. <i>Escherichia coli</i> , un modelo para el estudio de la vía del MEP.	60
1.3. LOS APTÁMEROS.	63
1.3.1. Estrategias para la obtención y selección de aptámeros.	69
1.3.1.1. SELEX ( <i>Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment</i> ).	69
1.3.1.2. Sistemas de información genética expandidos artificialmente-SELEX (AEGIS-SELEX).	70
1.3.1.3. SELEX genómico.	70
1.3.1.4. Cell-SELEX.	71
1.3.1.5. SELEX <i>in vivo</i> .	71
1.3.1.6. Electroforesis capilar-SELEX (CE-SELEX).	73
1.3.1.7. Selección micromagnética (M-SELEX).	74
1.3.1.8. Microscopía de fuerza atómica (AFM)-SELEX.	74
1.3.1.9. Resonancia de plasmón superficial (SPR)-SELEX.	74
1.3.1.10. Selección en chip.	75
1.3.1.11. Estrategia no SELEX.	75

2. MATERIALES Y MÉTODOS.	76
2.1. PREPARACIÓN DE ENZIMAS RECOMBINANTES.	76
2.1.1. Proteína de fusión 6xHis-GST- PfDXR-6xHis (GST-PfDXR).	77
2.1.2. Proteína recombinante PfDXR-6His (PfDXR).	79
2.1.3. Proteína EcDXR-6His (EcDXR).	80
2.1.4. Proteína CMS-6His (CMS).	80
2.2. SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE APTÁMEROS DE ADN.	81
2.2.1. MÉTODO M-SELEX.	81
2.2.1.1. Separación de las cadenas de ADN por unión a neutravidina.	84
2.2.1.2. Subclonación y secuenciación de los oligonucleótidos seleccionados.	88
2.2.1.2.1. Método de clonaje por selección positiva.	89
2.2.2. Nueva estrategia para la obtención de aptámeros: Método de selección de aptámeros a partir una sola esfera ( <i>Single Bead Aptamer Selection, SBAS</i> ).	90
2.3. CARACTERIZACIÓN DE APTÁMEROS CANDIDATOS.	93
2.3.1. EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE APTÁMERO Y ENZIMA.	93
2.3.1.1. Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA).	93
2.3.1.2. La calorimetría de titulación isotérmica (ITC).	94
2.3.1.3. Ensayo de <i>Western blot</i> con aptámeros.	96
2.3.1.4. Ensayo de <i>Dot Blot</i> con aptámeros.	96
2.3.1.5. Determinación de la constante de disociación ( <i>K<sub>d</sub></i> ) de los aptámeros seleccionados.	97
2.3.2. EVALUACIÓN FUNCIONAL: Ensayos de actividad enzimática.	98
2.3.2.1. Determinación de la actividad enzimática de la DXR.	98
2.3.2.2. Determinación de la actividad enzimática de la CMS.	99
2.3.2.2.1. Método colorimétrico o indirecto para la determinación de la actividad de la CMS.	100
2.3.2.2.1.1. Colorimetría de fosfatos.	100
2.3.2.2.1.2. Ensayo para la determinación de la actividad	101

enzimática.	
2.4. EVALUACIÓN EN GLÓBULOS ROJOS INFECTADOS CON <i>P. FALCIPARUM</i> (pRBCs) Y BACTERIAS.	102
2.4.1. Cultivos <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> .	102
2.4.1.2. Análisis de aptámeros en pRBC por microscopía de fluorescencia confocal y citometría de flujo.	103
2.4.2. Análisis de aptámeros en bacterias por microscopía de fluorescencia confocal.	104
2.4.3. Evaluación del efecto de aptámeros en cultivo <i>in vitro</i> de <i>E. coli</i> .	105
2.5. EXPERIMENTO DE FUNCIONALIZACIÓN DEL APTÁMERO D10.	105
3. RESULTADOS.	108
3.1. OBTENCIÓN DE APTÁMEROS ESPECIFICOS PARA LA ENZIMA DXR DE <i>P. FALCIPARUM</i> .	108
3.1.1. Obtención de enzimas DXR recombinantes.	108
3.1.2. Selección de aptaméros específicos a la enzima DXR de <i>P.falciparum</i> : Análisis de enriquecimiento.	112
3.2. Evaluación de la interacción del aptámero D10 y la enzima DXR.	116
3.2.1. Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA).	116
3.2.2. Ensayo de <i>Western blot</i> y <i>Dot Blot</i> con aptámeros.	118
3.2.3. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).	119
3.2.4. Determinación de la <i>Kd</i> de los aptámeros seleccionados.	120
3.3. Evaluación funcional: Efecto del aptámero D10 sobre la actividad enzimática de la DXR.	124
3.4. Caracterización del aptámero D10 en pRBCs.	126
3.5. Reconocimiento de bacterias por el aptámero D10.	134
3.6. Evaluación del efecto del aptámero D10 sobre el cultivo <i>In vitro</i> de <i>E. coli</i> .	137
3.7. Funcionalización del aptámero D10.	138
3.8. OBTENCIÓN DE APTÁMEROS ESPECIFICOS PARA LA ENZIMA CMS DE <i>E. coli</i> .	139

3.8.1. Caracterización de las preparaciones de CMS de <i>E. coli</i> .	140
3.8.2. Resultados del proceso M-SELEX para la obtención de aptámeros afines a CMS.	141
3.8.3. Resultados del proceso del método de esfera única o <i>Single Bead Aptamers Selection</i> (SBAS).	143
3.8.4. Aislamiento de aptámeros candidatos para la enzima CMS.	150
3.8.5. Evaluación de la interacción entre los aptámeros candidatos y la enzima CMS.	151
3.8.6. Detección de actividad enzimática de la CMS por método colorimétrico.	152
3.8.7. Detección de actividad enzimática de la CMS por medición directa de pirofosfato.	154
3.7.8. Evaluación del método SABS partiendo desde la biblioteca inicial.	156
4. DISCUSIÓN.	158
5. CONCLUSIONES.	188
6. REFERENCIAS.	191
ANEXO A.	229
ANEXO B.	230

## 1. INTRODUCCIÓN

Los isoprenoides constituyen una clase extremadamente amplia de compuestos presentes en todos los organismos desde las bacterias a los seres humanos. Tienen diversidad estructural y cumplen funciones muy diferentes de relevancia biológica, como la degradación de proteínas, la apoptosis, la regulación de la transcripción y los procesos postraduccionales (Marõ et al., 2000) (Wiley et al., 2015) (Hernandez et al., 2019) (Althagbi et al., 2021). A pesar de su notable diversidad, los isoprenoides se sintetizan en todos los organismos utilizando dos componentes básicos comunes: Isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP).

Aunque la vía del mevalonato (MVA) se había considerado durante mucho tiempo como la única vía utilizada por todos los organismos para la biosíntesis de IPP y DMAPP; actualmente, se conoce una vía alternativa que inicialmente se denominó vía no mevalonato, aunque la literatura más reciente utiliza el término vía del metileritritol fosfato (MEP), que lleva el nombre del primer intermediario específico de la vía, el 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (Rohdich et al., 2001). La vía del MEP es la única fuente de IPP y DMAPP para importantes patógenos humanos tales como *Mycobacterium tuberculosis* y *Plasmodium falciparum*, agentes causantes de la tuberculosis y la malaria, respectivamente. Ambas enfermedades fueron responsables de cerca de 2 millones de muertes por año en el mundo (WHO, 2021b) (WHO, 2019). Asimismo, se encuentra en *Escherichia coli*, la diarrea producida por sus cepas patogénicas es una causa importante de muerte en niños menores de 5 años, especialmente en las regiones de África subsahariana y sur de Asia (Black et al., 2003). Un hecho preocupante es que la mayoría de los medicamentos actualmente disponibles tanto para malaria, tuberculosis e infecciones humanas causadas por *E. coli*, ya no son efectivos debido a la aparición de cepas resistentes (WHO, Food and Agriculture Organization (FAO), World Organisation for Animal Health (OIE), 2021). La resistencia a los antimicrobianos es un importante problema de salud pública mundial (WHO, FAO and OIE, 2021). Un informe encargado por Reino

Unido (Neill, 2014) predijo que para el año 2050, se producirían 10 millones de muertes anuales debidas a infecciones resistentes a los antimicrobianos (de Kraker et al., 2016). Por ello, se requiere la búsqueda de nuevos compuestos con mayor poder inhibitorio, mejor bio-distribución y menos efectos colaterales para el manejo y control de estas patologías, así como el desarrollo de nuevos métodos eficaces y eficientes de diagnóstico.

## 1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS

Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios que adoptan una estructura tridimensional estable que les permite unirse con alta afinidad y especificidad a antígenos diana como moléculas pequeñas, péptidos, proteínas, células y tejidos. Dichas características permiten que se pueden utilizar como reactivos de investigación, diagnóstico, biosensores, herramientas terapéuticas y para el descubrimiento de biomarcadores. Motivo por el cual nuestro principal objetivo se centró en su desarrollo como estrategia antimalárica. Para ello, escogimos como dianas para el estudio las enzimas DXP reductoisomerasa (DXR/IspC) y CDP-metileritritol sintasa (CMS/IspD) de la vía del MEP de síntesis de isoprenoides. Debido a su ausencia en los seres humanos y porque son esenciales para la supervivencia del parásito. De esta manera se centran los esfuerzos en el desarrollo de aptámeros con proyección al desarrollo nuevos agentes terapéuticos con perfil inocuo para el humano y/o para el diseño de novedosos sistemas de diagnóstico para el manejo de agentes infecciosos como *P. falciparum*, la especie más peligrosa de *Plasmodium*.

### **Objetivo general:**

Desarrollar aptámeros específicos para enzimas clave de la vía del metileritritol fosfato

## **Objetivos específicos:**

- Expresar y purificar enzimas recombinantes de la vía del MEP.
- Buscar y realizar estrategias para la selección de aptámeros: SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) y SBAS (*Single Bead Aptamer Selection*).
- Evaluar la afinidad de los aptámeros candidatos para la enzima diana.
- Evaluar *in vitro* el efecto inhibitor de los aptámeros candidatos, basados en la inhibición de la actividad enzimática.
- Evaluar el reconocimiento de los agentes infecciosos por los aptámeros.

## **1.2. MARCO TEÓRICO**

### **1.2.1. PATOLOGÍA DE ESTUDIO: LA MALARIA**

La malaria (del italiano medieval «mal aire») o paludismo (de *paludis*, genitivo del término latino *palus*: ciénaga o pantano y de *-ismo*, en este caso acción o proceso patológico) es una enfermedad infecciosa que se caracteriza por ataques intermitentes de fiebre muy alta y por ser potencialmente mortal (Koram & Molyneux, 2007).

Los estudios científicos sobre la malaria hicieron su primer avance de importancia en 1880, cuando el médico Charles Louis Alphonse Laveran (Premio Nobel en 1907), observó parásitos dentro de los glóbulos rojos de personas con malaria. Propuso que la malaria la causaba un protozoo, fue la primera vez que se identificó a un protozoo como agente causal de una enfermedad. Dicho protozoo fue llamado *Plasmodium*, por los científicos Ettore Marchiafava y Angelo Celli (Ledermann D. & Valle B., 2009).

Producida por parásitos del género *Plasmodium*; en los seres humanos, esta enfermedad puede ser causada por cinco especies distintas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi* y, además dos subespecies de *P. ovale*, *P. ovale curtisi* y *P. ovale wallikeri* (Winzeler, 2008) (Fatih et al., 2013). Las tres primeras especies se distribuyen en África, Asia y América Central y del Sur, mientras que *P. ovale* se encuentra en África y *P. knowlesi* en Asia. A pesar de compartir la misma distribución geográfica, la infección por *P. vivax* es menos frecuente en África en comparación con *P. falciparum*, pero es la especie dominante que causa la malaria en muchas regiones fuera de África. La presencia del parásito en cualquier etapa y en cualquier parte del cuerpo humano, indica la presencia de una infección palúdica (Koram & Molyneux, 2007) (Jain et al., 2018).

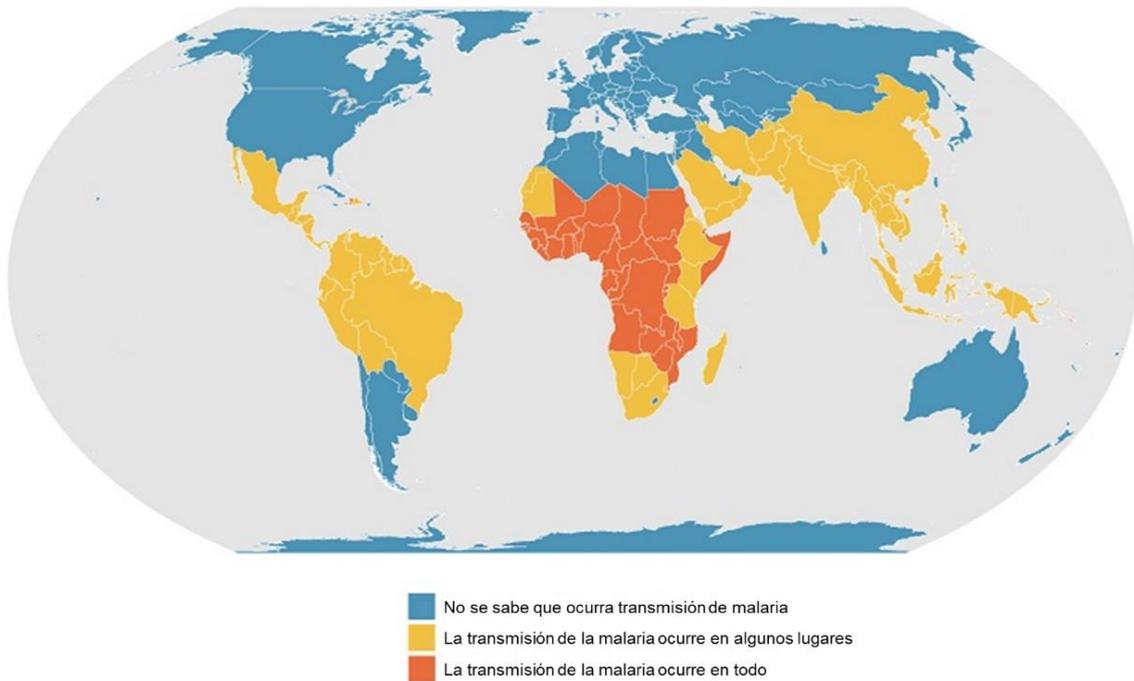
La malaria es transmitida principalmente por mosquitos del género *Anopheles*; tan sólo las hembras de este mosquito son las que se alimentan de sangre para poder madurar los huevos; los machos no pican y no pueden transmitir la enfermedad, ya que únicamente se alimentan de néctares y jugos vegetales. Hay aproximadamente 400 especies diferentes de mosquitos *Anopheles*, pero solo 30 son vectores de mayor importancia (Koram & Molyneux, 2007).

La única forma posible de contagio directo entre humanos es por vía placentaria al feto o bien por transfusiones sanguíneas de donantes portadores de la infección (Muñoz et al., 2015) (Redfield et al., 2018).

En regiones donde la malaria es altamente endémica, las personas se infectan tan a menudo que desarrollan la inmunidad adquirida, es decir son portadores más o menos asintomáticos del parásito (Koram & Molyneux, 2007) (Muñoz et al., 2015) (Redfield et al., 2018).

Según los informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se calcula que en 2019 se produjeron 229 millones de casos de paludismo y 409 000 muertes relacionadas con esta enfermedad en 87 países; y, desafortunadamente, aproximadamente el 65% de estas muertes son niños menores de 5 años. Generalmente la mayoría de las víctimas son niños, mujeres embarazadas, personas inmunodeficientes y/o con enfermedades crónicas, como pacientes con virus de inmunodeficiencia humana (VIH/AIDS) (Alemu et al., 2013) (WHO, 2019). Lamentablemente las cifras aumentaron según el Informe del 2021 de la OMS sobre la malaria (WHO, 2021a), que indica un total de 241 millones de casos de malaria y aproximadamente 627,000 muertes en 2020. Sin embargo, la malaria es prevenible y curable, y el aumento de los esfuerzos está reduciendo la carga de la malaria en muchos lugares. De hecho, entre 2000 y 2015, la incidencia de la malaria entre las poblaciones en riesgo disminuyó en un 37% a nivel mundial (WHO, 2020).

En mayo del 2007 “La Asamblea Mundial de la Salud” decidió conmemorar el 25 de abril como el Día Mundial del Paludismo; y en mayo del 2015 adoptó “La Estrategia Mundial de Malaria 2016-2030”. La cual, proporciona un marco integral para orientar a los países en sus esfuerzos por acelerar la eliminación de la malaria. La estrategia establece el objetivo de reducir la incidencia mundial de la malaria y las tasas de mortalidad en al menos un 90% para 2030 (WHO, 2016).



**Figura 1: Presencia de malaria en el mundo.** Este mapa muestra una aproximación de las partes del mundo donde se produce la transmisión de la malaria ([CDC - Malaria - About Malaria - Where Malaria Occurs](#)).

Son muchos los esfuerzos realizados para aumentar la prevención y control de la malaria. Actualmente se intentan tres estrategias principales: (1) vacunación, (2) control de vectores y (3) medicamentos antimaláricos.

El 6 de octubre de 2021 marca un día histórico en el desarrollo de vacunas contra la malaria, con el lanzamiento de la recomendación de la OMS para el uso generalizado de la vacuna contra la malaria RTS,S/AS01 (RTS,S) entre los niños que viven en el África subsahariana y otras regiones con transmisión de malaria por *P. falciparum* de moderada a alta (Pringle et al., 2018) ([CDC - Malaria - About Malaria - Where Malaria Occurs](#)).

Si bien los ensayos aún están en curso hasta 2023, se han recopilado suficientes datos sobre seguridad y eficacia para permitir una recomendación

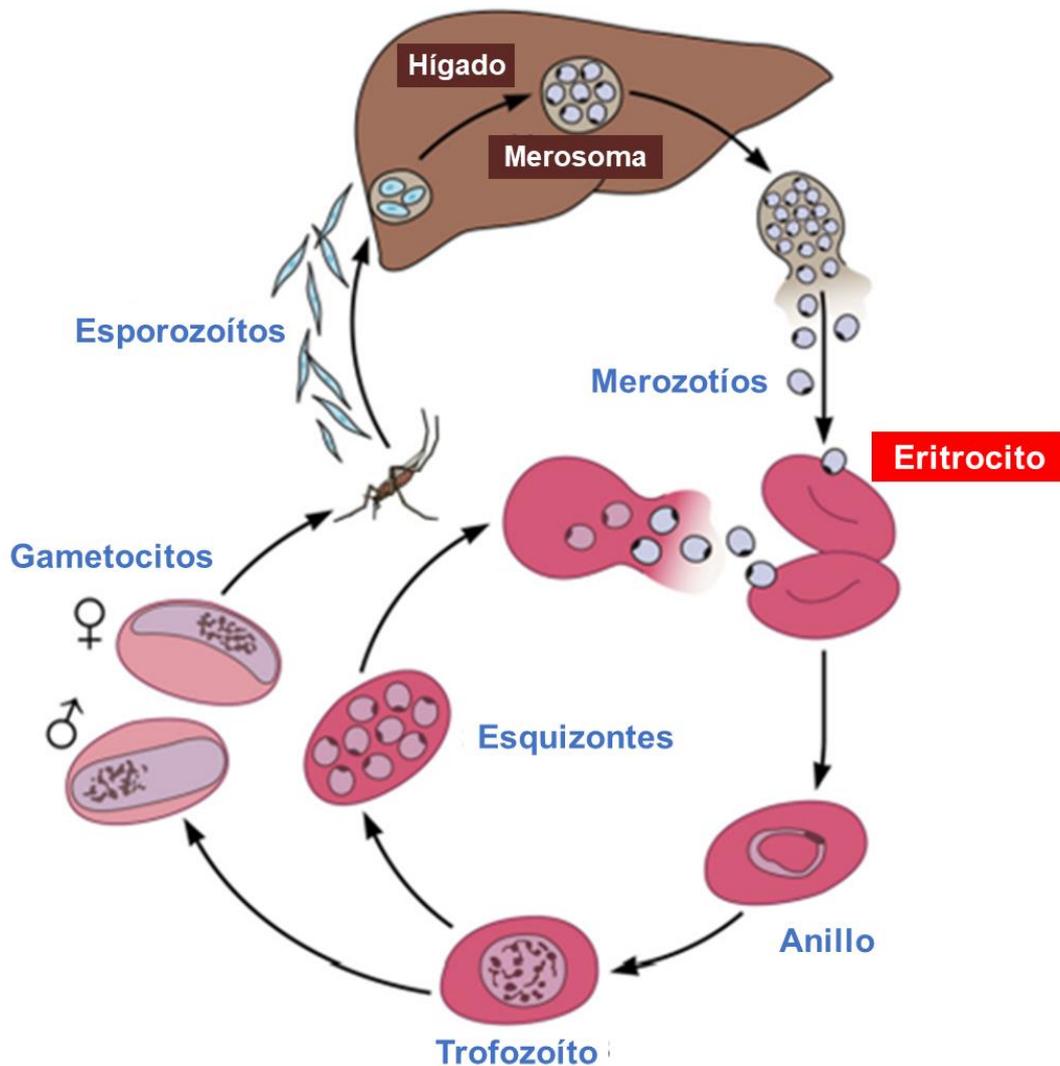
más amplia para el uso de la vacuna. Entre los datos se encuentra el alto impacto en entornos de vacunación infantil en la vida real: Reducción significativa (30%) de la malaria grave y mortal. Por otro lado, se intenta prevenir la infección evitando la picadura del mosquito con la fumigación de los hogares usando insecticidas de acción residual (FIAR) y mosquiteras tratadas con insecticidas. Además, se estudia el desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos y tratamientos eficaces con fármacos. Actualmente, el mejor tratamiento para combatir la enfermedad es la terapia combinada de artemisinina con otros fármacos antimaláricos (TCA) (Jain et al., 2018) (Tizifa et al., 2018).

#### **1.2.1.1. CICLO BIOLÓGICO**

Los parásitos de la malaria tienen un ciclo de vida con estadios reproductivos sexuales y asexuales, que incluyen dos huéspedes: el ser humano, y el mosquito *Anopheles* hembra. El ciclo se inicia cuando el mosquito hembra *Anopheles* pica a un humano e inyecta formas móviles de esporozoítos que viajan por el torrente sanguíneo hasta el hígado e invaden los hepatocitos, dónde inician un nuevo proceso denominado esquizogonia exoeritrocítica. Éste, consiste en la multiplicación del parásito dentro de los hepatocitos infectados, que acabará dando lugar a la ruptura y liberación de los merozoítos exoeritrocíticos, las formas de la etapa de sangre invasiva libre. Esta fase exoeritrocítica es asintomática y conduce al desarrollo de los esquizontes que, maduros, contendrán cientos de merozoitos. En un margen de 6 a 30 días se produce la ruptura de los esquizontes. Los merozoitos son liberados masivamente en la circulación e invaden los eritrocitos e inician la fase eritrocítica del ciclo vital, dónde experimentarán multiplicación asexual. En ellos, se desarrollan y multiplican asexualmente; pasando por el estado de trofozoito en anillo. La esquizogonia eritrocítica concluye en 24 horas (*P. knowlesi*), 48 horas (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum*) o 72 horas (*P. malariae*) (Cowman et al., 2012) (De Niz et al., 2016) (Lyth et al., 2018).

La mayoría de los síntomas de la malaria (fiebre, vómitos y/o dolor de cabeza) ocurren a lo largo de la fase asexual; durante esta fase, los merozoítos se van desarrollando en el estadio esquizonte, que acabarán con la ruptura de la célula y su liberación a la sangre (Rowe et al., 2009). Algunos merozoítos continúan el ciclo invadiendo otros glóbulos rojos, dando lugar a un crecimiento exponencial del parásito, de forma que se invaden eritrocitos no infectados anteriormente, favoreciendo así, la progresión de la enfermedad en el paciente; mientras tanto otros merozoítos se diferenciarán en las formas sexuales: macro y microgametocitos masculinos o femeninos. Solo en el caso particular de *P. falciparum*, se desarrollan en 3 o 4 días.

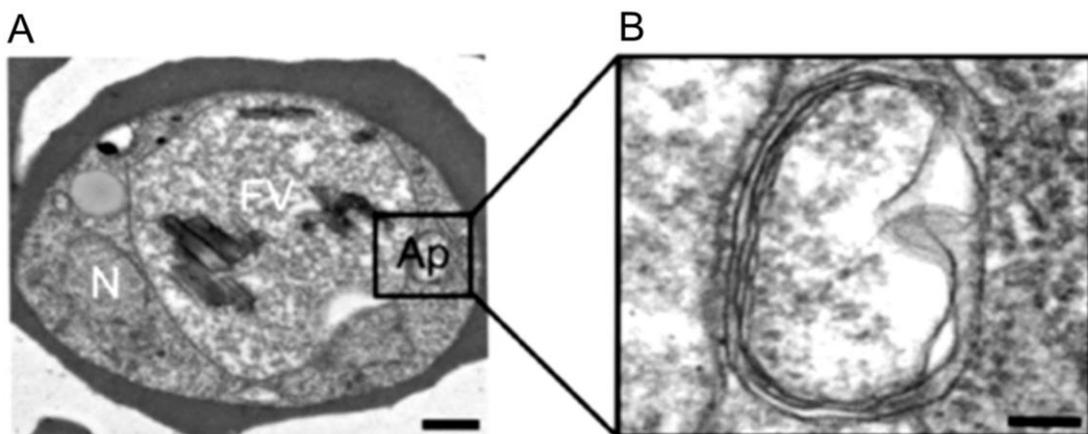
Los gametocitos, formados a partir de la etapa de sangre asexual, son absorbidos por un mosquito, y en su estómago experimentan un ciclo sexual, denominado ciclo esporogónico (Contreras-Ochoa & Ramsey, 2004). En su interior maduran y se diferencian en gametos masculinos y femeninos, produciendo la fecundación y la formación de un cigoto móvil y alargado, que pasará a la fase oocinete. El oocinete invade la pared del intestino medio del mosquito, y se convierte en oocito. Finalmente, se da la formación de esporozoitos que invaden las glándulas salivales para reinfectar a otros seres humanos.



**Figura 2: Ciclo vital de *P. falciparum*.** La infección comienza con la inyección de esporozoítos en el torrente sanguíneo del huésped por la picadura de un mosquito *Anopheles*. Los parásitos se multiplican en el hígado y se liberan de nuevo en el torrente sanguíneo del huésped en forma de merozoítos, donde comienzan el ciclo de desarrollo intraeritrocítico (en glóbulos rojos). Dentro del eritrocito, los parásitos crecen en trofozoítos grandes. Finalmente, se dividen para convertirse en esquizontes multinucleados, que brotan de la célula huésped y vuelven a entrar en la sangre como merozoítos. Una proporción de estos parásitos en etapa sanguínea se convierten en gametocitos y son absorbidos por el mosquito vector, donde completan la replicación sexual (Guggisberg et al., 2014).

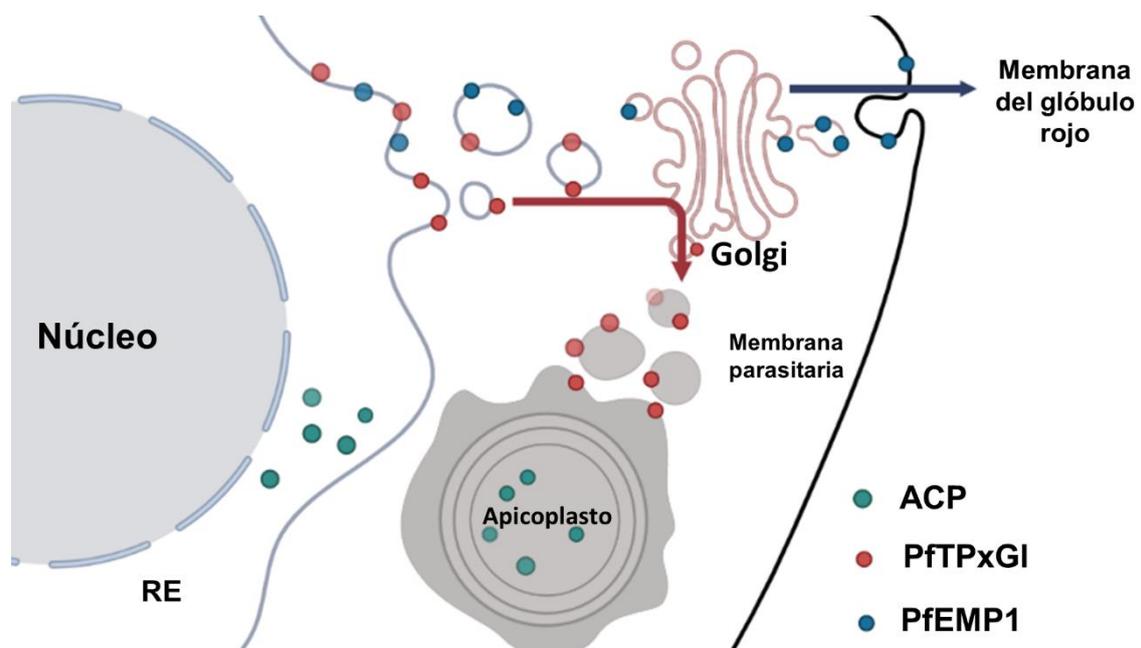
### 1.2.1.2. EL APICOPLASTO

El género *Plasmodium* pertenece al filum *Apicomplexa*, el cual se caracteriza por contener un plástido no fotosintético, llamado apicoplasto, un orgánulo de origen procariótico (Foth & McFadden, 2003)(Lim & McFadden, 2010). El orgánulo destaca la importancia de la transferencia genética lateral en la evolución y proporciona un sistema accesible para la investigación de la orientación de proteínas a orgánulos endosimbióticos secundarios (Roos et al., 1999). El apicoplasto tiene cuatro membranas (Figura 3) y tiene un pequeño genoma circular, que contiene muchos genes o secuencias que están claramente relacionados con los genomas de plastidios de plantas y algas; en conjunto, esto indica que el apicoplasto surgió por endosimbiosis secundaria (Ralph et al., 2004) . El apicoplasto interactúa con el medio ambiente, el citosol del parásito, para importar y exportar muchas moléculas, un claro ejemplo son las proteínas conocidas como translocadores de fosfato de plástidos (pPT) que se encuentran incrustadas en la membrana exterior del apicoplasto y son responsables de la importación de carbono, energía y poder reductor para impulsar la síntesis anabólica en el orgánulo (Lim et al., 2016).



**Figura 3: El apicoplasto.** A. Micrografía electrónica de transmisión de un *P. falciparum*, Núcleo (N), Vacuola digestiva (FV), y apicoplasto (Ap). Escala 500nm. B. El apicoplasto está rodeado por cuatro membranas, indicio de un origen endosimbiótico. Escala 100nm. (Guggisberg et al., 2014)

La vía secretora de *P. falciparum* ha evolucionado para transportar proteínas a la membrana de la célula huésped y a un orgánulo endosimbótico, el apicoplasto. Este último puede ocurrir a través de la ruta ER o ER-Golgi. A diferencia de la proteína soluble ACP (*Acyl Carrier Protein*), la PfTPxGI (tiorredoxina peroxidasa semejante a la glutation peroxidasa (*Glutathion peroxidase-like*)) se localiza en la membrana más externa del apicoplasto. Por lo tanto, el apicoplasto del parásito adquiere proteínas a través de dos vías diferentes: primero, la vía de tráfico vesicular parece manejar no solo proteínas secretoras, sino también una proteína de membrana del apicoplasto, PfTPxGI; en segundo lugar, el tráfico de proteínas luminales de apicoplastos parece ser independiente de las vesículas acopladas a proteínas G (Figura 4) (Chaudhari et al., 2017).



**Figura 4: Representación esquemática de las vías de segmentación de proteínas secretoras en *P. falciparum*.** Se observan tres rutas usando proteínas PfEMP1 (*Erythrocyte Membrane Protein-1*), ACP (*Acyl Carrier Protein*) y PfTPxGI (*Glutathion peroxidase-like thiorredoxin peroxidase*). Las flechas indican la dirección del tráfico de proteínas secretoras.

Los parásitos de la malaria contienen un apicoplasto por célula, y la replicación del orgánulo precede a la forma especial de división celular, conocida como esquizogonía. La división celular debe garantizar no sólo la partición de los órganos, como las mitocondrias y los núcleos, en cada célula hija, sino también la fiel segregación de los apicoplastos de generación en generación (Ralph et al., 2004).

El apicoplasto en *Plasmodium* es esencial para el desarrollo intraeritrocítico e intrahepático en el huésped humano (Ramya et al., 2007a) (Janouškovec et al., 2015) y debido a su origen procariótico, contiene vías que no se encuentran en el huésped humano (Röhrich et al., 2005). Por lo tanto, constituye una diana importante para el desarrollo de nuevos antipalúdicos (Lim et al., 2016) (Saggu et al., 2016) (Goodman & McFadden, 2013).

El apicoplasto alberga maquinaria procariota, presumiblemente para replicar su genoma circular de 35 kb, para transcribir y traducir los genes que posee. (Roos et al., 2002). Los antibióticos que incapacitan las funciones de mantenimiento de la replicación del ADN, la transcripción y la síntesis de proteínas de este orgánulo interfieren con la replicación del orgánulo y, en consecuencia, con su segregación durante la esquizogonía. Los mutantes transitorios que son incapaces de replicar el apicoplasto también comparten el mismo destino (He et al., 2001). Por ejemplo, los antibióticos que inhiben la transcripción y la traducción procarióticas, como la doxiciclina y la clindamicina, bloquean la expresión del genoma del apicoplasto y son activos contra *Plasmodium* (Dahl & Rosenthal, 2007)(Ramya et al., 2007a). Desafortunadamente, la cinética o acción lenta limita el uso de doxiciclina y clindamicina para la quimioprofilaxis o como fármacos asociados en terapias combinadas con compuestos de acción más rápida (Ramya et al., 2007a).

Por otra parte, el apicoplasto es el sitio de varias vías metabólicas, como la síntesis de ácidos grasos, grupo hemo e isoprenoides (Lim & McFadden, 2010)

(Arisue et al., 2012). Todas las proteínas involucradas en el funcionamiento de dichas vías de biosíntesis están codificadas en el núcleo y dirigidas al apicoplasto. Se conoce que moléculas como triclosán (Heath et al., 1998) (Waller et al., 2003) (Surolia & Surolia, 2001) (Alfhili & Lee, 2019), cerulenina (Vance et al., 1972) (Tasdemir et al., 2006) y NAS-91 (Sharma et al., 2003), inhibidores de la vía de síntesis de ácidos grasos, y succinil acetona (Goldberg & Sigala, 2017), un inhibidor de la biosíntesis del grupo hemo que opera en el apicoplasto del parásito, muestran efectos parasiticidas rápidos (Uddin et al., 2018).

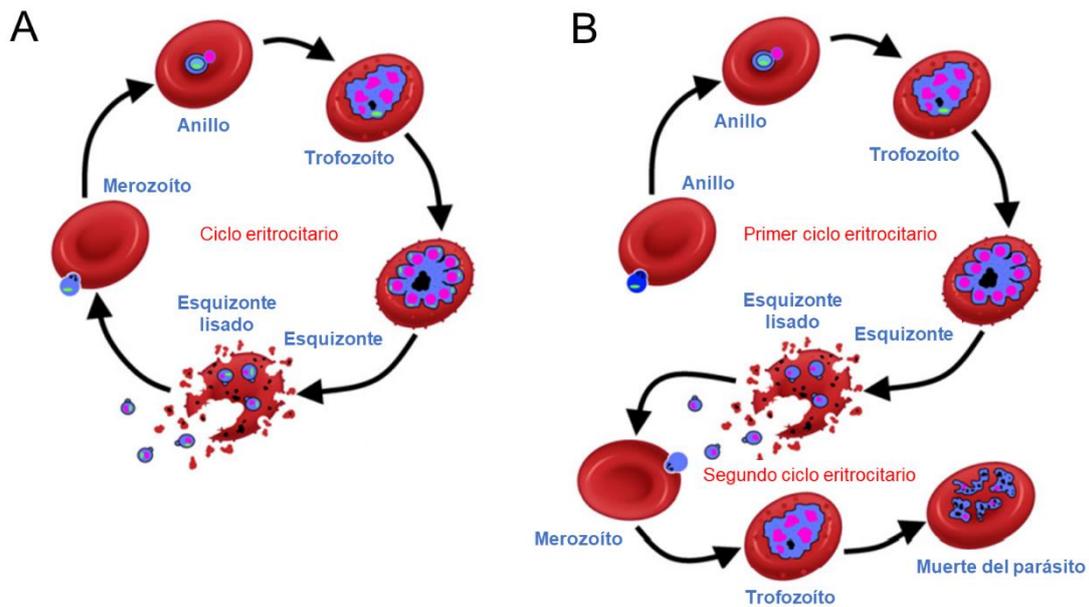
La muerte retardada, se caracteriza por la muerte de parásitos solo en la generación posterior a la intervención farmacológica. Los antibióticos como la clindamicina, el cloranfenicol y la tetraciclina, inhibidores de la síntesis de proteínas procarióticas, invocan el fenotipo de muerte retardada en *P. falciparum*, como es evidente a partir de una reducción específica del número de copias del genoma del apicoplasto (Ramya et al., 2007b).

Se ha postulado que el apicoplasto es necesario para reponer las reservas involucradas en la generación de la vacuola parasitófora que rodea al parásito en la célula huésped y es crucial para una invasión exitosa de la célula huésped (Ralph et al., 2004). Todas estas vías involucradas en la producción y modificación de lípidos y proteínas unidas a lípidos podrían ser necesarias para la interacción parásito-célula huésped o para la generación de la vacuola parasitófora, que son esenciales para la invasión exitosa de la célula huésped (Ralph et al., 2004). Por lo tanto, comprometer cualquier función de apicoplasto debería interferir con la invasión de la célula huésped, y potencialmente matar a los parásitos por muerte retardada.

La inhibición del ADN del apicoplasto, el ARN o la síntesis de proteínas (por clindamicina) no interfiere con la biosíntesis de ácidos grasos en el apicoplasto en el primer ciclo de reproducción asexual. En consecuencia, durante las

primeras 48 h de tratamiento con un agente que invoca la muerte retardada, los ácidos grasos todavía se sintetizan, a pesar de la inhibición de la replicación del ADN del apicoplasto, la transcripción o la síntesis de proteínas. Esto permite la supervivencia e invasión de la siguiente célula huésped. En el segundo ciclo, en ausencia de un apicoplasto, los ácidos grasos no se sintetizan durante la etapa de trofozoíto del parásito y, por lo tanto, no pueden sobrevivir y progresar a la etapa de schizont (Ramya et al., 2007b).

El tratamiento con fosmidomicina, un inhibidor de la biosíntesis de precursores isoprenoides en el apicoplasto, inhibe el crecimiento de *P. falciparum* en estadio sanguíneo (Lell et al., 2003). Sin embargo, la inhibición de fosmidomicina se puede rescatar químicamente mediante la suplementación con isopentenil difosfato (IPP), el producto de la ruta (Uddin et al., 2018) (Yeh & DeRisi, 2011). Sorprendentemente, la suplementación con IPP también revierte por completo la muerte después del tratamiento con antibióticos que causan la pérdida del apicoplasto. Los parásitos tratados con antibióticos rescatados con IPP durante múltiples ciclos pierden específicamente su genoma apicoplasto y no procesan ni localizan las proteínas de los orgánulos, lo que los hace funcionalmente menos apicoplastos. A pesar de la pérdida de este orgánulo esencial, estos auxótrofos sin apicoplasto pueden crecer indefinidamente en un hemocultivo asexual, pero dependen por completo de IPP exógeno para sobrevivir (Yeh & DeRisi, 2011). Estos hallazgos indican que la biosíntesis de precursores de isoprenoides es la función más esencial del apicoplasto durante el crecimiento en etapa sanguínea. En suma, los fármacos que interfieren con los procesos de replicación, transcripción y traducción del apicoplasto conducen a la pérdida del apicoplasto, no matan al parásito rápidamente, ya que permiten que otros procesos bioquímicos del apicoplasto continúen, lo que le permite sobrevivir a un ciclo de crecimiento. Sin embargo, los inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos, la biosíntesis del grupo hemo y de los isoprenoides, que son funciones esenciales del apicoplasto, parecen afectar más críticamente a la supervivencia misma del parásito.



**Figura 5: Representación esquemática del fenómeno de muerte retardada en *P. falciparum* bajo la influencia de agentes que interrumpen la división del apicoplasto o la expresión génica.** A. Ciclo eritrocitario de la malaria en condiciones normales. B. Ciclo eritrocitario de la malaria bajo la influencia de antibióticos que inhiben la división del apicoplasto. Cada parásito contiene una sola copia del apicoplasto. El fracaso del apicoplasto para dividirse y segregarse durante la etapa de esquizonte produce merozoitos hijos defectuosos que mueren posteriormente en el segundo ciclo eritrocitario después de invadir nuevos eritrocitos (Chakraborty, 2016).

Se sabe que pocos eucariotas pueden prosperar en ambientes de calor extremo; la mayoría no pueden completar sus ciclos de vida por encima de 40 °C (Clarke, 2022). El mecanismo de supervivencia de *Plasmodium* podría atribuirse al linaje ancestral de algas del apicoplasto.

La tolerancia del parásito a las temperaturas febriles es crucial para su propagación exitosa en poblaciones humanas, así como un aspecto

fundamental de la patogénesis de la malaria. El fenotipado paralelo de una biblioteca mutante reveló una superposición significativa entre las vías del parásito subyacentes a la respuesta a las temperaturas febriles y las implicadas en el mecanismo de acción de la artemisinina, incluido el estrés oxidativo, las respuestas de daño proteico y el tráfico vesicular mediado por apicoplasto (Rocamora et al., 2018) (Bridgford et al., 2018).

Estudios recientes indican que la función esencial de los isoprenoides en la etapa sanguínea del parásito está en sus funciones como sustrato para la prenilación de proteínas, específicamente, en las proteínas preniladas que impulsan el transporte vesicular a la vacuola digestiva (Kennedy et al., 2019) (Howe et al., 2013). En ausencia de prenilación, se conduce a la desestabilización de la vacuola digestiva y la muerte del parásito (Howe et al., 2013). Otra defensa clave del parásito contra el estrés oxidativo inducido por compuestos prooxidantes (como la artemisinina) incluye el aumento de la biosíntesis de vitamina E, otra función exclusiva de la vía del MEP (Sussmann et al., 2017). Curiosamente, los estudios concurrentes ahora proporcionan información mecanicista que ilumina la relación bioquímica entre la biosíntesis de isoprenoides y la respuesta de supervivencia febril-temperatura del parásito (Mathews & Jezewski, 2021). La farnesilación de HSP40 (PF3D7\_1437900), un tipo de prenilación mediada por la vía MEP, es crítica para la supervivencia de *P. falciparum* del estrés térmico. La inhibición de la biosíntesis isoprenoide finalmente resulta en la asociación reducida de HSP40 con componentes críticos del citoesqueleto, la exportación de proteínas y las vías de transporte vesicular, sin las cuales *P. falciparum* no podría sobrevivir ni al estrés por calor ni frío (Zhang M. et al., 2021). Por lo expuesto, la biosíntesis isoprenoide y el mecanismo de acción de la artemisinina pueden servir como objetivos farmacológicos sinérgicos.

Debido a que las dianas moleculares de los inhibidores de la vía MEP se encuentran dentro del apicoplasto, para ejercer su actividad estos fármacos tienen que atravesar varias bicapas lipídicas, a saber, las del glóbulo rojo

(RBC), la vacuola parasitófora, el propio parásito *Plasmodium* intraeritrocítico y el apicoplasto. Como resultado, las concentraciones de fármacos necesarias para obtener actividad antiparasitaria aumentan significativamente. Como alternativa se espera que los futuros nanovectores diseñados deberían poder reducir el IC<sub>50</sub> de los inhibidores de la vía MEP (Biosca et al., 2019).

### 1.2.1.3. TRATAMIENTO

El objetivo principal del tratamiento es asegurar la eliminación rápida y completa de los parásitos que causan la enfermedad del torrente sanguíneo de un paciente para evitar que un caso de paludismo no complicado progrese a una enfermedad grave o a la muerte (WHO, 2020). Desde una perspectiva de salud pública, el tratamiento de la malaria se administra para reducir la transmisión de la infección a otras personas mediante la reducción del reservorio infeccioso y para prevenir la aparición y la propagación de la resistencia a los medicamentos antipalúdicos (Koram & Molyneux, 2007) (Tizifa et al., 2018).

El primer tratamiento eficaz para la malaria fue la corteza del árbol *Cinchona*, que contiene el alcaloide quinina. Este árbol crece en las colinas de los Andes, en particular en Perú. Los habitantes del Perú usaban el producto natural para controlar la malaria, y los Jesuitas introdujeron esta práctica en Europa durante los años 1640, donde fue aceptada con rapidez (Jaramillo-Arango, 1949). Sin embargo, no fue sino hasta 1820 cuando la quinina, el ingrediente activo, fue extraída de la corteza y nombrada por los químicos franceses Pierre Joseph Pelletier y Joseph Bienaimé Caventou (Gachelin et al., 2017). Después de que la quinina y otros alcaloides de *Cinchona* habían sido purificados, la molécula se probó rápidamente en pacientes. Numerosas observaciones médicas e informes de casos de todo el mundo pronto indicaron que la quinina era específica para las fiebres "palúdicas" (intermitentes). Por lo tanto, el tratamiento de las fiebres con quinina contribuyó notablemente a la nosografía de la malaria al distinguir entre las fiebres que respondían a los extractos y las que no (Gachelin et al., 2017).

La quinina se continuó utilizando como el único tratamiento, hasta que en la década de los 40, se introdujo la cloroquina que reemplazó a la quinina, por poseer menos efectos colaterales y por tanto ser mejor tolerada (Parhizgar, 2017) (Hand & Meshnick, 2011). Sin embargo, desde que el *P. falciparum* resistente a la cloroquina fue reportado por primera vez en Tailandia en 1959 y en Colombia en 1961, la malaria resistente a las drogas se ha vuelto uno de los más importantes problemas en el control de la enfermedad en los años recientes (Chan et al., 2012) (Sidhu et al., 2002) (Awasthi & Das, 2013).

Sin embargo, actualmente se ha reconocido que en realidad ya desde el año 350 de Nuestra Era, los chinos utilizaban la planta del *qinghao* (*Artemisia annua*) de forma efectiva para el tratamiento de la malaria (Hsu, 2006b). Se han identificado varios metabolitos bioactivos en *Artemisia annua*, el más estudiado es la artemisinina, un endoperóxido de lactona sesquiterpénico (Castilho et al., 2008). La artemisinina fue aislada por primera vez en 1971 por Tu Youyou (Hsu, 2006a). El éxito de la "tarea de combatir la malaria" dependió crucialmente de los científicos modernos que tomaron en serio el conocimiento que se registró en un texto médico tradicional chino, "*Prescripciones de emergencia guardadas*", por el famoso médico Ge Hong (284-363) (Hsu, 2006a). Debido a su actividad antipalúdica, la artemisinina es fundamental en las estrategias actuales de medicamentos antipalúdicos (Tse et al., 2019).

En los últimos años, el acceso a los TCA se ha ampliado de manera sustancial (WHO, 2016). Se calcula que en 2016 los países adquirieron 409 millones de tratamientos combinados basados en la TCA, frente a los 311 millones adquiridos en 2015. Más del 69% de esas adquisiciones fueron hechas por el sector público. El número de TCA distribuidos a través del sector público aumentaron de 192 millones en 2013 a 198 millones en 2016, la mayoría de ellos (99%) en la Región de África de la OMS (WHO, 2016).

#### 1.2.1.4. RESISTENCIA

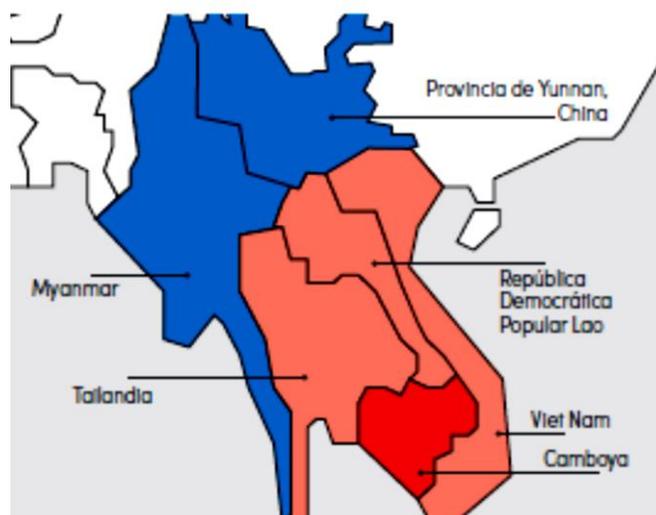
La OMS ha definido la resistencia como la capacidad de una cepa parasitaria de sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de una droga dada a dosis iguales o mayores que aquellas usualmente recomendadas, pero dentro de los límites de tolerancia del sujeto (WHO, 2010). Es así, que, tras la experiencia de resistencia a fármacos como la cloroquina, se considera que estamos ante *Plasmodium* resistente: cuando el tratamiento con antimaláricos, en dosis iguales o mayores a las recomendadas, resulta en un retraso en la eliminación o una eliminación incompleta del parásito en sangre (Paloque et al., 2016).

Comenzando a fines de la década de 1940, la cloroquina era el tratamiento estándar para la malaria sin complicaciones. Sin embargo, a fines de la década de 1950 y principios 1960, se identificaron *P. falciparum* resistentes a la cloroquina en todo el sudeste de Asia, Oceanía y Sudamérica (Sidhu et al., 2002) (Parhizgar, 2017) (Awasthi & Das, 2013) (Chan et al., 2012). La resistencia a la cloroquina desde entonces se ha extendido a casi todas las áreas del mundo (Sidhu et al., 2002). Posteriormente se han identificado cepas resistentes para antimaláricos como la sulfadoxina/pirimetamina, la mefloquina, halofantrina, y la quinina. Sólo esporádicamente se han reportado casos de resistencia en *P. vivax*; por este motivo la cloroquina permanece como el fármaco más utilizado para el tratamiento de la malaria causada por esa especie.

En el año 2008 se comunicaron los primeros casos de resistencia a las terapias combinadas con artemisinina en áreas del sudeste asiático (Noedl et al., 2008). La resistencia clínica a la artemisinina se manifiesta como un fenotipo de eliminación retardada; es decir, la infección, finalmente, se resuelve con la terapia TCA, pero el tiempo requerido para la eliminación del parásito aumenta sustancialmente (Mathews & Odom, 2018), lo cual podría contribuir al aumento

aún más preocupante de resistencia a múltiples medicamentos (Ménard et al., 2015). Los tratamientos basados en la combinación de fármacos son más susceptibles de desarrollar resistencias, poniendo en peligro terapias TCA consolidadas (Ashley & Phyo, 2018). La mayoría de los pacientes con una eliminación retardada del parásito post- tratamiento con TCA son capaces de curarse excepto cuando, adicionalmente, existe resistencia combinación de fármacos utilizada. Además, en la práctica médica, el diagnóstico se basa en la fiebre y la parasitemia, pero esto claramente da como resultado un diagnóstico excesivo de los casos de malaria y, por lo tanto, el uso inadecuado de medicamentos antipalúdicos, lo que aumenta el riesgo de resistencia a los medicamentos (Jain et al., 2018).

Aunque el problema de la resistencia está presente en todas las zonas endémicas de paludismo en el mundo, las áreas reconocidas actualmente como las más seriamente afectadas son la península de Indochina y la región del Amazonas en Suramérica (Ménard et al., 2015) (WHO, 2016). Hasta julio de 2016 se había confirmado la resistencia al tratamiento de primera línea contra el paludismo por *P. falciparum* en cinco países de la subregión del Gran Mekong (Camboya, Myanmar, República Popular Democrática Lao, Tailandia y Vietnam). En la mayoría de los lugares los pacientes con infecciones resistentes a la artemisinina se recuperan totalmente cuando reciben un TCA que contenga otro fármaco eficaz. No obstante, en la frontera entre Camboya y Tailandia, *P. falciparum* se ha vuelto resistente a casi todos los antipalúdicos, lo cual dificulta enormemente el tratamiento y requiere una estrecha vigilancia. Hay un verdadero riesgo de que la multirresistencia aparezca pronto en otras zonas de la subregión. La propagación de cepas resistentes a otras partes del mundo podría suponer un gran reto para la salud pública y poner en peligro los avances recientes en el control del paludismo (WHO, 2016) (Ménard et al., 2015).



**Figura 6: Mapa de resistencia a múltiples fármacos antipalúdicos en países de la subregión del Gran Mekong (WHO, 2016).**

Después de la experiencia positiva de la TCA, es posible que los nuevos tratamientos antimaláricos se basen en la utilización de terapias combinadas, que incluyan moléculas de diferentes clases químicas y con diversos mecanismos de acción para ayudar a frenar el desarrollo de multiresistencias (Ashley & Phyo, 2018). Desde hace décadas los estudios científicos vienen identificando una serie de rutas metabólicas que constituyen potenciales dianas terapéuticas y que ofrecen numerosas posibilidades para el desarrollo de nuevos compuestos antimaláricos (Sherman, 1979) (Ramya et al., 2007a). Por ello, actualmente se cuenta con varios fármacos en vías de desarrollo y se pueden caracterizar a partir de su mecanismo de acción (González & González Pacanowska, 2005): Los inhibidores de proteasas, inhibidores de la síntesis de ácidos grasos, inhibidores de la ruta de biosíntesis de isoprenoides, compuestos que interfieren con el transporte y el metabolismo de fosfolípidos, inhibidores del metabolismo mitocondrial, e inhibidores del metabolismo de pirimidinas (González & González Pacanowska, 2005) (Tse et al., 2019).

Un tratamiento antipalúdico ideal sería un potente inhibidor de la multiplicación de parásitos, de curso corto o dosis única, bien tolerado en mujeres embarazadas y niños pequeños, que además tenga un buen perfil de seguridad, sea asequible y presente una baja propensión a desarrollar resistencia (White, 1997) (Jain et al., 2018). Un candidato que recientemente se acerca a un antimalárico ideal, es el caso de la cipargamina (anteriormente conocido como KAE609), inhibidor potente de la multiplicación del parásito (Mathews & Odom, 2018) perteneciente a la familia de las espiroindolonas que actúa sobre la PfATP4, una Na<sup>+</sup> ATPasa que interrumpe la homeostasis de Na<sup>+</sup> en el parásito (Tse et al., 2019) (Am et al., 2020). Es un antipalúdico de acción muy rápida, es activo contra todas las etapas intraeritrocíticas del parásito de la malaria y ejerce actividad gametocitocida, con potencial de bloqueo de la transmisión (Mathews & Odom, 2018) (Am et al., 2020).

Se realizaron ensayos clínicos, ensayos de seguridad y tolerabilidad en humanos, siendo las principales preocupaciones la hepatotoxicidad y los efectos secundarios leves (Am et al., 2020). Un estudio clínico mostró una rápida eficacia en el tratamiento de la malaria por *P. falciparum* y *P. vivax* (White et al., 2015), por otro lado, el primer estudio realizado en África y el mayor realizado hasta la fecha con cipargamina, mostró que fue bien tolerada sin ningún problema de seguridad hepática en un rango de dosis más amplio y exposiciones más altas que los estudios anteriores. Además, confirmó su potencia y el rápido inicio de la actividad parasitaria con tiempos de eliminación del parásito de alrededor de 8 h (Ndayisaba et al., 2021).

El establecimiento de la resistencia a la artemisinina plantea la preocupación de la resistencia cruzada debido a las similitudes químicas entre dos grupos de compuestos (Tilley et al., 2016). Por el contrario, la cipargamina no está relacionada estructuralmente con los derivados de artemisinina (Ashley & Phyto, 2018) y es potente contra los parásitos resistentes a la artemisinina, incluido el mutante R561H, que se está propagando en Ruanda (Straimer et al., 2021). Sin embargo, cuando se utilizó como monoterapia, se detectaron mutaciones

emergentes en el tratamiento en pacientes que experimentaron recrudescimientos (Schmitt et al., 2021). Una combinación a base de cipargamina con un medicamento asociado adecuado con una alta barrera a la resistencia abordará la necesidad médica urgente para el desarrollo de nuevos medicamentos contra la malaria no basados en artemisinina (Ndayisaba et al., 2021) (Guasch-Girbau, 2021).

En suma, dado que la vacuna actual disponible proporciona sólo una protección moderada (Guasch-Girbau, 2021), los agentes quimioterapéuticos constituyen las mejores herramientas clínicas disponibles para la prevención y el tratamiento de la malaria (Tizifa et al., 2018). Los tratamientos antipalúdicos suelen administrarse como terapias combinadas, y las terapias combinadas basadas en artemisinina representan actualmente la clase de terapia más efectiva y ese es el estándar de atención recomendado por la OMS. Sin embargo, ya hay evidencia de resistencia emergente a la artemisinina y sus derivados (Ménard et al., 2015). Por lo expuesto, la búsqueda continua de nuevas clases de tratamientos adquiere gran relevancia y carácter de urgencia.

#### **1.2.1.5. DIAGNÓSTICO**

Algunas de las comunidades endémicas todavía carecen de acceso a pruebas de rutina en casos sospechosos. Por ejemplo, en 2018, solo el 74% de los pacientes sospechosos de tener malaria, excluyendo los casos indocumentados, tuvieron acceso a pruebas de diagnóstico en los centros de salud pública (WHO, 2019).

Ante la sospecha de que un paciente padece paludismo se recomienda realizar una confirmación del diagnóstico mediante pruebas de microscopia o mediante la prueba de diagnóstico rápido de paludismo antes de iniciar el tratamiento (WHO, 2010).

El tratamiento apoyado en el cuadro clínico solo está indicado cuando el resultado de las pruebas diagnósticas no puede obtenerse en el plazo de dos horas. Es preciso administrar rápidamente dentro de las primeras 24 horas después del inicio de la fiebre un medicamento eficaz y seguro para prevenir complicaciones potencialmente mortales (Koram & Molyneux, 2007).

Por lo tanto, el diagnóstico precoz y preciso de la malaria es importante para asegurar la administración apropiada del tratamiento. Esto minimiza el riesgo de desarrollo de resistencia del parásito, reduce la sobre dosificación de la droga y reacciones adversas innecesarias a los medicamentos antipalúdicos (WHO, 2010).

Un falso positivo por malaria puede generar resistencias a la medicación en el paciente tratado, sin embargo, un falso negativo puede conllevar la extensión de la enfermedad y la muerte del paciente. Por lo tanto, el diagnóstico certero de la malaria es fundamental para disminuir las tasas de mortalidad por esta enfermedad, y para ello es relevante identificar correctamente la especie de *Plasmodium* que infecta a cada paciente (Muñoz et al., 2015).

La detección y la identificación por microscopía de las especies de *Plasmodium* en muestras de sangre coloreadas con Giemsa, ha sido tradicionalmente el método de referencia y no ha tenido modificaciones desde el año 1903 (Montoya et al., 2008). La gota gruesa permite el examen de una mayor cantidad de sangre en menos tiempo. Se pone una gota en el centro de la lámina y se hacen movimientos envolventes para romper los hematíes y que permita observar los parásitos. Por otro lado, la extensión de sangre periférica es un método más lento que el de la gota gruesa, no se rompen los hematíes, por lo que los parásitos no cambian la morfología y es más fácil identificarlos (Muñoz et al., 2015) (Amir et al., 2018).

La sensibilidad de la gota gruesa es de hasta 10 a 30 parásitos por microlitro de sangre, lo que aproximadamente equivale al 0,001% de glóbulos rojos infectados. Sin embargo, las técnicas de diagnóstico basadas en la microscopía requieren de personal capacitado, y presentan limitaciones en la sensibilidad y en la detección de infecciones mixtas, especialmente en las regiones de baja y moderada endemia (Montoya et al., 2008). Los métodos de detección del parásito basados en la amplificación de ADN son una alternativa a este problema. Varios estudios han comparado el diagnóstico microscópico mediante gota gruesa con una técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR), alcanzando correlaciones de más del 90% (López et al., 2012).

Actualmente se cuenta con un creciente número de métodos basados en la técnica PCR para el diagnóstico de la malaria. Estos métodos permiten la identificación específica de parásitos de la malaria hasta el nivel de especie. Su principal ventaja radica en su alta sensibilidad, el límite teórico de detección de una PCR puede ser tan bajo como 0,02 parásitos /  $\mu\text{l}$  con PCR anidada siendo la tecnología de amplificación de ácido nucleico más sensible hasta ahora en comparación con un microscopista experimentado, que se dice que tiene un límite de detección de aproximadamente 5 parásitos /  $\mu\text{l}$  (Amir et al., 2018). Además, permite la diferenciación certera de las especies del parásito, cuando existen dificultades para su diferenciación morfológica o una infección mixta (López et al., 2012). En consecuencia, el enfoque molecular tiene el potencial de suplir algunas limitaciones del método microscópico, especialmente en lo relacionado a sensibilidad y especificidad (Amir et al., 2018), sin embargo, esta tecnología también tiene desventajas inherentes a la técnica y a los costos e infraestructura requerida. A pesar de ello es importante que los laboratorios de referencia cuenten con un método de PCR que permita el control de calidad del diagnóstico tradicional y hacer seguimiento de casos clínicos especiales (López et al., 2012). Hoy en día, existe la posibilidad de que los científicos pueden recolectar y procesar las muestras de sangre en zonas rurales sin electricidad y almacenar sin cadena de frío, y usarlas más tarde para el análisis genético de los parásitos (Nag et al., 2018). Lo atractivo de ello, es que la identificación genética global de estas mutaciones dibujaría un mapa de selectividad a los

diferentes TCAs, optimizando el tratamiento en función de la región geográfica. Cabe mencionar que métodos como la PCR, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el inmunoensayo enzimático (ELISA) se emplean sobre todo en estudios epidemiológicos (Amir et al., 2018).

Por otro lado, han surgido técnicas contemporáneas e innovadoras, principalmente las pruebas inmunocromatográficas, comúnmente llamadas "pruebas de diagnóstico rápido" (PDR), se basan en una técnica de inmunoensayo de flujo lateral integrada en un casete para la detección de biomarcadores específicos de parásitos de un solo paso, rentables, simples y rápidos. Estos atributos han hecho que las PDR sean inmensamente populares en el campo de la aplicación del diagnóstico de malaria en el punto de atención (POC) desde su introducción. África es el mayor consumidor con más del 80% de las ventas totales de PDR solo en 2017 (223 millones de los 276 millones de unidades) (Krampa et al., 2020). También han surgido otros métodos de diagnóstico molecular como qPCR y amplificación isotérmica (*loop-mediated isothermal amplification* LAMP) (Jain et al., 2018). La amplificación isotérmica mediada por bucle ha surgido como una alternativa simple, rápida, específica y rentable que permite un diagnóstico rápido de la malaria en áreas remotas fuera de los laboratorios de referencia (Vásquez et al., 2018). Se están desarrollando otros dispositivos, incluidos sistemas microfluídicos como LabChip qPCR, el cual es un dispositivo pequeño y portátil que integran múltiples funciones (Kim et al., 2021), aunque se necesita más investigación en esta dirección (Zhang et al., 2015). Incluso el diagnóstico microscópico ha pasado por un cambio de paradigma con el desarrollo de nuevas técnicas como el método de la capa leucocitaria cuantitativa (*the quantitative buffy coat* QBC) y la prueba rápida Partec y Paracheck-Pf (Amir et al., 2018).

Actualmente hay seis biomarcadores principales de *Plasmodium* que sirven como dianas en las pruebas diagnósticas. Estos incluyen cinco proteínas únicas del parásito (proteína II rica en histidina (HRP-2), lactato deshidrogenasa (LDH), aldolasa, glutamato deshidrogenasa (GDH) e

hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa y un marcador de pigmento (hemozoína) (Ragavan et al., 2018). Los biomarcadores pueden definirse como indicadores del estado biológico de un organismo, generalmente a través de la medición de sustancias, procesos o estructuras específicas a partir de una muestra extraída (Ragavan et al., 2018). Se pueden identificar en una prueba diagnóstica a través de un elemento de reconocimiento (por ejemplo, anticuerpos o aptámeros), produciendo una señal que se transduce en una salida que luego puede interpretarse (Ragavan et al., 2018) (Krampa et al., 2020). Además de las herramientas convencionales de diagnóstico de la malaria recientemente se han desarrollado nuevos sensores (Krampa et al., 2020). El aumento de la preferencia por sondear la LDH en sangre parece una mejora en el diagnóstico de la malaria, ya que su concentración se correlaciona con la densidad del parásito e implica parásitos metabólicamente activos. Esto contrasta con HRP-2 que está ausente en ciertas cepas mutantes. Además, los esfuerzos hacia una mayor complejidad del sistema podrían proponer sistemas electroquímicos apropiados para biomarcadores enzimáticos como LDH, GDH y aldolasa que podrían integrarse fácilmente en biosensores basados en enzimas. Por ejemplo, los sustratos que son específicos de estas enzimas podrían incorporarse para una reacción enzimática directa detectable a través de métodos electroquímicos. Estas innovaciones, junto con la capacidad de multiplexación, son necesarias para cumplir con un requisito importante de detección y diferenciación de especies en el diagnóstico clínico de la malaria (Krampa et al., 2020).

Los inmunosensores, que utilizan anticuerpos para la detección de biomarcadores, son el elemento central de la mayoría de las PDR (Krampa et al., 2020). Las pruebas PDR basadas en anticuerpos han beneficiado en gran medida el manejo de la malaria, pero siguen existiendo problemas con el costo y la estabilidad en climas tropicales que están intrínsecamente asociados con el uso de anticuerpos proteicos (Chanthap et al., 2010) (Albertini et al., 2012). Por otro lado, los sensores basados en aptámeros son de creciente interés debido a las buenas propiedades de los aptámeros, como la alta especificidad hacia la molécula objetivo, la estabilidad, la capacidad de funcionalización y la

no necesidad de animales para su producción (Kaur et al., 2018) (Jayasena, 1999)(Lakhin et al., 2013). Ya se han probado diferentes aptasensores contra biomarcadores de *Plasmodium*, colocándolos como alternativas simples, económicas y rápidas para el diagnóstico de la malaria (Jeon et al., 2013)(Ospina-Villa et al., 2018) (Gitta & Kilian, 2020). Añadir a estas plataformas nanomateriales como las nanopartículas (NPs) de oro (Hemben & Ashley, 2017), o diseñar inmunoensayos multiplex con la capacidad de detectar múltiples biomarcadores al mismo tiempo (Olesenlarsen, 2012), puede mejorar la sensibilidad y el rendimiento general de los sensores resultando en un diagnóstico mejor y más preciso (Guasch-Girbau, 2021).

Aptasensor	Biomarcador	Metodología de detección	LD	Referencia
pL1	pLDH (PvLDH, PfLDH)	Agregación por surfactante / Colorimétrico	8,3 - 8,7 pM (PvLDH) y 10,3 - 12,5 pM (PfLDH)	Jeon W. et al. 2013
pL1	pLDH	Electrodo de oro / EIS	**108,5 fM (PvLDH), **120,1 fM (PfLDH) y 1 parásito/μL (pLDH en muestras clínicas)	Lee S. et al. 2012
P38	pLDH	GCE / EIS	0,5 fM	Jain P. et al. 2016
p38	PfLDH	Agregación por surfactante / Colorimétrico	281 pM	Jain P. et al.2016
NG3-Tiol	PfGDH	Electrodo de oro/ EIS	* 0,77 pM	Singh N.K., et al. 2018
NG3-Tiol	PfGDH	Electrodo de oro / FET	** 16,7 pM y * 48,6 pM	Singh N.K. et al. 2019
36mer-FITC	pLDH	MoS2-Nanoláminas / FRET	** 550 pM	Kenry, Geldert A. 2016
2008s-biotin	PfLDH	Prototipo 3D / Colorimétrico	** 4,9 ng/mL	Dirkzwager R.M. et al. 2016
2008s-Tiol	PfLDH	APTEC - biosensor microfluídico portátil / Colorimétrico	** 0,84 pM y * 1,30 pM	Fraser L.A., et al. 2018

**Tabla 1: Aptasensores desarrollados para detección de biomarcadores de malaria.** LD: Límite de detección; \* LD: LD en muestras reales; \*\* LD: LD en tampón; EIS: Espectroscopia de impedancia electroquímica; FET: Transistor de efecto de campo; FRET: Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia; GCE: Electrodo de carbono vítreo.

Recientemente, Tanner et al., describieron un biosensor que usa anticuerpos y aptámeros basado en fluorescencia mejorada, que consiste en NPs de oro inmovilizadas aleatoriamente en un sustrato de vidrio a través del

autoensamblaje electrostático, para la detección específica de proteínas en sangre total. El reconocimiento de analitos se realiza a través de un esquema sándwich con una capa de anticuerpos como biorreceptores de captura, inmovilizada covalentemente en la superficie de NPs de oro, y una capa biorreceptora superior de aptámeros marcados fluorescentemente. Tal configuración sándwich garantiza no solo una especificidad extremadamente alta, sino también una distancia ideal de nanoestructura de fluoróforo (aproximadamente 10-15 nm) para lograr una fuerte amplificación de fluorescencia. Para una aplicación específica, probaron el rendimiento del biosensor en un estudio de caso para la detección del marcador relacionado con la malaria LDH de *P.falciparum*. El biosensor propuesto puede detectar específicamente la enzima LDH del parásito en sangre total con picos de hasta 10 pM (0,3 ng/ml) sin ningún tratamiento previo de muestra. La especificidad extremadamente alta, el LD competitivo, mejor que el logrado por ELISA, y la fabricación escalable son las principales fortalezas del dispositivo propuesto. Además, se espera que el LD reportado que se encuentra en el rango picomolar pueda reducirse al nivel femtomolar si se analiza una matriz transparente (por ejemplo, suero humano) en lugar de sangre total (Minopoli et al., 2021).

#### **1.2.1.6. BIOSINTESIS DE ISOPRENOIDES**

Los isoprenoides también conocidos como terpenos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, son esenciales para la supervivencia celular en todos los organismos, representan aproximadamente un tercio de los productos naturales caracterizados y comprenden >80,000 estructuras químicas únicas (Christianson, 2017) (Chang et al., 2021). Su diversidad proporciona una fuente versátil de potentes productos farmacéuticos con actividades que incluyen antibióticos (fumigaclavina A), compuestos anticancerígenos (paclitaxel), antivirales (ácido betulínico) y antiparasitarios (artemisinina). Además de su relevancia farmacéutica, los isoprenoides tienen utilidad como productos industriales que incluyen fragancias (limoneno), saborizantes (guaíol),

pigmentos (carotenoides), biocombustibles (bisabolano), biopolímeros (caucho) y pesticidas (piretrina I) (Malico, 2021).

Las funciones biológicas que realizan los isoprenoides son muy variadas e incluyen su participación en el metabolismo primario como reguladores de crecimiento (hormonas), fotoprotectores (pigmentos), transportadores de electrones, mediadores del ensamblaje de polisacáridos, componentes estructurales de las membranas celulares (Marõ et al., 2000) así como del metabolismo secundario como moléculas de comunicación y defensa frente a patógenos, atrayentes de los polinizadores, o responsables de aromas y sabores (Pichersky & Raguso, 2018).

Todos los isoprenoides están formados por una o varias unidades básicas de 5C (unidades de isopreno), y según el número de unidades se clasifican en: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesteterepenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) y politerpenos (superior a 40C). Todos los isoprenoides se forman a partir de dos precursores comunes de cinco carbonos, el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP); (Zhao et al., 2013) (Masini & Hirsch, 2014).

Hasta la década de los 90 se asumía que ambos precursores IPP y DMAPP eran sintetizados por todos los organismos vivos a través de una ruta metabólica universal denominada vía del MVA. Sin embargo, algunos resultados experimentales obtenidos al estudiar la biosíntesis de algunos compuestos isoprenoides en bacterias y plantas no se podían explicar de forma clara a partir de la existencia de esa vía metabólica. Destacan los estudios realizados en bacterias acerca de la biosíntesis de hopanoides (isoprenoides de la pared celular de las bacterias) y ubiquinonas, en los cuales se encontró que cuando se utilizaba como sustrato acetato marcado radioactivamente éste no se incorporaba a dichos compuestos (Rohmer, 1999) (Zhou & White, 1991).

Estos resultados pusieron en duda que el acetato fuera el precursor de estos compuestos y complementados con el uso experimental de inhibidores de la vía MVA, permitieron demostrar la existencia de una vía alternativa para la biosíntesis de isoprenoides en bacterias (Sangari et al., 2010). Actualmente se sabe que tanto el IPP como el DMAPP pueden ser sintetizados por dos vías metabólicas independientes según los organismos: la vía del MVA que es utilizada por los animales, las plantas (en el citosol), los hongos y las arqueobacterias; y la vía del metileritritol fosfato (MEP), utilizada por la mayoría de las eubacterias, las algas verdes, las plantas (en los plastos) (Mandel et al., 2001) y algunos parásitos, entre ellos los del género *Plasmodium* (Rodríguez-Concepcion, 2004) (Bracho et al., 2015) (Chakraborty, 2016) (Heuston et al., 2012).

La mayoría de las bacterias gramnegativas sintetizan isoprenoides a través de la vía del MEP (Boucher & Doolittle, 2000). Sin embargo, a través de diferentes filos bacterianos, hay ejemplos de especies que utilizan la vía del MVA, incluyendo *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Myxococcus* y *Borrelia*. También se sabe que *Listeria monocytogenes* y algunas especies de *Streptomyces* poseen ambas vías, pero en ambos organismos la vía del MEP desempeña el papel esencial en el metabolismo primario (Boucher & Doolittle, 2000), mientras que la vía del MVA es prescindible (Bron et al., 2008). Curiosamente, *Staphylococcus* constituye un ejemplo único de un género bacteriano cuyas especies utilizan diferentes vías para la biosíntesis de isoprenoides. Los estudios filogenéticos han sugerido que la vía del MEP es la vía ancestral en las bacterias y la vía del MVA se adquirió más tarde a través de la transferencia lateral de genes (Misic et al., 2016). Las especies de *Staphylococcus* que poseen la vía del MVA forman un grupo monofilético que incluye muchas especies notables asociadas a humanos y primates, como *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. simiae* y *S. aureus* (Misic et al., 2016). Por lo tanto, una hipótesis es que el uso de la vía del MEP por *Staphylococcus* puede contribuir a una restricción del rango del huésped animal, pero esto aún no se ha probado. Si bien *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. lugdunensis* poseen cada uno todos los genes en la vía del MVA, también han retenido algunas enzimas de la

vía del MEP, incluyendo la enzima CMS. En *S. aureus* la enzima CMS está involucrada en la vía de biosíntesis del ácido poli(ribitol fosfato) teicoico, que forma parte de la biogénesis de la pared celular. En concreto cataliza la transferencia del grupo citidil de CTP a D-ribitol 5-fosfato (Pereira et al., 2008). Por lo tanto, debido a su carácter esencial en el metabolismo primario se conservaría evolutivamente. Otra hipótesis que podría explicar la ausencia de enzimas de la vía del MEP es que sus metabolitos tales como HMBPP pueden estimular una fuerte respuesta a patógenos en el huésped humano (Chen, 2013). En efecto, *S. aureus* adoptaría la vía del MVA para evadir el sistema inmune del ser humano. Por el contrario, *S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* asociados a caninos poseen todos los miembros de la vía del MEP y carecen completamente de genes de la vía del MVA.

Organismo	MVA	MEP
Animales	+	-
Plantas superiores	+ (Citoplasma)	+ (cloroplastos)
° Algas	+	+
Hongos	+	-
Protozoos	+	+
* Eubacterias	+	+
Arqueobacterias	+	-

\* Se pueden sintetizar a partir de una de las vías (MVA o MEP).

\* Pueden sintetizarse a partir de una de las vías o ambas (MVA y/o MEP).

**Tabla 2:** Distribución de las vías para la biosíntesis de IPP y DMAPP en los distintos organismos.

La vía del MEP es esencial para la producción de isoprenoides en muchas especies bacterianas, incluidos patógenos humanos como *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, y *Vibrio cholera* (Murkin et al., 2014) (Qidwai et al., 2014) Bacterias en las que algunos isoprenoides intervienen en el transporte de electrones, mientras que otros actúan como portadores de carbohidratos en la biosíntesis del peptidoglucano (Heuston et al., 2012). En *P. falciparum*, sin embargo, los isoprenoides participan en los procesos de isopentenilación de ARNt, la prenilación de proteínas, así como para la síntesis de vitamina E, de carotenoides, de ubiquinona y dolicoles (Guggisberg et al., 2014), lo que los hace esenciales para la supervivencia del parásito.

### **1.2.1.6.1. La vía del metileritritol fosfato (MEP)**

La vía del MEP consta de siete reacciones en las que participan veinte metabolitos y siete enzimas (Singh & Ghosh, 2013b) (Figura 7). Los experimentos iniciales sugirieron que en la primera reacción de la vía tenía lugar la condensación de una molécula de piruvato y una molécula de gliceraldehído 3-fosfato (G3P) para formar un compuesto de 5 átomos de carbono, la 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) y liberar una molécula de CO<sub>2</sub> catalizada una enzima del tipo transcetolasa. La identificación del gen que codifica para dicha enzima, a la que se denominó DXP sintasa (DXS), se llevó a cabo de forma independiente por tres grupos de investigación (Campos et al., 2001) (Jürgen Bongs et al., 1997).

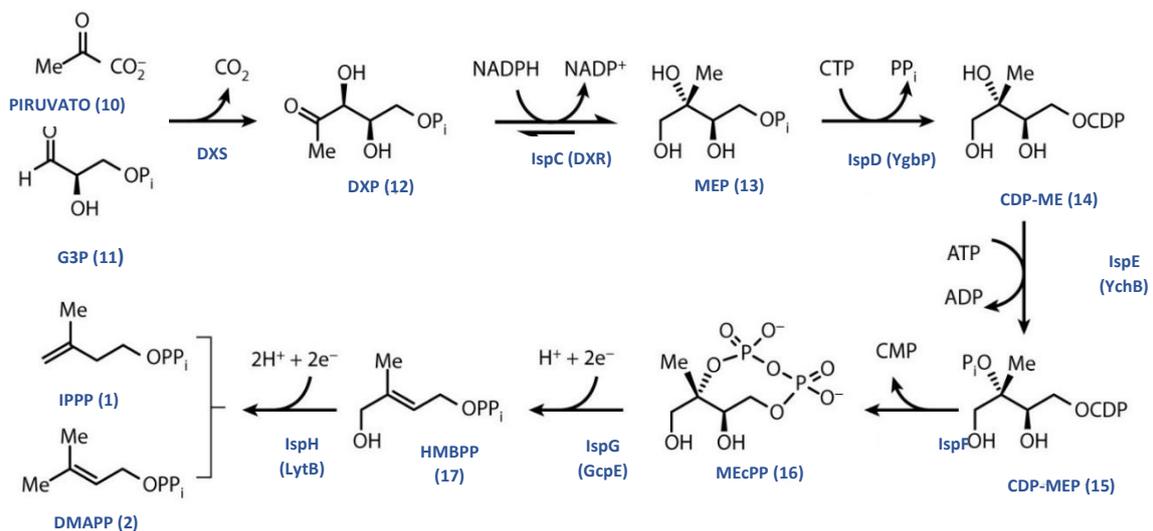
La identificación de las enzimas y de los genes correspondientes para cada una de las etapas de la vía MEP, así como los mecanismos de reacción para cada una de ellas, se obtuvo a través del uso de estrategias multidisciplinarias incluyendo genética, biología molecular, genómica comparativa y bioinformática. La funcionalidad de varios de estos genes pudo ser demostrada a través del rescate de mutantes de bacterias (Sangari et al., 2010). En el caso de la vía del MEP, se ha demostrado que la enzima HDR es capaz de sintetizar una mezcla de IPP y DMAPP, en una relación 1:5 (Rohdich et al, 2001), lo que constituye una diferencia con la vía MVA, en la que existe una enzima para la formación de DMAPP a partir de IPP (Hecht et al., 2001).

Actividad	Enzima		Gen bacterias	Gen <i>E. coli</i>
1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa	DXP sintasa	DXS	dxs	dxs
1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa	DXP reductoisomerasa	DXR/ IspC	ispC	dxr
4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol sintasa	CDPME sintasa	CMS /IspD	ispD	ygbP
4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol quinasa	CDPME quinasa	CMK /IspE	ispE	yghB
2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa	MEcPP sintasa	MCS /IspF	ispF	ygbB
1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintasa	HMBPP sintasa	HDS /IspG	ispG	gcpE
1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato reductasa	HMBPP reductasa	HDR /IspH	ispH	lytB

**Tabla 3: Enzimas de la vía del MEP.** Se puede observar la nomenclatura utilizada para referirse a las enzimas de la vía del MEP, su actividad, sus respectivos genes en bacterias y el nombre específico de los genes de *E. coli*.

Como se mencionó la vía del MEP comienza con la reacción de condensación entre una molécula de D-gliceraldehído 3-fosfato (G3P; **11**) y piruvato (**10**), formando como producto, DXP (**12**) con la liberación de CO<sub>2</sub>. La reacción es irreversible, la enzima utiliza pirofosfato de tiamina (TPP) y su cinética se ajusta a un mecanismo secuencial ordenado en el que el piruvato actúa como sustrato conductor (Eubanks & Poulter, 2003). En la segunda etapa la DXP es transformada en MEP (**13**), mediante un proceso de reordenamiento intramolecular y reducción catalizado por la enzima DXP reductoisomerasa (DXR/IspC) (Bowman et al., 2014). El MEP da nombre a la vía ya que es el primer intermediario específico para la biosíntesis de IPP y DMAPP, puesto que en bacterias la DXP también actúa como precursor en la biosíntesis de las vitaminas B1 (tiamina) y B6 (piridoxal) (Sprenger et al., 1997). En el siguiente paso, el MEP reacciona con CTP produciendo CDP-metileritritol (CDP-ME; **14**) por acción de la enzima CDP-ME sintasa (CMS/IspD). A continuación, tiene lugar la fosforilación del grupo hidroxilo del C<sub>2</sub> del CDP-ME catalizada por la

enzima CDP-ME quinasa (CMK/IspE), que utiliza ATP como sustrato y forma 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfato (CDP-MEP; **15**). En la etapa siguiente, la enzima metileritritol ciclodifosfato sintasa cataliza la transformación del CDP-MEP en CMP y 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcPP; **16**). Seguidamente, la IspG cataliza la apertura del anillo del ciclodifosfato y la deshidratación reductora del C<sub>3</sub> de MEcPP, formando 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP; **17**). Por último, el HMBPP se reduce a IPP (**1**) y DMAPP (**2**), en un proceso catalizado por la enzima IspH. Se encontró que la proporción de IPP a DMAPP producida por la enzima era de 6.3: 1 (Singh & Ghosh, 2013b).



**Figura 7: Esquema de la vía del metileritritol fosfato (MEP) para la biosíntesis de IPP y DMAPP.** En esta imagen se presentan las estructuras químicas tanto de los sustratos como de los productos de cada enzima. Figura extraída y modificada a partir de (Zhao et al, 2013).

Las enzimas de la vía del MEP pueden consumir o generar un producto específico, su función no puede ser compensada por ninguna otra enzima y tienen secuencias altamente conservadas (Kuntz et al., 2005) (Goodman &

McFadden, 2013) (Gardner et al., 2002). Lo expuesto, junto al hecho de que en los seres humanos la síntesis de IPP y DMAPP tiene lugar mediante la vía del mevalonato (por lo que no hay homólogos de las enzimas de la vía del MEP) aunado al hecho de que muchos microorganismos que infectan a mamíferos hacen uso exclusivo de la vía MEP para producir isoprenoides, convierte a estas enzimas en dianas potenciales para identificar nuevos fármacos antimicrobianos (Obiol-Pardo et al., 2011) (Saggu et al., 2016).

Se sabe que no todas las enzimas de una vía metabólica tienen el mismo nivel de control sobre la vía (Reinhart Heinric, 1974). Para poder determinar los principales puntos de regulación de la vía del MEP, Vivek Kumar Singh e Indira Ghosh (V. K. Singh & Ghosh, 2013a), construyeron un modelo cinético de la vía MEP de *P. falciparum*, que fue sometido a un análisis de control metabólico (un marco matemático que relaciona el comportamiento local, es decir, el comportamiento de una sola reacción considerada aisladamente, con el comportamiento global de la vía en la que participa) y al análisis de inhibición *in silico* de sus enzimas (Tabla 4). En dicho, trabajo mencionan principalmente dos estrategias o mecanismos metabólicos que conducen a la muerte del patógeno: (1) reducir el flujo a través de la vía mediante la inhibición de aquellas enzimas que tienen un alto coeficiente de control de flujo (la inhibición de las enzimas DXS o DXR causó una gran disminución en el flujo a través de la vía haciendo que la síntesis de los productos finales IPP y DMAPP fuese casi nula), y (2) La segunda estrategia consiste en inhibir las enzimas que tienen los coeficientes de control de flujo más bajos (la inhibición de las enzimas MEcPP sintasa (MCS /IspF) o HMBPP sintasa (HDS /IspG) condujo a una gran acumulación de sus respectivos sustratos y de algunos de los intermediarios que se encuentran en reacciones anteriores en la vía), provocando así una acumulación de metabolitos que provocó toxicidad celular. La inhibición de las enzimas CMS, CMK o IspH también dio lugar a un aumento de la concentración de metabolitos, principalmente de sus sustratos, pero no causaron inestabilidad al sistema. La posible advertencia en todo este esquema es que los dos grupos de enzimas no deben ser tratados simultáneamente porque en ese caso existe la posibilidad de compensar el

efecto de la inhibición del otro y provocar la neutralización general del efecto de los medicamentos.

Enzima inhibida	% decremento en flujo debido a la inhibición ( $I/K_i = 100$ )			Apoyo a los datos experimentales
	Competitivo	No competitivo	No competitivo	
<b>DXS</b>	96.11	96.04	97.99	La cetoclomazona inhibe la DXS de <i>Chlamydomonas</i> (a)
<b>DXR</b>	86.20	24.99	86.30	La fosmidomicina es un inhibidor bien conocido de la DXR (b)

(a) ((Mueller et al., 2000) y (b) (Umeda et al., 2011)

**Tabla 4: Resultados de la inhibición *in silico* de las enzimas que condujeron a la disminución en el flujo a través de la vía MEP.**  $K_i$  = Constante de inhibición del inhibidor e  $I$  = es la concentración de inhibidor que causó una disminución del 50% en la velocidad de la reacción en comparación con la velocidad no inhibida.

Otro aspecto importante derivado del estudio de la vía MEP con fines de salud pública que ha tomado auge en los últimos años, es la identificación del HMBPP (1-hidroxi-2-metil-2-(E)- butenil 4-difosfato), producto de la enzima HMBPP sintasa (HDS/IspG), que cataliza la sexta etapa de la vía. Este compuesto se ha encontrado que es el activador más potente conocido de las células T V- $\delta$ -9/V $\delta$ -2, que desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune frente a microorganismos patógenos. Este descubrimiento, convierte al HMBPP en un buen candidato para el desarrollo de vacunas contra diferentes patógenos importantes entre los que se incluyen *C. botulinum*, *M. tuberculosis*, *S. typhimurium*, *V. cholerae* y *P. falciparum* (Heuston et al., 2012)

#### 1.2.1.6.1.1. DXP reductoisomerasa (DXR)

La identificación del gen *dxr* de *E.coli* y la expresión exitosa de la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa recombinante (DXR, IspC, EC 1.1.1.86) se publicaron por primera vez en 1998 (Eto, 1998). Reuter y col. publicaron la primera estructura de la DXR (Reuter et al., 2002), y actualmente se dispone de más de 30 estructuras cristalinas de la DXR de distintos organismos, incluidas las de *M. tuberculosis* (Por ejemplo: código PDB 3ZHX) y *P. falciparum* (por ejemplo: códigos PDB 4KP762 y 3AU963). La enzima DXR de *P. falciparum* está codificada por el gen *ispC* y se encuentra localizada en el apicoplasto. Esta enzima es un homodímero (Umeda et al., 2010) (Umeda et al., 2011) y su estructura cristalina ha sido reportada en complejo con un análogo de la fosmidomicina beta-sustituido y manganeso usando difracción de rayos X (Chofor et al., 2015).

La estructura general de la DXR consiste en un homodímero, cada monómero se divide en tres dominios. El dominio N-terminal que presenta un sitio de unión a NADPH, mientras que el dominio central alberga la mayoría de los residuos que recubren el sitio activo, así como una región de bucle flexible que parece funcionar como una tapa sobre el sitio activo. Debido a esta flexibilidad intrínseca, se ha propuesto que la unión de catión, sustrato/inhibidor podría inducir un cambio conformacional (Yajima, 2002). Se cree que el dominio C-terminal tiene principalmente un papel estructural (Steinbacher et al., 2003). La DXR en su forma activa contiene una molécula de NADPH como donante de hidruro y un ion de metal divalente ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  o  $Co^{2+}$ ) como cofactor en cada subunidad para su actividad catalítica.

La enzima presenta un pH óptimo en el rango 7-8 (Jérôme de Ruyck et al., 2011). La DXR es una diana terapéutica particularmente atractiva porque cataliza el primer paso específico de la vía MEP: la isomerización y la reducción dependiente de NADPH de la DXP a MEP (Umeda et al., 2011). Lo que

significa que cataliza esta reacción en una sola etapa que implica un reordenamiento intramolecular seguido de una reducción del intermedio de aldehído resultante (Murkin et al., 2014). Los estudios realizados con la DXR de *E.coli* indicaron que su cinética se ajusta a un mecanismo secuencial ordenado, en el que el NADPH actúa de sustrato conductor. La enzima también es capaz de catalizar la reacción inversa, aunque a una velocidad menor (Singh & Ghosh, 2013b). Se han propuesto dos mecanismos para la reacción catalizada por la DXR. En el mecanismo de transposición de  $\alpha$ -cetol, la reacción comienza con la desprotonación del grupo hidroxilo C-3 seguida de una migración 1,2 para formar metileritrosa fosfato, que luego se reduce a MEP por acción del NADPH. En el mecanismo de reordenamiento retroaldol / aldol, la DXR primero escinde el enlace C3-C4 de la DXP de una manera retroaldol para generar un intermedio bimolecular de fosfato de tres carbonos y dos carbonos. Estas dos especies luego se reúnen mediante una reacción aldólica para formar un nuevo enlace C-C, produciendo un intermedio aldehído. La posterior reducción por NADPH proporciona MEP (Munos et al., 2009).

Estudios con DXR *knockout* en *E. coli* (Querol J et al 2002), *Arabidopsis thaliana* (Rodriguez-Concepcion, 2004) y *Bacillus subtilis* (Rohmer, 1999), resultaron tóxicos para las especies respectivas, lo que ilustra aún más la dependencia de estos organismos a la DXR y por consiguiente lo esencial de la vía del MEP.

#### **1.2.1.6.1.1.1. La Fosmidomicina**

La fosmidomicina (FR-31564; ácido 3-(N-formil-N-hidroxi-amino) propil fosfónico) es un ácido aminopropilfosfónico desarrollado en la década de 1970 como un agente antibacteriano. La fosmidomicina y su derivado, FR-900098, son productos naturales aislados a partir de *Streptomyces lavendulae* y *Streptomyces rubellomurinus*, respectivamente (Cobb et al., 2015). Se ha demostrado que la actividad de la enzima DXR es inhibida específicamente por la fosmidomicina de una manera dependiente de la dosis (Armstrong et al., 2015) (Lell et al., 2003). Se estableció que este compuesto antibacteriano actúa

como un inhibidor mixto (competitivo y no competitivo) de la DXR de *E. coli* y con un valor  $IC_{50}$  de  $\sim 8,2$  nM (Jérôme de Ruyck et al, 2011), caracterizado con una fase inicial de inhibición que es competitiva de unión lenta con el sustrato (DXP) y una segunda fase de inhibición que no es competitiva (Umeda et al., 2011) (Murkin et al., 2014). Ambos compuestos muestran una potente actividad antipalúdica *in vitro*, pero FR900098, que difiere de la fosmidomicina por la presencia de un grupo metilo adicional, inhibe el crecimiento de los cultivos de *P. falciparum* con aproximadamente el doble de eficacia que la fosmidomicina. El análisis de las estructuras de la DXR unida a FR900098 reveló que su grupo metilo adicional forma un contacto de van der Waals con la cadena lateral de un residuo de triptófano, lo que podría explicar por qué el FR-900098 es más activo que la fosmidomicina (Umeda et al., 2011) (Lell et al., 2003) (Cobb et al., 2015).

La fosmidomicina inhibe la DXR recombinante de *P. falciparum* con un valor de  $IC_{50}$  de  $\sim 28$  nM y muestra actividad sobre el parásito intacto, en cultivos *in vitro* de *P. falciparum* ( $IC_{50}$  entre 290 y 370 nM dependiendo de la cepa del parásito) y ensayos *in vivo* con ratones infectados con la especie de malaria de roedores *P. Vinckei* (Jomaa et al., 1999).

A pesar de su carácter polar, la fosmidomicina se transporta activamente dentro de la célula en *P. falciparum*; el mecanismo de transporte, sin embargo, queda por dilucidar (Baumeister et al., 2011) (Desai, 2015). Además, la fosmidomicina es un potente inhibidor de DXR de *M. tuberculosis in vitro*, pero no tiene ninguna actividad inhibidora en micobacterias, presumiblemente debido a su incapacidad para atravesar la pared celular micobacteriana. Se demostró que *M. tuberculosis* carece del transportador de glicerol 3-fosfato GlpT, que es responsable del mecanismo de transporte de compuestos polares en otras bacterias como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Deng et al., 2011). De hecho, una mutación *glpT* es uno de los pocos caminos reportados hacia la resistencia contra fosmidomicina (Dhiman et al., 2005) (Zhou et al., 2017).

*Toxoplasma gondii* es un parásito que, como *P. falciparum*, alberga un apicoplasto que es esencial para la supervivencia del parásito. Sin embargo, la fosmidomicina no muestra efecto en cultivos *in vitro* de *T. gondii*. Se demostró que la membrana plasmática del parásito es una barrera crítica para la absorción de fármacos. En un fuerte apoyo de esta hipótesis, se diseñaron *de novo* parásitos *T. gondii* sensibles a los medicamentos mediante la expresión heteróloga de una proteína transportadora bacteriana GlpT, y como resultado, los ratones infectados con estos parásitos transgénicos ahora pueden curarse con fosmidomicina. El intercambio de metabolitos entre el huésped y el parásito es un determinante crucial de la susceptibilidad a los medicamentos y un predictor de resistencia futura (Nair et al., 2011).

La fosmidomicina parece ser altamente efectiva contra los protozoos apicomplexos que se desarrollan dentro de los glóbulos rojos como *Plasmodium* y *Babesia*. *Babesia* causa una enfermedad similar a la malaria en el ganado y una variedad de otros mamíferos (Jomaa et al., 1999). En contraste, aquellos apicomplexos que son resistentes a la fosmidomicina parasitan las células nucleadas; *Theileria* infecta linfocitos, *Eimeria* infecta las células epiteliales y *T. gondii* se desarrolla en macrófagos y muchos otros tipos de células nucleadas. Esto sugiere que la importancia de una vía anabólica particular depende de la célula huésped específica infectada por el parásito y que, por lo tanto, la mera presencia de las enzimas no prueba su esencialidad. Mediante el uso de un mutante condicional en el translocador de fosfato de apicoplasto (APT) de *T. Gondii*, demostraron que el bloqueo de la actividad metabólica del apicoplasto mediante la supresión de la importación de carbono a través de APT resulta en la rápida desaparición del parásito (Lim & McFadden, 2010) (Brooks et al., 2010); y experimentos posteriores mostraron que los parásitos *Plasmodium* también son sensibles a la fosmidomicina cuando se desarrollan en células hepáticas nucleadas, al igual que en los glóbulos rojos (Nair et al., 2011). Por lo tanto, se evidencia la importancia del apicoplasto y que la célula huésped no es el determinante crítico de la sensibilidad a la fosfomicomicina del parásito.

Por otra parte, la fosmidomicina tiene efecto inmediato, pero muestra altas tasas de resistencia cuando se usa como monoterapia (Lell et al., 2003). El uso de la fosmidomicina como monoterapia para la malaria adolece de varios inconvenientes que incluyen baja biodisponibilidad, semivida corta e infecciones recurrentes (Lell et al., 2003), por lo que se requieren altas dosis del compuesto para lograr los resultados deseados. Esto parece deberse en parte a la naturaleza altamente polar de esta molécula. Por lo tanto, se intentó, probar con derivados con carácter más lipofílicos, que desafortunadamente no exhiben actividad antibacteriana (Jérôme de Ruyck et al, 2011). Los esfuerzos más recientes en términos de desarrollo de inhibidores para DXR se centran tanto en mejorar la biodisponibilidad de fosmidomicina y FR-900098 como en potenciar su carácter lipofílico para obtener actividad antimicobacteriana de células completas. Considerando que se cree que la ionización de sus grupos fosfonato contribuye a su baja biodisponibilidad, el uso de sus ésteres lipofílicos podría ayudar a superar este problema (Nishida, 1982) (Mckenney et al., 2012).

En particular, varios estudios han demostrado que la introducción de residuos de fenilo con diferentes patrones de sustitución en la posición  $\alpha$  de los algunos de los derivados puede aumentar significativamente su potencia inhibidora ante la DXR de *P. falciparum* en comparación con el compuesto original FR-900098 que presentaba una  $IC_{50}$  de 15 nM (Cobb et al., 2015). Además, algunos derivados similares produjeron una inhibición de DXR de *P. falciparum* con un rango nanomolar, así como una potente actividad inhibidora contra la cepa MDR K1 de *P. falciparum*, aproximadamente 10 veces mayor que la de fosmidomicina y sin citotoxicidad en células MRC-5 humanas (Brücher et al., 2015) (Masini & Hirsch, 2014).

Inspirado por los resultados mencionados anteriormente con inhibidores de DXR, el grupo de Song sintetizó y probó varios derivados de fosmidomicina y FR-900098, que llevan piridinas en la posición  $\alpha$  del grupo fosfonato, que mostraron una actividad inhibitoria hasta 11 veces mayor contra DXR de *P. falciparum* con respecto a la fosmidomicina (Diao & Cai, 2013) (Deng, 2013). Como era de esperar, algunos derivados de piridina mostraron una actividad

antipalúdica considerablemente mejorada con respecto a la fosmidomicina contra la cepa 3D7 (sensible a la cloroquina) y la cepa Dd2 (resistente a la cloroquina, pirimetamina y mefloquina) de *P. falciparum* y se encontró no ser citotóxico. Los experimentos de cocrystalización revelaron que el modo de unión era similar al de fosmidomicina.

Kurz y colaboradores han informado de profármacos de ésteres lipofílicos más funcionalizados que muestran valores de IC<sub>50</sub> significativamente mejores que fosmidomicina en los ensayos de crecimiento de *P. falciparum*, incluida una cepa de *P. falciparum* resistente a fármacos (Brücher et al., 2012).

Adicionalmente, se identificó una nueva clase de piridina/quinolona que contiene fosfonatos que inhibe la DXR con IC<sub>50</sub> tan bajo como 0,84 µM (Jérôme de Ruyck et al., 2011).

Actualmente, la fosmidomicina se encuentra bajo investigación junto con la piperaquina, una bisquinolina desarrollada en la década de 1960, que ya forma parte de un TCA líder en combinación con DHA. Un pequeño ensayo de Fase 2 en pacientes ghaneses de todas las edades mostró una alta eficacia de fosmidomicina-piperaquina (Mombo-Ngoma et al., 2018). Es un fármaco menos potente que el DHA con una semivida de eliminación de alrededor de 2 horas (Nishida, 1982). Desafortunadamente, se ha informado de resistencia a la piperaquina desde Camboya, Tailandia y Vietnam (Pluijm et al., 2019).

Una característica de las combinaciones en la Fase 2 es que todas contienen un socio que puede haber comprometido la eficacia en áreas de resistencia a múltiples fármacos (Jain et al., 2018). Este es un posible revés para los nuevos tratamientos y puede estimular nuevas combinaciones de las clases de fármacos más potentes con los socios no en uso generalizado como pironaridina y azul de metileno (Vanga et al., 2018). Mientras, los ensayos clínicos de la combinación fosmidomicina-clindamicina se han interrumpido

debido a la falta de eficacia en niños mozambiqueños menores de 3 años (Lanaspa et al., 2012).

#### **1.2.1.6.1.2. La enzima CDP-metileritritol sintasa (CMS/ispD)**

La enzima CDP-metileritritol sintasa (CMS) es la tercera enzima de la vía del MEP y es el producto del gen *ygbP* (también llamado *ispD*) de *E. coli*. La CMS cataliza la formación de 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfato (CDP-metileritritol) y PPI a partir de MEP y citidina trifosfato (CTP) (Rohdich et al., 1999).

La actividad de la enzima depende de cationes divalentes,  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , lo cual se ha demostrado mediante estudios cinéticos con la CMS de *E. coli* (Richard et al., 2004) (Richard et al., 2001). El CTP actúa como segundo sustrato, de forma que se produce una transferencia de CMP al MEP y se libera pirofosfato inorgánico (PPI). El CTP y el  $Mg^{+2}$  se encargan de neutralizar las cargas de los grupos fosfato del CTP. Una vez unido, se forman puentes de hidrógeno y se produce la reacción, dando lugar a los productos CDP-ME y PPI (Richard et al., 2004).

Los estudios realizados por Richard et al. en 2004, muestran dos residuos de lisina (Lys27 y Lys213 en la CMS de *E. coli*) necesarios para estabilizar el estado de transición pentavalente. Además, se ha observado que los residuos de lisina anteriores, situados en el centro activo de la enzima CMS de *E. coli*, también se encuentran conservados en la enzima de *P. falciparum* (Gabrielsen et al., 2004).

Se han informado varias estructuras cristalinas de CMS bacterianas, (Gabrielsen et al., 2006) incluidas algunas de micobacterias. Esto es particularmente interesante dado que se demostró que el gen que codifica para

la CMS es esencial para el crecimiento de *M. tuberculosis* (Bernal et al., 2005). Actualmente, se cuenta con el depósito de las estructuras del apoenzima de la CMS de *M. tuberculosis* (código PDB 3OKR) y de la enzima formando un complejo con CTP y  $Mg^{2+}$  (código PDB 2XWN) (Björkelid et al., 2011) así como con CDP-ME (código PDB 3Q80).

La estructura de la CMS consiste en un homodímero, cuya formación es promovida por un brazo  $\beta$  largo, que se extiende desde el dominio globular principal que tiene un pliegue  $\alpha / \beta$ . El sitio activo está altamente conservado entre varias especies, y está formado principalmente por residuos de aminoácidos que pertenecen al dominio principal, aunque también están implicados algunos residuos del brazo  $\beta$  (Imlay et al., 2016). Como resultado, el sitio activo está ubicado en la interfaz del dímero, lo que lo hace bastante expuesto al solvente (Bernal et al, 2005) (Masini & Hirsch, 2014). Además, se observó cierto grado de flexibilidad en el sitio de unión a citosina de la CMS cuando se comparo la estructura de la CMS de *M. tuberculosis* que lleva unida CTP con la del apoenzima. Los sustratos y productos se mantienen unidos gracias a un *loop* de glicina e interacciones con puentes de hidrógeno entre ligandos y cadenas laterales (Masini & Hirsch, 2014).

La CMS de *P. falciparum* muestra diferencias notables en la secuencia de aminoácidos con respecto a las CMS bacterianas, siendo más de 3 veces mayor que las de los correspondientes homólogos bacterianos (Björkelid et al., 2011). Una región de la secuencia de aminoácidos de la CMS de, *P. falciparum* cercana al extremo C- terminal y similar en longitud a la de otros ortólogos de CMS, muestra 19% y 16% de identidad de secuencia con la CMS de *E. coli* y CMS de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, respectivamente. Sin embargo, de los 22 residuos de aminoácidos que se conservan estrictamente en la enzima de la mayoría de las especies bacterianas, (Kemp et al., 2003) sólo 17 se conservan en la CMS de *P. falciparum*. El brazo  $\beta$  de la CMS de *P. falciparum* se extiende en nueve aminoácidos, pero se conservan en su mayoría otros motivos de la

secuencia que definen las características conformacionales de la proteína (Imley et al., 2016).

La presencia de una región particularmente polar situada en el medio de la secuencia podría sugerir que la CMS de *P. falciparum* está formada por dos dominios conectados por este enlazador polar. CMS posee el sitio activo menos lipofílico entre las enzimas de la vía MEP (Imley et al., 2016).

Además, la CMS ha recibido una atención renovada, si bien su sitio activo es particularmente polar y tradicionalmente difícil de atacar con análogos de sustrato, la identificación de un sitio alostérico potencial en la CMS ha proporcionado una forma factible para el descubrimiento de potentes inhibidores alostéricos, por ejemplo, Witschel et al. reportaron pequeñas moléculas con actividad inhibidora en el rango nanomolar contra la CMS de *A. thaliana* ( $IC_{50} = 140$  nM e  $IC_{50} = 35$  nM) y actividad herbicida muy potente (Witschel et al., 2011).

Recientemente, mediante el cribado de una biblioteca de 100 000 compuestos utilizando un ensayo monitorizado fotométricamente, Kunfermann et al. descubrió alcaloides marinos halogenados del tipo pseudilina que tienen una potente actividad inhibidora contra la CMS de *A. thaliana* (Kunfermann et al., 2014). Curiosamente, la presencia de un catión metálico divalente, en particular  $Cd^{2+}$ , dio como resultado un aumento de 7 veces en la actividad. Otros cationes de metales divalentes como  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  también mejoran la potencia inhibitoria. El papel fundamental de un catión divalente para la actividad inhibidora se confirmó al resolver la estructura del cocrystal (código PDB 4NAK) (Kunfermann et al., 2014).

Los derivados de pseudilina halogenados también se probaron contra la enzima CMS de *P. vivax* y se encontró que eran ligeramente menos potentes. Los autores consideran la posibilidad de que la bolsa alostérica observada para

la CMS de *A. thaliana* no esté presente o es menos flexible en otros ortólogos de CMS (Kunfermann et al., 2014). Esto podría justificar la menor potencia inhibitoria contra la enzima de *P. vivax*, considerando también las diferencias de secuencia antes mencionadas entre la CMS de *P. falciparum* y sus ortólogos bacterianos.

La CMS es el único objetivo intercelular del compuesto antipalúdico conocido como MMV008138 [(2,4-dichloro-phenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2-ium-3-carboxylate)] (Imlay et al., 2016). Sin embargo, no se observó ningún efecto sobre el crecimiento cuando fue probado contra *T. gondii*. Esta falta de actividad puede deberse a la falta de transporte de MMV008138, que es similar a las observaciones anteriores utilizando fosmidomicina. Mientras que *T. gondii* se basa en la vía MEP para la biosíntesis de precursores isoprenoides, el parásito es insensible a altas concentraciones de fosmidomicina debido a la falta de absorción del fármaco a nivel de la membrana plasmática del parásito (Bowman et al., 2014). MMV008138 inhibe la CMS de *P. falciparum* competitivamente respecto a su sustrato CTP. No se observó la inhibición de ortólogos CMS bacterianos, pero se inhibe la CMS de *P. vivax* (Imlay et al., 2016), lo que sugiere que nuevas modificaciones en esta molécula pueden ampliar su alcance terapéutico contra múltiples especies de malaria (Ghavami et al., 2018).

Por otro lado, el compuesto de amonio cuaternario bromuro de domifeno (DMB) también se ha demostrado en ensayos de actividad enzimática *in vitro* inhibir la CMS de *M. smegmatis* y de *P. vivax* (Gao et al., 2012). Además de su actividad contra la CMS, se encontró que DMB inhibe el crecimiento de *M. smegmatis* también al afectar las vías independientes de CMS y, además, muestra valores de MIC comparables con respecto a la isoniazida y la rifampicina frente a las cepas de tuberculosis MDR (multidrug-resistant) y XDR (extensively-drug-resistant) (Gao et al., 2012). En otro estudio, cepas representativas de patógenos comunes fueron seleccionadas (*Cinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *E. coli* (8099) y *Candida albicans*

(ATCC 10231)) y tratadas con 60 µg/mL de AgNPs y 60 µg/mL de DMB, y se verificó la actividad antimicrobiana individual y sinérgica de AgNPs o DMB, los efectos antimicrobianos sinérgicos, que pueden estar asociados con la reducción de la biomasa de biopelículas patógenas (Hu et al., 2021).

Los liposomas en particular son una plataforma ideal para desarrollar sistemas de administración de fármacos para terapias combinadas a nanoescala, debido a su capacidad para incorporar en una sola nanoestructura moléculas con características ampliamente divergentes (y mecanismos antimicrobianos), a saber, fármacos hidrófilos en su núcleo acuoso y compuestos lipofílicos en su bicapa lipídica. Las dimensiones moleculares de la DMB sugieren que se puede insertar en las membranas biológicas para constituir una carga de fármaco liposoluble en un LP diseñado para la administración dirigida de terapias combinadas antipalúdicas. Por ello, DMB formó parte de un nanovector en combinación de otros fármacos, el cual podría ser una herramienta esencial para un futuro escenario de erradicación en el que los últimos casos de cepas de *Plasmodium* resistentes tendrán que eliminarse con dosis locales extremadamente altas de combinaciones de futuros nuevos medicamentos (Biosca et al., 2019).

#### **1.2.1.6.1.3. *Escherichia coli*, un modelo para el estudio de la vía del MEP**

La vía del MEP que es utilizada por todas las bacterias gramnegativas (por ejemplo, *E. coli*), la mayoría de las bacterias grampositivas (por ejemplo, *M. tuberculosis*) y algunos protozoos apicomplexanos (por ejemplo, *P.falciparum*), proporciona enzimas útiles para el desarrollo de nuevos antimicrobianos debido a su ausencia en los seres humanos, ya que es menos probable que las terapias contra estas enzimas causen efectos secundarios graves en los pacientes.

En *E. coli*, la vía MEP ha sido ampliamente estudiada, sobre todo debido a su valor industrial para la producción bacteriana de isoprenoides. Además, es un organismo modelo para la comprensión de la vía y explorar otros agentes patógenos la vía conservan, principalmente, porque sus enzimas están altamente conservadas entre las especies. Particularmente, *E. coli* y *P. falciparum* son dos modelos evolutivamente diversos, sin embargo, las implicaciones evolutivas en el desarrollo de resistencia de *P. falciparum* son similares a las de *E. coli* (Pines et al., 2019). Lo cual se aplica en investigaciones con la CMS de *E. coli* (Baatarkhuu et al., 2018) y la CMS de *P. falciparum* (Imlay et al., 2016) (Price et al., 2016). Otro ejemplo, es el alto grado de similitud de la DXR de *E. coli* con la enzima DXR de *P. falciparum* y la DXR de *M. tuberculosis* (Umeda et al., 2011).

Por lo expuesto y por la amplia información disponible sobre la inhibición de sus enzimas se considera a *E. coli* un modelo valido para estudiar:

(1) Los mecanismos de acción de las enzimas; por ejemplo, las enzimas DXS y DXR, tanto de *E. coli* y *P. falciparum* mantienen un único mecanismo de actividad enzimática, y que se puede inferir a otros patógenos tales como *M. tuberculosis* (Wang & Dowd, 2020) (Jérôme de Ruyck et al., 2011) (Deng et al., 2011); (2) la identificación de mutaciones que confieren resistencia a fármacos, con el propósito de ayudar al diseño de futuras generaciones de fármacos antimicrobianos. Por ejemplo, Pines et al, encontraron mutaciones en la DXR de *E. coli* que confieren resistencia a la fosmidomicina, en sitios altamente conservados que también existen en *P. falciparum* (Pines et al., 2019); (3) las bases moleculares y los mecanismos de acción de fármacos; por ejemplo, en la investigación de los análogos de la fosfomicomicina (Armstrong et al., 2015); (4) los mecanismos de acción distintivos que conducen a la muerte del parásito de la malaria (V. K. Singh & Ghosh, 2013b); (5) las características estructurales para el diseño de fármacos basados en la estructura; por ejemplo, la estructura de DXR, DXS y MCS de *E. coli* comparten una gran similitud de secuencia con sus correspondientes enzimas de *P. falciparum*; (6) el grado de orden y

conservación en partes del sitio activo; por ejemplo, el alto grado de conservación estructural en y alrededor del sitio activo de MCS de *P. falciparum* respecto a la MCS de otras bacterias gramnegativas sugiere que cualquier modelo estructural podría ser adecuado para apoyar al descubrimiento de fármacos (O'Rourke et al., 2014); (7) el perfil metabólico de agentes patógenos frente a fármacos; por ejemplo, se observó en estudios previos que el perfil metabólico de *P. falciparum* y *E. coli* tratados con fosmidomicina fue similar y consistente con la identificación de CMS (Zhang et al., 2011); (8) consecuencias de la inhibición de una enzima sobre la vía del MEP; por ejemplo, la fosfomicomicina inhibe directamente su objetivo conocido, DXR, y actúa indirectamente sobre las células para inhibir CMS (Zhang et al., 2011); (9) estudio de potenciales dianas farmacológicas; por ejemplo, MCS y HDS (Singh & Ghosh, 2013a); (10) la identificación de nuevos inhibidores; por ejemplo, se han identificado nuevos inhibidores para CMK, enzimas clave de la vía del MEP, usando las enzimas CMK de *E. coli*, CMK de *Shigella dysenteriae*, CMK de *Salmonella typhi* y CMK de *Yersenia Pestis*, con secuencias altamente conservadas (Tang et al., 2011).

Por otro lado, *E. coli* es usada ampliamente en experimentos de genética y biología molecular debido a que la estructura de su genoma es altamente flexible, permitiendo la movilidad de material genético por medio de transposones, secuencias de inserción, bacteriófagos y plásmidos. Además, *E. coli* como modelo, tiene ventajas a nivel técnico por su velocidad de crecimiento y pocos requerimientos nutricionales. Por lo contrario, para el cultivo de *P. falciparum* se requiere condiciones especializadas, mayores niveles de bioseguridad y experticia para su manipulación. Finalmente, hay que considerar que para acceder a las enzimas de la vía del MEP de *P. falciparum* es necesario cruzar varias barreras, debido a que las enzimas se localizan en el apicoplasto, en cambio *E. coli* tiene menor complejidad estructural y por lo tanto permite ampliar las estrategias experimentales.

### 1.3. LOS APTÁMEROS

Etimológicamente el término aptámero proviene del latín *aptus* que significa fijar o unir y del griego *meros* que significa partícula.

Los aptámeros son ácidos nucleicos de cadena sencilla, ADN o ARN, que poseen una estructura tridimensional particular que les permite unirse con afinidad y especificidad a la molécula diana. Los aptámeros tienen propiedades de reconocimiento equiparables a las de los anticuerpos; sin embargo, por la naturaleza de su composición tienen ventajas significativas sobre estas moléculas, tales como: (1) por su tamaño (5-20 KDa) son eliminados rápidamente por filtración renal; generalmente se requieren modificaciones para alcanzar niveles terapéuticos, sin embargo, representa una ventaja debido a que se puede modular su eliminación disminuyendo el riesgo de daño renal, (2) baja inmunogenicidad, (3) proceso simple y económico para su síntesis y modificación, (4) son resistentes al calor y a las proteasas sin modificaciones estabilizadoras; pueden ser desnaturalizados y utilizados repetidamente, en cambio un anticuerpo bajo cualquier episodio de desnaturalización generalmente reduce o anula su capacidad de reconocimiento (5) alta precisión, pureza y reproducibilidad en síntesis, y (6) procesos de producción no dependientes de células o animales, lo que representa una ventaja a nivel bioético (Yang et al., 2011) (Afrasiabi et al., 2020).

Los aptámeros prometen ser buenos candidatos como moléculas estratégicas para terapias o diagnóstico, ya que pueden dirigirse contra una amplia variedad de moléculas diana o incluso microorganismos completos (Romero-López & Berzal-Herranz, 2017). Aunque los aptámeros son candidatos prometedores para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, aún quedan algunos desafíos como, por ejemplo, su degradación ante las nucleasas, factor crucial que se debe tener en cuenta en su optimización sobre todo si su fin último es ser administrado como terapia (Nitsche et al., 2007).

Los aptámeros no modificados (especialmente los aptámeros de ARN) son generalmente susceptibles a la digestión por nucleasas celulares presentes en fluidos o células corporales. Por lo tanto, las modificaciones químicas a menudo se introducen en los oligonucleótidos para aumentar la estabilidad *in vivo* de los aptámeros. Estas modificaciones químicas incluyen la limitación del extremo 3' con timidina/biotina (Dougan et al., 2000), sustitución de grupos fosfato por fosforotioato/metilfosfonato, modificaciones de 2'-azúcar con un fluoro (F), amino (NH<sub>2</sub>) u O-metilo (OCH<sub>3</sub>) y modificación de ácido nucleico bloqueado (LNA). La modificación del LNA es un puente de metileno intramolecular de 2'-O a 4'-C, y los LNA muestran una alta resistencia a las nucleasas (Karlsen & Wengel, 2012). Las modificaciones más comunes son la sustitución de un átomo de azufre por un oxígeno en un fosfato de la cadena de ADN o ARN, así como las modificaciones de los aptámeros de ARN en la posición 2' en el anillo de ribosa. Los aptámeros de ARN modificado tienen una vida media que varía de varias a cientos de horas, pero el ARN no modificado generalmente tiene una vida media de segundos en el suero humano (Shigdar et al., 2013) (Pan et al., 2018)

En cuanto a la pequeña masa (5-20 kDa) y el diámetro corto (< 5 nm) de los aptámeros, como se precisó anteriormente, los aptámeros se filtran fácilmente a través de los capilares glomerulares. Para extender el tiempo de circulación de los aptámeros, se conjugan con compuestos con alta masa molecular, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), además de extender la vida media en la circulación sanguínea, la conjugación de PEG puede mejorar la solubilidad y la estabilidad del aptámero como fármaco. El primer fármaco a base de aptámeros (Macugen de Pfizer) se basó en la PEGilación (Swierczewska et al., 2015) y se obtuvo una vida media de 9,3 h según los experimentos farmacocinéticos realizados en monos (Nimjee et al, 2017).

En lo que respecta a la obtención de aptámeros, durante su proceso de selección, los aptámeros con la mayor afinidad a una estructura diana se aíslan de una biblioteca (grupo de oligonucleótidos con posiciones aleatorias para

ácidos nucleicos, que contienen hasta  $10^{15}$  variantes de secuencia diferentes), que representa un grupo de variantes significativamente mayor que los anticuerpos (Lakhin et al., 2013) (Nitsche et al., 2007). Mientras que los anticuerpos pueden generarse solo contra antígenos (principalmente proteínas), se pueden generar aptámeros contra prácticamente cualquier tipo de biomoléculas, que incluyen proteínas, lípidos y azúcares. La especificidad mostrada por los aptámeros es otra característica que se evidencia en su capacidad para diferenciar cambios estructurales mínimos entre la molécula diana y otras moléculas. Un ejemplo es el aptámero antiteofilina, que distingue específicamente la teofilina de la cafeína, a pesar de que sólo un grupo metilo diferencia estas dos moléculas (Jenison et al., 1994). Además, la afinidad del aptámero también puede ajustarse optimizando su secuencia de reconocimiento o manipulando procesos de condiciones de reacción de unión (Yang et al., 2002) (Schmidt et al., 2004) (Stovall et al., 2014).

Actualmente, muchas enfermedades infecciosas tienen inconvenientes a nivel de pruebas diagnósticas, como baja sensibilidad, poca especificidad, procedimiento prolongado y resultados falsos positivos o negativos. Por ello, se han generado aptámeros dirigidos a dianas estratégicas tales como lipoglicanos, proteínas y células enteras como posibles herramientas de diagnóstico. En dicho ámbito, se han podido apreciar avances prometedores tales como el desarrollo del aptámero T9 que detecta antígenos ManLAM (Lipoarabinomanano de manosa) en muestras de suero y esputo de pacientes con tuberculosis pulmonar activa y pacientes con tuberculosis extrapulmonar; y el caso del aptámero R12.06 desarrollado para la  $\alpha$ -toxina de *S. aureus*, con el cual se logró la detección sensible de 200 nM de toxina a en muestras de suero humano sin diluir usando un sistema de detección tipo sándwich (Afrasiabi et al., 2020) (Wan et al., 2021). Recientemente, el brote de SARS-CoV-2 ha sido declarado una emergencia de salud mundial y su manejo depende en gran medida de la disponibilidad generalizada de una prueba de diagnóstico precisa. Para abordar dicha necesidad se desarrolló el aptámero de ADN S14 contra la proteína S (*Spike*) del SARS-CoV-2. La evaluación clínica del aptámero S14 en muestras de hisopado nasofaríngeo ha mostrado una respuesta altamente

discriminatoria entre los individuos infectados por SARS-CoV-2 y los no infectados con una sensibilidad y especificidad del 91% y 98% (Gupta et al., 2021).

Además, se han evaluado varias herramientas nanotecnológicas para fortalecer el aislamiento y la aplicación de nuevos aptámeros para el diagnóstico de la malaria dirigidos a detección la enzima lactato deshidrogenasa del parásito: 2008s (Cheung et al., 2013), pL1 (Lee et al., 2014) (Choi & Ban, 2016), P38 (Jain et al., 2016) y LDHp 11 (Frith et al., 2018). Sin embargo, de todos los aptámeros relacionados hasta la fecha el mejor caracterizado es el aptámero 2008s identificado por Tanner et al., aprovechando la secuencia y la divergencia estructural entre la enzima LDH del parásito y la de mamíferos, identificó el aptámero de ADN en la década de 2008 con una alta afinidad por la PfLDH, lo que permitió el desarrollo de un ensayo colorimétrico para el diagnóstico rápido de malaria en sangre (Cheung et al., 2013) (Fraser et al., 2018). Este tipo de experiencias nos muestra el potencial de los aptámeros como herramientas prometedoras para la identificación y el control de la malaria.

DENOMINACIÓN DEL APTÁMERO	ORGANISMO	DIANA	Kd (nM)
LYD-3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Célula entera	661.8 ± 111.3
APT3	<i>Salmonella choleraesuis</i>	Célula entera	41 ± 2
BB16-11F	<i>Bifidobacterium breve</i>	Célula entera	18.66 ± 1.41
CCFM641-S	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Célula entera	10.69 ± 0.89
SAL.26	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Célula entera	123 ± 23
CT916	<i>Vibrio cholerae</i>	La toxina del cólera	48.5 ± 0.5
S3	<i>Staphylococcus aureus</i>	SEA (enterotoxina A estafilocócica)	36.93 ± 7.29
C10	<i>Staphylococcus aureus</i>	Enterotoxina C1	65.14 ± 11.64
MA1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Célula entera	12.0 ± 2.0
T9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ManLAM	668 ± 59
ST2P	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Célula entera	6,33 ± 0,58
Apto22	<i>Salmonella Paratyphi A</i>	Célula entera	47 ± 3
R12,06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Toxina alfa	93,7 ± 7,0
Apto B12	<i>Escherichia coli K88</i>	Célula entera	15 ± 4
8.28A	<i>Escherichia coli DH5α</i>	Célula entera	27,4 ± 18,7

**Tabla 5: Aptámeros de ADN contra bacterias con potencial para uso diagnóstico y/o terapéutico (Pan et al., 2018) (Afrasiabi et al., 2020) (Wan et al., 2021).**

Por otro lado, los aptámeros se pueden usar en dos formas diferentes en el desarrollo de procesos terapéuticos: (1) Como moléculas efectoras para reconocer una molécula diana y ejercer concisamente la función terapéutica; (2) y como vehículos para llevar y liberar el fármaco a su lugar de acción (Afrasiabi et al., 2020).

Sobre el uso del aptámero como molécula efectora, se han identificado aptámeros con propiedades terapéuticas que han sido evaluados exitosamente, un caso ejemplar es el desarrollo del aptámero S3, que se une a la enterotoxina estafilocócica A (SEA) de *S. aureus*, con  $K_d$  de  $36,93 \pm 7,29$  nM, e inhibe eficazmente la proliferación mediada por SEA de células mononucleares de sangre periférica humana y la secreción inflamatoria (Wan et al., 2021). También, se han descrito el aislamiento de aptámeros para parásitos con capacidad terapéutica, los cuales ejecutan su acción terapéutica principalmente interrumpiendo la interacción entre el parásito y el huésped o inhibiendo la función de proteínas clave. Un ejemplo de aptámero con capacidad de inhibir la invasión celular es el identificado por Ulrich, et al. En sus experimentos observaron que el aptámero podía bloquear las interacciones receptor-ligando entre *Trypanosoma cruzi* y las células huésped LLCMK2 (células epiteliales de riñón del mono) (Ulrich et al., 2002). Por otro lado, un ejemplo de inhibición de la función de las proteínas son los aptámeros para la proteína de unión poli(A) (PABP), la cual es una proteína esencial para la supervivencia de *Leishmania infantum*. Otro ejemplo de aptámero con efecto inhibidor de la función proteica es el aptámero anti-rosetting descrito por Barford, et al. Dicho aptámero fue desarrollado para interactuar con la PfEMP1 (Proteína 1 de la membrana eritrocitaria *P. falciparum*) y demostró tener la capacidad de interrupción de la roseta a 387 nM (Barford et al., 2009).

ORGANISMO	TIPO DE APTÁMERO	DIANA
<a href="#"><i>Entamoeba histolytica</i></a>	ARN	Factor EhCDIm25 (factor de poliadenilación)
<a href="#"><i>Leishmania infantum</i></a>	ADN	LiPABP (proteína de unión a poli (A) de <i>Leishmania infantum</i> )
<a href="#"><i>Plasmodium falciparum</i></a>	ARN	EMP1 (proteína 1 de membrana del eritrocito)
<a href="#"><i>Trypanosoma cruzi</i></a>	ARN	Receptores de adhesión celular
<a href="#"><i>Trypanosoma brucei</i></a>	ARN	Proteínas VSG (glicoproteínas de superficie variante).

**Tabla 6: Aptámeros terapéuticos desarrollados para infecciones parasitarias por el método de SELEX (Afrasiabi et al., 2020).**

Por lo que se refiere al uso de los aptámeros como vehículos de administración intracelular, se sabe que gracias a sus características pueden diseñarse para una amplia gama de aplicaciones a través del acoplamiento con NPs, fármacos u otros ácidos nucleicos y desempeñan un papel importante en la internalización celular. Un ejemplo, de conjugado aptámero-fármaco, es lo observado tras el uso de un conjugado aptámero-ampicilina, el aptámero ayudó a la ampicilina a penetrar en la biopelícula y matar las bacterias (Lijuan eta al., 2017). El uso de conjugados de ARN de interferencia con aptámero para la administración de fármacos puede resultar en el aumento de la eficacia terapéutica, y el ensamblaje de aptámeros-NPs puede resultar en una mayor focalización y terapias más eficientes, especialmente si se usan aptámeros que pueden unirse específicamente a las moléculas receptoras de la superficie celular. Además, la mayoría de las NPs poseen una biocompatibilidad aceptable, y pueden defender los ácidos nucleicos de la destrucción causada por la digestión de las nucleasas (Afrasiabi et al., 2020).

En suma, los avances permiten anticipar el protagonismo que tendrán los aptámeros como agentes terapéuticos y de diagnóstico para enfermedades infecciosas en un futuro cercano.

### **1.3.1. Estrategias para la obtención y selección de aptámeros**

#### **1.3.1.1. SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*)**

En 1990, surgió el método para la generación de aptámeros denominado SELEX (por las siglas en inglés de *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) (Ellington & Szostak, 1990). El método SELEX consiste en la selección de los miembros de una biblioteca que se unen a la molécula diana.

Actualmente, se ha seleccionado un buen número de aptámeros que reconocen una gran variedad de moléculas diana, entre las cuales se encuentran: toxinas, compuestos inorgánicos y orgánicos, nucleótidos y sus derivados, cofactores, aminoácidos, carbohidratos, péptidos y proteínas, al igual que estructuras complejas como células (Stoltenburg et al., 2007). Esta diversidad de aptámeros lleva a considerar el SELEX como un método genérico que teóricamente permitiría seleccionar aptámeros para cualquier molécula bajo las condiciones elegidas.

El punto de partida del proceso SELEX es una biblioteca (Stoltenburg et al., 2005), que está expuesta a una presión de selección donde las mejores secuencias de unión a la diana se dividen o separan del resto. Estas secuencias se recuperan, amplifican por PCR y la biblioteca enriquecida se emplea en el siguiente ciclo de selección: en suma, se caracteriza por la repetición de etapas sucesivas de unión a la diana y eliminación de oligonucleótidos no unidos, seguido de elución, amplificación, y purificación de los oligonucleótidos seleccionados.

La mayoría de los aptámeros seleccionados contra bacterias patógenas se han desarrollado utilizando el método SELEX convencional, por ejemplo: *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*. Estos aptámeros específicos para una única especie bacteriana se pueden obtener después de 10 ciclos de selección o incluso menos, Zhang et al. describieron la selección de aptámeros de ADN dirigidos a *E. coli*. Y obtuvieron dos aptámeros de alta afinidad a *E. coli* con un total de ocho ciclos de SELEX (Zhang et al., 2015). Mientras que los de múltiples especies bacterianas también se pueden lograr dentro de 20 rondas de selección (Teng et al., 2016).

#### **1.3.1.2. Sistemas de información genética expandidos artificialmente-SELEX (AEGIS-SELEX)**

Este método utiliza sistemas de información genética expandidos artificialmente para la selección de aptámeros. Un AEGIS-SELEX se inicia con una biblioteca de ADN GACTZP, que consiste en secuencias aleatorias, sitios de cebador y dos nucleótidos modificados (ZP); y luego se sigue un protocolo estándar para SELEX de células enteras para el ciclo de selección. El éxito de AEGIS-SELEX se basa en varias innovaciones, incluyendo (i) la capacidad de sintetizar bibliotecas GACTZP, (ii) polimerasas que PCR amplifican el ADN GACTZP con poca pérdida de los nucleótidos no estándar AEGIS, y (iii) tecnologías para secuenciar profundamente a los sobrevivientes de ADN GACTZP. Estos resultados toman el siguiente paso hacia la expansión de la potencia y la utilidad de SELEX y ofrecen un AEGIS-SELEX que posiblemente podría generar receptores, ligandos y catalizadores que tienen diversidades de secuencia más cercanas a las mostradas por las proteínas (Sefah et al., 2014).

#### **1.3.1.3. SELEX genómico**

Además del SELEX con células enteras, SELEX también se puede generar en el nivel de ácido nucleico. Lorenz et al. introdujeron el SELEX genómico. Una biblioteca de ADN genómico se utiliza en SELEX genómico en contraste con un

SELEX convencional, en el que se utiliza una biblioteca sintetizada químicamente (Lorenz et al., 2006). Una ventaja distintiva de SELEX genómico es la disminución dramática de la diversidad de la biblioteca inicial. El ADN genómico se aísla del organismo objetivo y la biblioteca inicial se prepara agregando cebadores específicos al ADN aislado y seguido de la extensión del fragmento de Klenow en la nueva cadena. Esta biblioteca inicial se transcribe en ARN y luego se continúa para el proceso de selección. Primero, se realiza una selección negativa contra el paso de la matriz de inmovilización. Las secuencias de la biblioteca se incuban con el objetivo y los oligonucleótidos unidos se someten a transcripción inversa en ADNc y se utilizan en la siguiente ronda de selección. Después de varias rondas más, las secuencias enriquecidas se someten a análisis de secuenciación de alto rendimiento (Lorenz et al., 2010) (Zimmermann et al., 2010).

#### **1.3.1.4. Cell-SELEX**

En contraste con el proceso convencional de SELEX que utiliza usualmente como diana una proteína purificada, el proceso cell-SELEX utiliza células vivas enteras (Zhang et al., 2015). Por lo tanto, las proteínas de la superficie celular mantienen sus conformaciones nativas que son críticas para las funciones biológicas. Los primeros ejemplos de cell-SELEX se dirigieron a tripanosomas vivos (Ulrich et al., 2002). Este cell-SELEX se llevó a cabo durante 25 rondas. El enfoque Cell-SELEX también es muy valioso para identificar nuevos marcadores para diferentes tipos de cáncer y otras enfermedades (Rahimizadeh et al., 2017). Varios artículos también han descrito SELEX de tipo celular dirigido a bacterias, virus y parásitos (Zhang et al., 2015) (Lantero et al., 2020).

#### **1.3.1.5. SELEX *in vivo***

SELEX de organismo entero *in vivo* comienza con una biblioteca aleatoria de ARN modificado con 2'-fluoropirimidina o aptámeros de ADN que se inyectan sistémicamente en un animal o planta viva y se les permite circular a través de

todo el organismo. Durante el tiempo de exposición, los aptámeros se distribuyen por todo el cuerpo, con ciertas especies de aptámeros que se unen a los tejidos diana deseables y las especies de aptámeros no unidas que son eliminadas por el riñón. Después, el órgano/tejido objetivo debe ser extraído del organismo para la obtención de ARN o ADN. Los aptámeros aislados se amplifican desde el órgano / tejido diana a través de PCR con cebadores específicos que coinciden con las regiones constantes flanqueadas de la biblioteca inicial para amplificar solo los aptámeros acumulados en el tejido objetivo. El nuevo grupo de aptámeros adquiridos de la ronda anterior se reinyecta en el mismo organismo y se sigue el mismo proceso durante varias rondas, enriqueciendo los aglutinantes de mayor afinidad con el tejido u órgano objetivo de interés (Sola et al., 2020).

SELEX *in vivo* de organismo completo proporciona no solo la posibilidad de dirigirse a las células cancerosas, sino también a los tejidos sanos morfológica o estructuralmente complejos. Por ejemplo, Cheng et al. emplearon SELEX de organismo completo *in vivo* e identificaron un aptámero capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (Cheng et al., 2013).

Una de las principales advertencias de SELEX *in vivo* de organismo completo es que los ácidos nucleicos son susceptibles a la degradación enzimática. La modificación 2'-fluoropirimidina es una modificación pre-SELEX que aumenta significativamente la resistencia a las nucleasas, mejorando la vida media cuando se administra en el torrente sanguíneo. Alternativamente, cuando los aptámeros se inyectan sistémicamente, la eliminación a través del hígado y el aclaramiento en el riñón son inevitables, lo que hace que la vida media de la circulación y el tiempo de extracción de los órganos diana sean críticos para el éxito de SELEX (Cheng et al., 2013). Este mayor tropismo a estos dos órganos probablemente puede reducir la complejidad y diversidad de especies en la biblioteca de aptámeros, reduciendo así las posibilidades de éxito de SELEX. Además, puede haber especies de aptámeros que muestren estructuras más propensas a la eliminación del hígado o el riñón, sesgando la selección.

La conjugación de la biblioteca con PEG aumenta el tiempo de circulación, lo que sugiere que esta modificación mejora la eliminación de aglutinantes inespecíficos y podría mejorar el SELEX *in vivo* de todo el organismo (Civit et al., 2019). La combinación de diferentes variantes de SELEX también puede aumentar las probabilidades de éxito para la selección *in vivo*. A lo largo de las primeras rondas de selección, podría ser deseable iniciar un SELEX celular más simple contra una línea celular específica del tejido en particular para medir las condiciones de restricción de la selección, y luego, a medida que avanza la selección, pasar a SELEX *in vivo* de organismo completo para garantizar la funcionalidad *in vivo* de los aptámeros seleccionados (Sola et al., 2020).

#### **1.3.1.6. Electroforesis capilar-SELEX (CE-SELEX)**

La electroforesis capilar es una técnica atractiva para seleccionar aptámeros porque requiere volúmenes de muestra mínimos y ofrece un entorno de selección en fase de solución a través del cual se puede determinar cuantitativamente el enriquecimiento de los oligonucleótidos de unión a la diana. Para el enfoque CE-SELEX, una biblioteca de oligonucleótidos se mezcla con una molécula diana y la mezcla se introduce en un sistema de electroforesis capilar (CE) de solución libre. Los oligonucleótidos no unidos migran a una velocidad, mientras que los oligonucleótidos que están unidos a la diana migran a través del capilar a una velocidad diferente. Una ventaja muy atractiva del CE-SELEX es que el número total de rondas se puede reducir significativamente (Drabovich et al., 2005) (Riley et al., 2015) Recientemente, el grupo de Krylov introdujo el método de selección de electroforesis capilar de equilibrio de mezclas (ECEEM) (Drabovich A et al., 2005). La característica única de ECEEM es fundamental para su capacidad de seleccionar aptámeros inteligentes con valores predefinidos de  $K_d$ . Los paneles seleccionados por ECEEM de aptámeros con valor de  $K_d$  podrían utilizarse en el cribado competitivo de candidatos (Drabovich et al., 2005).

#### **1.3.1.7. Selección micromagnética (M-SELEX)**

El método CE es menos efectivo para otras clases de dianas que no inducen suficiente desplazamiento electroforético de complejos de aptámeros (como para moléculas pequeñas). Las cuentas magnéticas se han utilizado como soporte sólido o matriz para enlazar con las dianas. Sin embargo, la eficiencia del uso de cuentas magnéticas se ha quedado atrás de lo que puede lograr CE con múltiples rondas de selección que consumen mucho tiempo. Recientemente, el grupo de Soh ha desarrollado una plataforma que integra SELEX asistido por perlas magnéticas con tecnología de microfluídica y ha demostrado la capacidad de aislar aptámeros de ADN de alta afinidad (Lou et al., 2009).

#### **1.3.1.8. Microscopía de fuerza atómica (AFM)-SELEX**

AFM es un método de elección para escanear la superficie de la muestra atómica utilizando una sonda en voladizo, detectando la fuerza débil entre la superficie de la muestra y la sonda. AFM también puede detectar dinámicamente la fuerza de adhesión o afinidad entre una superficie de muestra y el voladizo. Aprovechando estas características, Miyachi et al. (Miyachi et al., 2010) informaron que AFM-SELEX aisló aptámeros contra trombina con tres rondas de selección. Independientemente, Peng et al. (Peng et al., 2007) utilizaron una microscopía combinada de AFM, microscopio de fluorescencia y PCR para seleccionar aptámeros a partir de una biblioteca de ácidos nucleicos en un solo ciclo (Peng et al., 2007).

#### **1.3.1.9. Resonancia de plasmón superficial (SPR)-SELEX**

La resonancia de plasmón de superficie (SPR) puede rastrear interacciones moleculares en tiempo real, y es una técnica de detección biológica y química poderosa ampliamente utilizada. Entre las diferentes aplicaciones de detección basadas en SPR, los biosensores SPR basados en aptámeros han atraído una atención significativa debido a su simplicidad, viabilidad y bajo costo para la detección de las dianas (Chang, 2021). Misono y Kumar utilizaron el SPR-SELEX para aislar realmente los aptámeros de ARN que se unen a la

hemaglutinina del virus de la influenza humana. SPR-SELEX tiene varias ventajas, como el uso repetido de una diana inmovilizada y la identificación de fracciones de especies de unión ( Misono & Kumar et al., 2005).

#### **1.3.1.10. Selección en chip**

La tecnología actual permite la síntesis rápida de chips personalizados con decenas de miles de sondas (Agilent Technologies, CombiMatrix). La aplicación de *microarrays* de alta densidad al proceso de selección de aptámeros tiene el potencial de acelerar la generación de aptámeros con alta afinidad y especificidad. Por ejemplo, Asai et al. han aislado aptámeros de ADN dirigidos a la resorufina utilizando la selección en chip en combinación con un método para mutaciones puntuales (Ryoichi et al, 2005). Uno de los principales problemas en la aplicación de la tecnología de chips para la selección de aptámeros es el diseño del conjunto inicial de moléculas de oligonucleótidos para el cribado. Es bastante difícil diseñar uno con solo  $10^4$ - $10^5$  secuencias de ácidos nucleicos para el chip de *microarrays* a partir de un conjunto de  $10^{13}$ - $10^{14}$  secuencias posibles que normalmente se encuentran en bibliotecas de selección *in vitro*. Sin embargo, los avances recientes en los enfoques *in silico* han permitido una reducción en el tamaño del espacio de secuencia de ácidos nucleicos para el cribado experimental y la selección de aptámeros de ácidos nucleicos (Katilius et al., 2007).

#### **1.3.1.11. Estrategia no SELEX**

Muy recientemente, el grupo de Krylov también introdujo el proceso de selección no SELEX para los aptámeros (Berezovski et al., 2006). Esta estrategia no SELEX implica pasos de partición repetidos sin amplificación. La electroforesis capilar sin equilibrio de mezclas de equilibrio (NECEEM), que es un método de afinidad altamente eficiente, se utiliza para la partición. NECEEM también facilita el monitoreo de la afinidad masiva de las bibliotecas enriquecidas en cada paso de la partición y la detección de clones individuales para determinar su afinidad con el objetivo. NECEEM permite que todos los

clones se examinen antes de la secuenciación, de modo que solo se secuencian los clones con parámetros de unión adecuados. Encontramos que tres pasos de la partición basada en NECEEM en el enfoque no SELEX fueron suficientes para mejorar la afinidad de una biblioteca de ADN con una proteína objetivo. Es importante destacar que el procedimiento no SELEX puede tardar tan solo 1 h en completarse para mejorar la afinidad del aptámero en cuatro órdenes de magnitud, como se demuestra a través de una biblioteca de ADN dirigida a la proteína h-Ras. Todo el protocolo se puede completar en 1 semana, mientras que los protocolos SELEX convencionales tardan varias semanas incluso en una instalación industrial especializada (Berezovski et al, 2006).

Otros métodos que podríamos incluir como no SELEX, serían las propuestas de Nitsche et al., en el 2007, quien planteo el MonoLEX combinó un solo paso de cromatografía de afinidad con la posterior segmentación física de la resina de afinidad y un solo paso final de amplificación exponencial de los aptámeros unidos. Por otro lado, otra propuesta es el *Aptamer Selection Express* (ASExp) planteado por Fan M. et al., en el 2008, Este proceso combina la interacción de una diana con el ADN bicatenario (ADN<sub>dc</sub>) y la tecnología de separación magnética (Nitsche et al., 2007) (Fan et al, 2008).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. PREPARACIÓN DE ENZIMAS RECOMBINANTES**

El presente trabajo se centró en la obtención de aptámeros específicos. Para ello, fue necesario disponer de preparaciones purificadas de las enzimas recombinantes, siguiendo los procedimientos que se describen a continuación:

### 2.1.1. Proteína de fusión 6xHis-GST-PfDXR-6xHis (GST-PfDXR)

La proteína PfDXR (UniProt Q8IKG4) fue expresada mediante un gen sintético sin los 72 aminoácidos correspondientes al péptido señal que la dirige al apicoplasto y sus codones fueron optimizados para la expresión en *E. coli* (GenScript Biotech BV, Leiden, Países Bajos). Para su expresión el gen fue clonado en el vector pGS21a, el cual contiene una etiqueta glutatión-S-transferasa (GST) en el extremo N-terminal y etiquetas 6His en ambos extremos (6His-GST-PfDXR-6His), para mejorar la expresión de proteínas y facilitar la purificación por afinidad, respectivamente. Por lo tanto, al usar este plásmido pGS21a-PfDXR, la enzima recombinante se obtuvo como una proteína de fusión. El pGS21a también contiene un promotor T7, un terminador de transcripción T7, el origen de replicación del bacteriófago (f1 ori) en sentido negativo (-), un gen de resistencia a la ampicilina (marcador de selección), un origen de replicación (Ori) que permite replicar el plásmido de ADN, un gen *lac I* que codifica la proteína represora Lac I, la cual se une al operador *lac* e interrumpe la acción del ARN polimerasa, y un sitio de clonado múltiple. El inductor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) es el activador que libera la proteína represora Lac del operador *lac* de forma alostérica, promoviendo la actividad del ARN polimerasa para la transcripción del gen DXR.

Se transformaron células de *E. coli* BL21 competentes con la construcción pGS21a-PfDXR mediante el método de choque térmico (Froger & Hall, 2007). Se eligió el sistema en *E. coli* porque es una bacteria ampliamente utilizada en la industria biotecnológica para expresar y producir proteínas recombinantes, en bajo coste. Tienen una fácil manipulación genética, una alta densidad y rapidez de cultivo y crecimiento. La cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, es un lisógeno del bacteriófago DE3, que contienen una copia cromosómica del gen que codifica para la ARN polimerasa de T7, bajo control del promotor *lac I*, inducible por IPTG.

Después de la transformación las células se cultivaron en LB suplementado con 0,1 mg / ml de ampicilina a 37°C hasta una DO600 de 0,5. A continuación, se indujo la expresión de la enzima recombinante 6His-GST-PfDXR-6His (GST-PfDXR) mediante la adición de IPTG 0,5 mM. Las células se incubaron toda la noche a 15 ° C en agitación (180 rpm), se recogieron mediante centrifugación (21.500 x g, 15 min) y se resuspendieron en tampón de lisis: NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, lisozima 0,2 mg / mL, 20 µg / mL de ADNsa, inhibidor de proteasa Pefabloc® SC 1 mM (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), 2 tabletas en 20 mL de cOmplete™, Mini, cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA (Merck KGaA), Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Las células se lisaron mediante una sonicación de 12 min aplicando pulsos de 10 s encendido / 20 s apagado al 80% de amplitud en hielo para minimizar la inactivación de la enzima. Finalmente, los extractos se centrifugaron (aproximadamente 43.700 x g, 30 min, 4 ° C) y la distribución de la proteína recombinante en las fracciones soluble e insoluble se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y *Western blot*.

La proteína GST-PfDXR se extrajo desde la fracción insoluble debido a que solo el 1% era soluble, incluso cuando se evaluaron otras temperaturas de incubación tales como 25 ° C durante la noche y 37 ° C durante 4 h. Por lo tanto, fue necesario solubilizar y posteriormente renaturalizar la enzima recombinante. Para ello, la fracción insoluble se incubó durante 30 min con 40 mL de tampón de solubilización (urea 2 M, NaCl 0,5 M, Triton X-100 al 2%, EDTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) y sonicado 12 min aplicando pulsos de 10 s encendido / 20 s apagado al 80% de amplitud en hielo. Después, las muestras se centrifugaron (aproximadamente 43.700 x g, 4 ° C, 60 min), se desechó el residuo y el sobrenadante se transfirió a tubos de diálisis de acetato de celulosa con 14 kDa de tamaño de corte (D-9777, Sigma- Aldrich). Para eliminar gradualmente la urea del medio, se prepararon cuatro tampones con concentraciones de urea decrecientes (1,5;1,0; 0,5 y 0 M en NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0). Todas las diálisis se llevaron a cabo a 4 ° C con agitación constante durante 1 h antes de reemplazar el mismo tampón e incubar durante la noche, ya que la proteína debe dializarse en cada tampón durante al menos

4 h para conseguir un replegamiento adecuado (McCormick et al., 2014). Al final de la diálisis, se añadió EDTA 1 mM a la solución de proteína.

Una vez renaturalizadas y sin urea, se purificó la GST-PfDXR a partir de las preparaciones mediante cromatografía de afinidad por cationes metálicos inmovilizados (IMAC). Esta técnica se basa en la fuerte unión que se establece entre el níquel inmovilizado en la matriz de las columnas y los fragmentos de 6His que contienen los extremos N- y C-terminal de la proteína recombinante. Para ello, las preparaciones dializadas de GST-PfDXR se hicieron pasar a través de columnas His-Trap FF de 1 mL (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.), previamente equilibradas en tampón Tris-HCl 40 mM, pH 8,0 que contenía NaCl 100 mM e imidazol 10 mM (tampón A). Las columnas se lavaron con 25 volúmenes del mismo tampón y a continuación se eluyó la enzima recombinante mediante un gradiente de concentración de imidazol, preparado a partir de tampón A y tampón Tris-HCl 40 mM, pH 8,0 que contenía NaCl 100 mM e imidazol 100 mM (tampón B). En la purificación se utilizó un equipo ÄKTA start (GE Healthcare Bio-Sciences AB), Se recogieron fracciones y se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Las fracciones que contenían la enzima recombinante GST-PfDXR se reunieron y se concentraron mediante filtración a través de Amicon Ultra-15 de 10 kDa (Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.). Las preparaciones purificadas se conservaron a -20 ° C en presencia de MnCl<sub>2</sub> 1 mM glicerol al 50% v/v) hasta su utilización. Para los experimentos las preparaciones se desalaron utilizando columnas Zeba™ Spin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La concentración de proteína en las muestras se determinó utilizando el kit Pierce™ BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **2.1.2. Proteína recombinante PfDXR-6His (PfDXR)**

La selección de aptámeros se realizó con DXR de *P. falciparum* (PfDXR) que se obtuvo tras adaptar el método previamente descrito por Umeda et al., 2010

(Umeda et al., 2010). Se utilizó la secuencia de ADN que codifica para la PfDXR (UniProt Q8IKG4) y se omitieron los 72 aminoácidos correspondientes al péptido señal que lo dirige al apicoplasto (Roos et al., 2002), los codones fueron optimizados para la expresión en *E. coli* y sintetizados (Mr. Gene GmbH, Regensburg, Alemania). La secuencia se amplificó y se clonó en el plásmido pQE30 (Qiagen, Hilden, Alemania). La construcción pQE30-PfDXR resultante se usó para transformar células de *E. coli* M15 competentes (Qiagen, Hilden, Alemania) y se obtuvieron preparaciones de PfDXR purificadas como se describió anteriormente (Apartado 2.1.1).

### **2.1.3. Proteína EcDXR-6His (EcDXR)**

El gen *dxr* que codifica para la DXR de *E. coli* (EcDXR) (UniProt P45568) se sintetizó (GenScript Biotech B.V.) y se clonó en el plásmido pQE60 (GenScript Biotech B.V.). Las células M15 competentes se transformaron con la construcción pQE60-EcDXR resultante y se obtuvieron preparaciones purificadas de EcDXR siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la proteína GST-PfDXR (Apartado 2.1.1).

### **2.1.4. Proteína CMS-6His (CMS)**

El gen *ispD* que codifica para la CDP-metileritritol sintasa de *E. coli* (UniProt Q46893) se sintetizó (Mr. Gene GmbH, Regensburg, Alemania) y se clonó en el plásmido pQE30 (Qiagen, Hilden, Alemania). La construcción pQE30-CMS resultante se usó para transformar células de *E. coli* M15 competentes (Qiagen, Hilden, Alemania) y se obtuvieron preparaciones de CMS-6His (CMS) purificadas como se describió anteriormente (Apartado 2.1.1).

## 2.2. SELECCIÓN *IN VITRO* DE APTÁMEROS DE ADN

### 2.2.1. MÉTODO M-SELEX

Para la selección de aptámeros se utilizó el método M-SELEX que se caracteriza por la tecnología de separación magnética, y particularmente para la selección de aptámeros para la enzima DXR de *P. falciparum* se usó su variante, FluMag-SELEX que adiciona el marcaje por fluorescencia del ADN (R. Stoltenburg et al., 2005). La tecnología de esferas magnéticas facilita la separación de aptámeros en solución, mientras que los iniciadores marcados con fluorescencia permiten la monitorización cuantitativa del ADN (Yang et al., 2011).

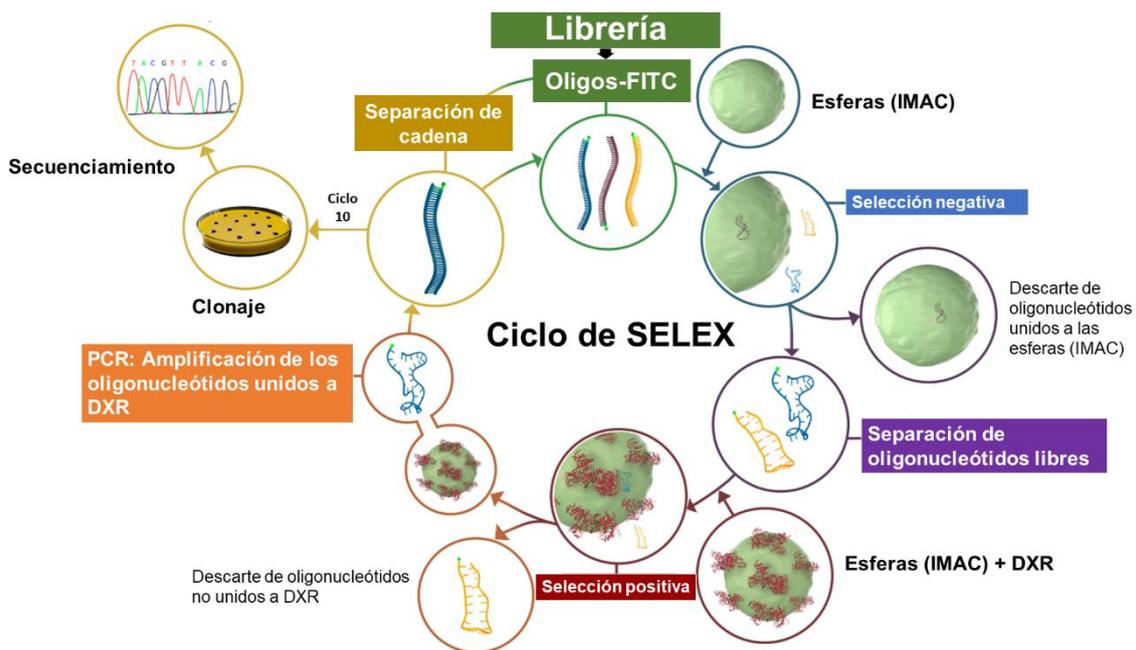


Figura 8. Esquema del proceso de M-SELEX usado para la obtención de aptámeros.

Se realizaron dos procesos de SELEX, el primero para la identificación de aptámeros específicos para la enzima PfDXR y el segundo para la enzima CMS de *E.coli* (CMS). El sistema M-SELEX utilizado se basa en el uso de

microesferas de cobalto con capacidad de unión a los fragmentos de 6His que contienen las enzimas recombinantes. Ello nos sirvió de soporte para poner en contacto las proteínas de interés con el conjunto de secuencias de ADN e ir capturando las secuencias más afines y conservadas conforme aumentaba el número de ciclos de selección. A continuación, se detalla el proceso de M-SELEX realizado:

En cada ciclo de SELEX, se realizó también una selección negativa, en la que se incubó el grupo de aptámeros correspondiente con las esferas de Dynabead sin proteínas para descartar aquellos que se unían de forma inespecífica.

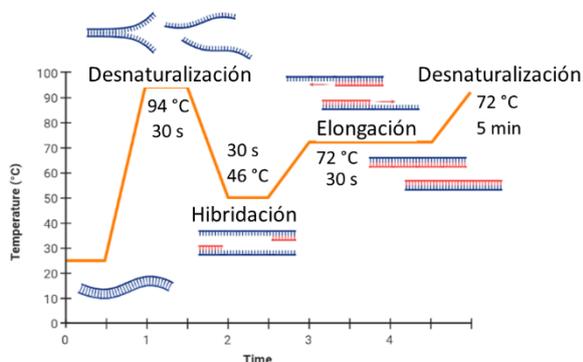
Las esferas magnéticas de cobalto (Dynabeads®, His-tag Isolation & Pulldown, Life Technologies) se equilibraron en tampón de unión (tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0 que contiene NaCl 10 mM y Tween-20 al 2% (v/v)). Una vez equilibradas se incuban 50 µL de las esferas con 100 µL de proteína (0,28 µg / µL) durante 1h a temperatura ambiente (TA). Después de la incubación se realizaron lavados, los cuales se guardaron como control de unión a la proteína. El complejo proteína-Dynabead se incubó a TA con 100 µL de una biblioteca de cadenas de ADN monocatenario (ADNsc) de 76 pb a una concentración de 10 ng/µL (hasta  $10^{15}$  secuencias) con dos regiones constantes de unión de cebadores de PCR y una secuencia central aleatoria de 40 nucleótidos (ATACCAGCTTATTCAATT-N40-AGATAGTAAGTGCAATCT, 1 µmol, DNA Technology A / S).

Las moléculas de ADNsc que no se unieron a las esferas funcionalizadas con la enzima se eliminaron mediante lavados con tampón fosfato salino 1x (PBS: NaCl<sub>2</sub> 137 mM, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 7,4 usando pipeteo manual y un separador magnético (MagnetoPURE, Chemicell GmbH), y las que se unieron al complejo proteína-Dynabead se eluyeron con tampón de unión a 80 ° C durante 5 min, dichas moléculas de ADNsc forman el grupo de aptámeros correspondiente a cada ciclo de selección.

Las secuencias de interés eluidas se amplificaron mediante PCR utilizando *Pfu* ADN polimerasa (Biotools B&M Labs), una polimerasa de *Pyrococcus furiosus* que trabaja a elevadas temperaturas incorporando 10 nmols de dNTPs cada 30 min a una temperatura de 72 ° C y que además tiene la capacidad de corregir errores gracias a su actividad 3'-5' exonucleasa (Cline et al., 1996). Con esta actividad se consigue que la amplificación se dé con una tasa de error muy baja ( $1^{-10} \times 10^{-7}$  pb) permitiendo hacer una PCR de elevada fidelidad.

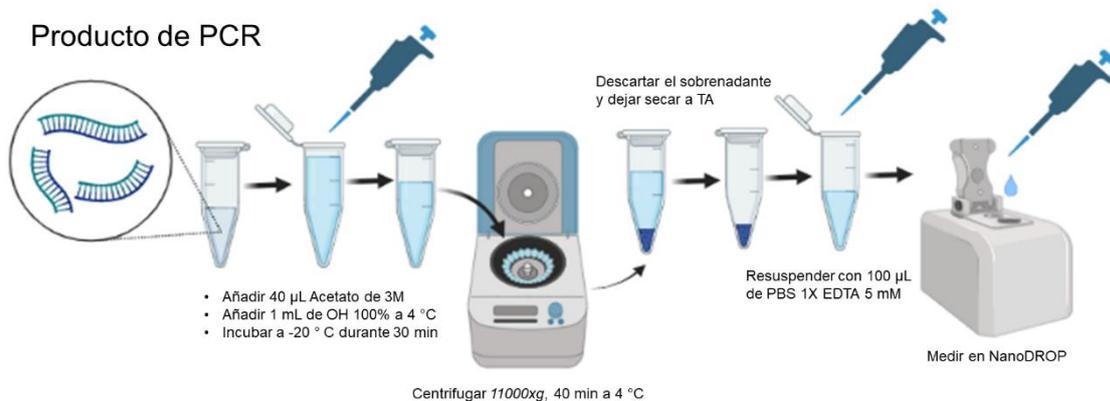
Como regla general, se programó un intervalo de 94 ° C por 60 s seguido de 20 ciclos en un termociclador *DNA 2720* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific): 94 ° C, 30 s / 46 ° C, 30 s / 72 ° C, 30 s. Los extremos 5' de los cebadores directo (5'-ATACCAGCTTATTCAATT-3') e inverso (5'-AGATTGCACTTACTATCT-3') estaban modificados con 6-carboxifluoresceína (6-FAM) y tri-biotina, respectivamente. Marcaje que ayudará a la separación de las cadenas de ADN y así obtener los grupos de aptámeros enriquecidos de cada ciclo de SELEX.

Mezcla de PCR	6 reacciones
dNTPs (2,5 mM)	24
Tampón	30
<i>Pfu</i> ADN polimerasa	6
Aptámeros (20 ng/ $\mu$ L)	12
Oligo marcado con biotina (25 $\mu$ M)	9
Oligo marcado con 6FAM (25 $\mu$ M)	9
H <sub>2</sub> O	216
<b>Volumen final</b>	<b>300</b>



**Figura 9: Amplificación de aptámeros.** A la izquierda de la imagen se detallan los componentes para la mezcla de reacción para PCR, mientras que al lado derecho de la imagen se esquematizan las temperaturas y tiempos de los 20 ciclos de PCR para la amplificación de aptámeros.

Una vez amplificado el ADN se recupera el material genético por precipitación con etanol. Al producto de PCR se le añade 40  $\mu$ L de acetato de sodio 3M y después 1000  $\mu$ L de etanol 100% a 4 °C. Una vez se ha añadido todo, se mezcla realizando varias inversiones suaves y se deja a -20 ° C durante 30 min. Seguidamente, se centrifuga a 11.000 x g durante 40 min a 4 ° C. El ADN quedará al fondo del tubo y se podrá eliminar el sobrenadante. Para eliminar el etanol restante se deja secar a TA durante aproximadamente 20 min. A continuación, el producto de PCR que contiene ADNdc se resuspende con 100  $\mu$ L de PBS 1x a pH 7,4 que contiene EDTA 5 mM. Se guarda una alícuota de 5 $\mu$ L para poder determinar su concentración en un NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific) y antes de continuar con el proceso de separación de cadenas para la obtención de ADNsc se corrobora su presencia y tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% a 90V durante unos 45min. Se utiliza como patrón el marcador de tamaño *O'RangeRuler 20pb DNA Ladder* (Thermo Scientific).



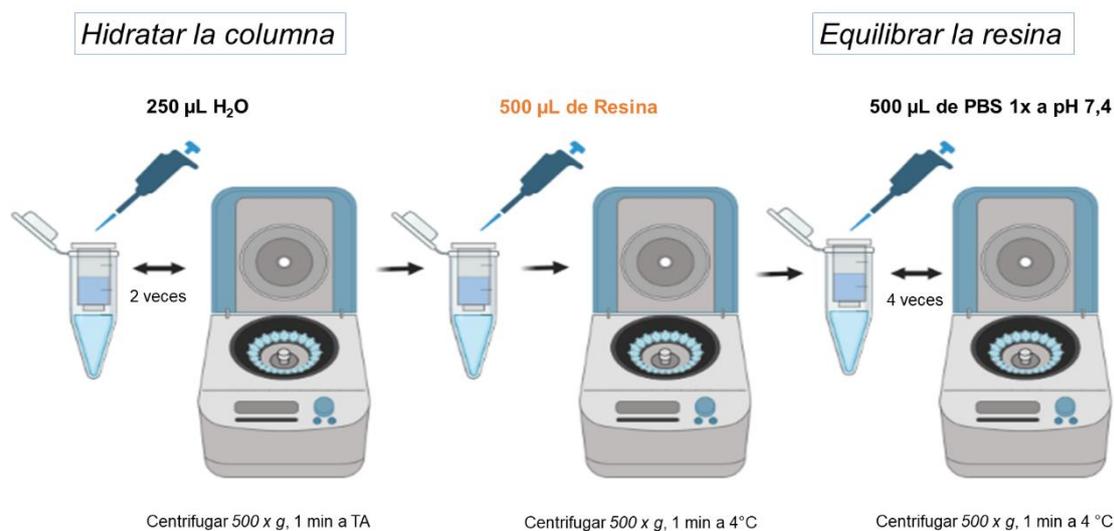
**Figura 10: Esquema del proceso de purificación y precipitación del ADN.**

### 2.2.1.1. Separación de las cadenas de ADN por unión a neutravidina

El método que utilizamos es una adaptación del método para la purificación de moléculas biotiniladas de ThermoFisher que se basa en el uso de columnas (Columnas de cromatografía Micro Bio-Spin <sup>TM</sup>; Bio-Rad Laboratories, Inc.,)

que contienen NeutrAvidin® agarosa (Pierce NeutrAvidin Agarose Resin 29200, Thermo Fisher Scientific), la cual es una resina compuesta por neutravidina, una avidina desglicosilada con cuatro sitios de unión para la biotina, unida covalentemente a la agarosa. En la columna quedarán retenidas únicamente aquellas moléculas de ADN marcadas con biotina. A continuación, se detalla el protocolo utilizado:

En primer lugar, se hidrata la columna con 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y luego se centrifuga a baja velocidad, ello se repite dos veces. Luego, se añade 500  $\mu\text{L}$  de la resina de NeutrAvidin-agarosa en la columna previamente hidratada, se coloca la columna en un tubo de recolección y se centrifuga a 500  $\times$  g durante 1 min para eliminar la solución de almacenamiento contenido en la resina. Para equilibrar la resina hacen 3 lavados agregando 600  $\mu\text{L}$  de PBS 1x a pH 7,4 y centrifugando a 500  $\times$  g durante 1 min para eliminar el tampón (Figura 11).

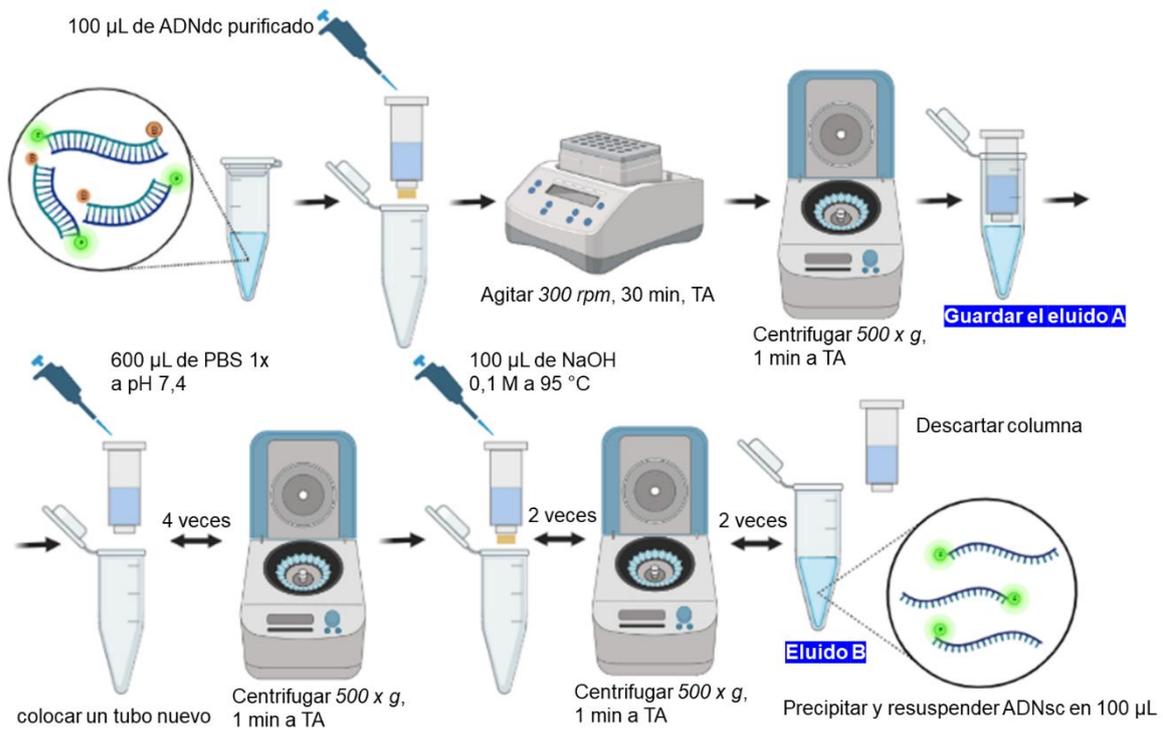


**Figura 11: Esquema de preparación de la columna con resina de NeutrAvidin-agarosa.**

En segundo lugar, después de preparar la columna y equilibrar la resina, se coloca la columna en un nuevo tubo de recolección, se agregan 100  $\mu\text{L}$  de

ADNdc a la columna y se permite que la muestra ingrese al lecho de resina. Se reemplazan secuencialmente las tapas superior e inferior y se incuba a TA durante 30 min con una agitación de 300 rpm. Luego, se realizan 4 lavados con PBS 1x (centrifugar a 500 × g durante 1 min). En esta etapa se obtiene el primer eluido (eluido A) que contendrá el exceso de ADNdc que no se une a la resina.

En tercer lugar, para separar las cadenas de ADN se añaden 100 µL de NaOH 0,1 M precalentado a 96°C se tapa e incuba a TA durante 15 min. La adición de NaOH hace subir el pH y provoca la desprotonación de las bases del ADN, así se reduce el número de puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, que junto a la temperatura elevada favorece la desnaturalización y la separación de las cadenas de ADN. A continuación, se centrifuga a 500 × g durante 1 min. Se repite el proceso, desde la adición de NaOH hasta la centrifugación, una vez más con un nuevo tubo colector. Con este último paso se obtiene el eluido B que está conformado por la cadena complementaria no biotinilada, marcada con fluoresceína, debido a que las cadenas que tienen biotina han quedado retenidas en la columna. A continuación, se reúne el contenido de los dos tubos colectores en uno solo y se precipita con etanol el ADN monocatenario (ADNsc) siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Figura 9). Finalmente, el ADNsc precipitado se resuspende en 100 µL de PBS 1x a pH 7,4.



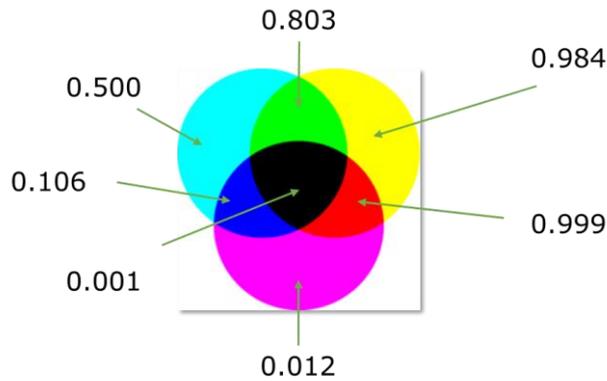
**Figura 12: Esquema del proceso de separación de cadenas de ADN por unión a neutravidina.**

Antes de empezar el siguiente ciclo de SELEX se comprobó la presencia de ADN de una sola cadena mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% a 90V durante 45 min utilizando *O'RangeRuler 20pb DNA Ladder* (Thermo Scientific) como marcador de tamaño y se determinó la concentración de ADN usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Conociendo la cantidad inicial de ADNsc que entra en un ciclo SELEX (ADNsc in) y la cantidad de ADNsc eluido de las esferas proteína-Dynabeads al final de cada ciclo de selección (ADNsc out), se calculó el rendimiento de unión de ADNsc ( $[\text{ADNsc out} / \text{ADNsc in}] \times 100\%$ ). Finalmente, después de 8 a 10 ciclos de selección se obtiene un conjunto de aptámeros enriquecido, a partir del cual se realiza una subclonación para la identificación de las secuencias candidatas.

### 2.2.1.2. Subclonación y secuenciación de los oligonucleótidos seleccionados

Después de 10 ciclos de M-SELEX, el conjunto de aptámeros obtenido se amplificó por PCR usando cebadores directos e inversos sin marcar y ADN polimerasa *Pfu* (Biotools B&M Labs). Los productos resultantes se clonaron en el plásmido pBluescript SK + después de su linealización con *Sma*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.) utilizando T4 ADN Ligasa (New England Biolabs) y el producto de ligación se utilizó para la transformación de células competentes TOP10 de *E. coli* (Life Technologies) por choque térmico (Froger & Hall, 2007). Las células transformadas se cultivaron durante la noche a 37 ° C en placas de agar LB que contenían 100 µg / mL de ampicilina y las colonias recombinantes se diferenciaron con el método de cribado azul / blanco después de la inducción de la expresión de lacZ en presencia de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido (X-gal) e IPTG. Se eligieron aleatoriamente colonias blancas de las placas, se cultivaron en 5 mL de LB (37 ° C, 180 rpm, durante la noche), se aisló el ADN plasmídico con el *kit NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) y se determinó su concentración en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La inserción exitosa de secuencias de la biblioteca original fue validada por PCR con los cebadores directos e inversos específicos usando una mezcla de reacción *GoTaq Green Master Mix* (Promega Corporation). Se detectaron bandas de ADN con la longitud esperada por electroforesis en geles de agarosa al 3% procesados en TBE 1x a 90 V. Los geles se tiñeron con *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen) y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Los clones positivos se secuenciaron utilizando el cebador universal M13 (Servicio de secuenciación, GENEWIZ GmbH, Leipzig, Alemania; <https://www.genewiz.com>). Una vez obtenidas las secuencias, se compararon utilizando el servidor en línea Multalin (<https://www.multalin.toulouse.inra.fr/multalin>) y a través del servidor en línea *mfold* (<http://unafold.rna.albany.edu>) (Zuker, 2003) se representó la estructura secundaria más probable, en base a la menor energía libre ( $\Delta G$ ) y se obtuvo el indicador *ss-count* que es la propensión de una base a ser de una sola cadena (Figura 13). Finalmente, las principales secuencias candidatas se sintetizaron

en cantidad suficiente para la caracterización de su unión a la proteína de interés.



**Figura 13: Indicador *ss-count*.** La imagen representa la guía según escala de color para la interpretación de la estructura secundaria de un aptámero. Los colores indican la probabilidad de una base a ser de una sola cadena, medido por el número de veces que es monocatenaria en un grupo de plegamientos predictivos (rojo: más probable que sea de una sola cadena; alto valor de *ss-count*).

#### 2.2.1.2.1. Método de clonaje por selección positiva

Se utilizaron dos métodos de clonación, primero con el vector pBluescript SK (+), y luego el sistema de clonación CloneJET (Thermo Scientific™) que resultó más eficiente. CloneJET es un sistema avanzado de selección positiva para la clonación de productos de PCR generados con *Pfu* polimerasa. Además, para cualquier otro fragmento de ADN, ya sea romo o con extremos cohesivos, y de pequeño tamaño como el de los aptámeros. Se utiliza el vector de clonación de selección positiva pJET1.2 / *blunt*. Este vector contiene un gen letal que se interrumpe por la ligación de un ADN insertado en el sitio de clonación. Como resultado, solo las células con aptámero insertado pueden propagarse, eliminando la necesidad de utilizar el sistema azul / blanco. El vector contiene

un sitio de clonación múltiple, así como un promotor T7 de la transcripción *in vitro*, por ello, los plásmidos se mandaron a secuenciar con primer T7 (servicio de secuenciación de Sanger, GENEWIZ GmbH, Leipzig, Alemania).

El primer paso del proceso es mezclar los componentes (Tabla 7) para la reacción de ligación sobre hielo, mezclar y centrifugar 5 s a baja velocidad. Luego se incubaba la mezcla de ligación a TA por 5 min, se añade directamente a las células competentes DH10B (Thermo Scientific™) y se agita vigorosamente unos segundos para continuar con la transformación por choque térmico (Froger & Hall, 2007). Finalmente, se siembran las células en placas de agar LB y se dejan a 37° C toda la noche, las colonias que crecen son sembradas en precultivos de medio LB y confirmadas mediante PCR.

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
Buffer 2X	10 µL
Producto de PCR	1 µL (0,15 pmol)
Vector pJET1.2/blunt (50 ng/µL)	1 µL (0,05 pmol)
Agua mQ	19 µL
T4 ADN Ligasa	1 µL
Volumen total	20 µL

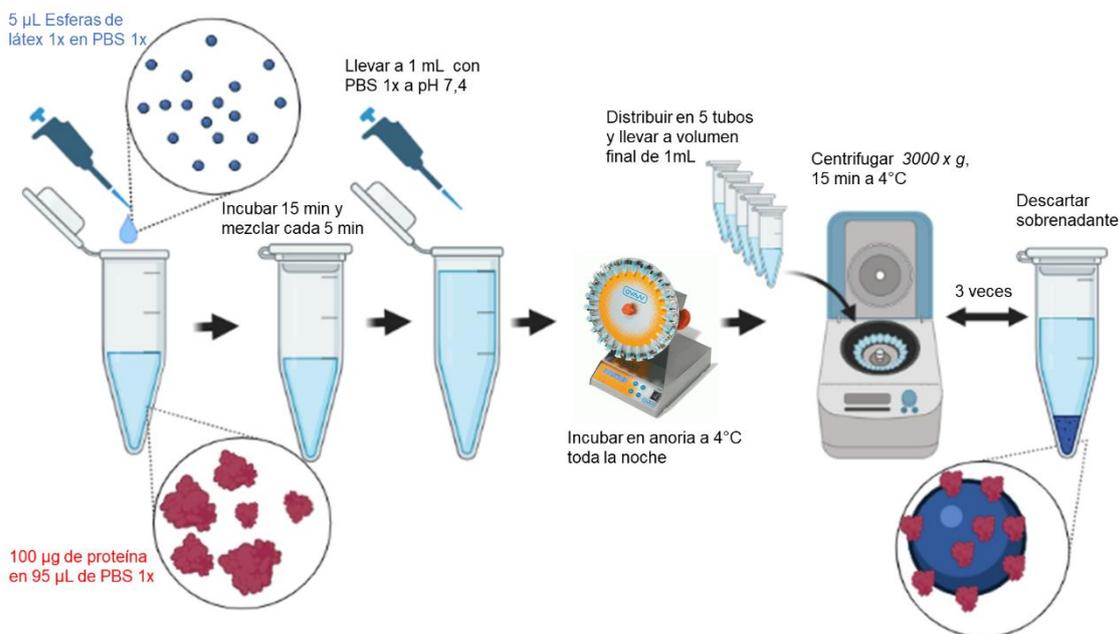
**Tabla 7: Detalle de componentes de la mezcla de ligación del método de clonaje por selección positiva.**

### **2.2.2. Nueva estrategia para la obtención de aptámeros: Método de selección de aptámeros a partir una sola esfera (*Single Bead Aptamer Selection, SBAS*)**

Teniendo en cuenta la complejidad técnica del método convencional M-SELEX, se decidió intentar una nueva estrategia de selección de aptámeros. La nueva

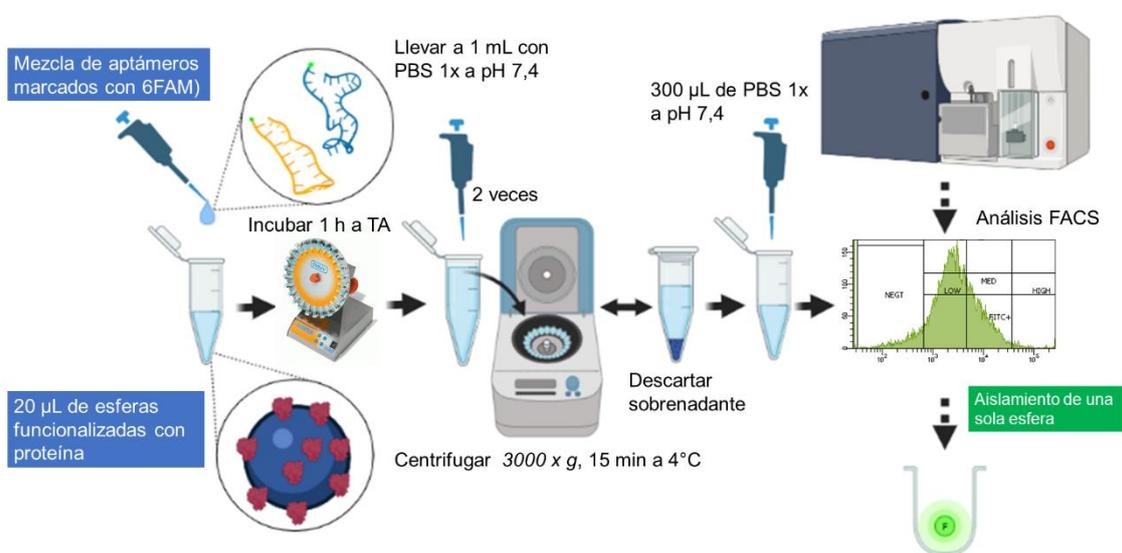
estrategia se basa en primer lugar en el uso de microesferas de látex de aldehído/sulfato que permite el acoplamiento de la proteína diana en una sola etapa. Y, en segundo lugar, se basa en el aislamiento de una sola esfera positiva seleccionada mediante citometría de flujo, desde la cual se obtendrá un grupo de aptámeros candidatos. Como siguiente paso se amplifica por PCR y se separan las cadenas para obtener suficiente cantidad de secuencias de aptámeros enriquecidas para el siguiente ciclo. El protocolo de PCR y separación de cadenas se describe en los apartados 2.2.1 y 2.2.1.1, respectivamente, mientras que la funcionalización de las esferas de látex, y aislamiento de aptámeros desde una sola esfera se describe a continuación:

Para la preparación de las esferas de látex conjugadas con la enzima CMS, se incubaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína (15 min, TA, PBS 1x) con 5  $\mu\text{L}$  de esferas 1x (Esferas de látex de aldehído/sulfato 4% w/v, 4  $\mu\text{m}$ , Thermo Fisher Scientific) en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  (Dai et al., 2005). Después, la mezcla se transfirió a un tubo de 1,5 mL con 1 mL de PBS 1x y se incubó a 4 ° C con agitación orbital suave durante la noche. Después de la centrifugación, las esferas recubiertas de CMS se lavaron 3 veces con PBS 1x a pH7,4.



**Figura 14: Esquema del proceso para la funcionalización de las esferas de látex con la proteína.**

Tras el lavado de las esferas funcionalizadas se inicia el proceso de obtención de los aptámeros específicos por citometría de flujo, las esferas funcionalizadas se resuspenden en 50  $\mu\text{L}$  de aptámeros marcados con 6-FAM (Preparados según el apartado 2.2.1.1) a una concentración aproximada de 30 ng /  $\mu\text{L}$  en PBS, se incubaron (60 min, TA, en la oscuridad) y se lavan 2 veces con volumen final de 1 mL de PBS 1x, 3000 x g a 4 ° C durante 15 min. Finalmente, para su análisis mediante citometría de flujo las preparaciones se dejaron en un volumen final de 300  $\mu\text{L}$ .



**Figura 15: Esquema del proceso para la exposición de los aptámeros a las esferas funcionalizadas con la proteína y aislamiento de esfera única.**

Con el citómetro de flujo se determinaron los límites entre las esferas con señal negativa y positiva según intensidad de fluorescencia, del grupo de esferas con mayor intensidad de fluorescencia se realizó el aislamiento de 1 esfera en placa de 96 pocillos. Para comprobar que sólo hay una esfera por pocillo, la placa se somete a un spin de un minuto, por lo que la esfera de látex quede en el centro del pocillo y que, con un microscopio de fluorescencia, sea más sencillo de encontrar y confirmar que la separación ha sido correcta. Una vez realizadas estas comprobaciones se añaden 20  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,1M al pocillo y

se incubó a 95 ° C durante 10 min. De esta manera se obtiene la muestra de aptámeros que se unieron a la proteína. Esta muestra se utiliza para realizar la PCR y separación de cadenas de ADN para iniciar el siguiente ciclo mediante el método de SBAS. Los experimentos se realizaron con un citómetro de flujo BD FACSAria II (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) configurado a 4 ° C, con láser de 488 nm, un filtro BP 530/30 y el software FACSDiva suministrado con el instrumento.

## **2.3. CARACTERIZACIÓN DE APTÁMEROS CANDIDATOS**

Cabe precisar que antes de cada prueba de caracterización se dejó que los aptámeros adoptaran sus conformaciones 3D nativas mediante una incubación secuencial a 90, 5 y 37 ° C (durante 10, 15 y 8 min, respectivamente).

La caracterización de los aptámeros candidatos se enfocó principalmente en la evaluación de la capacidad de interacción, afinidad, efecto inhibitorio, direccionamiento celular respecto a su enzima diana. A continuación, se describen la metodología llevada a cabo:

### **2.3.1. EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE APTÁMERO Y ENZIMA**

#### **2.3.1.1. Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)**

El método denominado EMSA por sus siglas en inglés *Electrophoretic mobility shift assay*, se utiliza para detectar complejos de proteínas con ácidos nucleicos. Es la metodología central subyacente a una amplia gama de análisis cualitativos y cuantitativos para la caracterización de sistemas que interactúan. (Hellman & Fried, 2007). En el ensayo clásico, se combinan soluciones de proteína y ácido nucleico, y las mezclas resultantes se someten a electroforesis

en condiciones nativas a través de poliacrilamida o gel de agarosa. Después de la electroforesis, se determina la distribución de las especies que contienen ácido nucleico. En general, los complejos proteína-ácido nucleico migran más lentamente que el correspondiente ácido nucleico libre. Para este estudio se buscaron las mejores condiciones de ensayo de tal manera se conservarán las estabildades y movildades electroforéticas de complejos.

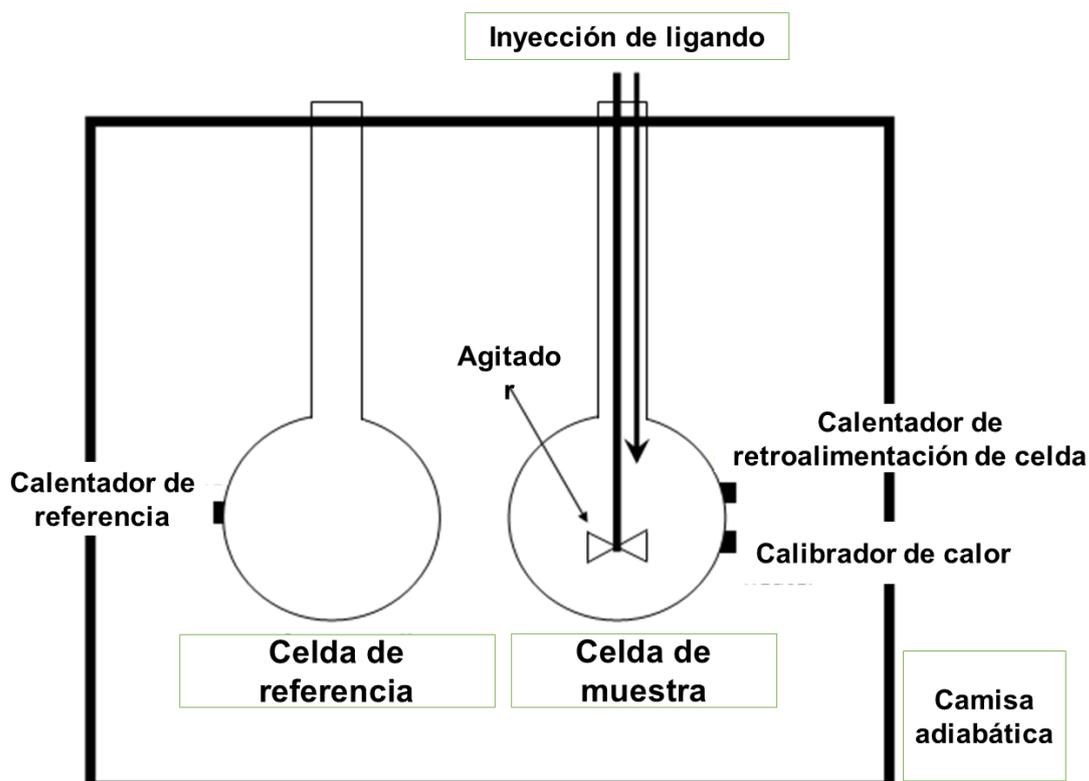
Las preparaciones purificadas de CMS, GST-PfDXR, EcDXR, GST o BSA almacenadas a - 20 ° C se desalaron y equilibraron en tampón HEPES 50 mM, pH 8,0 que contenía NaCl 10 mM, Tween-20 al 0,02%. Se prepararon diluciones de cada proteína con el mismo tampón y a continuación se mezclaron 14 µL de cada preparación con 1 µL de solución de aptámero (150 ng) preparada en 0,5x TB (Tris-HCl 45 mM, ácido bórico 45 mM, pH 8,0) y la mezcla se incubó a TA durante 60 min. A continuación, se añadieron a cada muestra 3 µl de tampón de carga (glicerol al 30% en 0,25 x TB) y se cargaron en geles de agarosa al 2% preparados y procesados en 0,5x TB a 20 V / cm. Los geles se tiñeron con *SyBR® Gold Nucleic Acid* (Life Technologies) y se observaron bajo luz ultravioleta.

### **2.3.1.2. La calorimetría de titulación isotérmica (ITC)**

La ITC es una técnica que permite determinar cuantitativamente de manera directa la entalpía de unión de una molécula o de un complejo molecular, sin necesidad de modelos o hipótesis adicionales, mediante la medición del calor liberado o absorbido a presión constante durante la unión (Duff et al., 2011) (Pagano et al., 2009). Una celda de muestra que contiene un volumen constante de aptámero o de proteína se titula con una serie de adiciones de su ligando. El calor se libera o absorbe (dependiendo de la naturaleza de la reacción) a medida que se forman cantidades crecientes de complejo. La señal se mide como la cantidad de energía eléctrica necesaria para mantener la temperatura en la celda de muestra igual que la temperatura en una celda de referencia que contiene el mismo volumen de tampón. A medida que la unión

alcanza la saturación, se genera menos complejo y, en consecuencia, menos diferencia de calor con cada adición. A continuación, se describe el procedimiento:

La celda de trabajo de un microcalorímetro VP-ITC (MicroCal, LLC, Northhampton, MA, EE. UU.) se llenó a 25 ° C con GST-PfDXR 5  $\mu$ M con PBS 1x a pH 7,4 o GST como control. La solución de aptámero 50  $\mu$ M en PBS se inyectó de la siguiente manera: Se realizaron 2 inyecciones de 20  $\mu$ L, a continuación 3 inyecciones de 10  $\mu$ L, por último, se efectuaron 20 inyecciones de 5  $\mu$ L de solución paso a paso en la celda de trabajo a intervalos de 2.5 min. También se realizaron experimentos de control: Titulación de PBS en GST-PfDXR y titulación de aptámero en GST. Los datos se ajustaron al modelo de unión de un solo sitio utilizando el *software MicroCal Origin* que se suministra con el instrumento.



**Figura 16: Esquema general del microcalorímetro VP-ITC.** El instrumento está compuesto por dos celdas idénticas hechas de un material térmicamente conductor y químicamente inerte, rodeadas por una camisa adiabática. Los circuitos se utilizan para detectar diferencias de temperatura entre la celda de referencia (llena de tampón o agua) y la celda de muestra que contiene la macromolécula.

### **2.3.1.3. Ensayo de *Western blot* con aptámeros**

Las proteínas se fraccionaron en geles de SDS-PAGE al 12,5% (120 V, 45 min, TA) y se electrotransfirieron durante 1 h a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) previamente activada con metanol a 4 ° C y 400 mA. La membrana se lavó 2 veces por 5 min con PBS a pH 7,4, y se bloqueó con agitación orbital (50 rpm) a TA durante 1 h con leche desnatada en polvo al 5% (p / v) en PBS que contenía Triton X-100 al 1%, se lavó de nuevo 3 veces por 5 min y se agregaron aptámeros marcados en sus extremos 5' con 6-FAM ( $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$  495/520) o biotina a una concentración final de 600 a 900 nM, se incubó toda la noche a 4 ° C. Se lavó 3 veces con PBS y se detectó la fluorescencia en un sistema de cámara CCD ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare) usando epi-iluminación y detectando los aptámeros marcados con 6-FAM con un filtro Y515 y los aptámeros marcados con biotina fueron revelados mediante quimioluminiscencia después de la incubación con estreptavidina unida a HRP (peroxidasa de rábano picante).

### **2.3.1.4. Ensayo de *Dot Blot* con aptámeros**

Se analizó la unión del aptámero D10 a la proteína recombinante GST-PfDXR y a la proteína GST mediante un ensayo *Dot Blot*. En este experimento se usaron los aptámeros D10 y 700, ambos marcados con biotina.

Se prepararon dos membranas de nitrocelulosa *Amersham™ Hybond™-ECL* (GE Healthcare). En la membrana se depositaron 10 µg de cada proteína. La membrana se incubó con una suspensión de leche desnatada en polvo al 2% (p/v) preparada en PBS-Tween 0,05% en rotación durante 1 h, TA para realizar el bloqueo de la membrana. A continuación, se hizo un lavado con PBS-Tween 0,05% durante 5 min y seguidamente, se añadió a cada tubo aptámeros a una concentración de 900 nM en PBS-Tween 0,05%, 0,5 mM EDTA, y se incubaron a 4 ° C toda la noche en agitación. La membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween 0,05%, 0,5 mM EDTA y la visualización fue a través de la interacción biotina con estreptavidina unida a HRP, se detectó mediante quimioluminiscencia y se observó con un equipo *ImageQuant™ LAS4000 CDD camera system* (GE Healthcare Life Sciences).

#### **2.3.1.5. Determinación de la constante de disociación (*K<sub>d</sub>*) de los aptámeros seleccionados**

La *K<sub>d</sub>* tanto de los grupos de aptámeros obtenidos después de los distintos ciclos de selección como del aptámero seleccionado se obtuvieron mediante el análisis de la unión del aptámero de ADN marcado con fluorescencia (6FAM) a esferas funcionalizadas con la enzima diana, para ello, se siguió el siguiente proceso: Se diluyen 2,5 µL de la solución concentrada de esferas de látex a un volumen final 25 µL con PBS a pH 7,4, de este modo se obtiene una solución de esferas de látex. A 25 µL de las esferas de látex se les añade 100 µg de preparación purificada de enzima CMS o DXR y se lleva a un volumen final de 100 µL con PBS. Se mezcla y se deja incubar a TA durante 15 min con inversiones suaves cada 5 min. Tras la incubación se vuelve a añadir PBS hasta alcanzar un volumen final de 1000 µL y se incuba a 4 ° C en agitación orbital toda la noche. Se distribuyen los 1000 µL en 5 tubos de forma que se tenga en cada uno 200 µL, a continuación, se lava 2 veces completando el volumen hasta 1000 µL con PBS, se centrifuga a 3000 x g a 4 ° C durante 15 min. Las esferas se recogen en 50 µL de PBS, se incuban 60 min a TA y en la oscuridad con aptámeros marcados con 6-FAM, ello se hace para cada dilución de aptámero (5,4 µM / 2,7µM / 1,4µM / 0,7 µM / 0,3 µM) y se analizan mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACSAria II (BD Biosciences)

utilizando una línea láser de 488 nm con un filtro BP 530/30 y el programa FACSDiva suministrado con el instrumento. La constante de disociación  $K_d$  y el número máximo de sitios de unión ( $B_{max}$ ) se obtuvieron ajustando la dependencia de la intensidad de fluorescencia relativa de la unión específica de las concentraciones de aptámero a la ecuación  $Y = B_{max} X / (K_d + X)$  (J. Liu et al., 2012). Se utilizó el programa *GraphPad Prism 9* (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.) para trazar la curva de saturación, eligiendo la regresión no lineal, el panel de ecuaciones de unión de saturación y una unión específica de sitio. Además, se representó el gráfico de Scatchard, que representa la unión específica frente al cociente entre la unión específica y la concentración de ligando libre.

### 2.3.2. EVALUACIÓN FUNCIONAL: Ensayos de actividad enzimática

#### 2.3.2.1. Determinación de la actividad enzimática de la DXR

La actividad enzimática de las preparaciones de EcDXR se determinó en un espectrofotómetro Ultrospec 3300 pro (GE Healthcare) a 340 nm siguiendo la oxidación de NADPH a TA en cubetas de cuarzo. Para corroborar las mediciones nos basamos en la ecuación de Lambert - Beer:  $A = \epsilon l c$ . En el caso, de NADPH 1,5 mM la absorbancia esperada es 0,93 a 340 nm en cubeta de 1 cm.

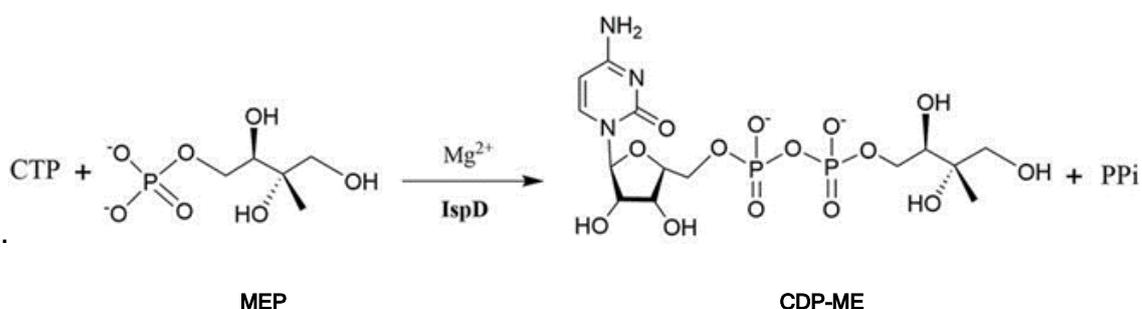
Compuesto	Concentración inicial	Concentración final	Volumen ( $\mu$ L)
Tris-Cl a pH 7,4	0,73 M	100 mM	68.5
DTT	200 mM	10 mM	25
MnCl <sub>2</sub>	100 mM	1 mM	5
NADPH	50 mM	0,15 mM	1.5
DX5-P	15 mM	0,15 mM	5
DXR	-	20 $\mu$ g	10
H2O mQ	-	-	385
Inhibidor	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5

**Tabla 8** La tabla muestra las concentraciones y volúmenes de los componentes para la preparación de la reacción enzimática de la enzima

**EcDXR.** La concentración de inhibidor es solo referencial y puede variar según el experimento.

### 2.3.2.2. Determinación de la actividad enzimática de la CMS

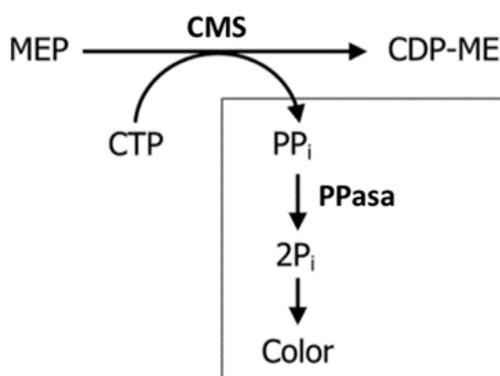
Para la determinación de la actividad enzimática de la enzima CMS, se utilizó el método de colorimetría de fosfatos optimizado en nuestro laboratorio (ver apartado 2.3.2.2.1.) y un método fluorimétrico comercial para corroborar los resultados, *Pyrophosphate Assay Kit* (ab112155, Abcam). El *Kit* utiliza un sensor de pirofosfato fluorogénico patentado, que tiene su intensidad de fluorescencia proporcionalmente dependiente de la concentración de pirofosfato (PPi). Debido a el método mide directamente el PPi se espera que sea más sensible que el método de colorimetría de fosfatos, que requiere acoplamiento enzimático para la detección del PPi. Los ensayos se realizaron en placas oscuras de 96 pocillos siguiendo las instrucciones del fabricante, y las lecturas en el lector de placa *Tecan SPECTRAFluor Plus* (Artisan Technology Group).



**Figura 17:** La reacción catalizada por la enzima CDP-metileritritol sintasa (CMS/IspD) da como productos 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) y pirofosfato inorgánico (PPi).

### 2.3.2.2.1. Método colorimétrico o indirecto para la determinación de la actividad de la CMS

El método colorimétrico emplea pirofosfatasa (PPasa) inorgánica como enzima acoplada para determinar la actividad de la CMS (Bernal et al., 2005). La CMS cataliza la formación de CDP-ME y pirofosfato inorgánico (PPi) a partir de MEP y CTP. El PPi se hidroliza mediante la PPasa obteniendo como producto final fosfato (Pi) y éste se cuantifica mediante colorimetría (Figura 18).



**Figura 18. Determinación de la actividad CDP-metileritrol sintasa (CMS) utilizando pirofosfatasa (PPasa) como enzima acoplada.**

#### 2.3.2.2.1.1. Colorimetría de fosfatos

El colorante está formado por 3 componentes: solución naranja de verde de malaquita, molibdato amónico y Tween-20 (Bernal et al, 2005). Es de color naranja oscuro y, para que reaccione, es necesario que se forme un complejo entre fosfato y molibdato, ya que el verde de malaquita no se une al Pi libre. Es así, que el colorante ante una muestra que contiene fosfato virará a un color verde en dependencia de la concentración (Baykov et al. 1988). Por otra parte, Tween-20 es el tensoactivo que evitará que se formen precipitados.

Como primer paso, se prepara una solución madre de verde de malaquita, se mezcla lentamente 60 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 3M en 300 mL de H<sub>2</sub>O y se deja enfriar. En la solución fría se añaden 0,44 g de verde de malaquita y se disuelve con agitador magnético durante toda la noche, al día siguiente se filtra y se conserva en un frasco protegido de la luz (Baykov et al. 1988). En estas condiciones, la solución es estable a TA durante un año.

Tras la preparación de la solución madre de verde de malaquita, se prepara el colorante para la determinación: 2,5 mL solución madre verde de malaquita, 625 µL molibdato amónico 7,5% (p/v) y 50 µL de Tween-20 11% (v/v). El colorante se debe preparar de nuevo antes de cada experimento y protegerlo de luz. Se mezclan 160 µL de colorante con 40 µL de muestra, se incuba la placa a TA durante 10 min y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm en un lector de placas *Benchmark Plus* de *Bio-Rad*.

Para poder determinar la cantidad de fosfato formado en la reacción que cataliza la enzima CMS, es necesario preparar una recta patrón con hidrógeno fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). La concentración de Pi máxima utilizada fue 40 µM porque en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se determinó que, a partir de esa concentración, se pierde la linealidad de la recta.

#### **2.3.2.1.1.2. Ensayo para la determinación de la actividad enzimática**

Para la determinación de la actividad enzimática de la CMS es necesario utilizar PPasa para hidrolizar el PPI generado. La PPasa ha de encontrarse activa y en exceso para que la velocidad de la reacción global identificada sea la catalizada por la CMS. Se ha utilizado una PPasa de levadura (Roche Diagnostics *GmbH*, Ref 10108897001) suministrada en forma de suspensión en sulfato de amonio 3,2 M a pH 6,0 que según las instrucciones del proveedor tenía una actividad de 200 U/mL. La PPasa es muy sensible a los ciclos de congelación y descongelación, para evitarlos, la PPasa se conserva a -20 °C

en glicerol y medio tampón Tris-HCl 100 mM a pH 7,5 en una proporción de 50:50.

Las cantidades y concentraciones iniciales de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción enzimática son los siguientes: 162  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ, 20  $\mu$ L de Tris-HCl 100 mM a pH 7,5, 2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 100 mM, 1  $\mu$ L MEP 12,5 mM, 2  $\mu$ L CTP 20 mM, 2  $\mu$ L DTT 100 mM, 10  $\mu$ L PPasa 5U/ml (se ajusta dependiendo de la actividad que presenta la solución de PPasa, siendo necesario utilizar 50 miliunidades para el ensayo) y 1  $\mu$ L de CMS. La reacción enzimática se lleva a cabo en un volumen final de 200  $\mu$ L, se incuba durante 10 min a TA en agitación. Luego, en una placa de 96 pocillos se añaden 40  $\mu$ L de la reacción enzimática, 120  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ y 40  $\mu$ L de colorante, y se incuba durante 10 min a TA en agitación. Finalmente, se determina la absorbancia a 630 nm.

## **2.4. EVALUACIÓN EN GLÓBULOS ROJOS INFECTADOS CON *P. FALCIPARUM* (pRBCs) Y BACTERIAS.**

### **2.4.1. Cultivos *in vitro* de *P. falciparum***

La cepa de *P. falciparum* 3D7 se cultivó *in vitro* en eritrocitos humanos del grupo B utilizando las condiciones descritas anteriormente (Cranmer et al., 1997). Los parásitos (descongelados de las reservas de glicerol) se cultivaron a 37 ° C en matraces T-25 o T-175 (Thermo Fisher Scientific) que contenían eritrocitos humanos al 3% de hematocrito en medio completo del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) que contenía Albumax II (Gibco™, Life Technologies), suplementado con L-glutamina 2 mM, bajo una mezcla de gases de 92,5% de N<sub>2</sub>, 5,5% de CO<sub>2</sub> y 2% de O<sub>2</sub>. La parasitemia se determinó mediante recuento microscópico de frotis de sangre fijados brevemente con metanol y teñidos durante 10 min con Giemsa (Merck KGaA) diluido 1:10 en tampón de Sorenson, pH 7.2.

#### **2.4.1.2. Análisis de aptámeros en pRBC por microscopía de fluorescencia confocal y citometría de flujo.**

Un cultivo de 15 mL de glóbulos rojos al 3% de hematocrito infectados con la cepa de *P. falciparum* 3D7 con parasitemia al 3% se lavó con RPMI, se fijó durante 30 min a TA con paraformaldehído al 3% en PBS y se lavó adicionalmente con PBS (500 x g, 5 min) hasta que no se observó hemólisis. A continuación, el sedimento celular se recogió en 100  $\mu$ L de medio de bloqueo (PBS suplementado con MgCl<sub>2</sub> 5 mM y 1 mg / ml de albúmina de suero bovino), se agitó suavemente durante 5 min y se incubó a 37 ° C durante 1 h en presencia de 120 pmol de aptámeros marcados con fluoresceína. Antes de la incubación con las células, los aptámeros a una concentración de 5  $\mu$ M se dejaron que adoptaran sus conformaciones 3D nativas mediante una incubación secuencial a 90, 5 y 37 ° C (durante 10, 15 y 8 min, respectivamente). Después de la incubación con las células el exceso de aptámeros se descartó con 3 lavados usando PBS, Las células se tiñeron durante 30 min a TA con 4  $\mu$ g / mL del tinte de ADN Hoechst 33342, se lavaron con PBS, se colocaron en un sistema de portaobjetos de cámara de 8 pocillos (Lab-Tek®II, Thermo Fisher Scientific), y se observó con un microscopio de fluorescencia confocal LSM 800 (Zeiss, Jena, Alemania) con un objetivo de inmersión en aceite 100x (NA 1.4) y los parámetros configurados en el equipo para el análisis y captura de imagen se muestran en el anexo A. Los fluorocromos se detectaron en  $\lambda_{exc}$  /  $\lambda_{em}$  400/480 (Hoechst 33342), 492/617 (6-FAM) y 644/700 (Cy5.5 y Alexa 647). El análisis de colocalización se realizó con un anticuerpo de conejo anti-ferredoxina-NADP reductasa (ab243175, Abcam,) a una dilución 1/100, el cual detectó con un anticuerpo secundario IgG de cabra anti-conejo marcado con Alexa Fluor 647 (A21245, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) a una dilución de 1/200; y con el aptámero LDH, desarrollado contra la enzima lactato deshidrogenasa de *P. falciparum* (PfLDH) (Cheung et al., 2013). El análisis de imágenes se realizó con el software FIJI, el paquete de procesamiento de imágenes (Schindelin et al., 2019) y el cálculo del coeficiente de colocalización de Manders se determinó utilizando el complemento JaCoP para el *software* FIJI.

Para el análisis de citometría de flujo, los pRBCs se diluyeron en PBS a una concentración final de  $1-10 \times 10^6$  células / mL, y las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo LSRFortessa™ (BD Biosciences) configurado con 5 láseres, configuración estándar de 20 parámetros. Los fluorocromos se excitaron utilizando láseres de 350 (Hoechst 33342), 488 (6-FAM) y 640 nm (Cy5.5 y Alexa Fluor 647), y sus respectivas emisiones se recogieron con filtros 450/50, 530/30, 730/45 y 670/14 nm. El análisis se realizó con los programas *FACSDiva Software* (BD Biosciences) y *Flowing Software 2.5.1* ([www.btk.fi/cell-imaging](http://www.btk.fi/cell-imaging); Cell Imaging Core, Turku Center for Biotechnology, Finlandia).

#### **2.4.2. Análisis de aptámeros en bacterias por microscopía de fluorescencia confocal.**

Las cepas bacterianas *E. coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Georgetown, DC, EE. UU.) y *S. aureus* ATCC 29213 se mantuvieron en medio Luria-Bertani (LB) y la concentración de células se determinó mediante dilución en serie con posterior siembra en placas de agar y medición de unidades formadoras de colonias (UFC). Para los estudios de microscopía confocal, se lavaron aproximadamente  $10^9$  UFC/mL 3 veces en PBS ( $10000 \times g$ ,  $4^\circ C$ , 5 min), se fijaron con paraformaldehído al 4% (precalentado a  $60^\circ C$ ) a TA durante 1 h y se lavaron con PBS de nuevo. Posteriormente, las células se sumergieron en 1 mL de tampón de bloqueo (3% BSA en PBS) durante 30 min a TA con agitación de 300 rpm, se lavaron 2 veces y luego se incubaron a  $4^\circ C$  durante la noche con 120 pmol de aptámeros en 100  $\mu$ L en oscuridad. Se realizó un lavado con PBS para eliminar el aptámero en exceso y se observó la fluorescencia en un microscopio de barrido láser confocal (LSM 800, Zeiss), utilizando un objetivo de inmersión en aceite 100x (NA 1.4) y un sistema de portaobjetos de cámara de 8 pocillos (Lab-Tek ®II, Thermo Fisher Scientific). Los fluorocromos se detectaron utilizando  $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$  492/617 (6-FAM) y 644/700 (Cy5.5).

### **2.4.3. Evaluación del efecto de aptámeros en cultivo *in vitro* de *E. coli*.**

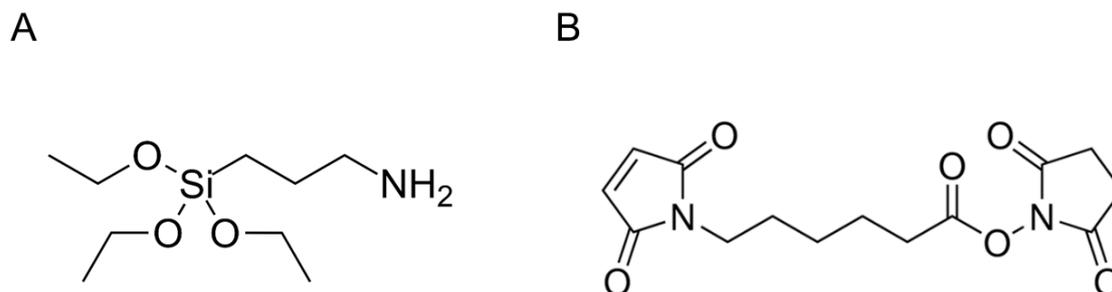
Para determinar si los aptámeros seleccionados mostraban capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano se expusieron a *E. coli* en cultivo de forma directa y con el uso de choque térmico (Froger & Hall, 2007) para facilitar su ingreso al interior de la célula. Se utilizaron células competentes DH10B y la concentración final de aptámero fue de 50  $\mu$ M. Se mantuvieron en medio Luria-Bertani (LB), se hizo un seguimiento del crecimiento de las células tratadas mediante mediciones de absorbancia a 600 nm a 37 °C y en paralelo la concentración de células se determinó mediante dilución seriada con posterior siembra en placas de agar y cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC).

### **2.5. EXPERIMENTO DE FUNCIONALIZACIÓN DEL APTÁMERO D10**

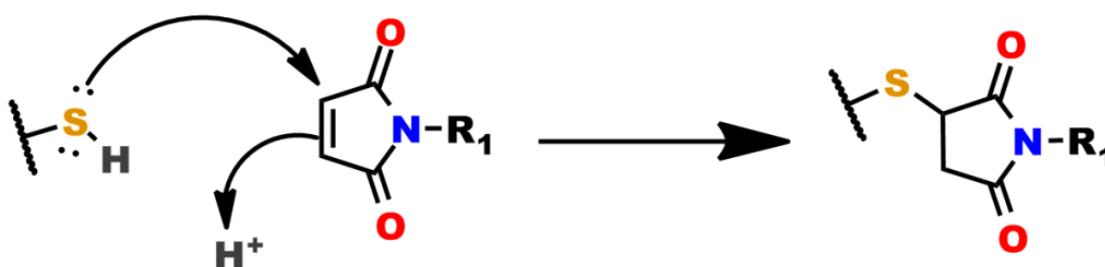
Como parte de la caracterización se decidió ensayar otras formas de uso del aptámero D10 como biosensor. Hasta el momento, todos los ensayos de caracterización fueron con el aptámero en su forma libre, sin embargo, con este experimento se explora su capacidad como molécula de captura unida a un material sólido y en un sistema tipo sándwich.

Para el experimento, se ordenó la síntesis de los aptámeros D10 y 700 con la adición de un grupo tiol en el extremo 5' (Integrated DNA Technologies) y como soporte se utilizaron láminas APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilane) (Figura 19) silanizadas comercialmente (Sigma-Aldrich). La silanización consiste en la cobertura de una superficie con moléculas de alcóxido silano funcionales. Los componentes minerales como el vidrio y las superficies de óxido metálico pueden ser silanizados, ya que contienen grupos hidroxilo que atacan y desplazan a los grupos alcoxi en el silano, formando así un enlace covalente (-Si-O-Si-). Por otro lado, se utilizó caproato de N-succinimidil-6-maleimida (NSM) (Merck) (Figura 19), el cual es un reactivo alifático heterobifuncional que

reacciona con los grupos amino y sulfhidrilo, el cual nos sirvió como molécula de enlace entre la lámina APTE y el aptámero modificado con tior (Figura 20).



**Figura 19: Componentes para la base para la funcionalización de las láminas.** A. (3-Aminopropyl)triethoxysilano (APTES). B. Caproato de N-succinimidil-6-maleimida ( $C_{14}H_{16}N_2O_6$ ).

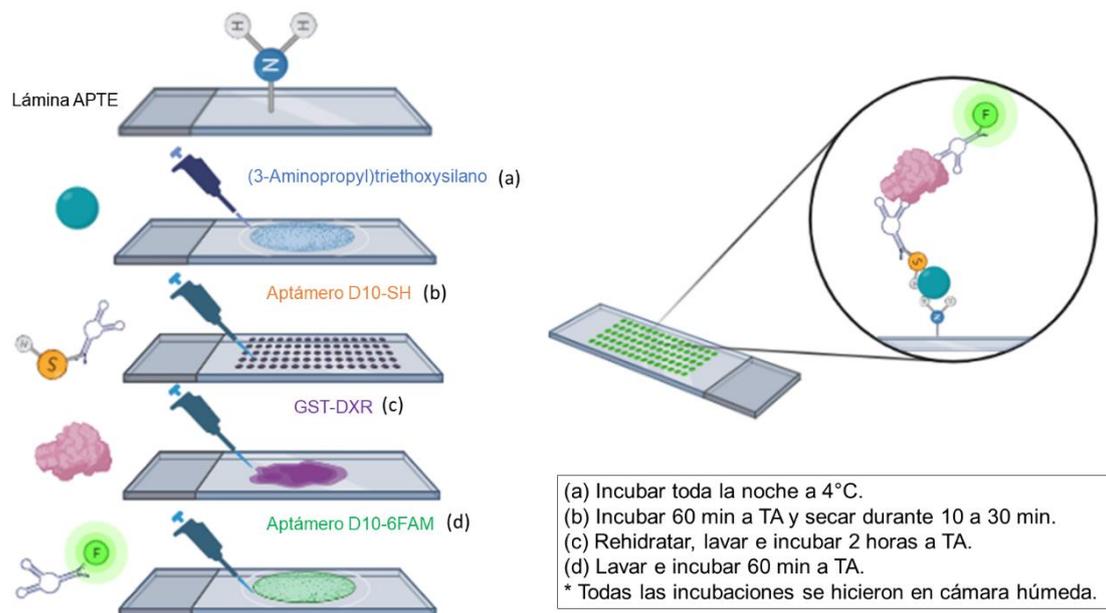


**Figura 20: Reacción de anclaje del aptámero.** La imagen muestra el mecanismo simplificado de la reacción tior-maleimida que permite la unión del aptámero modificado con un grupo tior y el caproato de N-succinimidil-6-maleimida.

A continuación, se detalla el procedimiento:

Se marca el contorno de las láminas APTEs con ayuda de un lápiz hidrofóbico y se cubren con NSM 1 mM (preparado en tampón fosfato 10 mM, pH 8,0) toda la noche a 4 ° C. Al día siguiente se preparan las diluciones de aptámeros y de mercaptoetanol con tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. Luego las láminas APTEs pretratadas con NSM se incuban en una cámara húmeda durante 60 min a TA

con D10-SH, justo antes de su uso es necesario reducir los grupos tiol con mercaptoetanol añadiendo 1 mM de mezcla equimolar. Tras la incubación se seca la lámina durante 10 a 30 min usando un desecador al vacío. La lámina se rehidrata y lava con Tris-HCl 10 mM a pH 7,4. Una vez lista la lámina se cubre e incuba con la proteína durante 2 h a TA en cámara húmeda, se lava con Tris-HCl 10 mM a pH 7,4. Finalmente, las láminas se incuban con el aptámero D10 marcado con 6-FAM y se lavan 3 veces con Tris-HCl 10 mM a pH 7,4 y se visualiza la fluorescencia con equipo el *ImageQuant™ LAS4000CDD camera system* (GE Healthcare Life Sciences).



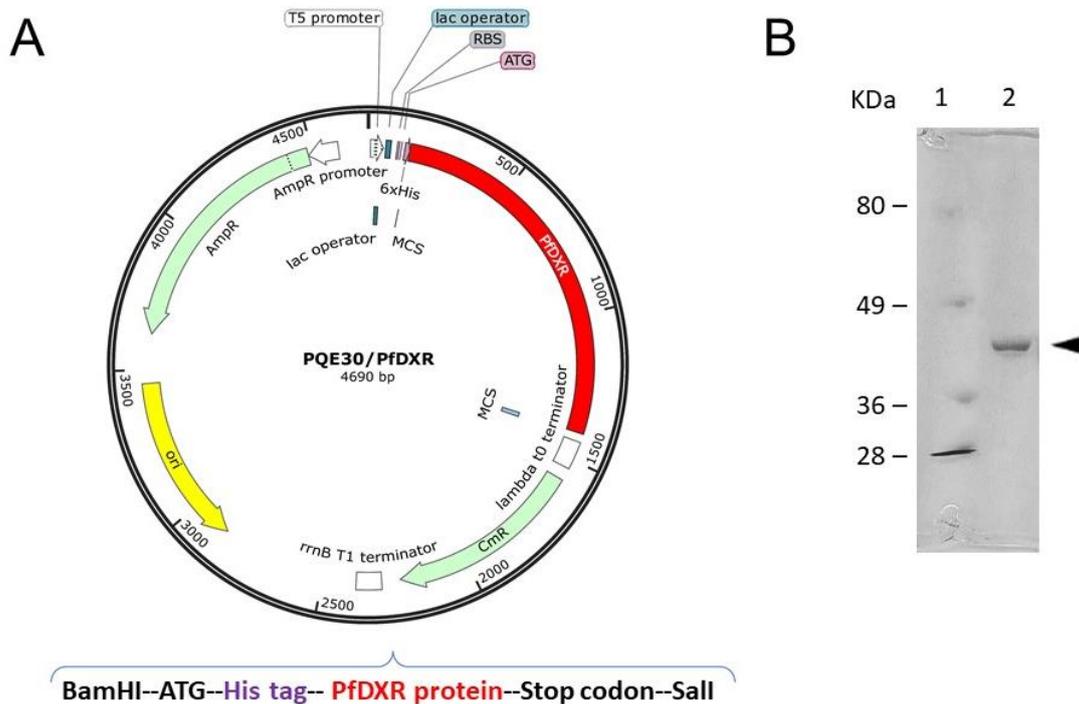
**Figura 21: Esquema general de los pasos y componentes del sistema tipo sándwich elaborado con el aptámero D10.**

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. OBTENCIÓN DE APTÁMEROS ESPECÍFICOS PARA LA ENZIMA DXR DE *P. FALCIPARUM*

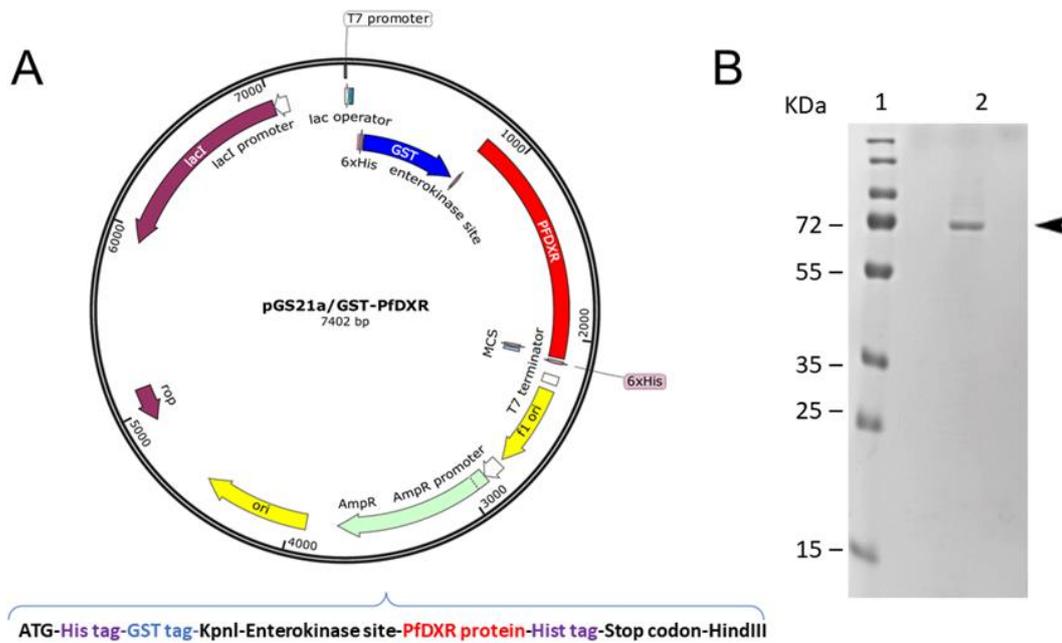
##### 3.1.1. Obtención de enzimas DXR recombinantes

El proceso de SELEX para la obtención de aptámeros afines a la enzima DXR de *P. falciparum* se realizó con la proteína PfDXR, cuya obtención se describe en el apartado 2.1.2. Como resultado el nivel de expresión que se obtuvo fue de 1 mg/L de proteína y 20% de solubilidad, sin embargo, debido a su baja expresión su recuperación era casi nula tras el proceso de purificación (Figura 22).



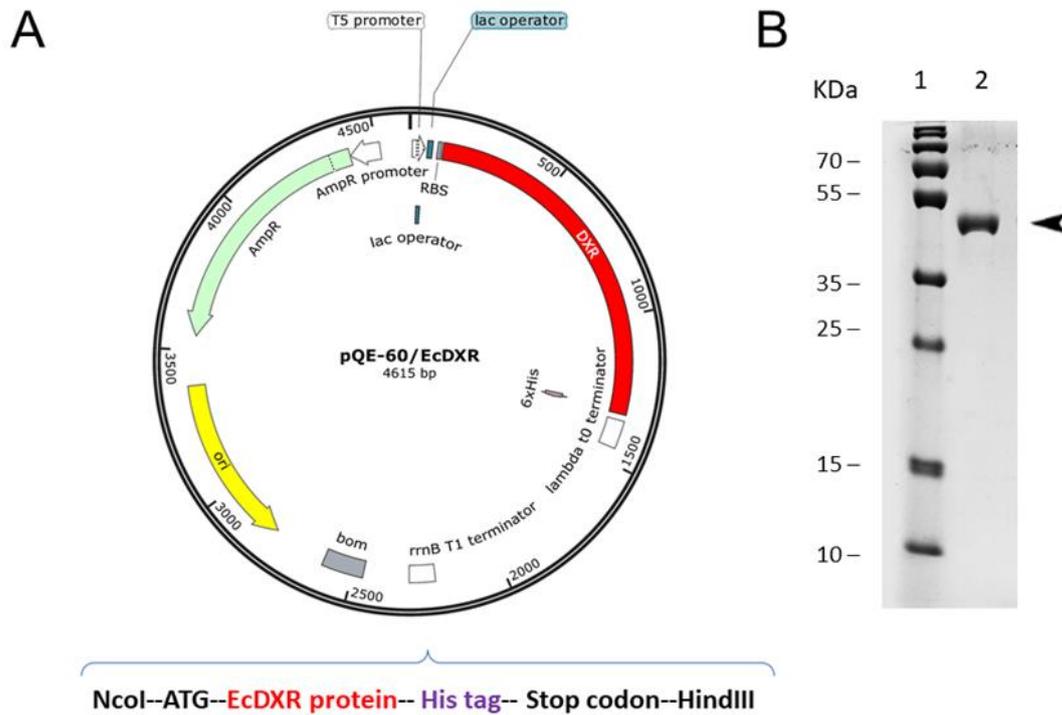
**Figura 22: Proteína DXR de *P. falciparum* (PfDXR).** A. Mapa del vector de transformación y construcción para PfDXR. El gene fue clonado en pQE-30 por BamHI/Sall. B. Carril 1: marcador de pesos moleculares; Carril 2: PfDXR purificada. Gel SDS-PAGE al 12,5%. Tinción de plata.

Por otro lado, el proceso de caracterización demandaba una mayor cantidad de proteína, para ello, se utilizó la enzima GST-PfDXR (Figura 23) expresada y purificada como se describe en el apartado 2.1.1. Se logró una alta expresión (40 mg/L), sin embargo, solo el 1% era soluble y de fácil lisis. Por ello, fue necesario realizar la solubilización y renaturalización. Sin embargo, tras dichos procesos la enzima perdió su actividad y fue difícil su purificación. Las estrategias de purificación usando la resina Life Sciences™ Glutathione Sepharose™ 4B (Fisher Scientific) con capacidad de unión a GST y usando la resina Blue Sepharose™ CL-6B (Amersham Biosciences Europe GmbH) que se une a la mayoría de las enzimas que requieren cofactores que contienen adenilo (incluyendo NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>) dieron poca concentración de proteína y bajo rendimiento de purificación. Sin embargo, con el método de purificación IMAC, se consiguió la pureza deseada, ello, se logró pasando la muestra antes de la diálisis para descartar las proteínas inespecíficas que unían a la columna y después de la diálisis se realizaba uno a dos pases de purificación. Al tratarse de una enzima clave para la caracterización las muestras fueron enviadas para su análisis de confirmación al servicio de proteómica de la Universidad de Barcelona, en donde fueron analizadas en *nanoAcquity HPLC chromatographer* acoplado a un *LTQ-Orbitrap Velos Mass Spectrometer* después de la digestión con tripsina.



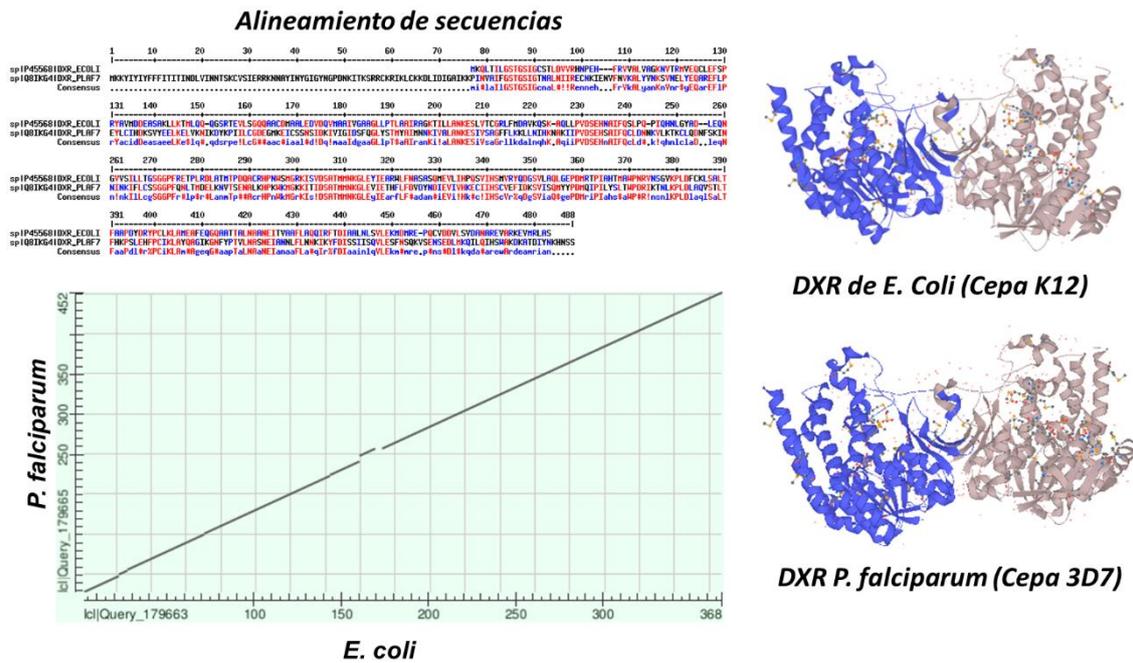
**Figura 23: Proteína de fusión Glutathione S-transferasa – DXR de *P. falciparum* (GST-PfDXR).** A. Mapa del vector de transformación y construcción para la GST-PfDXR. El gene fue clonado in pGS-21a por KpnI/HindIII. B. Carril 1: marcador de peso molecular; línea 2: GST-PfDXR purificada. Gel SDS-PAGE al 12,5%. Tinción con azul de coomassie.

Finalmente, para ver los efectos sobre la actividad enzimática se realizó la expresión y purificación de la enzima EcDXR como se describe en el apartado 2.1.3. Como resultado se obtuvo un nivel de expresión de 30 mg/L y 50% de solubilidad, lo cual ayudo a la posterior obtención de proteína purificada y activa (Figura 24).



**Figura 24: Proteína DXR de *E. coli* (EcDXR).** A. Mapa del vector de transformación y construcción para EcDXR. El gen fue clonado in pQE-60 por NcoI/HindIII. B. Carril 1: marcador de pesos moleculares; Carril 2: EcDXR purificada. Gel SDS-PAGE al 12,5%. Tinción azul de comassie.

Cabe mencionar que la enzima DXR es altamente conservada entre las especies y particularmente el alineamiento de la enzima EcDXR y PfDXR tienen una alta homología, ello, se puede verificar realizando el alineamiento de las secuencias de las enzimas DXR de *E. coli* (UniProt P45568) y DXR de *P. falciparum* (UniProt Q8IKG4) mediante la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Figura 25).



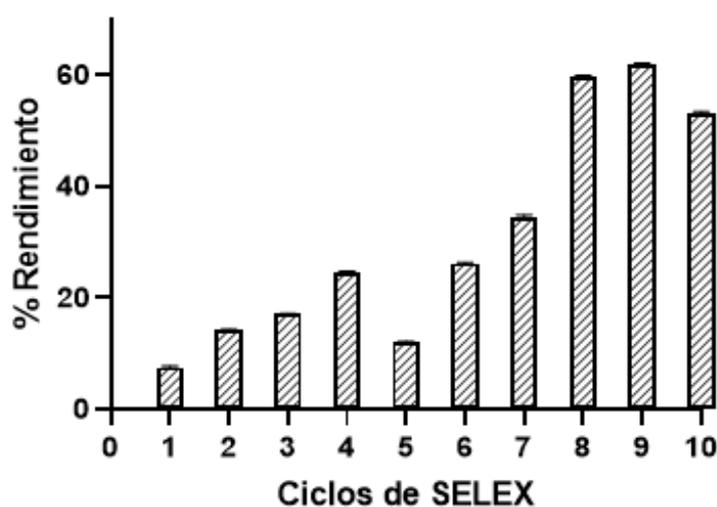
**Figura 25: Comparación de las proteínas DXR de *E. coli* y DXR *P. falciparum*.** En la parte izquierda superior de la imagen se muestra el resultado del alineamiento de ambas proteínas, los residuos resaltados en rojo son residuos idénticos y los residuos resaltados en azul son residuos conservados. BLAST generó la alineación de la secuencia de aminoácidos de DXR de *P. falciparum* (a lo largo del eje y) con de DXR de *E. coli* (a lo largo del eje x). Al lado derecho de la imagen se muestra la estructura 3D de ambas proteínas, las imágenes fueron extraídas de la base de datos UniProt (Universal protein).

### 3.1.2. Selección de aptámeros específicos a la enzima DXR de *P.falciparum*: Análisis de enriquecimiento

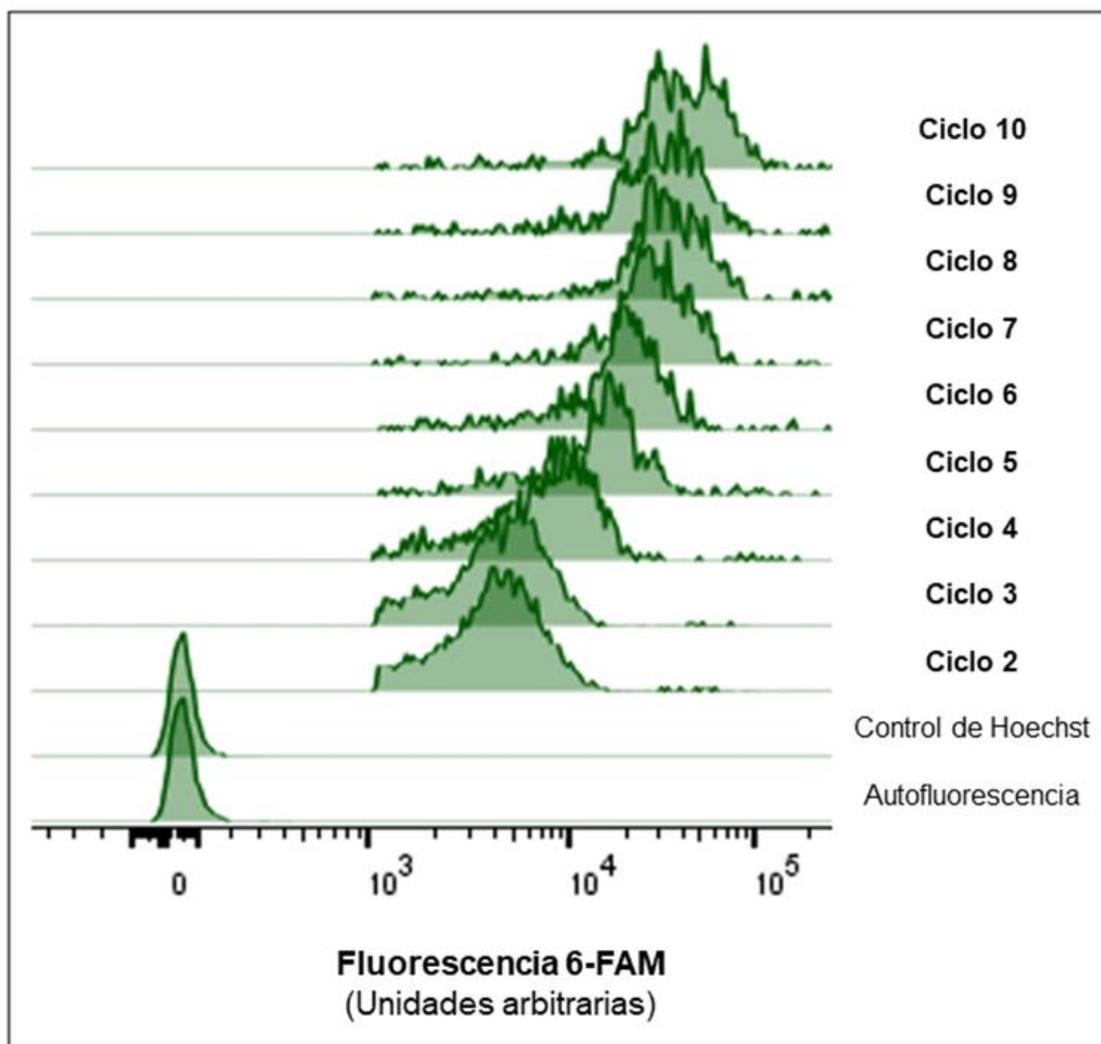
Para verificar si durante los ciclos de SELEX se alcanzó un enriquecimiento de aptámeros afines, se hicieron principalmente dos tipos de análisis: (1) mediante la medición directa de ADNsc en cada ciclo de selección usando el espectrofotómetro NanoDrop (Figura 26), y (2) mediante el análisis por citometría de flujo de pRBC incubadas previamente con los distintos grupos de

aptámeros obtenidos después de cada ciclo de selección (cada grupo fue marcado con 6-FAM).

Tanto con la medición directa de ADNsc como con la evaluación de pRBCs marcados con aptámeros se observó un enriquecimiento progresivo según aumentaban los ciclos hasta llegar a un máximo de 60% en el ciclo 9. Sin embargo, en el ciclo 10 se vio un estancamiento, por lo que se detuvo el proceso de selección cuando la fluorescencia asociada a pRBC no fue significativamente diferente de la detectada en el ciclo 9 (Figura 27).



**Figura 26:** A partir de la biblioteca de ADN aleatoria, se realizaron 10 ciclos de selección mediante el proceso FluMag-SELEX. El porcentaje de rendimiento expresa la relación entre el rendimiento real y teórico en cada ciclo. La concentración de ADNsc obtenida se cuantificó mediante NanoDrop. \* La concentración de ADNsc extraído se utilizó para calcular la masa total de ADNsc que se une a la enzima durante las rondas de selección (descritas como "ADNsc out"). A partir de la cantidad de ADNsc utilizada inicialmente en la selección (descrita como "ADNsc in"), el rendimiento del ADNsc de unión positiva se calculó a partir de la expresión:  $\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{ADNsc out (ng)}}{\text{ADNsc in (ng)}} \times 100$ .



**Figura 27. Determinación del enriquecimiento en aptámeros específicos para la enzima DXR de *P. falciparum*.** Los grupos de aptámeros desde el ciclo 2 al 10 obtenidos mediante proceso de SELEX se analizaron mediante citometría de flujo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.1.2. Conforme aumenta el número de ciclos de SELEX aumenta también el marcaje en la población de glóbulos rojos infectados con *P. falciparum*.

Dado que los datos de citometría de flujo sugirieron que los últimos ciclos de SELEX estaban enriquecidos en aptámeros específicos para la PfDXR, se procedió a subclonar el conjunto de los oligonucleótidos obtenidos después de los ciclos 8, 9 y 10 para obtener plásmidos que contenían aptámeros

individuales. Los aptámeros se clonaron en un vector pBluescript SK- en las condiciones descritas en 2.2.1.2. Se seleccionaron 96 clones individuales, se secuenciaron (Figura 28, A), identificaron las secuencias que mostraban el mayor número de repeticiones (Figura 28, C) y se sintetizaron químicamente.

Ciclo de SELEX	Número de secuencias
8	29
9	35
10	32
<b>Total</b>	<b>96</b>

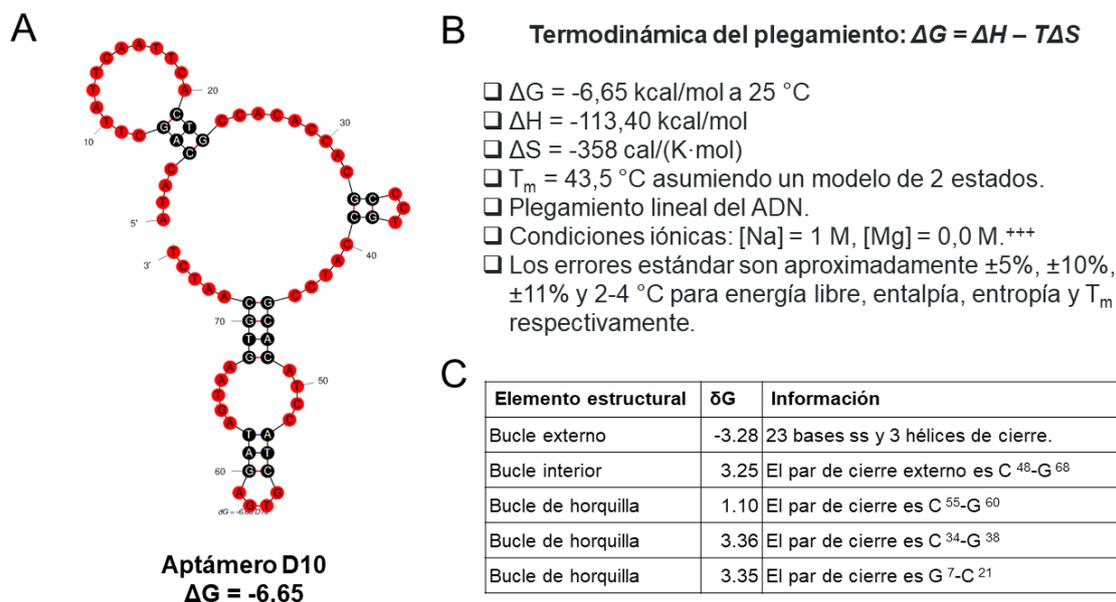
Comparación entre los ciclos de SELEX	8	9 y 10	8, 9 y 10
Número de secuencias repetidas	4	6	11
Número máximo de repeticiones por secuencia	4	6	16

Aptámero	Secuencia	Número de repeticiones
<b>D10</b>	<b>ATACCAGCTTATTCAATT</b> CACTGCCACACCACGCCCTGCCATCCGCACATCCATCGTG <b>AGATAGTAAGTGCAATCT</b> (21 A's, 26 C's, 11 G's, 18 U/T's, y 0 N's)	16
<b>D9</b>	<b>ATACCAGCTTATTCAATT</b> CACGACGGGACATACGCAACGTGATGGGTGTACATGTGGT <b>AGATAGTAAGTGCAATCT</b> (23 A's, 14 C's, 19 G's, 20 U/T's, y 0 N's)	8
<b>D8</b>	<b>ATACCAGCTTATTCAATT</b> CGCATCAAACCGATGTACGCGTGCCACATGTTGTTGAGTC <b>AGATAGTAAGTGCAATCT</b> (22 A's, 17 C's, 15 G's, 22 U/T's, y 0 N's)	5

**Figura 28: Se muestra la distribución de secuencias y resultados de la secuenciación.** A. Número de secuencias obtenidas en los ciclos 8, 9 y 10 del proceso de selección. B. Comparación de número de secuencias repetidas y máximo número de repeticiones por secuencia de los ciclos 8, 9 y 10, en el cual se observa que a medida que se avanza con los ciclos de selección aumenta el número de repeticiones como señal de enriquecimiento. C. Se detallan las 3 secuencias más conservadas entre los 3 últimos ciclos de SELEX.

El aptámero más conservado se le denominó aptámero D10 (**ATACCAGCTTATTCAATTCACTGCCACACCACGCCCTGCCATCCGCACATCCATCGTGAGATAGTAAGTGCAATCT**), cuya secuencia se encontró en 16 de los 96 clones analizados (Figura 28, C). Para generar la estructura secundaria (2D) del aptámero D10, se utilizó el servidor *web mfold* de Zuker, que se basa en el cálculo de la energía libre de Gibbs,  $\Delta G$ , de la autohibridación en condiciones empíricas, las condiciones bajo las cuales se realizaron las mediciones de energía libre fueron  $[Na^+] = 1 M$  y  $[Mg^{2+}] = 0 M$  a

25 °C. La estructura secundaria con el valor de  $\Delta G$  predicho más bajo se designó como la estructura secundaria más termodinámicamente favorable o dominante (Figura 29).



**Figura 29: Características 2D del aptámero D10.** A. Estructura secundaria más termodinámicamente favorable ( $\Delta G = -6.65$ ). Rojo: más probable que sea de una sola cadena; alto valor de *ss-count*. B. Termodinámica del plegamiento, las *condiciones iónicas* se han derivado empíricamente. C. Detalle de los elementos estructurales más resaltantes.

### 3.2. Evaluación de la interacción del aptámero D10 y la enzima DXR

A continuación, se procedió a analizar interacción del aptámero D10 con la enzima DXR de *P. falciparum* y DXR de *E. coli*, para ello se utilizaron 4 métodos diferentes: EMSA, *Western blot*, *Dot blot* e ITC.

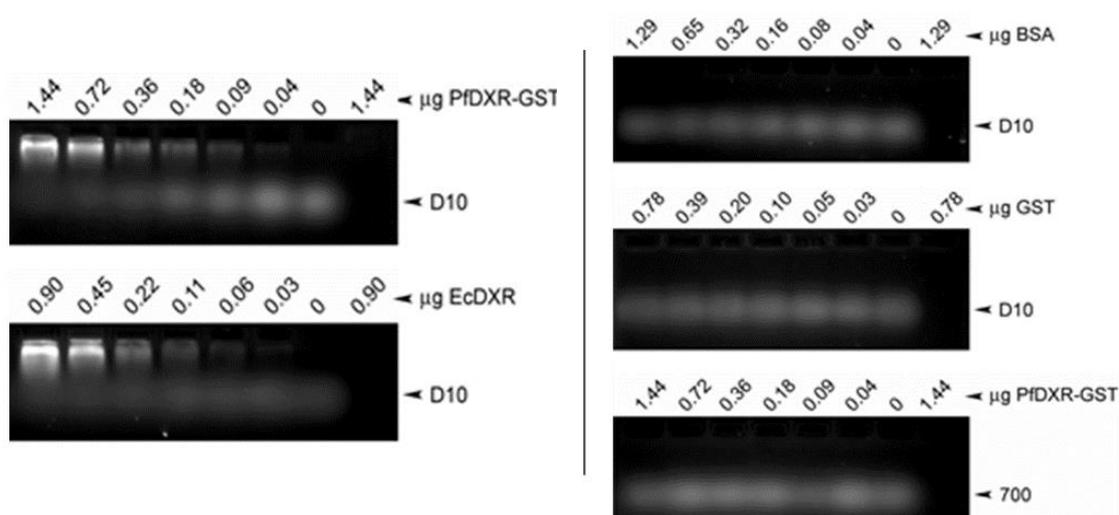
#### 3.2.1. Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

En estos experimentos se utilizaron preparaciones purificadas de la enzima GST-PfDXR (Figura 23) y de la enzima de EcDXR (Figura 24). Se prepararon

mezclas que contenían cantidades variables de enzima (desde 0,04 a 1,44  $\mu\text{g}$ ) y una cantidad constante del aptámero (150 ng).

Para analizar la interacción mediante EMSA se siguió el procedimiento descrito en 2.3.1.1. Los resultados obtenidos para el aptámero D10 se muestran en la Figura 30. Se observa como en presencia de la enzima hubo un retraso en la movilidad electroforética. Además, a medida que aumenta la cantidad de GST-PfDXR disminuye la intensidad de la banda correspondiente al aptámero D10. Un comportamiento similar se obtuvo con la enzima EcDXR. Sin embargo, no se observaron cambios al realizar los experimentos en presencia de GST ni de BSA (Figura 30). Estos resultados indican que el aptámero D10 se une tanto a la GST-PfDXR como a la EcDXR, pero no se unió a BSA ni a GST en ensayos de EMSA (Figura 30).

Por otra parte, se utilizó un aptámero aleatorio denominado 700 (**ATACCAGCTTATTCAATTAGTTGTGGTTGCAACTTTTTATTATTTGTTTCGTATCTTTAAGATAGTAAGTGCAATCT**) como control negativo. Dicho aptámero fue previamente diseñado por nuestro laboratorio específicamente para ser usado como control negativo (Lantero et al., 2020) y siempre mostró interacción negativa en presencia de todas las proteínas en nuestros ensayos de interacción.

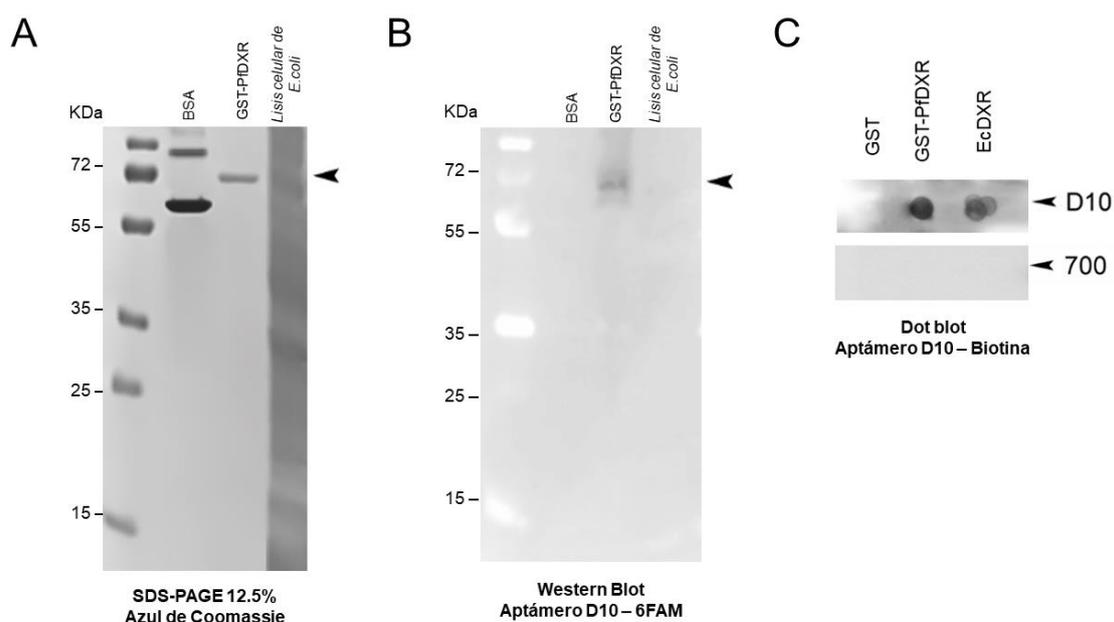


**Figura 30: Resultados de la evaluación mediante EMSA del aptámero D10.** A la izquierda de la figura se observan los resultados de interacción positiva

entre el aptámero D10 y la enzima DXR, tanto con su forma recombinante GST-PfDXR como EcDXR. A la derecha de la figura se observan los controles negativos, con los cuales se demuestra que la formación del complejo es específica.

### 3.2.2. Ensayo de *Western blot* y *Dot Blot* con aptámeros

Después de observar la formación del complejo aptámero:enzima mediante EMSA, se decidió continuar la caracterización del aptámero D10, para ello, se utilizaron membranas de PVDF que contenían las proteínas BSA, GST-PfDXR y células lisadas de *E. coli*. Los resultados mostraron que el aptámero D10 identifica la proteína de fusión GST-PfDXR mas no la proteína BSA o proteínas provenientes de la lisis celular de *E.coli* (Figura 31, B). También, se pudo observar señal de interacción del aptámero D10 con las formas nativas de GST-PfDXR y la EcDXR usando *Dot blot* y quimioluminiscencia como método de detección (Figura 31, C). En suma, el aptámero D10 identifica DXR de *P. falciparum* y de *E. coli* en su forma desnaturalizada (*Western blot*) y su forma nativa (*Dot blot*).

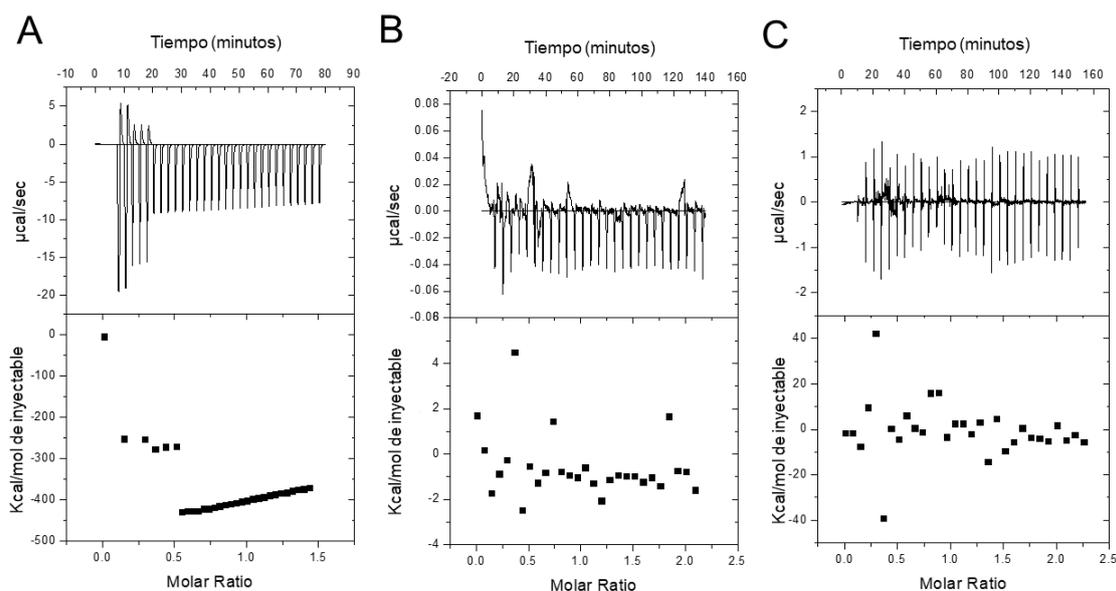


**Figura 31: Identificación del complejo aptámero y proteína. A:** Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas evaluadas; tinción azul

de Coomassie. B: GST-PfDXR unido al aptámero D10 marcado con fluoresceína en ensayos de transferencia en *Western blot*. C: *Dot blot* (proteína nativa) usando el aptámero D10 marcado con biotina y detectado con quimioluminiscencia, se observa que el aptámero D10 marca la proteína EcDXR y GST-PfDXR mas no la proteína GST.

### 3.2.3. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Como un paso más en la caracterización del aptámero D10, se intentó optimizar el ensayo ITC, para ello la temperatura de prueba siempre fue 25 ° C y las variables que se modificaron en cada intento fueron el número de inyecciones (10, 15 y 20 inyecciones) y la relación aptámero: proteína (1:5, 1:10 y 1:20). Los experimentos con mejor resultado fueron obtenidos cuando el equipo fue programado bajo las condiciones descritas en el apartado 2.3.1.2. Como resultado se pudo observar una tendencia que nos indica una interacción exotérmica (hasta -20  $\mu\text{cal/s}$ ) dependiente de la concentración de enzima GST-PfDXR (Figura 32, A), ello se caracteriza por el aumento de la temperatura en la celda de muestra con la adición de ligando. Esto hace que la potencia de retroalimentación a la celda de muestra disminuya para mantener una temperatura igual entre las dos celdas (celda de referencia y de muestra). A pesar de dicho resultado, no se llegó a encontrar el equilibrio proteína: aptámero necesario para el cálculo de la *K<sub>d</sub>*. Por otro lado, los experimentos de control negativo (GST y GST-PfDXR, con y sin aptámero, respectivamente) muestran menor liberación de energía (hasta -2  $\mu\text{cal/s}$ ) y ninguna tendencia definida (Figura 32, B y C), y a partir de ello, se confirma que la interacción exotérmica observada es propia del complejo formado entre aptámero y DXR de *P. falciparum*.

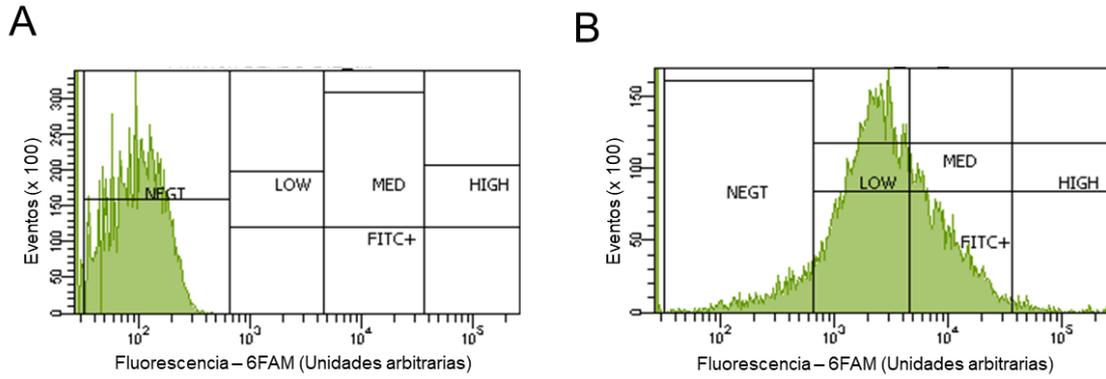


**Figura 32: Ajuste automático de las pruebas ITC.** A. GST-PfDXR en celda y Aptamer D10 en jeringa. B. GST en celda y Aptamer D10 en jeringa. C. GST-PfDXR en celda y tampón en jeringa.

### 3.2.4. Determinación de la *Kd* de los aptámeros seleccionados

La *Kd* se determinó siguiendo por citometría de flujo la asociación del aptámero D10 marcado con 6-FAM unido a esferas de látex funcionalizadas con GST-PfDXR, EcDXR, GST o BSA. Los experimentos se realizaron por triplicado y se analizaron 10000 eventos en todos los casos para hacer comparable los datos.

Teniendo en cuenta que las proteínas GST-PfDXR contienen etiquetas de 6 histidinas (6xHis) en su estructura, como control de la funcionalización positiva de las esferas de látex con la proteína diana (6His-GST-PfDXR-6His) se realizó la incubación con un anticuerpo anti-6xHistag, dicho anticuerpo fue marcado con un anticuerpo secundario fluorescente (6FAM). Los resultados mostraron un evidente desplazamiento de la población de esferas a la zona positiva. A su vez, se realizó un control omitiendo el anticuerpo primario anti-6xHistag, lo cual no mostró ningún desplazamiento a la zona positiva (Figura 33).

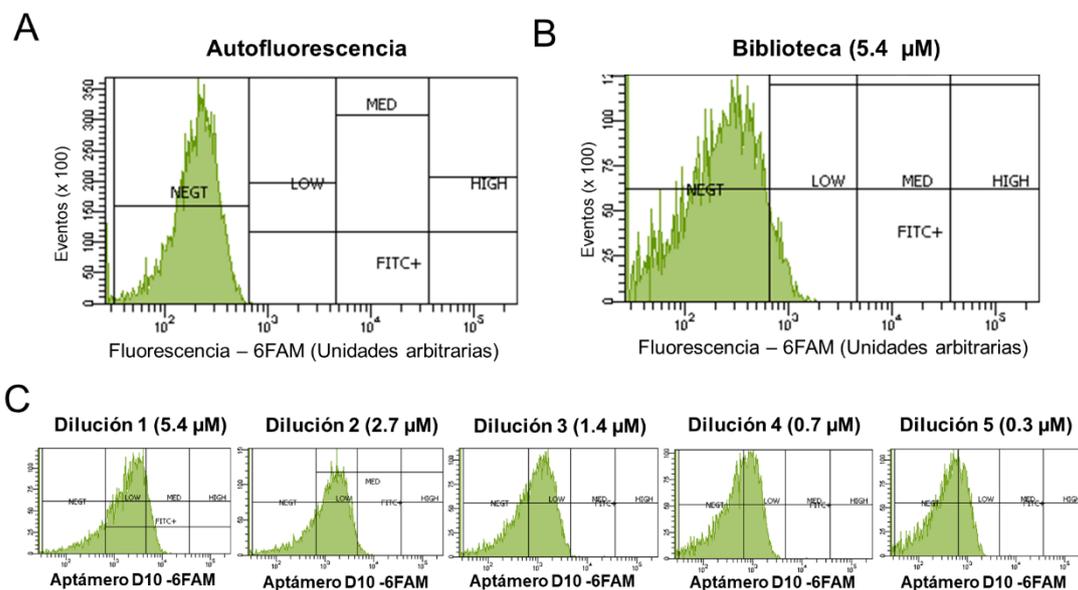


**Figura 33: Comprobación de las esferas de látex conjugadas con la diana.**

A. Control negativo: Incubación del anticuerpo secundario fluorescente con las esferas funcionalizadas con la proteína GST-PfDXR (6His-GST-PfDXR-6His).  
 B. Control positivo: Anticuerpo anti-6xHisTag incubado con las esferas funcionalizadas con la proteína GST-PfDXR y detectado con el anticuerpo secundario fluorescente.

En la figura 34, se muestra la distribución de la población de esferas según su intensidad de fluorescencia. A partir de la autofluorescencia de las esferas de látex se delimita lo que será nuestra población negativa y positiva (Figura 34, A). Esta última dividida a su vez en baja, media y alta. El control de autofluorescencia luego fue restado de todas las señales de intensidad resultantes del resto de condiciones. En la gráfica B de la figura 34, se muestra el resultado tras la incubación de la biblioteca (compuesta por aptámeros aleatorios marcados con 6FAM, su marcaje y preparación fue según los protocolos descritos en los apartados 2.2.1 y 2.2.1.1, respectivamente) con las esferas de látex funcionalizadas con la enzima GST-PfDXR. En este caso se observa un ligero aumento de la población positiva, la cual es de muy baja intensidad. Cabe mencionar, que la biblioteca fue la misma que se usó en el proceso de selección M-SELEX del que se aisló el aptámero D10. Por otra parte, para poder obtener la *K<sub>d</sub>*, fue necesario hacer una dilución seriada del aptámero D10 marcado con 6FAM (sintetizado por Sigma-Aldrich) y mantener la concentración de enzima en todas las condiciones según se detalla en el apartado 2.3.1.5. En la gráfica C de la figura 34, se muestra el resultado de las

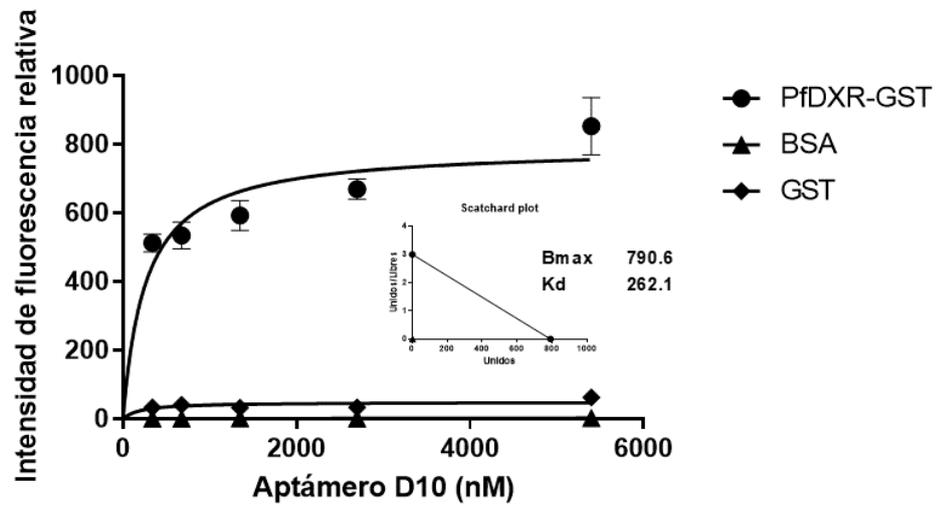
5 diluciones desde la más concentrada a la más diluida. Se observa que a medida que aumenta la concentración de aptámero D10 marcado con 6FAM la población negativa se desplaza a la zona positiva, indicando a su vez el aumentando de su intensidad de fluorescencia.



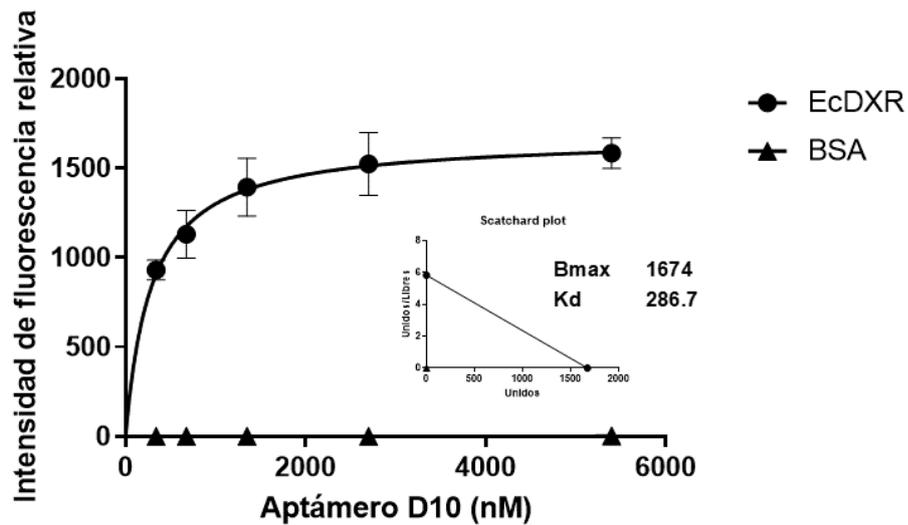
**Figura 34: Histogramas de intensidad de fluorescencia característicos de los ensayos para la determinación de la  $K_d$ .** A. El panel muestra la autofluorescencia de las esferas de látex. B. Se muestra el resultado tras la incubación de la biblioteca (aptámeros aleatorios marcados con 6FAM) con las esferas de látex funcionalizadas con GST-PfDXR. C. Se muestran las gráficas los resultados tras la incubación de diluciones seriadas del aptámero D10 (6FAM) con las esferas de látex funcionalizadas con GST-PfDXR.

Finalmente, con el análisis conjunto de todos los experimentos en triplicado, se pudo obtener la  $K_d$ . El análisis de la interacción entre el aptámero D10 y GST-PfDXR indicó valores respectivos de  $B_{\text{max}}$  0,79 y  $K_d$  0,26  $\mu\text{M}$  (Figura 35, A), que fueron similares a los obtenidos para la interacción D10-EcDXR,  $B_{\text{max}}$  1,67 y  $K_d$  0,29  $\mu\text{M}$  (Figura 35, B).

A



B



**Figura 35: Análisis de afinidad del aptámero D10.** Las gráficas muestran la intensidad de fluorescencia relativa vs curva de concentración de aptámeros marcados con 6-FAM (nM) y la correspondiente gráfica de Scatchard . A. Ensayos para la determinación de la *Kd* y Bmax para la unión del aptámero D10 a GST-PfDXR. B. Ensayos para la determinación de la *Kd* y Bmax para la unión del aptámero D10 a EcDXR.

### 3.3. Evaluación funcional: Efecto del aptámero D10 sobre la actividad enzimática de la DXR

En una primera etapa el aptámero D10 se evaluó junto a los aptámeros D9 y D8, obtenidos a partir del mismo proceso de M-SELEX, y como control adicional se usó la secuencia complementaria de uno de los aptámeros no candidatos provenientes del mismo proceso de selección (**AGATTGCACTTACTATCTCACACACACGTACGTACGCGCATTCCGCCCGCCATGTCTCGAATTGAATAAGCTGGTAT**), dicha secuencia fue denominada X y por su estructura no se espera ningún tipo de interacción. Se prepararon las reacciones enzimáticas según se describe en el apartado 2.3.2.1. y para efectos de control y análisis se hicieron reacciones omitiendo la enzima EcDXR, reacciones añadiendo 0,5  $\mu\text{M}$  de fosmidomicina y reacciones añadiendo 10  $\mu\text{M}$  de cada aptámero candidato (aptámero D10, D9 y D8), y reacciones añadiendo 10  $\mu\text{M}$  de la secuencia control X. Los resultados mostraron que el aptámero D10 tenía un efecto de inhibición significativo respecto al resto de aptámeros candidatos (Figura 36).

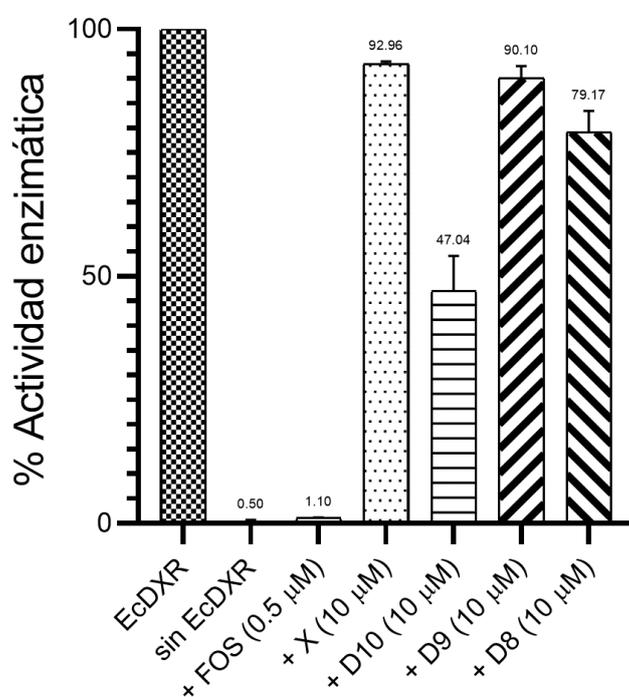
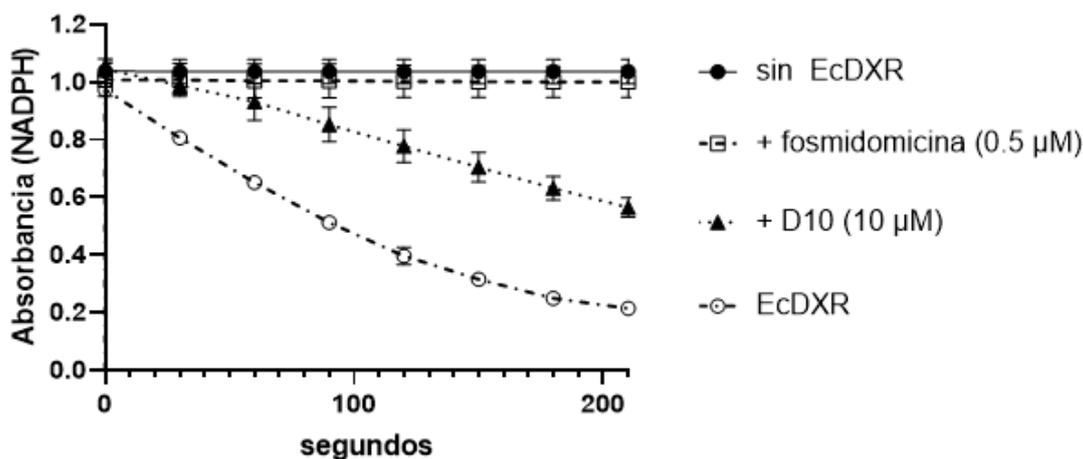


Figura 36: En esta gráfica se puede observar el resultado de los aptámeros candidatos sobre la actividad enzimática. La actividad de la

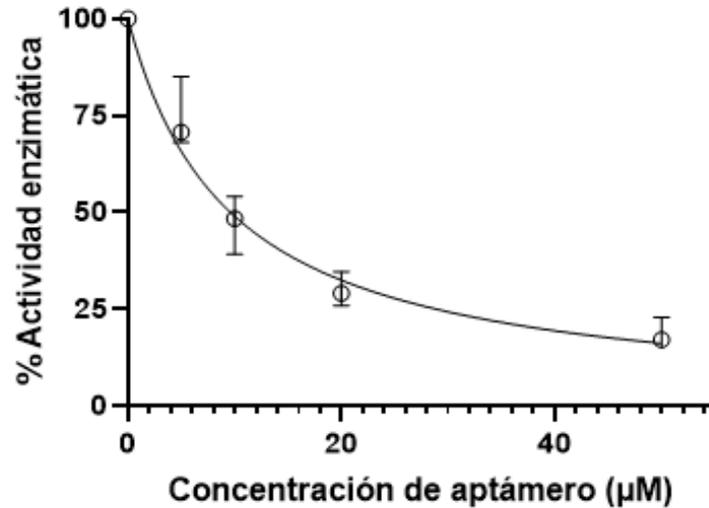
enzima EcDXR se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de la coenzima NADPH y la respuesta fue normalizada. \* Fosmidomicina (FOS).

A partir de los resultados previos, se hicieron más ensayos para corroborar la inhibición. Por una parte, el aptámero D10 siempre mostró un efecto inhibitor sobre la actividad de la EcDXR, que, sin embargo, era significativamente más débil que la fosmidomicina (Figura 37). Por otro lado, no se observó actividad inhibitora en cultivos de *P. falciparum* o *E. coli* hasta una concentración del aptámero D10 de 50  $\mu\text{M}$  (ver apartado 3.6).



**Figura 37: Cinética de la actividad enzimática EcDXR.** Se observa que luego de añadir el aptámero D10 o la fosmidomicina disminuye la oxidación de la coenzima NADPH.

Finalmente, también se obtuvo la  $\text{IC}_{50}$  del aptámero D10, tras seguir la cinética enzimática de la DXR incubada con diferentes concentraciones del aptámero. La  $\text{IC}_{50}$  que se obtuvo fue de 9,6  $\mu\text{M}$  (con un rango de 8,704  $\mu\text{M}$  a 10,59  $\mu\text{M}$  con intervalo de confianza de 95%) (Figura 38). Dicho experimento, corrobora que el efecto inhibitor que se observó en los primeros experimentos es del aptámero y que es dependiente de la concentración del aptámero.

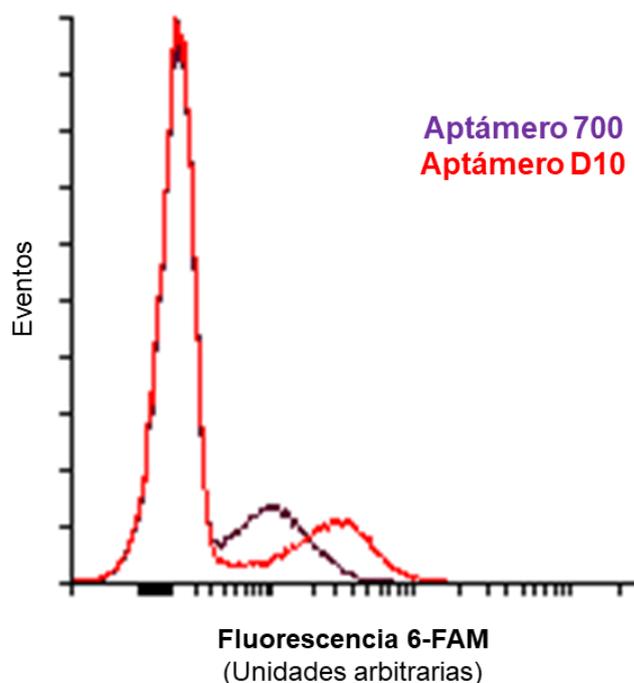


**Figura 38: Representación gráfica del análisis IC<sub>50</sub> del aptámero D10 frente a la enzima EcDXR.** Se aprecia la respuesta normalizada versus concentración del aptámero D10. Puntos con barra de error: Media y error (Intervalo de confianza del 95%).

### 3.4. Caracterización del aptámero D10 en pRBCs

Con el propósito de observar si el aptámero era capaz de diferenciar los pRBCs y su localización a nivel celular, se realizaron diferentes experimentos exponiendo el aptámero D10 a pRBCs provenientes de un cultivo de la cepa de *P. falciparum* 3D7 (apartado 2.4.1.). Dichos pRBCs fueron previamente fijados con paraformaldehído y los estudios se ampliaron con el uso de otros marcadores específicos a *Plasmodium*, por un lado, de la misma naturaleza de nuestro aptámero, es decir, un aptámero de ADN desarrollado contra la enzima lactato deshidrogenasa de *P. falciparum* (PfLDH) (Cheung et al., 2013) y el aptámero 30 que identifica pRBC (Lantero et al., 2020), por otro lado, con un anticuerpo específico a la proteína ferredoxina-NADP reductasa de *P. falciparum* (FXR) (ab243175, Abcam), la cual se localiza en el apicoplasto. Los detalles experimentales se describen en el apartado 2.4.1.2.

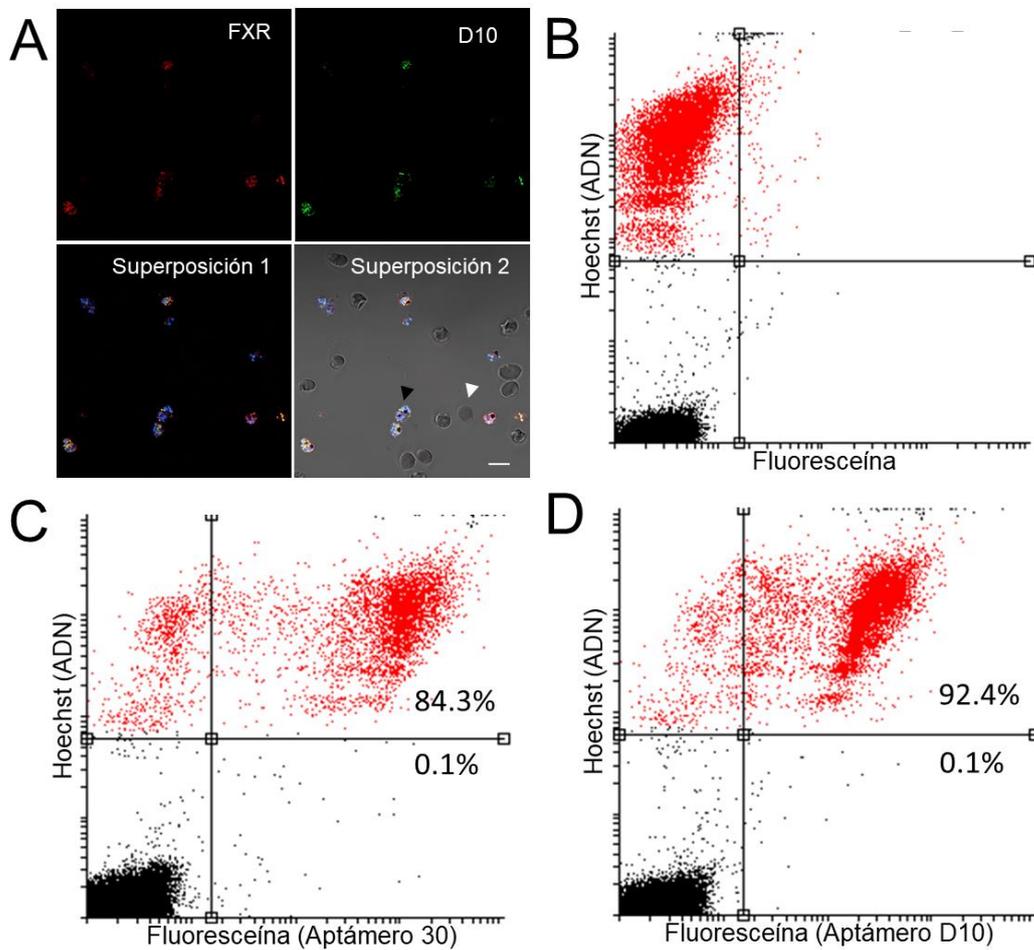
En primer lugar, se evaluó la comparación entre los aptámeros sintéticos D10 y aleatorios 700 (control negativo) por citometría de flujo. En esta primera evaluación los resultados mostraron que el aptámero D10 casi triplicaba (1890.974) la media de intensidad del aptámero 700 (772.586) (Figura 39).



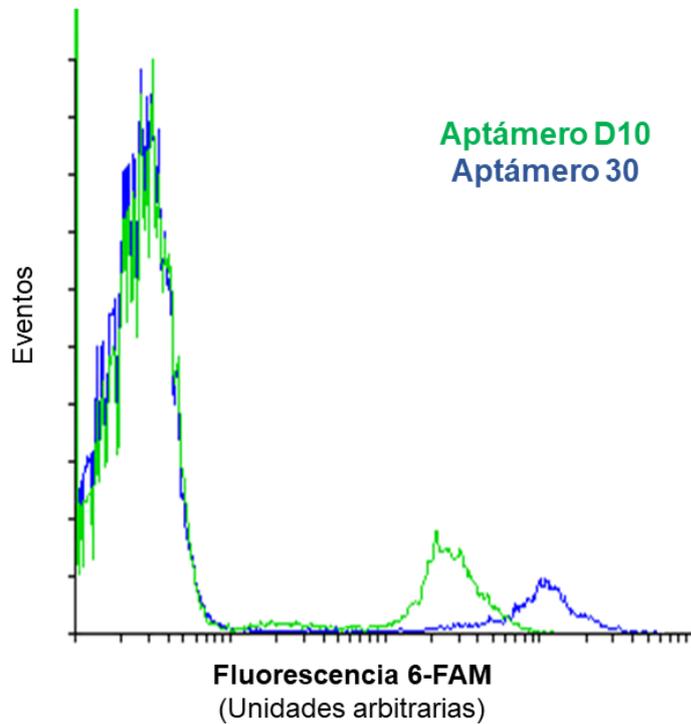
**Figura 39: Histograma comparativo de intensidad de fluorescencia entre el aptámero 700 (control negativo) y el aptámero D10.**

En segundo lugar, se realizó la comparación entre el aptámero D10 y el aptámero 30, el cual es una secuencia previamente publicada por nuestro grupo de investigación (Lantero et al., 2020), en dicha publicación se mostró la evolución de una familia de aptámeros de ADN que exhiben una alta discriminación específica de glóbulos rojos frente a pRBC, siendo el aptámero 30 el de mayor especificidad. Por otra parte, nuestros resultados mostraron que el aptámero D10 identificó el 92,4% de pRBCs mientras que el aptámero 30 identificó 84,3%, por lo tanto, el aptámero D10 tiene mayor sensibilidad en la discriminación entre RBC y pRBC (Figura 40); sin embargo, exhibe menor media de intensidad de fluorescencia (248.198) que el aptámero 30 (905,180)

(Figura 41), con concordancia con la localización y cantidad de enzima DXR de *P. falciparum* endógena.

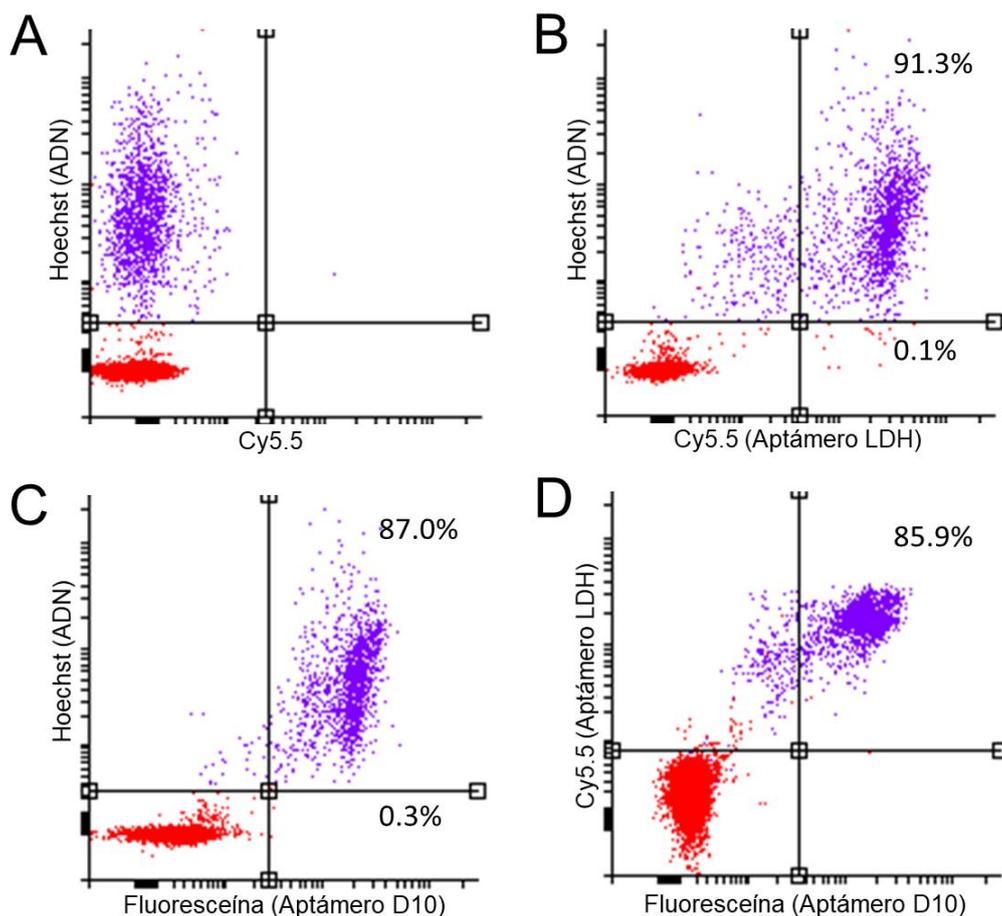


**Figura 40. Comparación del direccionamiento a pRBC del aptámero D10 y aptámero 30.** A. Análisis de microscopía confocal de fluorescencia del direccionamiento a los pRBC del aptámero D10: Núcleos teñidos con Hoechst 33342 (color azul), aptámero D10-6FAM (color verde), anticuerpo anti FXR (color rojo). En la superposición 2, la punta de flecha de color blanco señala un RBC y la punta de flecha de color negro señala un pRBC. Barra de escala: 10  $\mu$ m. B-D. Análisis de distribución de población por citometría de flujo: B: Control exclusivo Hoechst 33342. C. Análisis de focalización del aptámero 30. D. Análisis de focalización del aptámero D10. Los porcentajes indican la fracción de células marcadas en relación con el número total de (paneles superiores) pRBC y (paneles inferiores) no infectados.



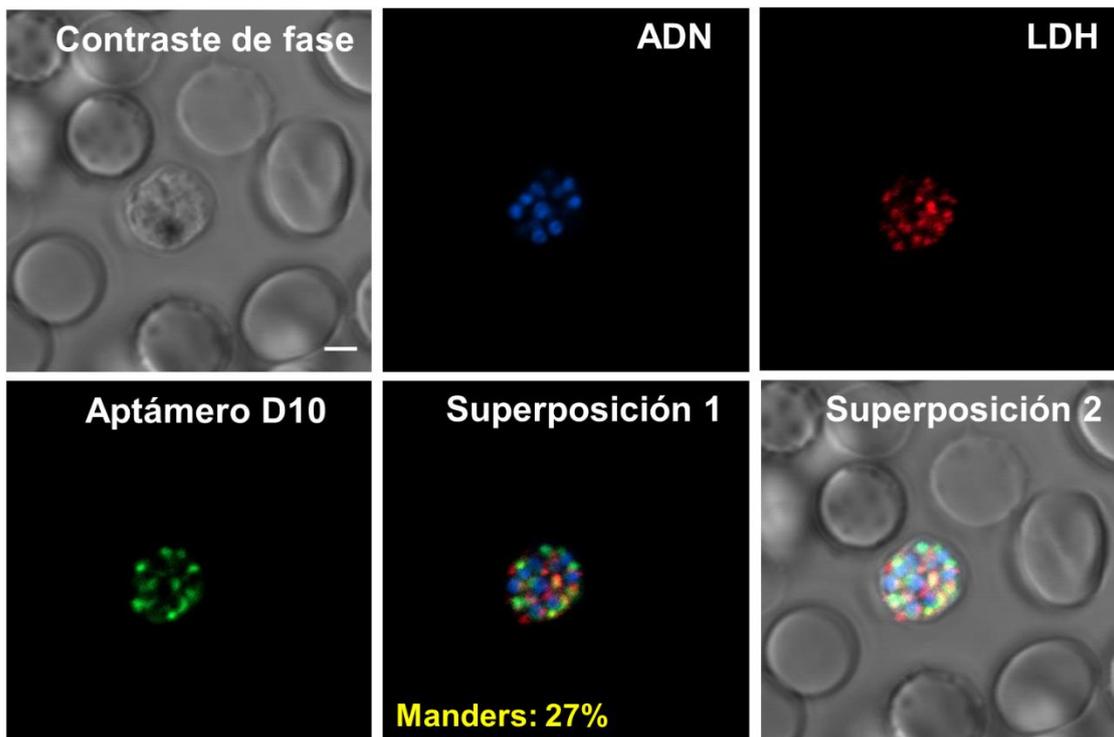
**Figura 41: Histograma comparativo de la intensidad de fluorescencia de los aptámeros D10 (desarrollado para identificar la enzima DXR de *P.falciparum*) y 30 (desarrollado para identificar pRBC por *P. falciparum*).**

Y, en tercer lugar, tras confirmar que el aptámero D10 discrimina pRBC, se realizaron los análisis de población por citometría de flujo junto con el análisis de colocalización mediante microscopia confocal con dos marcadores altamente específicos a *P. falciparum*: Aptámero contra PfLDH y el anticuerpo específico a FXR de *P. falciparum*. Con estos resultados nuevamente se evidenció que el aptámero D10 discrimina específicamente los pRBC de los RBC. Además, se observó que el aptámero contra la PfLDH tiene un poco más de sensibilidad para la identificación de pRBCs (91,3%) en comparación con el aptámero D10, lo cual concuerda con el hecho de que la PfLDH es más abundante a nivel celular (Figura 42).



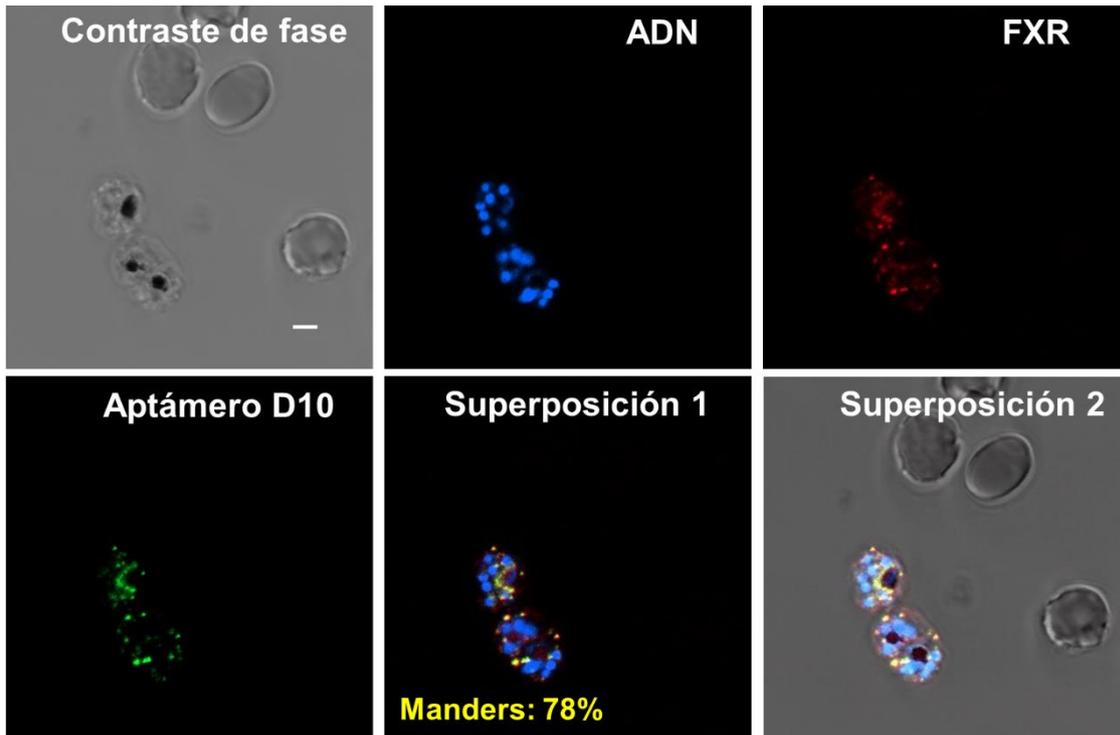
**Figura 42. Estudio de concordancia en la identificación de pRBC de los aptámeros D10 y LDH.** A. Muestra un control con solo tinción de ADN (Hoechst 33342). B. Análisis de citometría de flujo del aptámero LDH. C. Análisis de citometría de flujo del aptámero D10. D. El análisis de citometría de flujo con ambos aptámeros (LDH y D10) indicó 85,9% de coincidencia. Los porcentajes indican la fracción de células marcadas en relación con el número total de (paneles superiores) pRBC y (paneles inferiores) no infectados. Las escalas del eje indican unidades arbitrarias de fluorescencia relativa.

Dichos, resultados de citometría de flujo fueron respaldados con las observaciones realizadas mediante microscopia confocal. Se confirmó que ambos aptámeros tienen diferente localización subcelular con un coeficiente de Manders de 27%, lo cual está de acuerdo con el hecho de que la LDH es una enzima citoplasmática y la DXR se localiza en el apicoplasto (Figura 43).

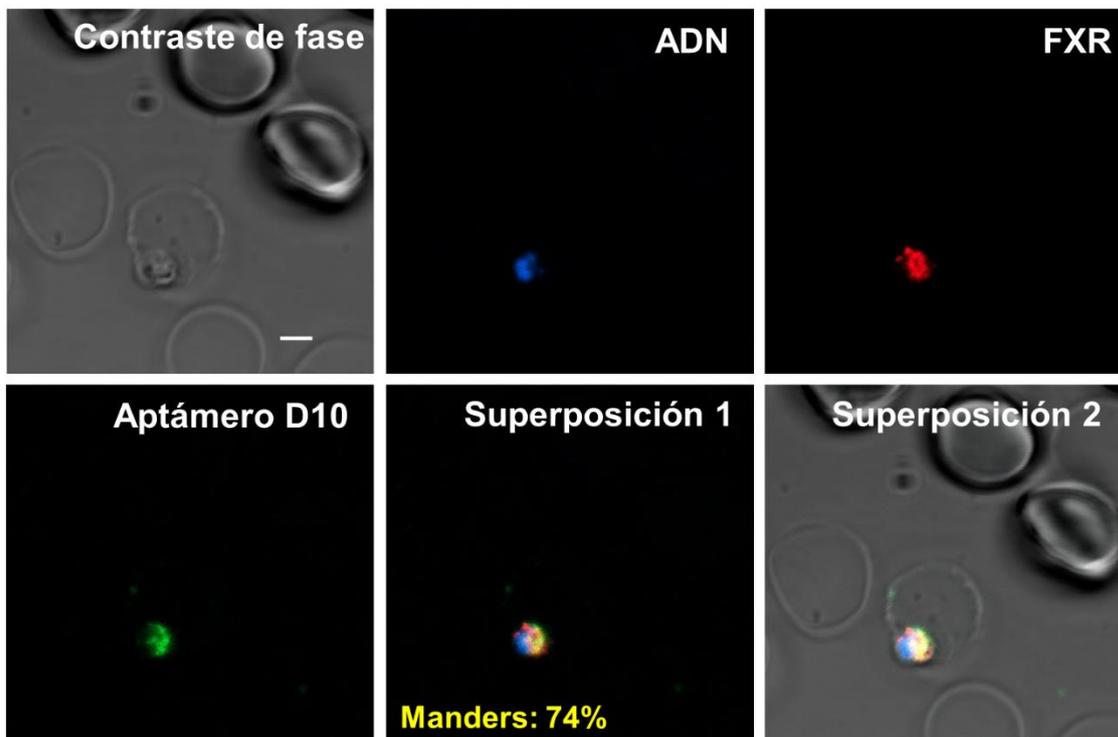


**Figura 43: Análisis de localización subcelular mediante microscopía confocal.** Hoechst 33342 (color azul), aptámero D10-6FAM (color verde), aptámero LDH (color rojo). Barra de escala: 2 $\mu$ m.

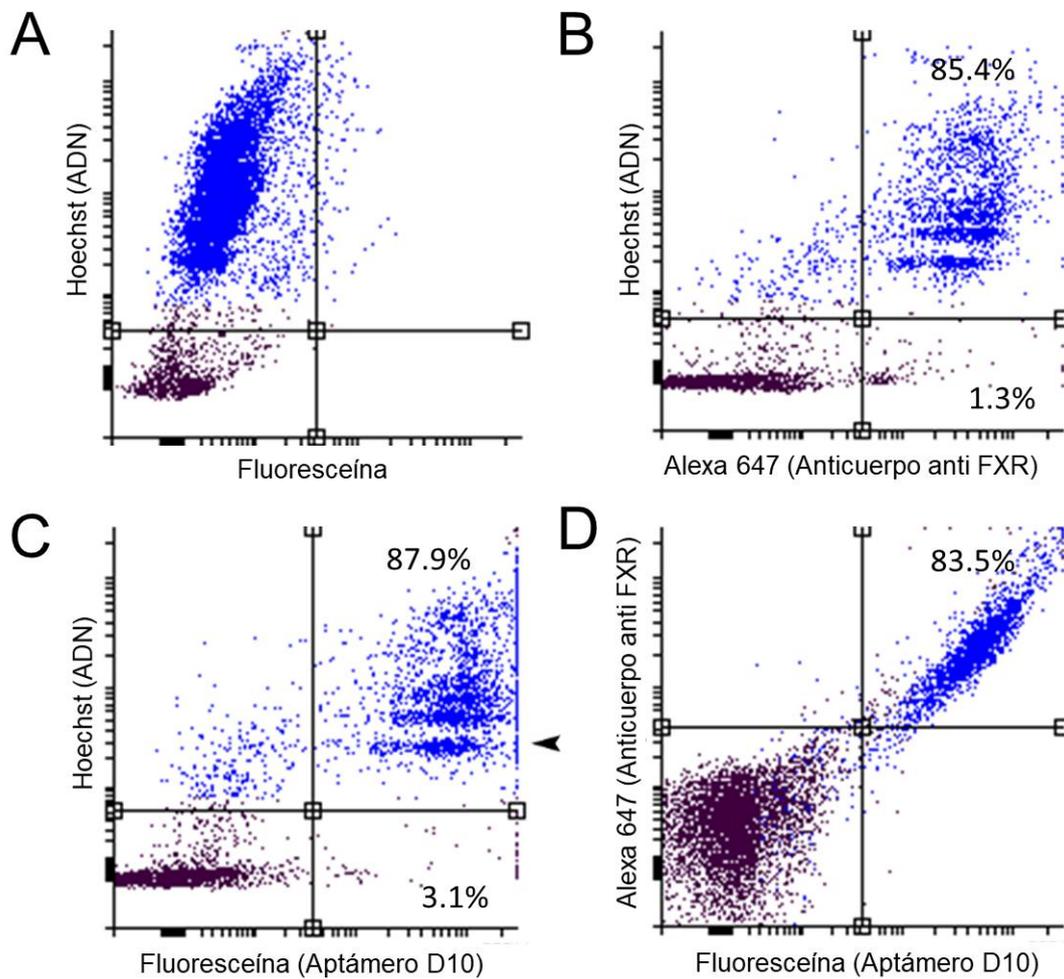
Finalmente, la evaluación utilizando el anticuerpo anti FXR de *P. falciparum* confirmó la orientación del aptámero D10 al apicoplasto. Los análisis tanto de imagen confocal (Figura 44 y 45) como los de citometría de flujo (Figura 46) mostraron que el aptámero D10 se unió a todos los estadios sanguíneos del parásito, incluidas las formas de anillo, de acuerdo con la orientación al apicoplasto, el cual está presente en todas las formas intraeritrocíticas del patógeno.



**Figura 44: Análisis de microscopía de fluorescencia confocal en esquizontes.** Hoechst 33342 (color azul), aptámero D10-6FAM (color verde), anticuerpo anti FXR (color rojo). Barra de escala: 2µm.



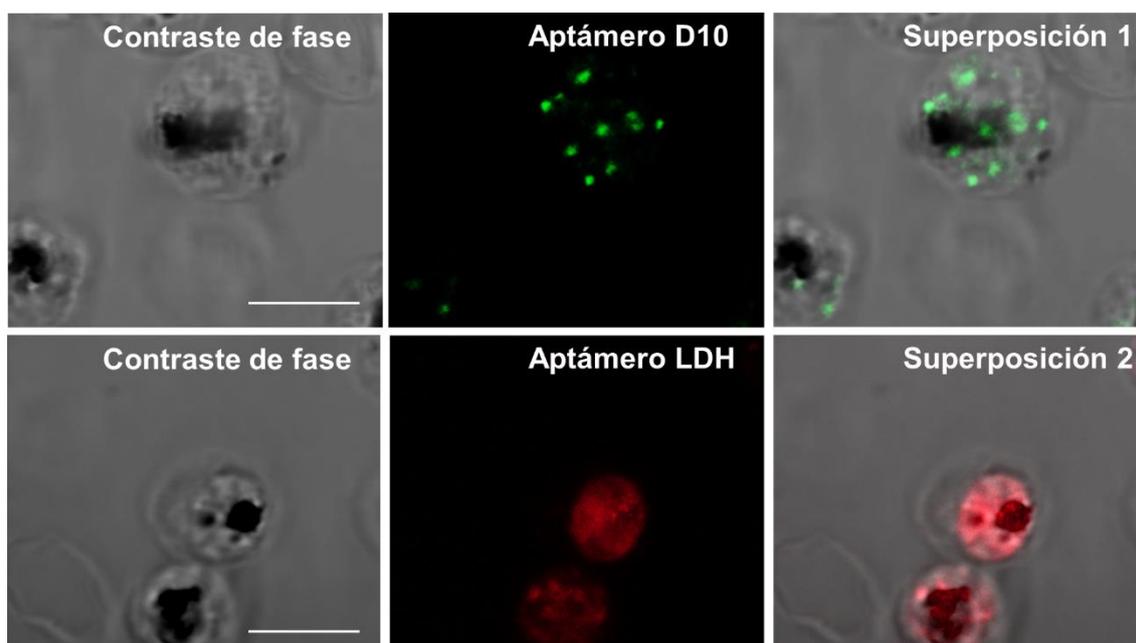
**Figura 45: Análisis de microscopía de fluorescencia confocal en etapas de anillo.** Hoechst 33342 (color azul), aptámero D10-6FAM (color verde), anticuerpo anti FXR (color rojo). Barra de escala: 2µm.



**Figura 46. Estudio de concordancia del aptámero D10 y de la enzima ferredoxina-NADP reductasa (FXR).** A. Muestra un control con solo tinción de ADN (Hoechst 33342). B. Análisis de citometría de flujo de la enzima FXR. C. Análisis de citometría de flujo del aptámero D10, la punta de flecha en el panel superior derecho indica la población en fase de anillo del parásito. D. El análisis de citometría de flujo de ambas moléculas juntas (aptámero D10 y FXR) indicó 83,5% de coincidencia. Las escalas del eje indican unidades arbitrarias de fluorescencia relativa. Los porcentajes indican la fracción de células marcadas en relación con el número total de (paneles superiores) pRBCs y (paneles inferiores) no infectados.

### 3.5. Reconocimiento de bacterias por el aptámero D10

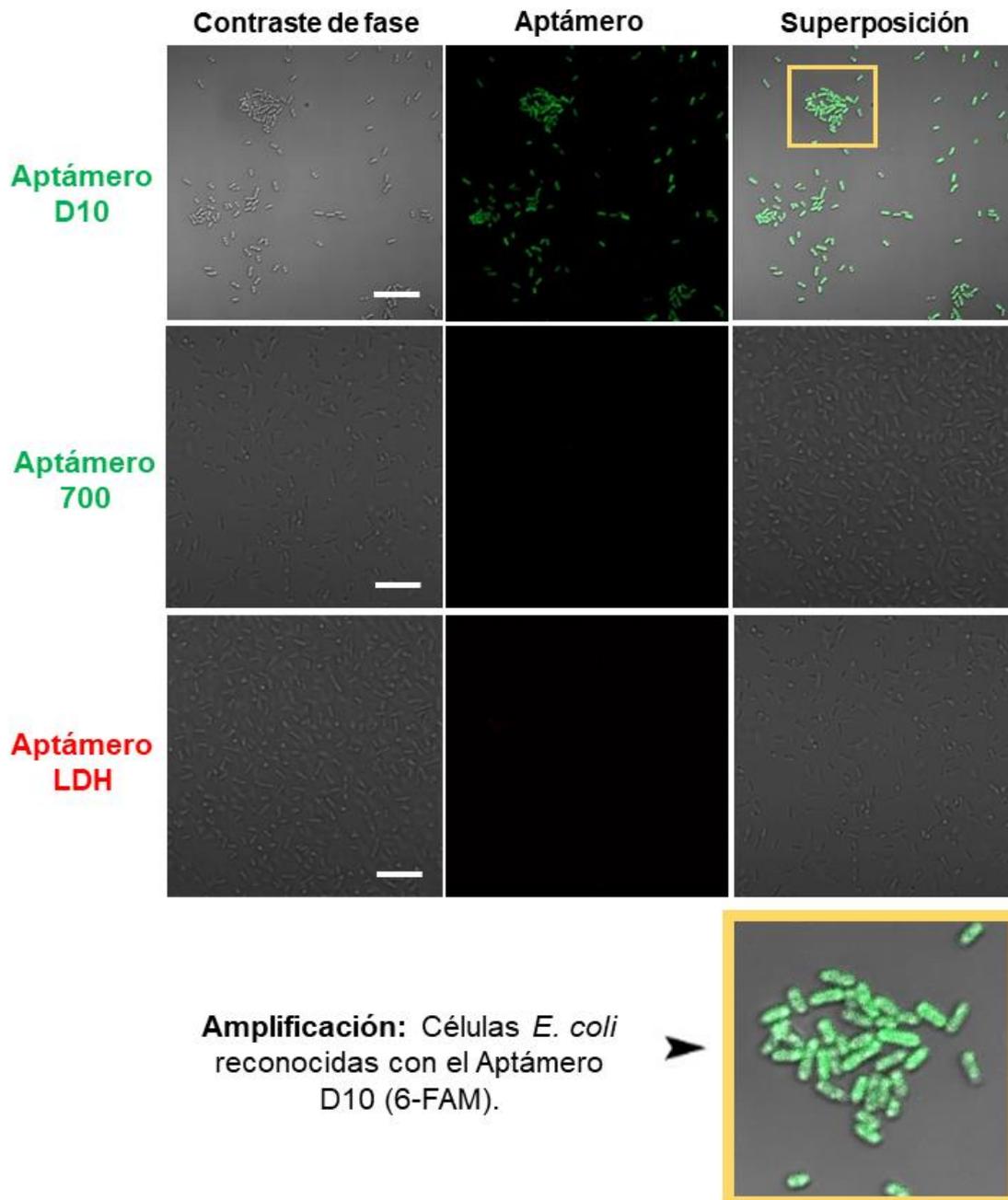
Los resultados previos de caracterización evidenciaron que el aptámero D10 tiene la capacidad de reconocer la EcDXR, por ello, se decidió experimentar su direccionamiento como marcador celular en bacterias. Para ello, las cepas bacterianas *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 fueron fijadas con paraformaldehído y posteriormente incubadas con los aptámeros D10, LDH o 700 marcados con fluorescencia siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4.2. En paralelo se usaron pRBCs previamente fijadas para el control de marcaje positivo de los aptámeros LDH (específico a LDH de *P. facilparum*) y D10 (Figura 47), y así confirmar que los aptámeros funcionan correctamente en el ensayo.



**Figura 47: Controles de marcaje positivo con pRBCs.** En la parte superior aptámero D10 (6-FAM) que localiza el apicoplasto, y en la parte inferior aptámero LDH (Cy5.5) que se localiza en el citoplasma del parásito. Microscopia confocal. Barra de escala = 5  $\mu$ m.

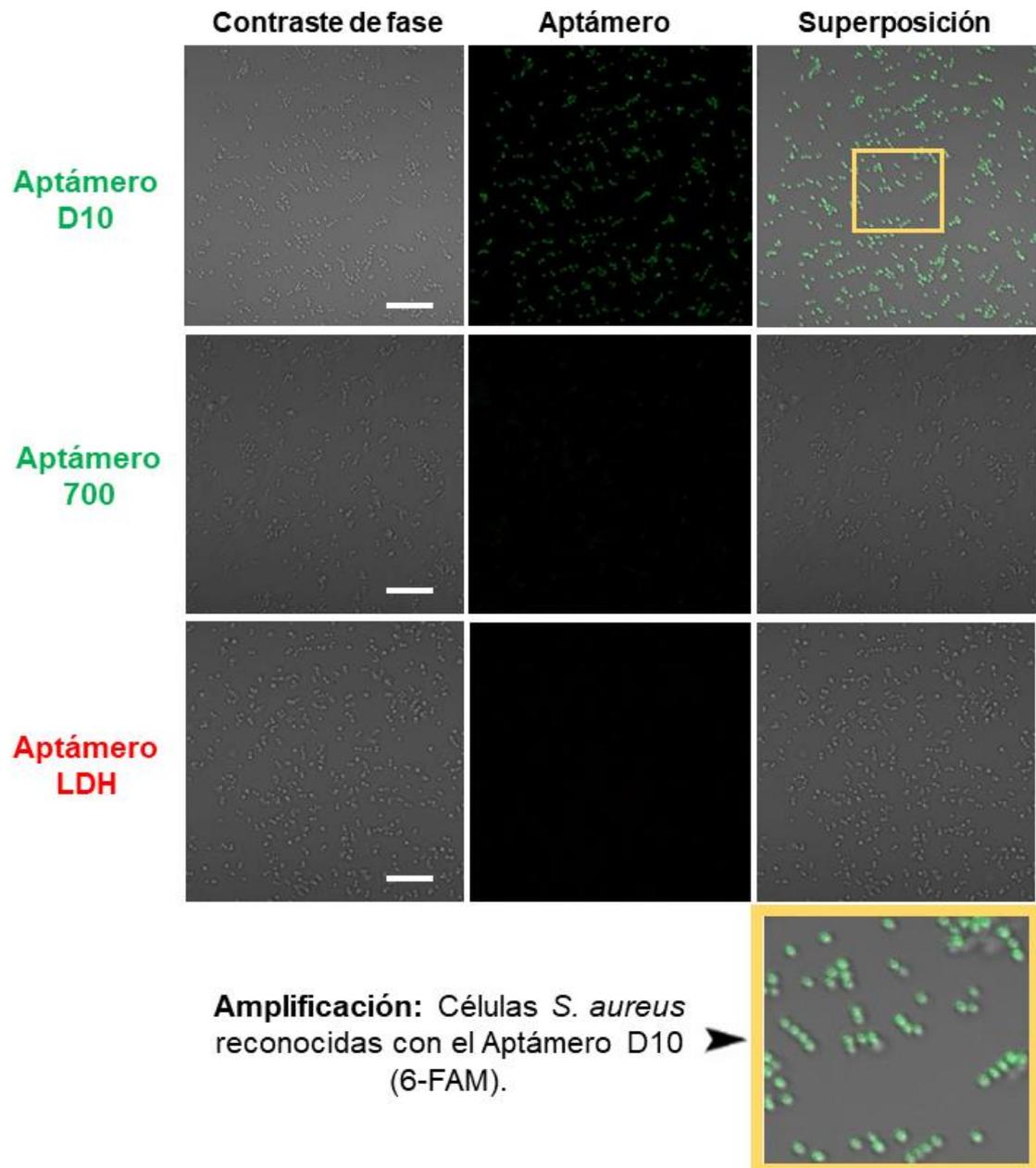
Los resultados mostraron que el aptámero D10 es capaz identificar ambas bacterias, grampositiva y gramnegativa. El aptámero D10 reconoció a *E. coli*

(Figura 48) y *S. aureus* (Figura 49), a diferencia de los controles con los aptámeros 700 y LDH.



**Figura 48: Microscopia confocal de *E. coli* marcadas con aptámero D10.** El cultivo de *E. coli* ATCC 25922 fue incubado con los aptámeros D10 (6-FAM), 700 (6-FAM) o LDH (Cy5.5). Solo el aptámero D10 identificó las células *E. coli*. Los campos mostrados son representativos de toda la lámina y de tres

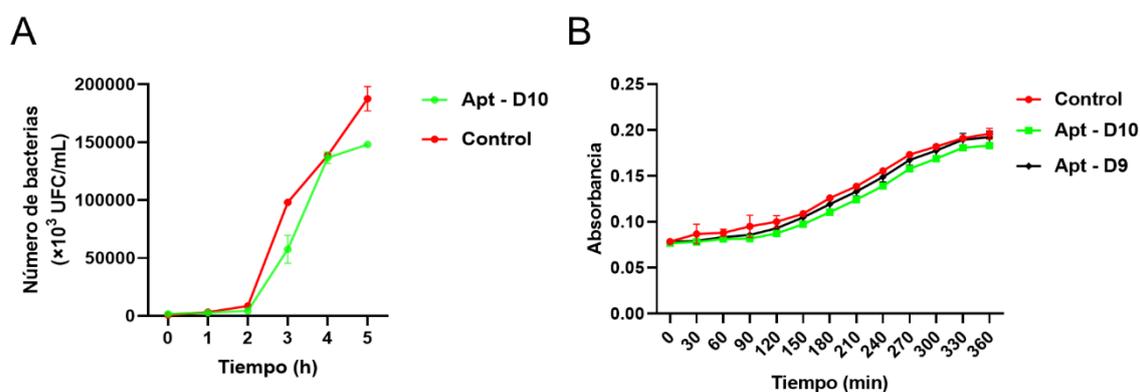
muestras independientes. El recuadro amarillo indica la zona ampliada. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 49: Microscopia confocal de *S. aureus* marcadas con aptámero D10.** El cultivo de *S. aureus* ATCC 29213 fue incubado con los aptámeros D10 (6-FAM), 700 (6-FAM) o LDH (Cy5.5). Solo el aptámero D10 identificó las células *S. aureus*. Los campos mostrados son representativos de toda la lámina y de tres muestras independientes. Barra = 10  $\mu$ m.

### 3.6. Evaluación del efecto del aptámero D10 sobre el cultivo *in vitro* de *E. coli*.

Se realizaron ensayos para observar el efecto inhibitor del aptámero D10 en cultivos de *E. coli*. Para facilitar el ingreso del aptámero al interior de la célula se usaron cultivos de células competentes DH10B. Dichas células fueron tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de aptámero directamente y usando choque térmico, y su crecimiento se siguió calculando la concentración de bacterias (UFC/mL) en placa de agar y por espectrofotometría según se describe en el apartado 2.4.3. Además, en la evaluación se añadió el aptámero D9 como control negativo, el cual proviene del mismo proceso de selección y no tiene efecto inhibitor sobre la actividad enzimática de la EcDXR según resultados previos (Figura 36). Finalmente, se observó que el aptámero D10 introducido por choque térmico dentro de la célula no afectó significativamente ( $P > 0,0001$ ) la cinética de crecimiento durante cinco horas comparado con el control (Figura 50). Lo mismo se observó cuando fue añadido directamente al cultivo usando la misma concentración (Anexo B).

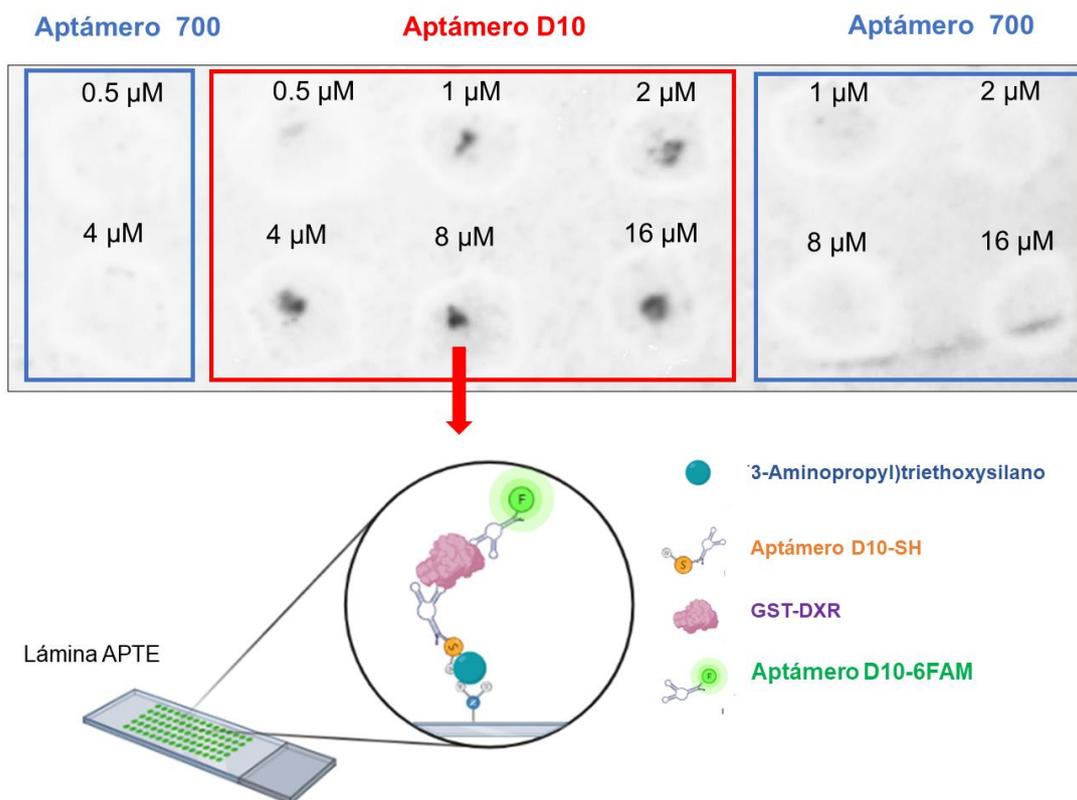


**Figura 50: Seguimiento del crecimiento de células *E. coli* tratadas con el aptámero D10.** Las gráficas muestran los resultados del tratamiento de células *E. coli* con el aptámero D10 introducido por choque térmico. A. Seguimiento del crecimiento por cuantificación de colonias en placa de agar LB (UFC/mL). B. La gráfica muestra el crecimiento de *E. coli* en presencia del aptámero D10 y D9 (control negativo) medido por espectrofotometría. Concentración de aptámero 50  $\mu\text{M}$ . Error y media, SD.

### 3.7. Funcionalización del aptámero D10

Hasta el momento todos los experimentos fueron realizados bajo la forma libre del aptámero D10, por ello, se propuso explorar la funcionalización del aptámero como molécula de captura sobre un soporte sólido, lo cual nos acercaría a un primer prototipo de método de laboratorio para el diagnóstico. En suma, sobre una lámina APTE preparada con la molécula de enlace MSN, se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de aptámero D10 marcado con tiol por cada concentración, una vez fijado el aptámero por desecación y rehidratada la lámina, se cubrió toda la lámina con 400  $\mu\text{g}$  de GST-PfDXR y finalmente tras 3 lavados se cubrió la lámina con 800 nM aptámero D10 marcado con 6-FAM. Considerar que entre cada paso el exceso de las soluciones fue descartado mediante 3 lavados y la fluorescencia resultante se visualizó con *ImageQuant™ LAS4000CDD camera system*. Los detalles del procedimiento se describen en el apartado 2.5. Por otro lado, cabe mencionar que el aptámero 700 (control negativo) se aplicó en la misma lámina y por lo tanto fue expuesto bajo las mismas condiciones que el aptámero D10.

Finalmente, los resultados mostraron que el aptámero D10 puede ser funcionalizado como molécula de captura sobre un soporte y mantener su capacidad de reconocimiento, además que la sensibilidad de detección llegó a verse hasta con la concentración más baja (0,5  $\mu\text{M}$ ) ensayada en este experimento, lo cual sugiere que se podrían seguir explorando concentraciones más bajas. Por lo contrario, el aptámero 700 no mostró señal de detección bajo ninguna de las concentraciones evaluadas.



**Figura 51: Resultado del ensayo del aptámero D10 como molécula de captura de la enzima GST-DXR.** La imagen muestra una lámina APTE donde se comparan diferentes diluciones del aptámero D10 (recuadro rojo) y el aptámero 700 (recuadros azules).

### 3.8. OBTENCIÓN DE APTÁMEROS ESPECIFICOS PARA LA ENZIMA CMS DE *E. coli*

A continuación, se muestran los resultados del trabajo llevado a cabo para la obtención de aptámeros específicos para la enzima que cataliza la tercera etapa de la vía del MEP, la CDP-ME sintasa (CMS).

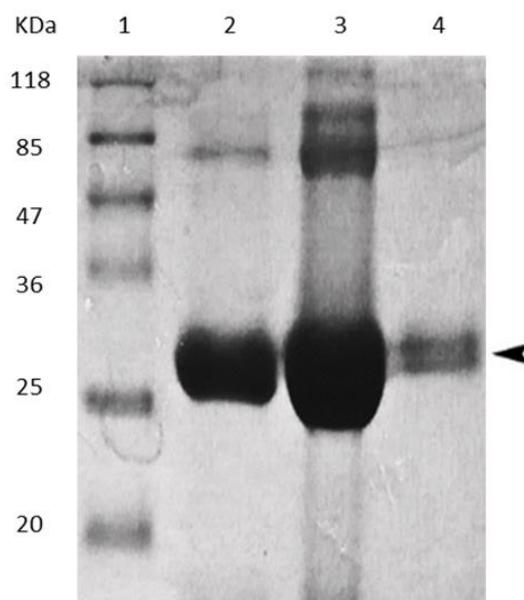
Como estrategia el método SBAS (apartado 2.2.2.) se acopló al método M-SELEX. Por lo que, se llevaron a cabo dos procesos de selección de forma consecutiva, el primer proceso consistió en la realización del método convencional M-SELEX, y a partir del ciclo 9 de dicho método se inició el segundo proceso, el cual consistió en la realización de 2 rondas de selección

con el método SBAS. Consecuentemente, se procedió a subclonar y secuenciar el conjunto de aptámeros obtenidos en el ciclo 9 (M-SELEX), esfera única A (SBAS) y esfera única B (SBAS) para la obtención de secuencias candidatas.

Finalmente, se realizó un nuevo proceso SBAS, en esta ocasión se inició desde la biblioteca aleatoria y se observó el enriquecimiento para ser comparado con la estrategia anterior.

### 3.8.1. Caracterización de las preparaciones de CMS de *E. coli*

Se disponía de dos preparaciones purificadas de la enzima CMS de *E. coli* (25,737 KDa) (Figura 52), dichas preparaciones fueron purificadas con el método IMAC descrito en el apartado 2.1.4. También se determinó su concentración mediante el método de Bradford y se obtuvieron como resultados que la CMS A tenía una concentración de 7,44 mg/mL y la CMS B de 1,2 mg/mL. Finalmente, se escogió la preparación A para los procesos de obtención de aptámeros y experimentos de caracterización.

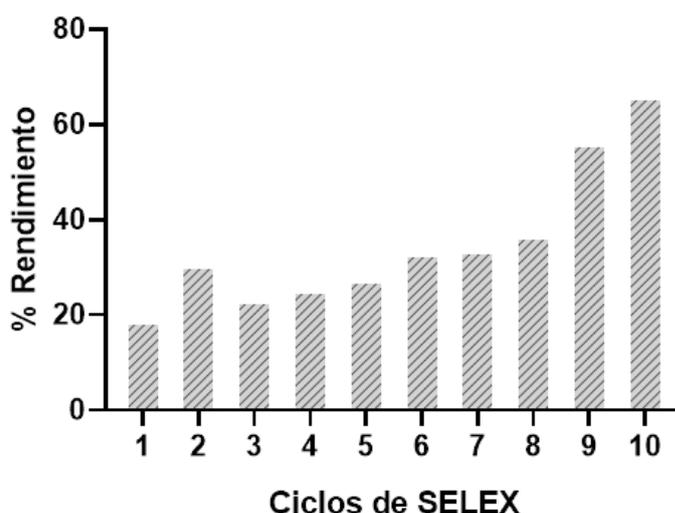


**Figura 52: Electroforesis en gel de poliácridamida de las preparaciones purificadas A y B de CMS de *E. coli*.** El carril 1: marcador de peso molecular EZ-RUN BP3600-500 (Fisher Scientific). Carril 2: CMS A dilución 1/10. Carril 3:

CMS A concentrada. También se observa, una banda con un peso molecular superior que corresponde al dímero que se forma durante la obtención de la CMS recombinante de *E. coli*. Carril 4: CMS B. Gel al 12,5% teñido con azul de Coomassie.

### 3.8.2. Resultados del proceso M-SELEX para la obtención de aptámeros afines a CMS

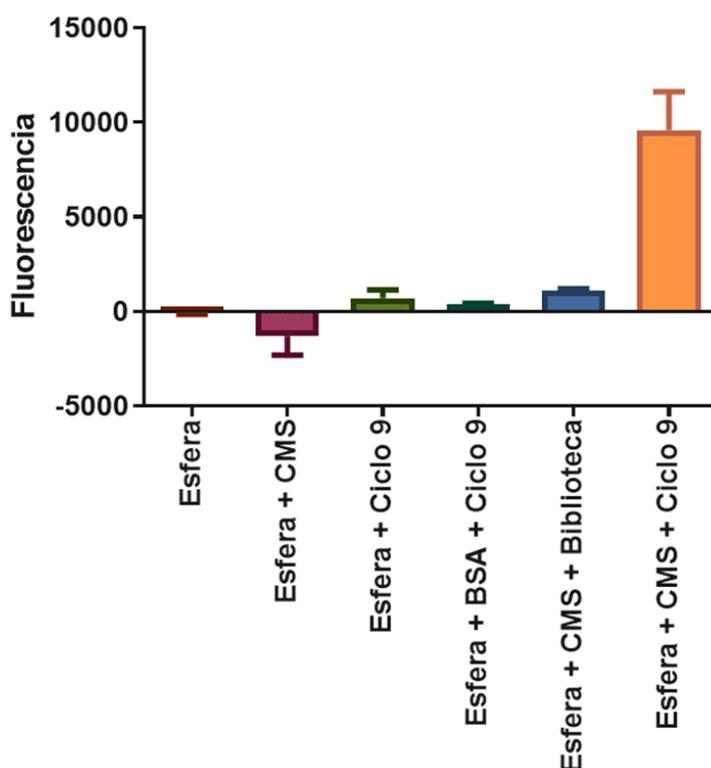
Se realizó una primera etapa de enriquecimiento a partir de la biblioteca de ADN, se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.2.1. con la diferencia de que se omitió el uso de cebadores marcados con fluoresceína. Para verificar el enriquecimiento se realizaron mediciones de rendimiento o recuperación del ADN usando NanoDrop en cada uno de los ciclos (Figura 53).



**Figura 53: M-SELEX para la obtención de aptámeros contra la enzima CMS.** Desde una librería de ADN aleatoria, se realizaron 10 ciclos de SELEX con la enzima CMS de *E. coli*: El porcentaje de rendimiento expresa la relación entre el rendimiento real y teórico en cada ciclo. La concentración de ADNsc extraído se utilizó para calcular la cantidad total de ADNsc que se une a a la enzima durante las rondas de selección (descritas como "ADNsc out"). A partir de la cantidad de ADNsc utilizada inicialmente en la selección (descrita como "

ADNsc in"), el rendimiento del ADNsc de unión positiva se calculó utilizando:  
Rendimiento (%) = ADNsc out (ng)/ ADNsc in (ng) x 100.

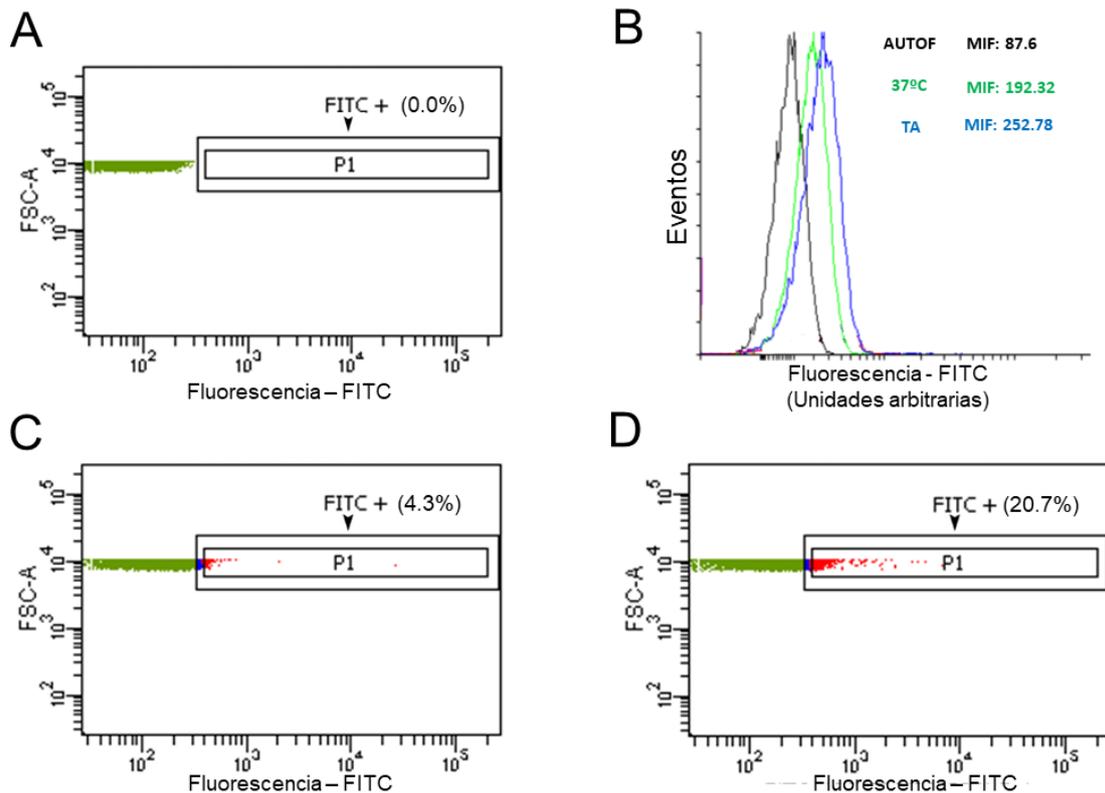
Adicionalmente, para verificar que el sistema de M-SELEX funciona correctamente, se evaluaron en simultaneo controles de especificidad. Para dicha condición, se incubaron primero 60  $\mu$ L de esferas y 0,6 mg/mL CMS en PBS, luego las esferas funcionalizadas con la proteína fueron incubadas con 8 ng/ $\mu$ l de aptámero marcado con 6-FAM en un volumen final de 100  $\mu$ l. Todas las condiciones fueron realizadas por triplicado y leídas en placa oscura. El análisis estadístico ANOVA mostró que la intensidad de fluorescencia emitida a partir de la condición de esferas funcionalizadas incubadas con el conjunto de aptámeros del ciclo 9 es significativamente diferente a los controles negativos con un  $P < 0,0001$ . En suma, los resultados muestran que el conjunto de aptámeros del ciclo 9 realmente contenía aptámeros con afinidad hacia la CMS y, por lo tanto, el sistema de M-SELEX usado funciona. A partir del ciclo 9 se continuará el enriquecimiento de aptámeros afines con el método SBAS, que se detalla en el siguiente apartado.



**Figura 54: Evaluación del sistema de selección M-SELEX por medición directa de intensidad de fluorescencia.** Se observa una señal de fluorescencia significativamente mayor de la muestra que contiene el conjunto de aptámeros del ciclo 9 de M-SELEX y CMS con respecto a todos los controles del sistema ( $P < 0,0001$ ).

### **3.8.3. Resultados del proceso del método de esfera única o *Single Bead Aptamers Selection (SBAS)***

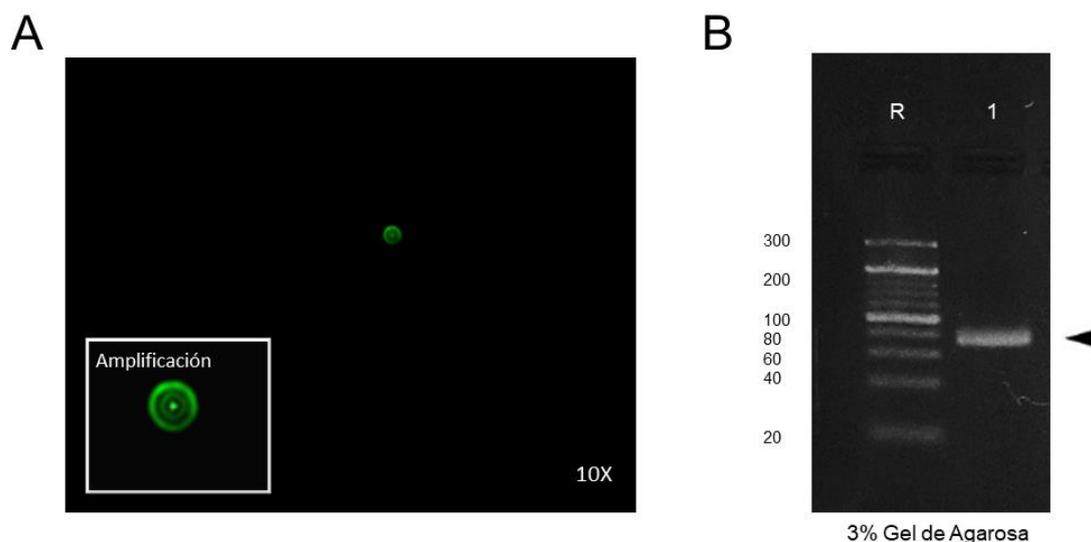
Como parte de la optimizar la nueva estrategia SBAS, se evaluaron diferentes condiciones. En primer lugar, se comprobó que la CMS de *E.coli* se une a las esferas de látex, para ello, la mezcla de 9,6 µg de CMS con 5 µl de la suspensión 1x de esferas se incubó durante 1 h a TA, tras los lavados se determinó la cantidad de proteína unida utilizando el *kit Pierce™ BCA* (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados de dicho ensayo mostraron que aproximadamente 1,26 µg de CMS se une a 5 µl de suspensión 1x de las esferas de látex. En segundo lugar, continuando con el proceso de optimización, se establecieron los parámetros para la identificación de las esferas negativas y positivas mediante citometría de flujo, y se compararon los resultados obtenidos tras la incubación de los aptámeros a 37 °C y a TA. Los resultados mostraron que la incubación a TA permitía mayor identificación de esferas positivas tras ser expuestas al grupo de aptámeros marcados con 6-FAM (Figura 55).



**Figura 55: Optimización del método SBAS.** A. Autofluorescencia de las esferas de látex, se delimita la población de esferas positivas (FITC +) y población positiva con mayor intensidad de fluorescencia (P1). B. Histograma comparativo de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) entre la incubación de los aptámeros y las esferas de látex funcionalizadas con CMS a 37°C y a TA. C. Se muestra el resultado después de la incubación a 37°C, se observó 4,3 % de esferas FITC + del total de esferas analizadas, mientras que P1 representó el 32,9% de las esferas FITC +. D. El resultado después de la incubación a TA muestra 20,7% de esferas FITC + del total de esferas analizadas, mientras que P1 representó el 53,8 % de las esferas FITC +.

Además, para corroborar de que realmente se estaba separando o aislando una sola esfera se hizo la observación directa con microscopio de fluorescencia del pocillo en la placa de 96 después del *sorting*. Otro aspecto importante de la optimización fue comprobar si se podían aislar los aptámeros a partir de una sola esfera después del *sorting*. Después de intentar diferentes estrategias, tales como realizar la mezcla de PCR directamente en el pocillo o añadir NaOH

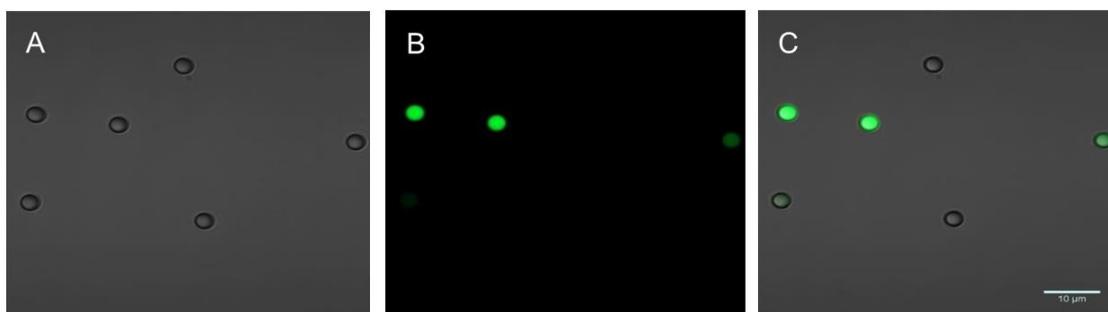
0,1 M e incubar 15 min, solo fue factible el aislamiento de los aptámeros después de incubar durante 10 min con 0,1 M de NaOH a 95 ° C la esfera FITC + previamente aislada, los resultados se confirmaron por PCR usando *DNA amplitools Green Marter Mix* (Biotools), la medición de concentración y pureza mediante NanoDrop y electroforesis de agarosa (Figura 56).



**Figura 56: Aislamiento de una sola esfera.** A. Se observa una sola esfera FITC + después de su aislamiento mediante *sorting*, en el recuadro blanco se observa la amplificación de la esfera. Microscopia de fluorescencia, imagen a 10x. B. Se muestra el producto de PCR a partir de una sola esfera, la ubicación de la banda de ADN confirma la amplificación de aptámeros unidos a la esfera funcionalizada con CMS.

Una vez realizada la optimización de los aspectos técnicos del método SBAS, se inició el proceso de selección partiendo del conjunto de aptámeros del ciclo 9 de M-SELEX previamente realizado para la enzima CMS y se prosiguió con el protocolo descrito en el apartado 2.2.2. para el método SBAS. Con la técnica de citometría de flujo se quiere aislar aquellos aptámeros que tienen más afinidad por la CMS y que corresponden a aquellas esferas que presentan una mayor intensidad de fluorescencia. Tal y como se observa en las imágenes de microscopia de fluorescencia confocal no todas las esferas tienen la misma intensidad de fluorescencia o son positivas (Figura 57). Paralelamente, también

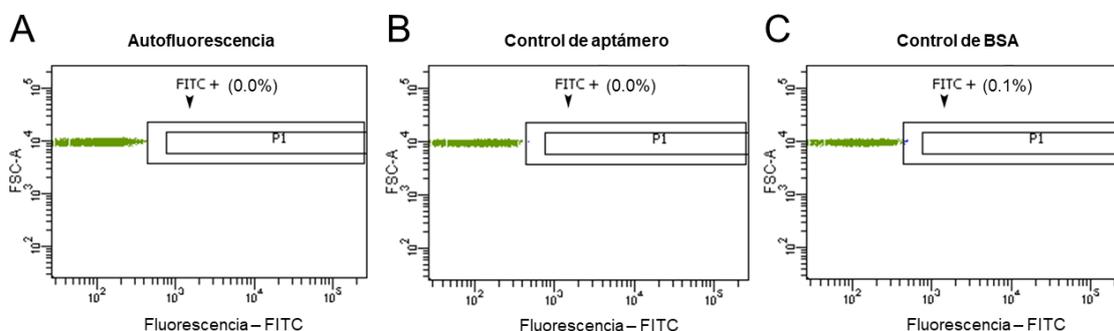
se determinó el valor de la  $K_d$  del conjunto de aptámeros a partir de cada esfera aislada (apartado 3.2.4.) como seguimiento del enriquecimiento.



**Figura 57: Observación mediante microscopia confocal de del grupo de esferas.** Las esferas de látex con CMS fueron incubadas con la mezcla de aptámeros de las esferas B (SBAS). Se observan esferas negativas y esferas positivas con diferentes intensidades de fluorescencia. A. Campo claro, B. Filtro 488nm, C. Superposición. Barra de escala = 10  $\mu$ M.

Para cada ensayo SBAS es necesario realizar una serie de controles esenciales en la citometría de flujo. El primero es el control de autofluorescencia que consiste en hacer la citometría con las esferas de látex sin incubación con la CMS y sin añadir los aptámeros (ver gráfica A, figura 58). El resultado demuestra que las esferas de látex por sí mismas no generan fluorescencia y que no provocarán interferencias en los resultados que se puedan obtener con esta nueva metodología. El segundo control que se realizó consistió, nuevamente, en utilizar las esferas de látex sin llevar a cabo la incubación de la CMS, pero esta vez, se adicionó el aptámero marcado con 6-FAM antes de llevar a cabo la citometría de flujo. Con este control se quiso comprobar la unión inespecífica del aptámero a la esfera de látex y, con el 0,0% de FITC+, se puede decir que no se produce unión y que no interferirá en los resultados (ver gráfica B, figura 58). El tercer control, consistió en utilizar las esferas de látex conjugadas con la proteína BSA y la subsiguiente adición de

aptámero marcado con 6-FAM (ver la gráfica C, figura 58), se evidencia que el grupo de aptámeros solo detectó 0,1% de esferas conjugadas con BSA.

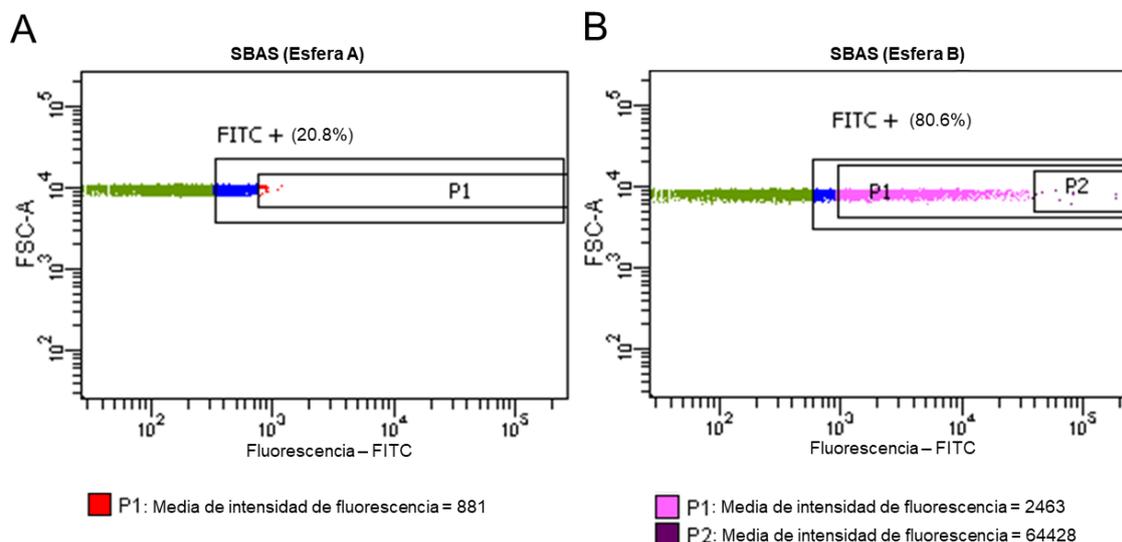


**Figura 58: Controles del método SBAS.** A. Se muestran el control de autofluorescencia. B. El control de esferas sin proteína incubadas con el grupo de aptámero marcados con 6-FAM. C. Esferas funcionalizadas con BSA e incubadas con el grupo de aptámeros marcados con 6-FAM.

Pasados los controles, las esferas de látex conjugadas con la CMS y expuestas a la mezcla de aptámeros marcados con 6-FAM fueron analizadas. En la A de la figura 59, se muestra que se obtuvo 20,8% de eventos positivos tras la incubación con la mezcla de aptámeros provenientes del ciclo 9 del M-SELEX. Debido a ello, fue necesario crear una nueva categoría que se llamó P1 para poder discriminar de un modo más estricto y separar aquellas esferas que presentaban la intensidad de fluorescencia más elevada y así aislar mediante *sorting* la esfera A, los aptámeros unidos a dicha esfera representarán el producto de la primera ronda del método SBAS.

Se continuó con el método y se inició una nueva ronda de SBAS a partir de la esfera A. Como se puede apreciar en la gráfica B de la figura 59, se obtuvo 80,6% de eventos positivos (FITC+). Al igual que en el ciclo anterior, se utilizó la categoría P1 para diferenciar las esferas que tenían una mayor intensidad de fluorescencia, no obstante, se tuvo que crear otra categoría que se llamó P2,

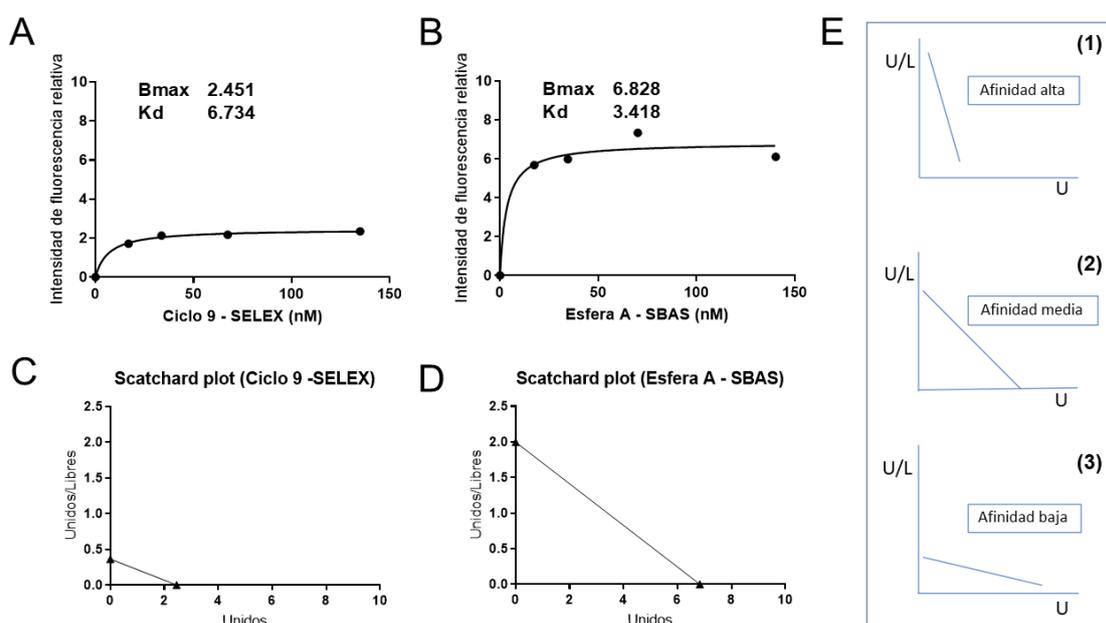
que ayudó a discriminar las esferas con mayor intensidad de fluorescencia y a su vez aislar la nueva esfera B, los aptámeros unidos a dicha esfera representarán el producto de la segunda ronda del método SBAS.



**Figura 59: Análisis de citometría de flujo para la caracterización de las poblaciones positivas y aislamiento de la esfera única.** A. A partir de la población FITC + con mayor intensidad de fluorescencia (P1) se aisló la primera esfera (esfera A) del proceso SBAS, el cual se inició a partir de un grupo de aptámeros previamente enriquecidos mediante 9 ciclos de M-SELEX. B. A partir de las esferas A se continuó una nueva ronda del proceso SBAS, de donde se aisló la esfera B. Al comparar los gráficos A y B, se puede inferir que tanto el porcentaje de población FITC + y la intensidad de fluorescencia son mayores conforme se avanza con las rondas del método SBAS.

Para poder comparar el método convencional M-SELEX con el nuevo método SBAS, se calculó la  $K_d$  y  $B_{max}$  del ciclo 9 obtenido mediante M-SELEX y de la esfera A obtenida mediante SBAS. El análisis estadístico de unión específica con el 95% de Intervalo de confianza dio como resultado  $B_{max} = 6,828 \pm 0,5722$  IRF y  $K_d = 3,418 \pm 3,156$  nM para la esfera A del SBAS, y  $B_{max} = 2,451 \pm 0,06755$  RFI y  $K_d = 6,734 \pm 1,206$  nM para el ciclo 9 del M-SELEX (Figura 60). Con estos resultados se evidenció que con solo una ronda de

selección del método SBAS se puede obtener un grupo de aptámeros con casi el doble de enriquecimiento y afinidad que el grupo de aptámeros obtenidos después de 9 ciclos del método M-SELEX. Por otra parte, ambas representaciones de Scatchard mostraron que la población del ciclo 9 de M-SELEX tiene la tendencia a tener afinidad baja y la población de aptámeros obtenida a partir de la esfera A tiene la tendencia a tener afinidad media y múltiples sitios de unión (Figura 60).



**Figura 60: Análisis de afinidad de los métodos M-SELEX y SBAS para la obtención de aptámeros contra la enzima CMS.** A. Representación gráfica de  $K_d$  del ciclo 9 del M-SELEX: La gráfica muestra la intensidad relativa de fluorescencia vs curva de concentración de aptámeros marcados con 6-FAM en nM obtenidos en el ciclo 9 del M-SELEX. B. Representación gráfica de  $K_d$  de la esfera A del SBAS: La gráfica muestra la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) vs la concentración en nM de aptámeros marcados con 6-FAM obtenidos de la esfera A del SBAS. C y D. Representación de Scatchard a partir del análisis de la gráfica A y B, respectivamente. E. Esquema de los tipos de afinidad según el tipo de Representación de Scatchard: (1) La inclinación de la recta representa una población de afinidad alta, es decir pocos receptores o sitios de unión, (2) La inclinación de la recta representa una población de afinidad media, es decir muchos receptores o sitios de unión, y (3) La

inclinación de la recta representa una población de afinidad baja, es decir muchos receptores o sitios de unión. Intensidad de fluorescencia relativa = [(fluorescencia del aptámero - fluorescencia del control) /fluorescencia del control].

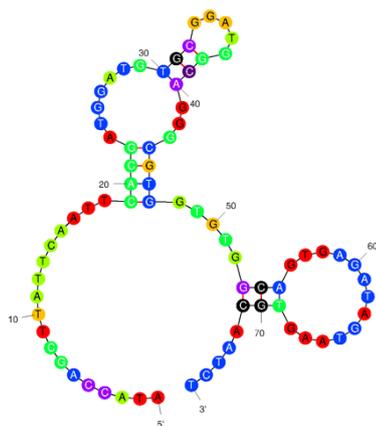
#### 3.8.4. Aislamiento de aptámeros candidatos para la enzima CMS

Se realizó el clonaje de la mezcla de aptámeros provenientes del ciclo 9 del M-SELEX, Esfera A (SBAS) y Esfera B (SBAS). El sistema de clonaje utilizado fue *CloneJET* de Thermo Scientific™. Los resultados mostraron que la subclonación con el *CloneJET kit* funcionó mejor que el método de colonia azul y blancas para la inserción de aptámeros. con una eficiencia casi del 100%.

Tras la comprobación de los clones, se aislaron los plásmidos y se enviaron a secuenciar. Se compararon 78 secuencias y se escogieron los aptámeros 8A(**ATACCAGCTTATTCAATTCACGACGGGACATACGCAACGTGATGGGTGTACATGTGGTAGATAGTAAGTGCAATCT**, 12 veces conservado) y 10 A (**ATACCAGCTTATTCAATTCACGATGGATGTGCGGATGGCAGGGCGTGGTGTGGCAGTGAGATAGTAAGTGCAATCT**, 29 veces conservado) como principales candidatos por ser los más conservados. La secuencia 10A con 29 veces, representa 39,7% del total de secuencias y 55,9% de secuencias aisladas a partir de la Esfera B (SBAS). También se evidencia un enriquecimiento de la secuencia 10A: 2 veces en el ciclo 9 (M-SELEX), 8 veces desde Esfera A (SBAS) y 19 veces desde Esfera B (SBAS).

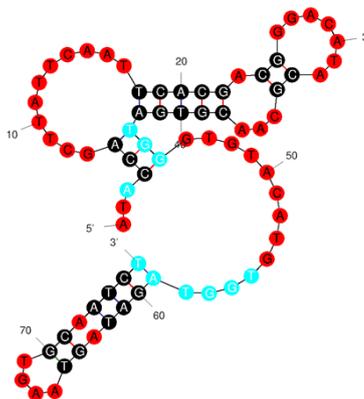
El análisis de las estructuras secundarias de ambos aptámeros mostró que el aptámero 8A tiene mayor cantidad de bases con probabilidad de formar doble cadena, ello, le confiere mayor estabilidad estructural a la molécula (Figura 61).

A



Aptámero 10A  
 $\Delta G = -7.10$

B



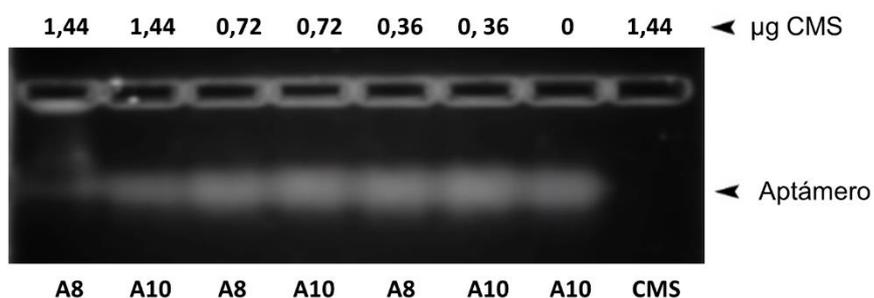
Aptámero 8A  
 $\Delta G = -8.14$

**Figura 61: Características 2D de los aptámeros 10A y 8A.** A. Estructura secundaria del aptámero 10A más termodinámicamente favorable ( $\Delta G = -7.1$ ). B. Estructura secundaria del aptámero 10A más termodinámicamente favorable ( $\Delta G = -8.14$ ). Las condiciones iónicas se han derivado empíricamente a 25° C:  $[Na^+] = 1,0$  M y  $[Mg^{2+}] = 0,0$  M. Rojo: más probable que sea de una sola cadena; alto valor de *ss-count* (ver figura 13).

### 3.8.5. Evaluación de la interacción entre los aptámeros candidatos y la enzima CMS

Las preparaciones purificadas de CMS se desalaron y equilibraron en tampón HEPES 50 mM, pH 8,0 que contenía NaCl 10 mM, Tween-20 al 0,02%. Se prepararon diluciones con el mismo tampón y a continuación se mezclaron 14  $\mu$ L de cada preparación con 1  $\mu$ L de dilución de aptámero (150 ng) preparada en 0,5x TB a pH 8,0 y la mezcla se incubó a TA durante 60 min. A continuación, se añadieron a cada muestra 3  $\mu$ l de tampón de carga (glicerol al 30% en 0,25 x TB) y se cargaron en geles de agarosa al 2% preparados y procesados en 0,5x TB a 20 V / cm. Los geles se tiñeron con SyBR® Gold Nucleic Acid (Life Technologies) y se observaron bajo luz ultravioleta.

El cribado de interacción de los aptámeros A10 y A8 con el método de EMSA mostró que aparentemente el aptámero A8 tiene más afinidad por la enzima CMS que el aptámero A10, sin embargo, dicha interacción fue más evidente tan solo después de su incubación con la concentración más alta de enzima. Por lo tanto, se observó que ninguno de los aptámeros mostró una interacción importante con la CMS (Figura 62). A pesar de ello, se llevaron a cabo más adelante ensayos para observar si los aptámeros tenían un efecto sobre la actividad enzimática, los resultados se muestran en los siguientes apartados.

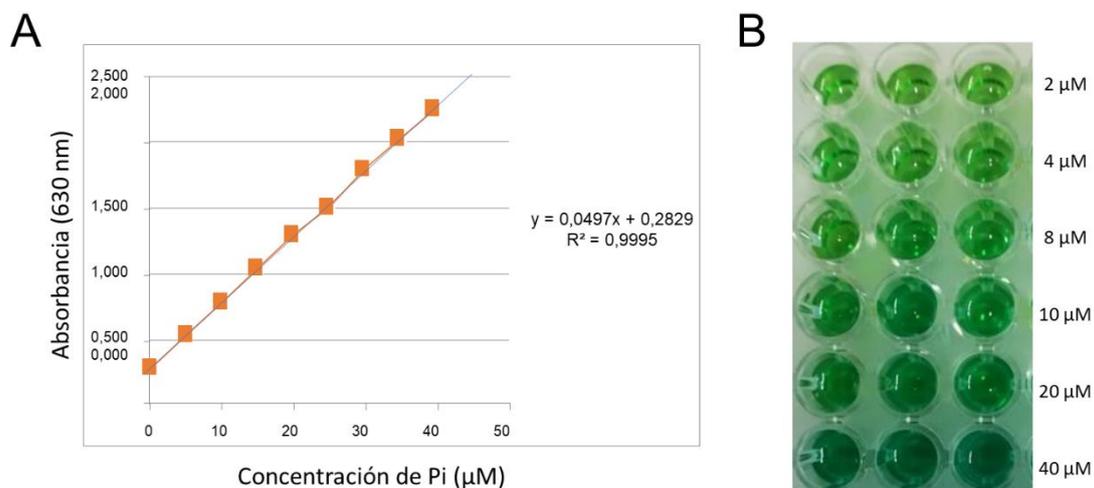


**Figura 62: Resultados de la evaluación mediante EMSA de los aptámeros A10 y A8.** Se observa un retraso en la movilidad de ambos aptámeros incubados previamente con 1,44 µg de CMS, principalmente la formación del complejo se evidenció con el aptámero A8.

### 3.8.6. Detección de actividad enzimática de la CMS por método colorimétrico

La CMS es el tercer enzima de la vía MEP. Transforma CTP y MEP en CDP-ME y libera también PPI. En el método utilizado para determinar la actividad enzimática se hidroliza el PPI a Pi añadiendo PPasa y se cuantifica el Pi formado mediante colorimetría. Este método tiene una linealidad hasta 40 µM. Tras comprobar la actividad de la enzima PPasa y que el colorante funciona

correctamente, se realiza la determinación de la concentración de Pi generado usando una recta patrón (Figura 63).

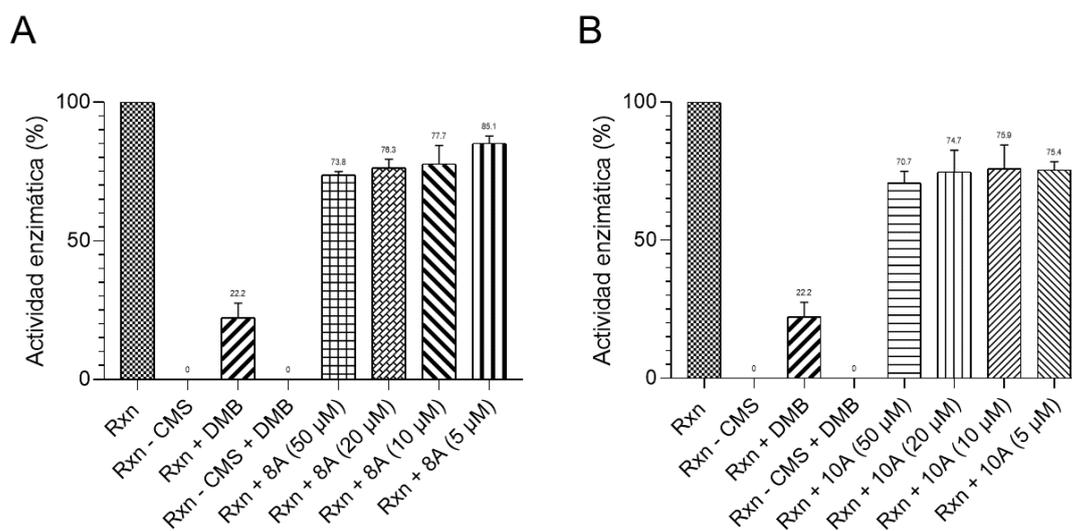


**Figura 63. Colorimetría de fosfatos.** A. Recta patrón de Pi. B. Imagen de la placa con las diferentes soluciones patrón de Pi (µM) por triplicado. Permite calcular la concentración de fosfato producida durante la reacción de la CMS utilizando PPasa como enzima acoplada. El colorante ante una muestra que contiene fosfato virará a un color verde en dependencia de la concentración de fosfato.

En el caso del ensayo enzimático en presencia de aptámeros, se incubaron 4 µg de la enzima con diferentes concentraciones de aptámero (5, 10, 20 y 50 µM) en un volumen final de 21 µl con tampón Tris-HCl 100 mM a pH 7,5 durante 2 h a TA. A continuación, se agregó el resto de los componentes de la reacción enzimática, se dejó reaccionar 10 min y se determinó la actividad por colorimetría de fosfatos como se indica en el apartado anterior (2.3.2.2.1.). Adicionalmente se preparó un control sin CMS, se hizo una reacción sin inhibición y una reacción con 1,6 mg/mL de DMB.

Los resultados mostraron que las respuestas normalizadas fueron significativas diferentes respecto al control  $P < 0,0001$ . Ambos aptámeros mostraron un

porcentaje máximo de inhibición muy similar, 29,3% para el aptámero 8A y 26,2% para el aptámero 10A (Figura 64).



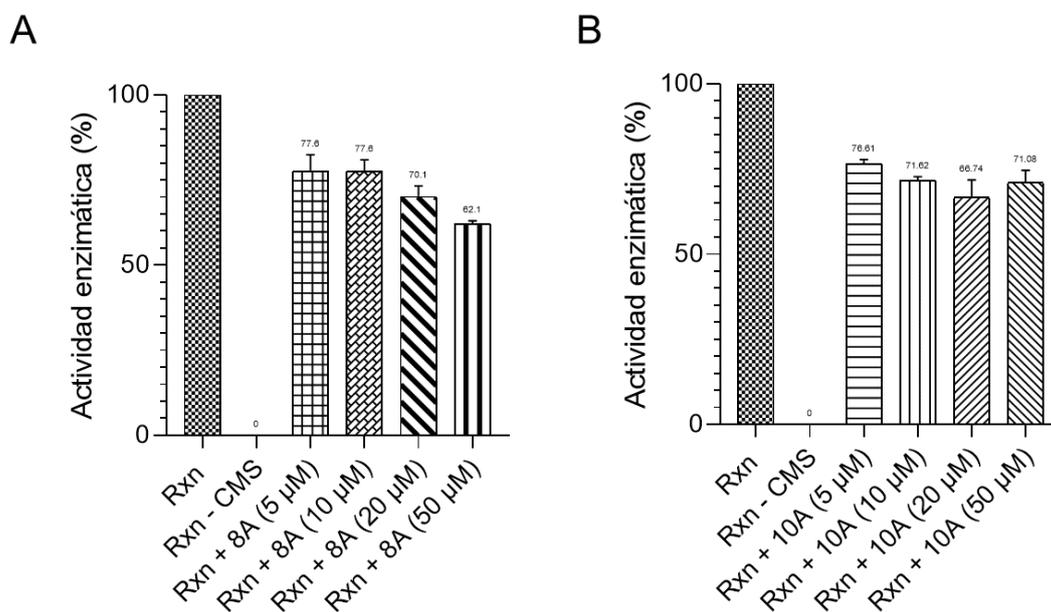
**Figura 64: Efecto de los aptámeros candidatos sobre la actividad enzimática de la CMS medida por colorimetría.** Las gráficas A y B muestran respectivamente el efecto de los aptámeros 8A y 10A a diferentes concentraciones sobre la actividad enzimática. La actividad enzimática fue representada como porcentaje considerando el control de reacción (Rxn) como 100%. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

### 3.8.7. Detección de actividad enzimática de la CMS por medición directa de pirofosfato

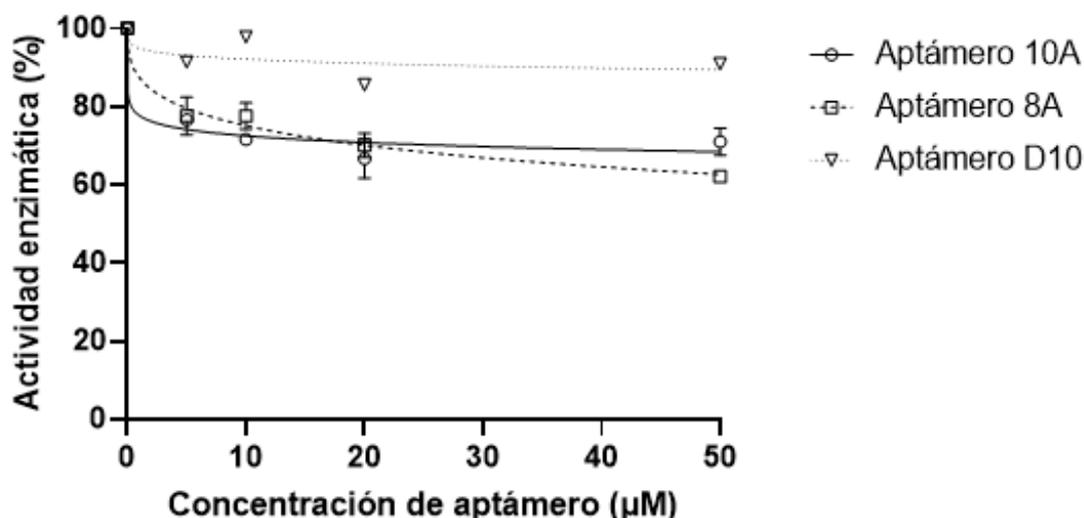
La evaluación mediante el método colorimétrico nos permitió optimizar las condiciones experimentales. Sin embargo, el método colorimétrico no es muy sensible debido a que mide la actividad de forma indirecta, mediante una reacción acoplada, por ello, para confirmar los resultados se repitió el experimento usando otro método de medición directa de pirofosfato (Pyrophosphate Assay Kit ab112155), el cual utiliza un sensor de pirofosfato

fluorogénico que tiene su intensidad de fluorescencia proporcionalmente dependiente de la concentración de pirofosfato.

Se confirman los resultados previos con el método colorimétrico, sin embargo, el porcentaje de inhibición del aptámero 8A que se obtuvo fue de 37,9%, ligeramente mayor en comparación con el porcentaje de inhibición obtenido con el método de colorimetría de fosfatos (29,3%). Lo mismo ocurrió con el aptámero 10A (Figura 65). Para poder alcanzar dicho efecto fue necesario usar 50  $\mu\text{M}$  de aptámero.



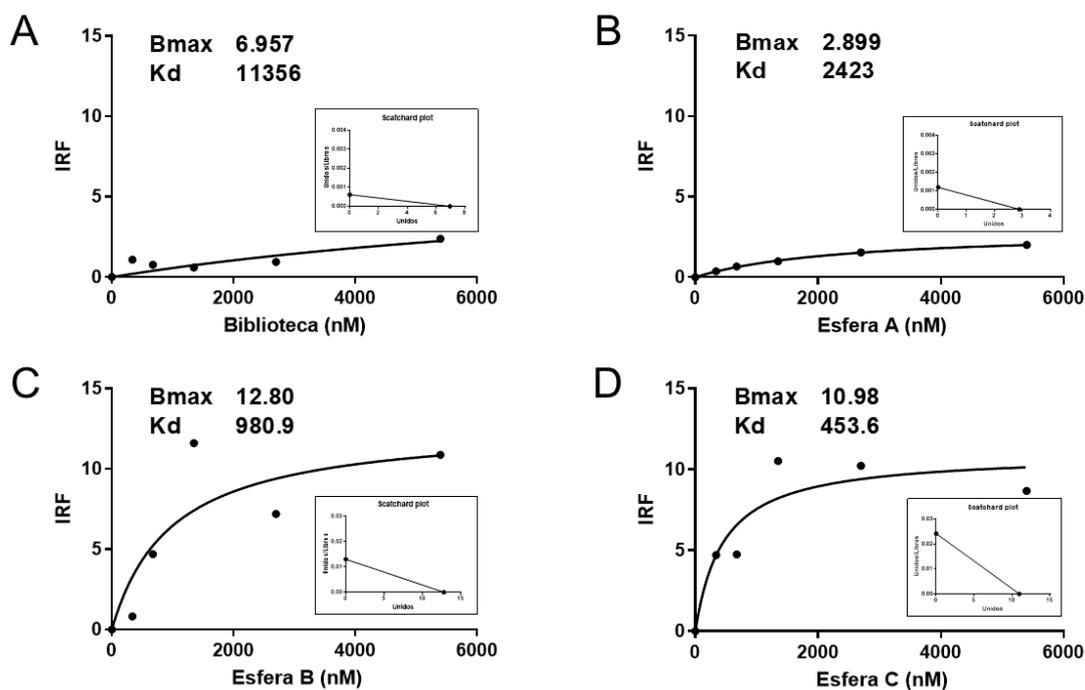
**Figura 65: Efecto de los aptámeros candidatos sobre la actividad enzimática de la CMS medido por determinación directa de pirofosfato. A.** Las gráficas A y B muestran respectivamente el efecto de los aptámeros 8A y 10A a diferentes concentraciones sobre la actividad enzimática. La actividad enzimática de la CMS fue determinada por medición directa de pirofosfato y fue representada como porcentaje considerando el control de reacción (Rxn) como 100%. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.



**Figura 66: Determinación del  $IC_{50}$  de los aptámeros candidatos para la enzima CMS.** La gráfica muestra la comparación del efecto inhibitor (IC<sub>50</sub>) del aptámero 10A (IC<sub>50</sub> = 87,24 μM; 57,14 - 146,3 μM), Aptámero 8A (IC<sub>50</sub> = 70,68 μM; 40,81 - 140,5 μM) y el Aptámero D10 (De la selección para DXR) mediante medición directa de pirofosfato y los datos fueron normalizados considerando el control de reacción (Rxn) como 100%. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y con intervalo de confianza de 95%.

### 3.7.8. Evaluación del método SABS partiendo desde la biblioteca inicial

En la última parte de este proyecto, se realizaron 4 rondas de selección con el método SBAS en esta ocasión partiendo desde la biblioteca inicial. Se prosiguió siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.2. En cada ciclo de selección se escogió aquella esfera que presentaba una mayor intensidad de fluorescencia. Además, se determinó la  $K_d$  del conjunto de aptámeros de la biblioteca, esfera A, esferas B y esfera C, en relación con la enzima CMS. Así, tras el análisis de afinidad mediante la  $K_d$  se pudo observar la evolución de la selección o enriquecimiento de la población de aptámeros. Los resultados muestran que en cada ronda SBAS aproximadamente se duplica la afinidad del grupo de aptámeros por la CMS (Figura 67).



**Figura 67: Análisis de afinidad de las rondas de selección mediante el método SBAS.** Las gráficas muestran la intensidad relativa de fluorescencia vs Curva de concentración de aptámeros marcados con 6-FAM en nM y en recuadro la correspondiente representación de Scatchard. A. Representación gráfica de  $K_d$  de la biblioteca inicial. B. Representación gráfica de  $K_d$  de la esfera A del SBAS. C. Representación gráfica de  $K_d$  de la esfera B del SBAS. D. Representación gráfica de  $K_d$  de la esfera C del SBAS.

Los resultados de intensidad de fluorescencia, porcentaje de eventos FITC + y los análisis de afinidad muestran que si se compara con el método de M-SELEX, del que se deben hacer como mínimo 8 ciclos, parece que el método SBAS es muy esperanzador para sustituir al SELEX para la obtención de aptámeros específicos con elevada afinidad en futuros proyectos.

#### 4. DISCUSIÓN

Según el Informe del 2021 de la OMS sobre la malaria (WHO, 2021a), en 2020 se notificaron un total de 241 millones de casos de malaria en 85 países endémicos, la mayoría de ellos en el África subsahariana. A pesar de los recientes avances en el tratamiento, aproximadamente 627,000 muertes aún se informaron en 2020 debido a la malaria (WHO, 2021a). En febrero del presente año, se cumplieron dos años desde que se declaró una emergencia de salud pública de importancia internacional, que es el nivel más alto de alarma según el derecho internacional, por la propagación de la COVID-19. A modo de comparación, después de dos años, se han notificado más de 370 millones de casos y más de 5,6 millones de muertes, y sabemos que estas cifras son una subestimación (WHO, 2022). Lo que sugiere que la malaria es superior en términos del número de casos a la pandemia de COVID-19. Por lo tanto, no es una patología que se deba descuidar y que requiere de más esfuerzos para ser tratada con más eficacia especialmente en las zonas endémicas.

La resistencia del principal patógeno de la malaria *P. falciparum* a la cloroquina ampliamente utilizada se ha reportado desde los años 50 y 60 del siglo pasado. Incluso para la terapia combinada basada en artemisinina, recomendada por la OMS para tratar la malaria (WHO, 2020), se observó una resistencia creciente en áreas endémicas. Además de esto, las infecciones resistentes a los antimicrobianos causan aproximadamente 700,000 muertes anuales en todo el mundo, con un aumento estimado de hasta 10 millones para el año 2050 (de Kraker et al., 2016) (IACG, 2019). En cuanto a la gravedad de esta situación, un foro de más de 20 compañías farmacéuticas líderes en el mundo lanzó el establecimiento del "Fondo de Acción AMR" en 2020, con el objetivo de inversión para llevar 2-4 nuevos medicamentos al mercado para el año 2030 (Clancy & Hong Nguyen, 2020). En conjunto, ha habido un enorme esfuerzo de la comunidad científica para la identificación de nuevas dianas terapéuticas y, posiblemente, para la propuesta de nuevos candidatos a fármacos que podrían usarse en áreas endémicas de malaria. En medio de dicho contexto, el enfoque

que se plantea en el presente trabajo implica la biosíntesis de isoprenoides y el desarrollo de aptámeros específicos.

Los aptámeros, también llamados anticuerpos químicos, son moléculas de ácido nucleico (ADN o ARN) de cadena sencilla que poseen la capacidad de reconocer específicamente moléculas o regiones de moléculas de forma semejante a como los anticuerpos reconocen epítomos en sus antígenos. En suma, este proyecto se ha centrado en la obtención de aptámeros específicos para dos de las enzimas de la vía del metileritritol fosfato, vía esencial en microorganismos y ausente en los seres humanos.

El proyecto se ha estructurado en dos bloques, en el primero se describe la búsqueda de aptámeros específicos para la segunda enzima de la vía del MEP, la desoxixilulosa 5-fosfato reductoisomerasa de *P. falciparum* (PfDXR) mediante la técnica convencional M-SELEX. En este bloque se ha identificado el aptámero D10, que reconoce la enzima, y es capaz de marcar específicamente los eritrocitos infectados por *P. falciparum*. El aptámero D10 reconoce también la enzima DXR de la bacteria modelo *E. coli* y actúa como un inhibidor de su actividad enzimática. Se muestra el marcaje de las bacterias con el aptámero mediante microscopía de fluorescencia y se describen resultados preliminares sobre su uso para la detección de la enzima DXR y la unión a superficies del aptámero D10.

En el segundo bloque se muestran los resultados obtenidos en la búsqueda de aptámeros contra la tercera de las enzimas de la vía del MEP, la CDP-metileritritol sintasa, CMS, de la bacteria *E. coli*. Se ha obtenido 2 aptámeros después de varios ciclos de selección, acoplando dos métodos, y se ha analizado su interacción con la enzima y su efecto sobre la actividad enzimática. En nuestro grupo de investigación anteriormente se había intentado la obtención de aptámeros para la CMS, sin embargo, después de 10 ciclos de selección mediante el método FluMag-SELEX, ninguno de los aptámeros

mostró interacción. Por ello, se partió desde cero usando el método convencional M-SELEX, en el cual solo difiere en el hecho de que no usamos marca fluorescente. Luego con el grupo de aptámeros del ciclo 9, obtenido a partir del método M-SELEX, se iniciaron rondas de selección con el método SBAS, el cual tiene un enfoque de esfera única, y que nos permitía enriquecer más rápido el grupo de aptámero afines y solventar algunos inconvenientes del M-SELEX convencional.

#### - **Elección de las enzimas para la selección de aptámeros y evaluación de la interacción**

En principio, cualquiera de las enzimas de la vía del MEP sería una buena candidata para la obtención de aptámeros, ya que por un lado todas ellas son esenciales para *Plasmodium* y su bloqueo detiene el crecimiento del parásito. De forma que si el objetivo inicial era utilizar los aptámeros como herramientas terapéuticas cualquiera de ellas sería una diana adecuada. Lo mismo ocurre si el objetivo se centra en su uso para el diagnóstico de la malaria o como marcadores de apicoplasto ya que las siete enzimas se expresan en todas las etapas del ciclo intraeritrocitario del parásito y se localizan en el apicoplasto. Pero, se sabe que no todas las enzimas de una vía metabólica tienen el mismo nivel de control sobre la vía (Reinhart Heinric, 1974). Interesantemente, Vivek Kumar Singh e Indira Ghosh determinaron los principales puntos de regulación de la vía del MEP, y mencionan que uno de los principales mecanismos metabólicos que conducen a la muerte del patógeno es la reducción del flujo a través de la vía mediante la inhibición de aquellas enzimas que tienen un alto coeficiente de control de flujo, siendo una de ellas la enzima DXR, cuya inhibición hace casi nula la síntesis de IPP y DMAPP. Además, por diversos motivos la mejor caracterizada en *Plasmodium* es la DXR, porque cataliza la primera etapa específica de la vía y posee un inhibidor específico con un efecto dependiente de la dosis, que en su momento validó a la enzima como diana contra la malaria (Armstrong et al., 2015) (Lell et al., 2003) (Jomaa et al., 1999).

Por lo tanto, se decidió empezar los estudios de aislamiento de aptámeros específicos utilizando la DXR de *P. falciparum*.

Hasta la fecha, sólo unas pocas enzimas dirigidas al apicoplasto de *Plasmodium* se han expresado, debido en parte a las dificultades para obtener la enzima recombinante soluble de las células huésped de *E. coli* (Handa et al., 2013) (Rohdich et al, 2001). Además de los sesgos de codones entre las especies de *E. coli* y *Plasmodium* (alto contenido de GC, sitios de unión ribosómica, repeticiones aleatorias de codones raros, etc.), la presencia de los motivos de señalización y tránsito resulta consistentemente en la acumulación de cuerpos de inclusión insolubles (Jomaa et al., 1999). Por lo tanto, se requiere la delección del motivo de señalización al apicoplasto en el gen de longitud completa para producir una variante DXS o DXR que sea soluble y en lo posible activa cuando se expresa en *E. coli* (Handa et al., 2013). En el parásito los péptidos se separan (muy probablemente por una proteasa de procesamiento estromal) para producir la enzima catalíticamente competente. Por lo expuesto, la expresión de las enzimas recombinantes DXR de *P. falciparum* se realizaron excluyendo la secuencia de señalización al apicoplasto.

Por otro lado, otro aspecto que se tomó en cuenta es que para poder analizar el posible efecto inhibitorio de los aptámeros que se obtuvieran en el estudio sobre la actividad de la enzima diana sería necesario disponer de preparaciones purificadas de la misma y de un ensayo enzimático para la determinación de la inhibición. En el laboratorio se tenía experiencia previa en la puesta a punto de ensayos enzimáticos utilizando las primeras enzimas de la ruta del MEP: DXS, DXR, CMS y CMK, usando las enzimas recombinantes bacterianas, especialmente de origen *E. coli* debido a que tienen mayor probabilidad de expresarse en su forma soluble y activa a diferencia de las proteínas de *P. falciparum* expresadas en sistemas *E. coli*. Sin embargo, las enzimas HDS y HDR son sensibles al oxígeno ya que disponen de agrupaciones FE-S que fácilmente se oxidan provocando su inactivación (Felix

Rohdich et al., 2003), por lo tanto, su obtención requiere procedimientos más complejos no disponibles en nuestro laboratorio. Por lo tanto, fue crucial complementar el trabajo con la enzima DXR de *E. coli* y más adelante con la enzima CMS de *E. coli*.

Los primeros experimentos llevados a cabo en el laboratorio permitieron obtener preparaciones purificadas de la enzima DXR, aunque el rendimiento que se obtuvo fue muy inferior al descrito por Umeda, et al. (Umeda et al., 2010). Se prepararon construcciones que contenían tanto la secuencia original del gen, como la secuencia optimizada para el uso de codones de *E. coli*. También se ensayaron diferentes vectores de expresión pQE-30, pET-23, pRSET, pGEX-4T1 y diferentes condiciones, modificando la temperatura de crecimiento (20 - 37 °C), la concentración del inductor IPTG (0,01mM – 0,5mM) y en ningún caso se pudieron obtener niveles de expresión elevados. La expresión de proteína con el vector pQE-30 nos sirvió para el proceso de M-SELEX, de manera que tras muchos intentos se disponía de preparaciones purificadas de la enzima, y aunque con cantidades pequeñas se llevaron a cabo los ensayos de selección. Sin embargo, debido a la baja expresión su recuperación era casi nula tras el proceso de purificación e insuficiente para los siguientes procesos de caracterización como la ITC que demandaba gran cantidad de proteína. Por lo tanto, se decidió expresar enzima con una nueva construcción 6His-GST-DXR-6His, lográndose una alta expresión. Sin embargo, solo el 1% era soluble y de fácil lisis, no obstante, se realizaron también varios ensayos con diferentes condiciones de expresión para intentar aumentar la proporción de enzima soluble sin resultado. Por ello, finalmente se decidió realizar un tratamiento de resolubilización y renaturalización de la enzima insoluble. Para ello se utilizó urea 2M y se consiguieron obtener preparaciones con una concentración elevada (1 mg/mL). Se cree que tras dichos procesos la enzima perdió su actividad y por lo tanto luego fue difícil su purificación. Los métodos basados en la cromatografía con resina Glutathione Sepharose™ 4B (Fisher Scientific) y la resina Blue Sepharose™ CL-6B (Amersham Biosciences Europe GmbH) dieron poca concentración de proteína y bajo rendimiento de purificación. Es posible que los intentos con la

cromatografía de afinidad en glutation-sepharose no dieron el resultado deseado ya que la GST puede inactivarse de forma irreversible en el tratamiento con urea, por otro lado, los intentos con la resina Blue Sepharose no resultaran del todo debido a que requiere que la DXR se encuentre activa. Solo se logró obtener suficiente cantidad de proteína para el resto de los procesos con el método de purificación IMAC, pasando la muestra o extracto proteico antes de la diálisis para así descartar las proteínas inespecíficas que unían a la columna y después de la diálisis con dos pases de purificación. Se pudo considerar este método gracias a que la construcción contiene dos etiquetas de 6 histidinas, las cuales por ser etiquetas pequeñas son más difíciles de desnaturalizarse y el hecho que contenga dos etiquetas de este tipo, nos asegura que por lo menos una se mantengan lo suficientemente expuesta para unirse a la proteína, ya que anteriormente la recuperación después de la purificación era casi nula con otros vectores. También, se intentó separar la GST de la proteína usando la enzima enterokinasa, pero los resultados de espectrofotometría de masa mostraron que la GST forma dímeros que se asemejaban al peso molecular de la enzima diana, por lo que perdió sentido usar el método de exclusión de tamaño y como se mencionó anteriormente tampoco se podía usar la cromatografía de afinidad por glutatión debido a que la GST se encontraba inactiva. Con estas preparaciones se llevaron a cabo los ensayos para analizar la interacción entre los aptámeros seleccionados y la enzima. En todos ellos se incluyeron controles con la GST. Por otra parte, afortunadamente la enzima DXR se encuentra muy conservada entre las especies y se pudo expresar la DXR de *E. coli* para la obtención de proteína activa y así poder realizar el análisis funcional de los aptámeros *in vitro*. Debido a su expresión soluble se pudo realizar la purificación con un solo paso de purificación.

Para poder seleccionar aptámeros específicos para las enzimas de la vía del MEP es necesario disponer de la librería de secuencias de ADN, de las preparaciones de las enzimas y de un método que permita poner en contacto las secuencias con la enzima y escoger aquellas que se unan específicamente. En este trabajo se utilizó una librería que contenía moléculas diferentes, cada

una de ellas presentaba dos fragmentos de secuencia constante en los extremos 5' y 3' y una región variable (ver apartado 2.2.1.). Esta librería se puede utilizar para la búsqueda de aptámeros específicos para cualquier molécula orgánica, proteica o también para células o tejidos (Lantero et al., 2020). Se decidió además que, para llevar a cabo el método a pequeña escala, adaptado a la cantidad de muestra disponible, era conveniente que el método cromatográfico fuese sencillo. Por ese motivo se escogió utilizar esferas magnéticas (Dynabeads), de manera que el procedimiento global es un SELEX por separación magnética, M-SELEX y cuando lleva marcaje con fluorescencia FluMag-SELEX. A pesar de ello el método es laborioso, costoso y puede llevarse meses hasta la obtención de un enriquecimiento suficiente.

Para la selección de aptámeros específicos para la PfDXR se realizaron 10 ciclos de FluMag-SELEX. La concentración de aptámeros obtenidos después de la elución de cada ronda, es muy escaso y de difícil medición ya que muchas veces estaba por debajo del rango de confianza del equipo NanoDrop, por ello, para medir el enriquecimiento se requiere más de un tipo de ensayo o medición, por ello, amplificamos y preparamos las muestras de aptámeros de cada ronda de SELEX y las incubamos con el cultivo de pBRCs (Figura 27) y pudimos evidenciar el enriquecimiento, a pesar que ello resulta ser una buena estrategia, en el supuesto caso de no contar con cultivo, otra estrategia interesante que se puede optimizar es el seguimiento del enriquecimiento con la enzima endonucleasa S1 (Lim et al., 2011), las muestras de baja diversidad aparecen como bandas definidas de la longitud de ADN esperada, mientras que las muestras de alta diversidad son ausentes (Joseph et al., 2019).

Una vez llevado a cabo el proceso de selección y aislamiento del aptámero candidato, como primera prueba de interacción se llevó a cabo el ensayo de EMSA, con el cual se visualizó que la adición de las preparaciones de aptámero D10 previamente incubado con la GST-PfDXR y aptámero D10 previamente incubado con EcDXR en el gel de agarosa provocaba un cambio en la movilidad electroforética, apareciendo una banda adicional. En el

presente trabajo se optó por trabajar con técnicas que no conlleven el uso de radiactividad, a pesar de ser altamente sensibles, de hecho, el EMSA es un ensayo que usualmente es realizado con radiactividad, sin embargo, para este trabajo de tesis se realizó la optimización de un método de EMSA alternativo que no utiliza aptámeros modificados. Si bien es cierto la sensibilidad es muy inferior, ayuda a obtener un primer acercamiento a bajo costo del potencial de interacción entre el aptámero con la enzima diana.

Una vez evidenciada la interacción y por lo tanto el reconocimiento de la enzima, se realizó la evaluación de afinidad mediante la determinación de la  $K_d$ , para su obtención se pueden usar varios métodos, tales como: Ensayo de oligonucleótidos ligados a enzimas (ELONA), Espectroscopía mejorada de superficie, Termoforesis a microescala, Interferometría de biocapa, ITC, EMSA, SPR, AFM y Citometría de flujo (Godonoga et al., 2016) (Frith et al., 2018a) (Kalra et al., 2018) (Zhang N. et al., 2021). De los cuales nosotros usamos la medición de la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo (que consisten en la medición de la luz dispersada por partículas y la fluorescencia observada cuando las partículas pasan en una corriente a través de un rayo láser) debido a sus ventajas con respecto al resto de métodos: (1) decenas de miles de esferas pueden ser examinadas rápidamente, lo que permite obtener una muestra representativa confiable para obtener una inferencia estadística significativa, y los datos recopilados son procesados por una computadora; (2) proporciona datos cuantificables de una muestra; (3) debido a la rapidez de obtención de datos varias muestras pueden ser procedas y comparadas el mismo día; (4) buena repetibilidad; (5) costo moderado; (6) no requiere necesariamente conocer la secuencia; y (7) la medición de la intensidad de fluorescencia es más sensible que la ITC (Kalra et al., 2018) (Zhang N. et al., 2021). Sin embargo, para obtener más información, también se intentó mediante ITC, pero resulto ser una técnica muy costosa, la determinación de cada muestra llevaba horas, y requiere cantidades de muestra muy elevadas tanto de aptámero como de proteína a diferencia del método de citometría de flujo. Lo cual concuerda con lo que se conoce referente a la ITC, si bien es cierto puede llegar a dar información relacionada a la entalpia y  $K_d$  también

tiene desventajas tales como: (1) la gran cantidad y alta demanda de alta calidad para las muestras; y (2) la repetibilidad de una reacción muestral idéntica sigue siendo deficiente (Zhang N. et al., 2021). Con el método ITC se pudo observar una tendencia de la interacción y evidenciar que se trata de una interacción de tipo exotérmica, pero, con el método de intensidad de fluoresceína se pudo determinar la  $K_d$  eficazmente.

Como se describe, un medio para evaluar la unión aptámero-diana es mediante la medición de constantes de unión. Esta medición también puede ser relativa en cierto sentido; porque depende drásticamente del límite de detección o sensibilidad de la técnica empleada para la estimación. Jing y Bowser (2011) y Gopinath et al. (2016) han discutido en detalle las limitaciones y variaciones en las diferentes técnicas disponibles con los rangos de constante de disociación aparente estimada,  $K_d$ . Mientras que las técnicas altamente sensibles que emplean radiactividad pueden medir  $K_d$  hasta un rango sub-picomolar; La fluorescencia y la ITC pueden medir  $K_d$  limitado a nanomolares y las técnicas de espectrofotometría pueden medir  $K_d$  en rango micromolar (Jing & Bowser, 2011) (Kalra et al., 2018). Dada la variación en el valor de la  $K_d$  estimada que puede surgir técnica a técnica, es imperativo, que al comparar el rendimiento de los aptámeros relativamente,  $K_d$  para todos los candidatos se estime mediante la misma técnica, utilizando el mismo rango de concentraciones de aptámeros, por lo tanto, todas nuestras siguientes determinaciones de  $K_d$  fueron realizadas considerando lo descrito y midiendo la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo tal como se describe en el apartado 2.3.1.5.

Después de observar la interacción del aptámero D10 se evaluó su efecto sobre la actividad enzimática. La actividad de la DXR se determinó mediante un método espectrofotométrico directo, por lectura de la disminución de la absorbancia a 340nm debida a la oxidación del NADPH uno de los sustratos de la reacción. Además, se disponía de fosmidomicina como inhibidor específico de la enzima que se usó como control positivo de la inhibición. De los

aptámeros analizados el D10 era el que ejercía un mayor efecto inhibitor, no obstante, los valores de inhibición obtenidos son menores que los obtenidos con la fosmidomicina, el resultado es importante ya que confirma la unión del aptámero y su especificidad. No hay que olvidar que los aptámeros se denominan también anticuerpos químicos ya que comparten con ellos la capacidad de llevar a cabo el reconocimiento molecular de una región de una proteína. Al igual que ocurre con los anticuerpos, es posible que un aptámero se una a una región de la enzima pero que esa unión no afecte a su actividad. Con los aptámeros se pueden llevar a cabo técnicas de detección y cuantificación similares al *dot-blot* y al *Western blot*, tras depositar la muestra que contiene la proteína en una membrana o después de separar las proteínas mediante electroforesis y realizar su transferencia a una membrana, respectivamente. Cuando se utiliza aptámero D10 marcado con biotina, éste reconoce específicamente a la enzima DXR de *P. falciparum*, como se observa al incubar con estreptavidina marcada con peroxidasa. Estos experimentos se llevaron a cabo con las preparaciones de GST-PfDXR, por lo que era necesario comprobar que la unión se realizaba sobre la PfDXR y no sobre el otro componente de la enzima de fusión, la GST. Por ese motivo se usó GST recombinante, se añadió a uno de los carriles del gel y se analizó en las mismas condiciones. No se observó señal, lo que indica que la unión se realiza sobre la parte PfDXR de la proteína de fusión. Lo mismo se observó con el ensayo de *Western blot*, además de comprobarse por peso molecular que efectivamente se trata de nuestra enzima de interés.

También se hicieron experimentos para determinar si el método utilizado tenía la suficiente sensibilidad como para detectar la presencia de la enzima en un extracto de *P.falciparum* (resultados no mostrados). Se aplicaron 300 µg de muestra a lo largo de la membrana, se separaron las proteínas por SDS-PAGE y se cortó la membrana en tiras para que cada una sea incubada con diferentes marcadores o controles (aptámero D10, 700, 30, LDH y el anticuerpo anti FXR). En estas condiciones, solo el aptámero 30 dio positivo para dos bandas, actualmente no se conoce su diana, pero el resultado indica que su diana es mucho más abundante que la DXR, FXR y LDH endógenas.

El aptámero D10 identificado en este trabajo es uno de los pocos aptámeros desarrollados hasta el momento contra proteínas o enzimas de *Plasmodium*. Un resultado interesante de este estudio fue el hecho de que el aptámero D10 se une también a la DXR de *E. coli* como se demostró por los ensayos de retardo en la movilidad electroforética EMSA, como por el efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática.

En paralelo con los experimentos que condujeron a la identificación del aptámero D10 se llevó a cabo la obtención de aptámeros específicos para otra de las enzimas de la vía del MEP, la CDP-metileritritol sintasa (CMS). El primer paso dedicado de esta vía es la síntesis del metabolito clave, MEP, por la enzima DXR. En la reacción posterior, CMS cataliza la citidilación de MEP a CDP-ME. Debido a que la inhibición de la enzima DXR reduce drásticamente la función de la CMS en las células (Imlay et al., 2016), La CMS puede representar un punto de control metabólico particular del flujo de la vía MEP; por lo tanto, también fue considerada en el presente proyecto. Además, también cuenta con inhibidor específico el bromuro de domifeno, DMB.

Se disponía de preparaciones concentradas y con grado de pureza elevado de la enzima CMS recombinante de *E.coli*. Dichas preparaciones se habían obtenido a partir de la construcción pQE30-ygbP preparada previamente en nuestro grupo de investigación (Bernal et al., 2005). La enzima CMS de *Plasmodium* cataliza la misma reacción aunque muestra diferencias estructurales importantes (Björkelid et al., 2011). De los 22 residuos de aminoácidos que se conservan estrictamente en la mayoría de las especies bacterianas, (Kemp et al., 2003) solo 17 se conservan en la CMS de *P. Falciparum* (Imlay et al., 2016). La CMS posee el sitio activo menos lipofílico entre las enzimas de la vía MEP (Imlay et al., 2016) y ha recibido una atención renovada. Si bien el sitio activo de CMS es particularmente polar y tradicionalmente difícil de atacar con análogos de sustrato, tal vez la generación de aptámeros específicos para el sitio activo de la enzima pueda

solventar dicha dificultad. Por otro lado, utilizamos la CMS de *E. coli* como modelo porque es más factible la obtención de la enzima recombinante en su forma soluble y también por ser mucho más pequeña que la CMS de *P. falciparum*, lo cual podría acotar la selección de aptámeros específicos al área del sitio activo de la enzima, de tal manera que los aptámeros que tengan un efecto inhibitor puedan también inhibir la zona del sitio activo conservada de otras especies. En esta etapa la estrategia de selección implicó el uso de dos métodos acoplados, el método M-SELEX sin marcaje fluorescente y el método SBAS, este último representa una nueva propuesta o enfoque basado en el aislamiento de una sola esfera. Finalmente, nuestros resultados nos llevaron a la evaluación de 2 aptámeros candidatos, se analizó su efecto sobre la actividad enzimática y su interacción se evaluó mediante EMSA, en dichos ensayos no se requiere el marcaje fluorescente o de otro tipo.

En los siguientes guiones se discute con más detalle los resultados relativos a la caracterización del aptámero D10 desarrollado para la enzima DXR, los dos candidatos para la enzima CMS, así como las estrategias de selección.

### **- Potencial del aptámero D10**

El impacto de la malaria en la salud mundial ha impulsado continuamente la necesidad de descubrimiento de dianas farmacológicas, nuevos enfoques terapéuticos y de diagnóstico. Diferentes estrategias de control han sido efectivas, pero limitadas por herramientas de diagnóstico temprano ineficaces para la detección, especialmente, en entornos de baja parasitemia y vigilancia en entornos de baja transmisión. La capacidad de detectar individuos asintomáticos tendrá un gran impacto en la dinámica de transmisión, el control de la malaria y, posiblemente, hacia la eliminación. Las pruebas de diagnóstico pueden ayudar a los proveedores de servicios de salud a investigar más a fondo otras etiologías de enfermedades febriles; prevenir enfermedades graves y muerte probable; reducir el presunto uso de medicamentos antipalúdicos y los

efectos secundarios asociados; y mitigar la rápida aparición y propagación de la resistencia a los medicamentos. También podría reducir el grupo de personas que pueden contribuir a la transmisión de la malaria.

Por lo expuesto, en el presente trabajo nos hemos esforzado en el desarrollo y caracterización de aptámeros como estrategia contra la malaria, y entre nuestros resultados más resaltantes logramos aislar el aptámero D10 que interactúa con la DXR de *P. falciparum* y la DXR de *E. coli*. En nuestros ensayos para la evaluación del efecto del aptámero D10 sobre la actividad enzimática y sobre el crecimiento de *E. coli in vitro*, se evidenció que a pesar de que se une a la enzima, el aptámero no es un buen inhibidor de la actividad de la enzima EcDXR. Por lo tanto, el empleo a futuro del aptámero D10 como agente terapéutico pierde fuerza, pero, su uso como biosensor o biorreceptor para desarrollar estrategias de diagnóstico más efectivas que puedan superar las deficiencias en la detección precisa y temprana, cobra relevancia especialmente después de analizar nuestros resultados de caracterización *in situ* con cultivos de pRBCs fijados. Para dicha caracterización usamos uno de los biomarcadores de diagnóstico de la malaria más importantes, la enzima lactato deshidrogenasa del parásito (pLDH), la cual desempeña un papel catalítico en la vía glucolítica durante las etapas intraeritrocitarias de *Plasmodium*. Es producida por parásitos metabólicamente activos dentro de los pRBCs. De hecho, en el desarrollo de biosensores para detección de biomarcadores de malaria en muestras clínicas, la elección de PfHRP-2 y LDH sigue siendo predominante, similar a las PDR (Hemben & Ashley, 2017). Sin embargo, hay un aumento en la preferencia por pLDH posiblemente debido a la persistencia de la respuesta antigénica PfHRP-2 durante varias semanas después de la eliminación del parásito y los informes de cepas mutantes de África y Asia con genes *PfHRP-2* eliminados (Krampa et al., 2020). El aumento de la preferencia por sondear la enzima pLDH en sangre parece una mejora en el diagnóstico de la malaria, ya que su concentración se correlaciona con la densidad del parásito e implica parásitos metabólicamente activos. Por ello, se han venido evaluando varias herramientas nanotecnológicas para fortalecer el aislamiento y la aplicación de nuevos aptámeros para el diagnóstico de la

malaria dirigidos a la enzima LDH de *Plasmodium*: Aptámero 2008s que interactúa con la PfLDH (Dirkzwager et al., 2015), aptámero pL1 que interactúa con PvLDH y PfLDH (Jeon et al., 2013), y aptámeros P38 (Jain et al., 2016) y LDHp 11 (Frith et al., 2018) que interactúan con la PfLDH. Entre los aptámeros contra LDH nombrados, para el presente trabajo de investigación escogimos el aptámero 2008s, este aptámero fue patentado por Tanner et al., y es uno de los más caracterizados hasta la fecha. En su caracterización se observó que no inhibe la actividad enzimática de la PfLDH ni de la LDH de los controles humanos (hLDH). Para comprender esta ausencia de actividad inhibitoria, sobrepusieron la estructura del complejo aptámero-PfLDH con la estructura de la PfLDH previamente resuelta unida al cofactor (código PDB ID: 1LDG) y observaron a nivel general que el aptámero se une en un sitio distinto de los sitios de unión del sustrato, pero cerca de los sitios de unión del cofactor. La unión del aptámero a PfLDH puede bloquear la unión del extremo adenina del cofactor NADH. Sin embargo, al mantener el bucle de especificidad del sustrato en una conformación abierta, el NADH aún puede entrar en el sitio activo en una conformación diferente, lo que explica la ausencia de actividad inhibitoria del aptámero a pesar de la unión estrecha a la enzima (Cheung et al., 2013). Creemos que algo similar podría suceder con el aptámero D10, tampoco se uniría al sitio activo de la enzima, sin embargo, su ligero efecto inhibitor sobre la actividad enzimática *in vitro* podría deberse a que posiblemente también este bloqueando parcialmente la interacción de la enzima con otras moléculas tales como el cofactor NADPH, sin embargo, se requiere mayor evidencia para confirmar dicha posibilidad. Por otra parte, se ha descrito que la especificidad del aptámero 2008s de ADN se logra mediante la unión discriminatoria a un bucle que está presente solo en el *P. falciparum* pero no en la enzima lactato deshidrogenasa humana, lo cual lo hace idóneo como herramienta para el diagnóstico, y particularmente, como herramienta para validar nuestros datos de caracterización del aptámero D10 *in situ* mediante citometría de flujo y microscopia confocal. De hecho, a pesar de que el aptámero 2008s viene siendo ampliamente estudiado, es la primera vez que se observa su direccionamiento en pRBCs. La LDH es una enzima localizada en el citoplasma (Frith et al., 2018) y es abundante en parásito a diferencia de la enzima DXR que encuentra en el apicoplasto. Por lo tanto, como era de esperarse nuestros

resultados mostraron que el aptámero 2008s no colocalizó con el aptámero D10, ello, confirmado con un coeficiente de Manders de 27% (Figura 43), y con respecto a la discriminación de los pRBCs de los glóbulos rojos sin parasitar, el aptámero 2008s manifestó ser más sensible al detectar el 91.3% de pRBCs frente a un 87% de pRBCs detectados por el aptámero D10 (Figura 42).

A su vez, para validar dichos resultados y confirmar que el aptámero D10 efectivamente está localizando la enzima DXR en el apicoplasto, escogimos como marcador específico a la enzima ferredoxina-NADP(H) reductasa (FXR) de *P. falciparum*, que al igual que las enzimas de la vía del MEP se sintetizan en el núcleo y se localizan en el apicoplasto. La ferredoxina (FX) depende de la FXR para formar una cadena corta de transporte de electrones que proporciona poder reductor para la síntesis de precursores isoprenoides (Balconi et al., 2009). El último paso de reacción de la vía del MEP está catalizado por la enzima IspH que contiene un grupo [4Fe-4S]. Röhrich et al., demostraron que IspH de *P. falciparum* es catalíticamente activo en presencia de un sistema de transferencia de electrones dependiente de NADPH que comprende FX y FXR. Lo cual sugirió que el sistema redox FX/FXR reductasa sirve como donante fisiológico de electrones para IspH en el apicoplasto de *P. falciparum* y posiblemente también de la enzima IspG (Röhrich et al., 2005). Además, la eliminación de la FX se asoció con una disminución dramática en los niveles celulares de los dos últimos metabolitos en la biosíntesis de isoprenoides, HMBPP y DMAPP/IPP (Henkel et al., 2022). En suma, este sistema redox es de importancia primordial para el parásito y su estrecha vinculación con la vía del MEP hacen que la FXR sea un marcador apico-específico ideal para evaluar la detección de la enzima DXR en la célula de *P. falciparum* por el aptámero D10. En efecto, nuestros resultados mostraron que la FXR detectada por un anticuerpo anti-PfFXR (Abcam) colocaliza con la DXR detectada por el aptámero D10, con un coeficiente de Manders de 74% y 78% (Figura 44). Por lo tanto, se confirma que efectivamente, nuestro aptámero reconoce la enzima DXR *in situ* y que, además, al igual que el anticuerpo anti-PfFXR puede ser usado como biosensor para la localización del apicoplasto. Además, ambos biosensores, tienen una sensibilidad similar para discriminar

pRBCs de los no parasitados (Figura 46), lo cual concuerda con el hecho de que la localización de ambas enzimas se ve focalizada dentro de un orgánulo subcelular y que posiblemente su nivel de abundancia esté relacionado debido a que su actividad funcional se intercepta en la misma vía metabólica. Otra similitud observada, es que ambos biosensores pueden reconocer estadios tempranos (Figura 45) y tardíos del parásito (Figura 44). La localización precisa de proteínas en células fijadas es importante para muchos estudios en biología celular, pero una buena fijación es a menudo antagónica a un buen inmunotiquetado, dada la densidad de células bien conservadas y el tamaño de la mayoría de los anticuerpos. Por lo tanto, es interesante seguir explorando aptámeros como alternativa a los anticuerpos.

Los análisis comparativos del aptámero D10 con dos biosensores altamente específicos, el aptámero 2008s y el anticuerpo anti-PfFXR dieron resultados interesantes, que se refuerzan aún más con los resultados obtenidos tras la comparación del aptámero D10 con un aptámero inespecífico denominado 700 y un aptámero desarrollado contra pRBCs denominado 30, ambos aptámeros fueron desarrollados en nuestro laboratorio; el diseño del aptámero 700 se basó en la misma biblioteca que dio origen al proceso de selección Cell-SELEX realizado para la obtención del aptámero 30 (Lantero et al., 2020) y al proceso M-SELEX descrito en el presente trabajo para la obtención del aptámero D10. En la publicación que abarca el desarrollo del aptámero 30, se describió que tiene una unión altamente específica a pRBCs versus glóbulos rojos no infectados. No se conoce la molécula diana, pero se sabe que puede detectar *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. Interesantemente, se menciona que las secuencias descritas en ese desarrollo, incluyendo el aptámero 30, mostraron una mejora >30 veces en la detección de pRBCs en relación con 2008s.

En general el aptámero D10 mostró ser un marcador para discriminar glóbulos rojos parasitados con *P. falciparum* de los no infectados. Al compararse con el aptámero aleatorio 700 se pudo descartar que su efecto sea debido a su

naturaleza ADNsc, y su especificidad y sensibilidad para el reconocimiento de los pRBC fijados se corroboró comparándolo con el aptámero 30, LDH y anticuerpo anti-FXR. Efectivamente, nuestros resultados mostraron que el aptámero D10 es más sensible para el reconocimiento de pRBC fijados en relación con el aptámero 30 (Figura 40), lo cual es de esperar debido a que la enzima DXR se encuentra en todas las fases eritrocitarias del parásito, en cambio la diana del aptámero 30 todavía debe ser identificada. Además, se observó que la media de intensidad de fluorescencia del aptámero D10 era menor en relación al aptámero 30 (Figura 41), lo que va acorde con la localización y cantidad de enzima DXR de *P. falciparum* endógena, además, se debe de considerar que el aptámero 30 posiblemente de mayor señal o intensidad de fluorescencia debido a que fue desarrollado a partir de su exposición a células enteras y por lo tanto, su diana debería ser más abundante y de localización más superficial o expuesta que la DXR, que se encuentra en interior del apicoplasto. En suma, según nuestros resultados el aptámero D10 es más sensible que el aptámero 30, pero menos sensible que el aptámero 2008s para la detección de pRBCs. Sin embargo, si nos guiamos por los resultados previamente publicados por Lantero et al., el aptámero 2008s debería ser el de menor sensibilidad para la discriminación de pRBCs, ello, discrepa de nuestros resultados, pero hay que tener en cuenta que las condiciones experimentales fueron diferentes: la forma de permeabilización de las células fue con saponina en cambio todos nuestros experimentos fueron realizados con pRBCs fijados con paraformaldehído, además, utilizaron aptámeros marcados con biotina, en cambio nuestros experimentos fueron realizados con aptámeros marcados con fluorocromos. En este sentido son varios los estudios (Lantero et al., 2020) (Sosic et al., 2011) en los que se observa que las modificaciones en los aptámeros pueden afectar o repercutir en la afinidad de unión de los aptámeros con su molécula diana, por lo tanto, el bajo nivel de detección observado con el aptámero 2008s puede deberse al tipo de marcaje (Biotina) y sistema de detección utilizados en ese trabajo. Cabe mencionar, que a lo largo del presente trabajo de tesis el aptámero D10 fue evaluado sin modificaciones y con modificaciones tales como el marcaje con 6FAM, biotina y tiol, y con ninguna de las modificaciones se vio pérdida de

detección, lo cual sugiere que se puede manipular para el diseño de diferentes tipos de pruebas.

Las evaluaciones *in situ* con pRBCs fijados, nos indican que el aptámero D10 al parecer podría ser un biosensor ideal para detectar la infección en la etapa eritrocitaria debido al número exponencialmente elevado de parásitos, sin embargo, resulta difícil proponer a la enzima DXR como un biomarcador ideal en muestras de sangre de pacientes debido a la baja cantidad de DXR endógena en comparación a la expresión de enzimas tales como la LDH y también por ser más difícil acceder a ella por su localización en el apicoplasto. A pesar de ello, el aptámero D10 podría usarse como biosensor para investigación o para potenciar pruebas de diagnóstico en combinación con otros biomarcadores específicos. Lo último se ha venido llevando a cabo en pruebas PDR, que se han vuelto populares para el diagnóstico de malaria en el POC, por ejemplo, las PDR que combinan aldolasa/PfHRP-2 (Krampa et al., 2020). Actualmente, las PDR disponibles comercialmente tienen menos sensibilidad que las técnicas alternativas basadas en laboratorio, por lo que no proporcionan la sensibilidad y la cuantificación comparables a la microscopía estándar de oro o la PCR. Estas limitaciones requieren la necesidad de desarrollar otras tecnologías de diagnóstico con sensibilidades mejoradas, al tiempo que se garantiza la simplicidad, la robustez y la rentabilidad. Los costos unitarios de las PDR de malaria en muchos países africanos se encuentran dentro del rango no subsidiado de USD 2,54 - 2,83. Sin embargo, un estudio en Uganda reveló que los consumidores estaban dispuestos a pagar un promedio de USD 0,53. Las perspectivas de que algunos aptasensores se estimen en 1 USD o menos por prueba, propone una reducción significativa de los costos generales de atención médica en las regiones tropicales empobrecidas donde prevalece la malaria (Cohen et al., 2015). Bajo dicho contexto, los aptasensores han recibido un interés considerable en medio de los esfuerzos por mejorar y miniaturizar pruebas para el diagnóstico en dispositivos portátiles. Algunos de estos avances recientes han incluido, sistemas ópticos, electroquímicos y de microfluídica basada en chips, muchos de los cuales han

logrado sensibilidades comparables con los métodos de diagnóstico tradicionales.

Varios de los prototipos para el desarrollo de dispositivos portátiles que se vienen desarrollando a base de aptasensores (Tabla 1) se caracterizan por la inmovilización del aptámero modificado con tiol en el extremo 5', Singh et al. lograron inmovilizar con éxito el aptámero NG3 marcado con tiol en un electrodo de oro y Figueroa-Miranda et al., hicieron lo mismo con el aptámero 2008s (Singh et al., 2019) (Figueroa-Miranda et al., 2018). El enlace covalente tiol-oro confirió una alta estabilidad de inmovilización al aptámero y pudo regenerarse y reutilizarse hasta tres veces sin pérdida de rendimiento analítico. Por ello, hicimos un primer prototipo de prueba tipo sándwich inmovilizando el aptámero D10 tiolado a una lámina APTE (Figura 21). Observamos que el aptámero modificado con tiol en el extremo 5' e inmovilizado se mantuvo funcional y pudo capturar a la enzima (Figura 51). Eso sugiere que el aptámero D10 es una herramienta flexible que se podría utilizar y acoplar a sistemas más sensibles de detección, como, por ejemplo, los sistemas electroquímicos, que utilizan EIS, FET y FRET, y que de forma similar a los avances llevados a cabo con el aptámero 2008s se podría modelar o integrar a futuro para dispositivos autónomos aprovechando las técnicas tales como la impresión 3D y la microfluídica basada en chips para el despliegue en campo. La mayoría de los biosensores se basan en los principios de inmunoensayo e involucran múltiples pasos, lo que dificulta y encarece su uso en campo. Por ello, la tendencia sería la simplificación del prototipo llevado a cabo con el aptámero D10. Además, podría ser interesante evaluar si el aptámero sigue funcionando con otros métodos que no involucren la modificación del aptámero con tiol, ya que ello podría disminuir los costos, un ejemplo, sería el ensayo de detección basado en surfactante catiónico que funcionó con los aptámeros pL1 y p38 (Lee et al., 2014) (Jain et al., 2016).

Otro punto que quisimos abordar fue el observar si el aptámero podía funcionar como biosensor en bacterias debido a que la contaminación bacteriana se ha

convertido en una preocupación creciente en el control de enfermedades, el diagnóstico clínico, el monitoreo ambiental y el análisis de incrustaciones de alimentos, entornos hospitalarios e instrumentación quirúrgica (WHO, 2014) (MacKinnon et al., 2020). Los resultados mostraron que el aptámero D10 reconoció células de *E. coli* (Figura 48) y *S. aureus* (Figura 49). El resultado con las células de *E. coli* estaría acorde con la presencia de DXR endógena en la bacteria y con nuestros resultados de interacción del aptámero D10 y EcDXR. Por otro lado, si bien *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. lugdunensis* poseen cada uno todos los genes en la vía del mevalonato, también han retenido algunas enzimas de la vía del MEP, tales como la CMS, pero no la DXR. En *S. aureus* la enzima CMS está involucrada en la vía de biosíntesis del ácido poli(ribitol fosfato) teicoico, que forma parte de la biogénesis de la pared celular (Pereira et al., 2008). Por ello, tal vez resultaría ser más esencial su conservación a diferencia de la DXR y se explicaría su ausencia. Por lo tanto, el marcaje positivo de la bacteria a pesar de la ausencia de DXR en *S. aureus* podría estar indicando una reacción cruzada, el aptámero D10 estaría reconociendo más de un blanco aparte de la enzima DXR. En efecto, uno de los posibles inconvenientes que pueden presentar los aptámeros seleccionados *in vitro* para una diana purificada es que no funcionen adecuadamente frente al microorganismo completo o *in vivo* como se esperaba, debido a la diversidad de moléculas y la complejidad estructural de la diana *in vivo* (Maomian Fan et al, 2008) (Pan et al., 2018). La unión cruzada a moléculas inespecíficas podría limitar el uso del aptámero para la detección en muestras bacterianas.

Lo observado en nuestros resultados de actividad enzimática (Figura 38) y en cultivo (Figura 50) con concentraciones hasta 50  $\mu\text{M}$  de aptámero D10, sugiere que el aptámero no se une al sitio activo de la DXR y ello, nos deja una gran zona con muchísimos sitios probables de interacción que a su vez pueden asemejarse a otras proteínas. Además, la capacidad de unión de los aptámeros está influenciada no solo por su compatibilidad estructural sino también por las interacciones electrostáticas y puentes de hidrogeno que dependiendo en gran medida del tipo de experimento pueden verse condicionadas inclusive por el tipo de buffer (Stovall et al., 2004) y tasas de difusión de ADNsc en células

fijadas (Stanlis & McIntosh, 2003). Por lo que a nivel experimental es posible que algunas variables condicionasen la interacción del aptámero con una proteína inespecífica de *S. aureus*. Sin embargo, la sospecha de una reacción cruzada sigue siendo la hipótesis más fuerte, que los aptámeros al igual que los anticuerpos pueden manifestar interacciones inespecíficas. Tanner et al, durante la estandarización de la prueba APTEC observaron interacciones electrostáticas no específicas con los aptámeros de ADN, pero que luego pudieron evitar ajustando las condiciones de unión (Dirkzwager et al., 2015). Algo similar podría haber ocurrido con el aptámero D10, sin embargo, todavía está por dilucidar si el motivo del marcaje positivo se debe a una afinidad del aptámero D10 para una proteína inespecífica de *S. aureus*, o si es debido a condiciones técnicas. Para ello, se podría realizar más ensayos con otras bacterias grampositivas y gramnegativas, especialmente incluir otras especies de *S. aureus*, además añadir aptasensores específicos para bacterias como controles. Hasta la fecha se sabe poco sobre qué exactamente determina las interacciones específicas de los aptámeros con sus dianas, se han resuelto pocas estructuras de los complejos diana y aptámero de ADN, la mejor estudiada es el aptámero G-quadruplex que se une a la trombina (Pasternak et al., 2011). Un aptámero de ADN que se une al factor Von Willebrand mostró una estructura de tres tallos de ADN principalmente en forma de B con algún emparejamiento de bases no canónico (Huang et al., 2009), y recientemente, se resolvió la estructura de un innovador aptámero (SOMAmer) unido al factor de crecimiento B derivado de plaquetas, revelando la unión a través de una superficie hidrofóbica que imita cómo el factor se une a su receptor (Davies et al., 2012). En general, los mecanismos de unión suelen diferir, por ejemplo, la estructura de horquilla distorsionada reportada para el aptámero LDH (2008s) es bastante distinta del aptámero G-quadruplex que se une a la trombina y al SOMAmer que exhibe una interfaz de unión hidrofóbica (Cheung et al., 2013). Por lo tanto, es necesario más estudios que expliquen los mecanismos por los cuales los aptámeros de ADN alcanzan especificidad, ya que el vacío que existe al respecto puede implicar un sesgo en el desarrollo de aptasensores (Miyachi et al., 2010) (Baird, 2010) (Tucker et al., 2012). También hay que considerar que la afinidad del aptámero D10 puede mejorarse, y así aumentar su especificidad, tal y como se hizo con el aptámero LDH (2008s), el cual no

lleva los extremos de unión a cebador (Cheung et al., 2013) y por lo tanto es mucho más pequeño que el aptámero D10. La estructura secundaria del aptámero D10, muestra varias regiones con alta probabilidad de mantenerse como una sola hebra (Figura 29), lo que implica que una gran parte del aptámero tiene nucleótidos no apareados propensos a formar enlaces de hidrógeno intermoleculares con proteínas, que en conjunto con las interacciones basadas en compatibilidad estructural e interacciones electrostáticas ayudan a que el aptámero interactúe con su diana (Choi & Ban, 2016), sin embargo, no se descarta que se formen puentes de hidrogeno con moléculas inespecíficas, lo cual podría solventarse con una optimización adecuada del aptámero, por ejemplo, al disminuir el tamaño, podría disminuir la probabilidad de unión con moléculas inespecíficas y a su vez aumentar la especificidad.

En suma, faltaría más pruebas y contrarrestar con otros tipos de ensayos y evaluaciones con otras especies bacterianas para verificar si efectivamente se trata de una reacción cruzada y si se da lo mismo con otras especies. Lo cual es crucial si se desea aplicar el aptámero D10 para la detección de bacteriana, por lo pronto, el aptámero D10 ha demostrado ser una buena molécula de marcaje para discriminar pRCBSs de los glóbulos rojos sin parasitar y para la localización del apicoplasto en *P. falciparum*. También ha mostrado ser un potencial aptasensor por potencial de adaptación a diferentes sistemas de detección y que cuya afinidad puede aun ser optimizable. Por ello, se pueden seguir explorando su potencial para uso en investigación, diagnóstico o como coadyuvante en nanoconjugados para fines terapéuticos específicos tanto para *E. coli*, y *P. falciparum*, y posiblemente para otros microorganismos patógenos que comparten la vía del MEP.

## - **Obtención de aptámeros para la CMS. Nuevo enfoque de selección**

Es necesario un diseño cuidadoso del proceso de selección para mejorar la especificidad de los aptámeros identificados, que pueden distinguir mejor las moléculas estrechamente relacionadas a bajas concentraciones.

La alta variación de las estructuras complejas de las dianas son factores adicionales que pueden influir en el rendimiento de los aptámeros. Es importante continuar desarrollando procedimientos SELEX más simples y eficientes (que requieren menos tiempo en la selección) para desarrollar aptámeros específicos y/o universales contra diversos microorganismos patógenos.

Varios autores han usado la estrategia de acoplar dos metodologías de selección para aumentar la probabilidad de encontrar aptámeros con alta afinidad para su diana (Lou et al., 2009). Nosotros acoplamos dos métodos, el método M-SELEX convencional y el método SBAS, este último fue ideado usando los materiales y herramientas asequibles en el laboratorio. Basados en nuestra experiencia con el método convencional nos dimos cuenta al observar las esferas con microscopía de fluorescencia que no todas las esferas eran positivas o daban la misma intensidad de fluorescencia después del ciclo de FluMag-SELEX, a pesar de que las esferas eran sometidas por igual a las incubaciones y lavados durante todo el proceso. Por ello, quisimos acercarnos a las esferas que, si daban mayor intensidad de fluorescencia, debido a que en teoría se trata de esferas que capturaron mayor cantidad de aptámeros afines. Además, el poder aislar una sola esfera que evidencia el complejo positivo proteína-aptámero, nos permitiría descartar gran parte de aptámeros inespecíficos o de débil afinidad.

De manera semejante, Tok y Fischer (Tok & Fischer, 2008) decidieron desarrollar un enfoque SELEX de microesfera única eficiente y fácil de ejecutar

para generar aptámeros ADNsc de alta afinidad contra la neurotoxina botulínica. Para ello, a diferencia de los medios tradicionales que exponen la biblioteca ADNsc a miles de microesferas conjugadas con la diana, expusieron la biblioteca a una sola microesfera. Plantearon la hipótesis de que al reducir drásticamente la cantidad de moléculas diana, solo se espera que los aglutinantes de ADNsc más afines permanezcan unidos a la diana expuesta después del período de incubación (Las secuencias débiles serán desplazadas por los aglutinantes de mayor afinidad). El proceso lo realizaron bajo un estereomicroscopio de fluorescencia, esferas de 90 – 100  $\mu\text{m}$  y 1 nmol de biblioteca que lleva  $10^{14}$  secuencias diferentes. Sus resultados sugirieron que los aptámeros de alta afinidad se pueden generar en un solo ciclo de selección, ya que solo hay una disminución mínima en los valores de  $K_d$  de los grupos de aptámeros de los ciclos 1 a 2. Otros investigadores también trataron de optimizar el tiempo de obtención de aptámeros, por ejemplo, el MonoSELEX planteado por Nitsche (Nitsche et al., 2007), el ASEXP planteado por Fan M. (Fan et al., 2008) o el enfoque novedoso de Yang et al., en el 2002, en el que además de disminuir el número de pasos de selección, también plantea el aislamiento de una esfera (Yang et al., 2002). Su planteamiento consiste en crear una biblioteca PS2-ODN unida a esferas que luego será expuesta a una diana, seguido de la adición de un anticuerpo primario específico para la proteína diana y luego un segundo anticuerpo conjugado con marcaje fluorescente. Para la selección manual, las esferas se observan bajo un microscopio de fluorescencia, y las que muestran la fluorescencia más intensa se pueden recoger con la ayuda de una micropipeta acoplada a un micromanipulador. Estas cuentas positivas tienen secuencias de aptámeros que demuestran una alta afinidad por la diana. Este proceso se puede utilizar para seleccionar aptámeros que contienen nucleótidos modificados que no se pueden incorporar enzimáticamente. Por lo tanto, podría incorporar una diversidad química significativamente más amplia. El proceso también invierte el enfoque convencional de SELEX para la unión y separación. En contraste, con el SELEX convencional, el proceso incubaba el objetivo soluble con una biblioteca inmovilizada. Por lo tanto, no existe una competencia vinculante directa entre los aptámeros de unión fuerte y los de unión débil. Sugieren que una sola esfera que lleve unido un aptámero de alta afinidad unirá a su vez

gran cantidad de la molécula diana a bajas concentraciones, mientras que la mayoría de las cuentas mostrarán poca o ninguna unión. También sus resultados sugirieron que, dado que las esferas de alta afinidad se aíslan directa e individualmente, los aptámeros de unión fuerte o mayor afinidad se podrían aislar en un solo paso. Los procesos que se acaban de nombrar son prometedores y apoyan nuestras observaciones coincidiendo con nuestra idea de que es factible disminuir el número de pasos de selección y en particular usando el enfoque de esfera única (Yang et al., 2002) (Tok & Fischer, 2008).

Sin embargo, los planteamientos antes mencionados son difíciles de reproducir debido a que conllevan largos tiempos de optimización, microesferas o columnas exclusivas para cada diana o sistema que se requiera, o técnicas que requieren materiales y equipamiento especializado como lo necesario para la micromanipulación acoplada a microscopia utilizada por Yang (Yang et al., 2002), el cual es un sistema costoso, que se encuentra en pocos lugares, de difícil manipulación, y que requiere una optimización técnica prologada solo para el uso del equipo. La fuerza de absorción y la apertura de la microinyección debe ser calibrados según el peso de la esfera, sin embargo, es difícil encontrar esferas comerciales que cumplan con las características de peso y tamaño, sumado al hecho que además deben cumplir con las características funcionales para posterior formación de los complejos. Particularmente, se requiere una gran fuerza de absorción para poder aislar la esfera con la micro aguja o microinyección, lo cual implica gran experiencia previa y la compra de varias agujas o microcapilares hasta encontrar la idónea.

En nuestro caso, nos planteamos el enfoque de SBAS, en el cual optamos por usar esferas aún más pequeñas; en concreto esferas de 4  $\mu\text{m}$ , tamaño muy distante de las esferas de 100  $\mu\text{m}$  usadas en estudios previos. Ello, con la idea de acotar aún más la capturar de aptámeros de alta afinidad, es así como se siguió abordando la idea de esfera única. Partiendo desde la observación de diferencia de intensidad de fluorescencia de las esferas, se pensó en el método de citometría de flujo y *sorting*, por un lado, podríamos clasificar los grupos de

esferas según la intensidad de fluorescencia y por otro aislar la esfera con mayor intensidad de fluorescencia. Un aspecto importante fue elegir un sistema de esferas flexible y que se pueda utilizar en citometría. Para ello, buscamos esferas de tamaño semejante a las que se usan para control en citometría de flujo y con muy poca autofluorescencia ya que las esferas que se usan para el M-SELEX son esferas magnéticas de cobalto, su característica metálica les proporcionaba una autofluorescencia alta por lo que era difícil discriminar las esferas positivas de las negativas. En el caso de M-SELEX se ajustaban al diseño del proceso debido a que las esferas de cobalto se unen por afinidad a las etiquetas de histidina de las proteínas, y la propiedad magnética permitía el cambio de las soluciones durante el proceso con un separador magnético. Sin embargo, para el diseño del nuevo proceso SBAS las esferas de cobalto usadas en el M-SELEX no eran compatibles. Por lo cual, se escogieron esferas de látex, que son esferas con carácter aldehído/sulfato, lo cual les confiere flexibilidad ya que su unión a la proteína diana no depende de la presencia de etiquetas en la proteína. Brevemente, la nueva estrategia se basa en primer lugar en el uso de microesferas de látex (también llamadas gránulos o partículas), son partículas esféricas en el rango de tamaño coloidal que se forman a partir de un polímero amorfo como el poliestireno. Debido a la forma en que las cadenas de poliestireno se organizan en el gránulo, la superficie es de carácter muy hidrófoba, lo que hace que estos materiales sean ideales para la adsorción de proteínas. Este látex de aldehído/sulfato contiene una abundancia de grupos de aldehído insertados en la superficie de la partícula de polímero. La alta densidad de grupos aldehído permite el acoplamiento de proteínas a las partículas de látex en una sola etapa. La carga de los grupos sulfato de las microesferas permite la retención de la estabilidad durante el proceso de acoplamiento covalente. Debido a la alta densidad de grupos polares, este látex tiene una superficie hidrófila. Y, en segundo lugar, se basa en el aislamiento de una sola esfera positiva (complejo esferas:proteína:aptámeros) seleccionada mediante citometría de flujo, desde la cual se obtendrá un grupo de aptámeros candidatos.

Con los aptámeros seleccionados se analizó en primer lugar si tenían un efecto inhibitorio sobre las preparaciones de CMS de *E.coli*. Para ello se utilizó un método colorimétrico discontinuo para la determinación de la actividad, que se basa en la utilización de pirofosfatasa inorgánica como enzima acoplada (Bernal et al., 2005).

Finalmente como producto del acoplamiento del método M-SELEX y SBAS se obtuvieron dos aptámeros candidatos, de los cuales el aptámero denominado 8A mostró mayor interacción tanto en el EMSA (Figura 62) como en los ensayos de inhibición de la actividad enzimática (Figura 63 y 64), pero su baja interacción y bajo poder de inhibición, no justificaron mayor exploración de ambos aptámeros, que dieron muy baja inhibición para la enzima CMS con  $IC_{50}$  promedio de  $\sim 80 \mu M$ , en comparación con el aptámero D10 con un  $IC_{50}$  de casi  $\sim 10 \mu M$ . Sin embargo, en el proceso de obtención y evaluación de los aptámeros 8A y 10A, se pudo inferir que con solo una primera ronda del método SBAS se duplicó la afinidad alcanzada hasta el momento después de 9 ciclos de M-SELEX. Según nuestros resultados, el método colorimétrico para la determinación de la actividad enzimática de la CMS es ligeramente menos sensible que el método directo patentado por Abcam, sin embargo, el método colorimétrico sigue siendo eficiente y más económico para la evaluación del efecto de aptámeros sobre la actividad de la enzima CMS. En los experimentos en los que se analizó el efecto de los aptámeros 8A y 10A sobre la actividad se incluyeron como control de inhibición positivo el DMB y como control negativo el aptámero D10, el cual como se ha descrito anteriormente se desarrolló para una diana totalmente diferente.

Adicionalmente, comparamos las estructuras secundarias, y observamos que la estructura del aptámero 8A tiene más zonas con alta probabilidad de formar doble cadena (Figura 61), ello sugiere mayor probabilidad de formar enlaces covalentes, y por lo tanto mayor estabilidad, también tiene mayor cantidad de bucles dándole complejidad estructural, y zonas amplias con alta probabilidad de mantenerse en una sola cadena, lo cual posiblemente le confiere a su vez

mayor posibilidad de tener zonas expuestas que puedan formar puentes de hidrógeno que ayuden a la afinidad con la diana que la estructura secundaria del aptámero 10A (Figura 61). Además, la estructura secundaria del aptámero 8A requiere menor energía libre que el aptámero 10A bajo las mismas condiciones, observación que también podría sugerir mayor estabilidad de la forma funcional o 3D del aptámero. Por lo tanto, se considera que durante el EMSA y el ensayo de actividad enzimática tal vez las características estructurales del aptámero 8A influyeron para que tenga una unión más estable con la CMS y una inhibición mayor que la que evidenció el aptámero 10A, que tiene una estructura con características menos estables.

Otro punto importante, es el potencial del método SBAS, por ello, se realizó una nueva serie de rondas partiendo desde la biblioteca inicial, y se comparó la  $K_d$  aparente del grupo de aptámeros obtenidos desde el aislamiento de la esfera con mayor intensidad de fluorescencia, al comparar los valores de  $K_d$  se pudo observar que la afinidad de los grupos de aptámeros para la enzima CMS aumentaba conforme avanzaban las rondas, a pesar que la afinidad prácticamente se duplicaba en cada ronda, al llegar a una cuarta ronda la afinidad aún estaba distante de la obtenida hasta el ciclo 9 del M-SELEX, ello, quiere decir que posiblemente sean necesarios más ciclos de SBAS. A pesar de ello, las ventajas de poder trabajar con una sola esfera, nos da un enfoque más certero en la búsqueda de aptámeros, si el método se acopla a métodos tales como el HTS, sin duda se convertiría en una estrategia muy potente para la selección más precisa de aptámeros. Además, el método SBAS es más breve y junto a la efectividad del nuevo proceso de clonaje por selección positiva practicado (Apartado 2.2.1.2.1.), se pudo reducir significativamente el tiempo para la obtención de las primeras secuencias candidatas. Durante el método de SELEX, se selecciona una biblioteca mixta de oligonucleótidos en solución para unirse a una diana inmovilizada. En esta situación, se recupera una gran masa de secuencias de unión débil junto con el pequeño número de aptámeros de unión afín. Por lo tanto, generalmente se requieren numerosas rondas de selección para enriquecer las secuencias de alta afinidad. Sin embargo, métodos como SBAS que mantienen un enfoque de esfera única

pueden permitir reducir el número de rondas. Otro beneficio es que este tipo de enfoque pueden eliminar o reducir los pasos repetidos de amplificación por PCR requeridos durante el SELEX. La PCR puede imponer un "sesgo de amplificabilidad" durante la selección de aptámeros, y puede limitar significativamente o incluso prevenir la recuperación de aptámeros deseables que se amplifican con baja eficiencia (Potapov & Ong, 2017). En suma, nuestra propuesta de esfera única se aúna a la búsqueda de otros autores de nuevas estrategias que puedan superar las desventajas del método convencional de selección SELEX.

También es interesante mencionar que se puede acortar aún más los tiempos usando el método de separación de cadenas de la enzima lambda exonucleasa en el que solo se necesitan 2 h, a diferencia de un día o más que requiere la preparación de aptámeros con el método neutravidina-biotina (apartado 2.2.1.1). Además, se puede obtener mayor cantidad de ADNsc en una sola preparación, lo cual es muy útil, debido a que con el método neutravidina-biotina se limitaban mucho los experimentos por la escasa cantidad de ADNsc. En el laboratorio se hicieron unas pruebas preliminares del método de separación de cadenas con la enzima lambda, probando diferentes tiempos de incubación, y se obtuvieron ADNsc con solo 1 h de incubación con la enzima, sin embargo, se deben realizar más ensayos para asegurarnos de no generar productos no deseados como fragmentos del aptámero o residuos de ADNdc.

#### - **Perspectivas futuras del trabajo**

Las pruebas con las enzimas recombinantes y evaluaciones *in situ* con pRBCs, sugieren que el aptámero D10 tiene el potencial como aptasensor para discriminar pRBCs de los glóbulos rojos sin parasitar y para la localización del apicoplasto en *P. falciparum*. Además, es un aptámero con capacidad de adaptación a diferentes sistemas de detección y con afinidad aún optimizable para el desarrollo de tecnologías destinadas a investigación o diagnóstico con

sensibilidades mejoradas, simplicidad y buena rentabilidad. En efecto, el aptámero D10 formaría parte de los pocos aptámeros desarrollados contra enzimas de *Plasmodium* y el único aptámero contra una de las enzimas de la vía del MEP hasta el momento. Además, su uso podría ampliarse como potencial elemento para el desarrollo de futuro aptasensor de infecciones bacterianas, una vez se descarten las posibles reacciones cruzadas entre bacterias.

Por otra parte, el método convencional M-SELEX resulta ser un buen método para la selección de aptámeros, sin embargo, hay otras estrategias que pueden ayudar a optimizar la selección y evitar los sesgos intra e Inter operacionales que conlleva el laborioso método M-SELEX de múltiples rondas de selección. La estrategia SBAS que se propone en el presente trabajo es una alternativa al método convencional SELEX e implica un enfoque de esfera única, el cual tiene potencial para reducir el número de rondas, requiere menos tiempo de operación, y que acoplándose a otros métodos podría convertirse en una estrategia muy potente para la selección más certera de aptámeros.

## 5. CONCLUSIONES

- I. A partir de una librería de secuencias de ADN de cadena sencilla y mediante el método M-SELEX se ha identificado un aptámero de ADN (aptámero D10), específico para la enzima, desoxixilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR) que cataliza la segunda etapa de la vía del metileritritol fosfato (MEP) de biosíntesis de isoprenoides de *P. falciparum*.
- II. El aptámero D10 es capaz de marcar específicamente los pRBCs infectados por *P. falciparum* tanto en sus fases tempranas y tardías. La capacidad del aptámero D10 para discriminar pRBCs de los glóbulos rojos sin parasitar es equiparable a la de otros marcadores específicos para *P. falciparum* como el aptámero 2008s (específico para la enzima lactato deshidrogenasa PfLDH), el aptámero 30 (específico para pRBCs) y un anticuerpo anti-ferredoxina tiorredoxina reductasa (FXR).
- III. El aptámero D10 y el anticuerpo anti-FXR de *P. falciparum*, enzima localizada en el apicoplasto, mostraron tener alta colocalización y concordancia, mediante microscopia confocal y citometría de flujo. Estos resultados están de acuerdo con la localización subcelular de la enzima DXR en el apicoplasto e indican que el aptámero D10 reconoce la enzima *in situ* y puede ser usado como biosensor para el apicoplasto.
- IV. El aptámero D10 también reconoce la enzima DXR de la bacteria modelo *E. coli* y actúa como inhibidor de su actividad enzimática. De los aptámeros analizados el D10 era el que ejercía un mayor efecto inhibidor, no obstante, los valores de inhibición obtenidos son menores que los obtenidos con la fosmidomicina.

- V. Los resultados mostraron que el aptámero D10 reconoció células de *E. coli* acorde con la presencia de DXR endógena en la bacteria y con los resultados de interacción del aptámero D10 y la enzima EcDXR.
- VI. El valor de constante de disociación ( $K_d$ ) del aptámero D10 y la enzima DXR tanto de *P. falciparum* como de *E. coli* es muy similar. Lo cual, revela que el aptámero D10 reconoce probablemente la misma zona en ambas enzimas y con similar afinidad, resultado que se corresponde con el alto nivel de conservación de la DXR entre las especies y lo observado en los ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA).
- VII. Con el aptámero D10 se pueden llevar a cabo técnicas de detección y cuantificación similares al *dot-blot* y al *Western blot*, es decir reconocer la enzima PfDXR en su forma nativa y no nativa, respectivamente. Además, el aptámero D10 fue evaluado sin modificaciones y con modificaciones tales como el marcaje con 6FAM, biotina y tiol. Con ninguna de las modificaciones se vio pérdida funcional, lo que sugiere que se podría usar para el diseño de diferentes tipos de pruebas analíticas y de diagnóstico.
- VIII. En la segunda parte de este trabajo se ha llevado a cabo la selección de aptámeros para la enzima que cataliza la tercera etapa de la vía del MEP, la CDP-metileritritol sintasa (CMS) de *E.coli* mediante la combinación de dos métodos: el método M-SELEX y un método de selección basado en el aislamiento de una sola esfera positiva, método SBAS. Se han obtenido dos aptámeros, 8A y 10A que aunque mostraron una interacción positiva con la CMS de *E.coli* en la prueba de EMSA ejercían poco efecto inhibitor sobre su actividad enzimática.

- IX. El método SBAS evidenció tener potencial para disminuir tiempos de operación, aumentar rápidamente el enriquecimiento de los grupos de aptámeros afines a la diana. Además, El diseño elegido para el método permite un seguimiento más certero de las esferas positivas y es un sistema flexible con el que se pueden usar proteínas sin etiquetas o modificaciones especiales e incluir otras proteínas control en simultaneo.
- X. El método SBAS también permite monitorear la  $K_d$  de la ronda anterior en simultaneo. Esto último es importante debido a que se ahorra el tiempo requerido en la elaboración de procesos adicionales que evidencien el enriquecimiento después de un M-SELEX, el cual si requiere por lo menos de dos métodos para la medición del enriquecimiento.
- XI. El poder aislar una sola esfera que evidencie el complejo positivo proteína-aptámero, permite descartar gran parte de aptámeros inespecíficos o de débil afinidad. Los resultados sugirieron que los aptámeros de alta afinidad se pueden aislar con menos pasos de selección, debido a que se observó una disminución sustancial en las  $K_d$ s según avanza el número de rondas.

## 6. REFERENCIAS

- Afrasiabi, S., Pourhajbagher, M., Raoofian, R., Tabarzad, M., & Bahador, A. (2020). Therapeutic applications of nucleic acid aptamers in microbial infections. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0611-0>
- Albertini, A., Lee, E., Coulibaly, S. O., Sleshi, M., Faye, B., Mationg, M. L., Ouedraogo, K., Tsadik, A. G., Feleke, S. M., Diallo, I., Gaye, O., Luchavez, J., Bennett, J., & Bell, D. (2012). Malaria rapid diagnostic test transport and storage conditions in Burkina Faso, Senegal, Ethiopia and the Philippines. *Malaria Journal*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-406>
- Alemu, A., Shiferaw, Y., Addis, Z., Mathewos, B., & Birhan, W. (2013). Effect of malaria on HIV / AIDS transmission and progression. *Parasites & Vectors*, 6(18), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-18>
- Alfhilli, M. A., & Lee, M. H. (2019). Triclosan: An update on biochemical and molecular mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 2019, 1-28. <https://doi.org/10.1155/2019/1607304>
- Althagbi, H. I., Budiyanto, F., Abdel-Lateff, A., Al-Footy, K. O., Bawakid, N. O., Ghandourah, M. A., Alfaifi, M. Y., Elbehairi, S. E. I., & Alarif, W. M. (2021). Antiproliferative isoprenoid derivatives from the red sea alcyonacean xenia umbellata. *Molecules*, 26(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26051311>
- Am, S., Zoleko-manego, R., Csermak, K., Schmitt, E. K., Mombo-ngoma, G., & Grobusch, M. P. (2020). The early preclinical and clinical development of cipargamin ( KAE609 ), a novel antimalarial compound. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 36(May), 101765. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101765>
- Amir, A., Cheong, F. W., De Silva, J. R., & Lau, Y. L. (2018). Diagnostic tools in childhood malaria. In *Parasites and Vectors*; 11, 1. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2617-y>

- Andrea Kunfermann, Matthias Witschel, Boris Illarionov, René Martin, Matthias Rottmann, H. Wolfgang Höffken, Michael Seet, Wolfgang Eisenreich, Hans-Joachim Knölker, Markus Fischer, Adelbert Bacher, Michael Groll, F. D. (2014). *Pseudilins: Halogenated, Allosteric Inhibitors of the Non-Mevalonate Pathway Enzyme IspD*. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(8), 2235–2239. <https://doi.org/10.1002/anie.201309557>
- Arisue, N., Hashimoto, T., Mitsui, H., Palacpac, N. M. Q., Kaneko, A., Kawai, S., Hasegawa, M., Tanabe, K., & Horii, T. (2012). *The plasmodium apicoplast genome: Conserved structure and close relationship of P. ovale to rodent malaria parasites*. *Molecular Biology and Evolution*, 29(9), 2095–2099. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss082>
- Armstrong, C. M., Meyers, D. J., Imlay, L. S., Meyers, C. F., & Odom, A. R. (2015). *Resistance to the antimicrobial agent fosmidomycin and an FR900098 prodrug through mutations in the deoxyxylulose phosphate reductoisomerase gene (dxr)*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), 5511–5519. <https://doi.org/10.1128/AAC.00602-15>
- Ashley, E. A., & Phyto, A. P. (2018). *Drugs in Development for Malaria*. *Drugs*, 78(9), 861–879. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0911-9>
- Awasthi, G., & Das, A. (2013). *Genetics of chloroquine-resistant malaria: A haplotypic view*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(8), 947–961. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130274>
- Sprenger G., Schorken U., Wiegert T., Grolle S., De Graaf A., Taylor S., Begley T., Bringer-Meyer S., and Sahn H. (1997). *Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol*. 94(November), 12857–12862.
- Baatarkhuu, Z., Chaignon, P., Borel, F., Ferrer, J. L., Wagner, A., & Seemann, M. (2018). *Synthesis and Kinetic evaluation of an azido analogue of methylerythritol phosphate: a Novel Inhibitor of E. coli YgbP/IspD*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35586-y>

- Baird, G. S. (2010). *Where are all the aptamers? American Journal of Clinical Pathology*, 134(4), 529–531. <https://doi.org/10.1309/AJCPFU4CG2WGJJKS>
- Balconi, E., Pennati, A., Crobu, D., Pandini, V., Cerutti, R., Zanetti, G., & Aliverti, A. (2009). *The ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase/ferredoxin electron transfer system of Plasmodium falciparum. FEBS Journal*, 276(14), 3825–3836. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07100.x>
- Barfod, A., Persson, T., & Lindh, J. (2009). *In vitro selection of RNA aptamers against a conserved region of the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1. Parasitology Research*, 105(6), 1557–1566. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1583-x>
- Baumeister, S., Wiesner, J., Reichenberg, A., Hintz, M., Bietz, S., Harb, O. S., Roos, D. S., Kordes, M., Friesen, J., Matuschewski, K., Lingelbach, K., & Seeber, F. (2011). *Fosmidomycin Uptake into Plasmodium and Babesia-Infected Erythrocytes Is Facilitated by Parasite-Induced New Permeability Pathways*. 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019334>
- Baykov, A. A., Evtushenko, O. A., & Avaeva, S. M. (1988). *A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. Analytical Biochemistry*, 171(2), 266–270.
- Berezovski, M., Musheev, M., Drabovich, A., & Krylov, S. N. (2006). *Non-SELEX Selection of Aptamers. J. Am. Chem. Soc*; 128, 1410–1411.
- Berezovski, M. V, Musheev, M. U., Drabovich, A. P., Jitkova, J. V, & Krylov, S. N. (2006). *Non-SELEX: selection of aptamers without intermediate amplification of candidate oligonucleotides. Nat Protoc*, 1(3), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.200>
- Bernal, C., Palacin, C., Boronat, A., & Imperial, S. (2005). *A colorimetric assay for the determination of 4-diphosphocytidyl-2-C- methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase activity. In Analytical Biochemistry*; 337, 1, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.10.011>
- Biosca, A., Dirscherl, L., Moles, E., & Imperial, S. (2019). *An*

- ImmunoPEGliposome for Targeted Antimalarial Combination Therapy at the Nanoscale. Pharmaceutics*, 11(341), 1–19. <https://doi.org/doi:10.3390/pharmaceutics11070341>
- Björkelid, C., Bergfors, T., Henriksson, L. M., Stern, A. L., & Unge, T. (2011). Structural and functional studies of mycobacterial IspD enzymes. *Acta Cryst., D67*, 403–414.
- Black, R. E., Morris, S. S., & Bryce, J. (2003). Child survival I Where and why are 10 million children dying every year?. *The Lancet*, 361, 2226–2234.
- Boucher, Y., & Doolittle, W. F. (2000). MicroReview The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Molecular Microbiology*, 37(4), 703–716.
- Bowman, J. D., Merino, E. F., Brooks, C. F., Striepen, B., Carlier, P. R., & Cassera, M. B. (2014). Antiapicoplast and gametocytocidal screening to identify the mechanisms of action of compounds within the malaria box. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 811–819. <https://doi.org/10.1128/AAC.01500-13>
- Bracho, C., Romano, M., Garibaldi, L., Dunia, I., & Pérez, H. A. (2015). Ultraestructura e inmunocitoquímica del apicoplasto de los estadios eritrocíticos de *Plasmodium vivax*. In *Acta Microscopica*; 24, 1-40.
- Bridgford, J. L., Xie, S. C., Cobbold, S. A., Pasaje, C. F. A., Herrmann, S., Yang, T., Gillett, D. L., Dick, L. R., Ralph, S. A., Spillman, N. J., Tilley, L., & Dogovski, C. (2018). Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nature Communications*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06221-1>
- Bron, P. A., Heuston, S., Casey, P. G., Englert, N., Wiesner, J., Jomaa, H., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2008). Analysis of the Isoprenoid Biosynthesis Pathways in *Listeria monocytogenes* Reveals a Role for the Alternative 2-C-Methyl- D -Erythritol 4-Phosphate Pathway in Murine Infection. 76(11), 5392–5401. <https://doi.org/10.1128/IAI.01376-07>
- Brooks, C. F., Johnsen, H., van Dooren, G. G., Muthalagi, M., Lin, S. S., Bohne, W., Fischer, K., & Striepen, B. (2010). The *Toxoplasma* Apicoplast

- Phosphate Translocator Links Cytosolic and Apicoplast Metabolism and Is Essential for Parasite Survival. Cell Host and Microbe*, 7(1), 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.12.002>
- Brücher, K., Gräwert, T., Konzuch, S., Held, J., Lienau, C., Behrendt, C., Illarionov, B., Maes, L., Bacher, A., Wittlin, S., Mordmüller, B., Fischer, M., & Kurz, T. (2015). Prodrugs of reverse fosmidomycin analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(4), 2025–2035. <https://doi.org/10.1021/jm5019719>
- Brücher, K., Illarionov, B., Held, J., Tschan, S., Pein, M. K., Bacher, A., Gräwert, T., Maes, L., Fischer, M., & Kurz, T. (2012).  $\alpha$ -Substituted  $\beta$ -oxa isosteres of fosmidomycin: synthesis and biological evaluation. 55(14), 300652. <https://doi.org/10.1021/jm300652f>
- Castilho, P. C., Gouveia, S. C., & Rodrigues, A. I. (2008). Quantification of artemisinin in *Artemisia annua* extracts by  $^1\text{H-NMR}$ . *Phytochemical Analysis*, 19(4), 329–334. <https://doi.org/10.1002/pca.1053>
- Chakraborty, A. (2016). Understanding the biology of the *Plasmodium falciparum* apicoplast; an excellent target for antimalarial drug development. In *Life Sciences* (Vol. 158, pp. 104–110). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.06.030>
- Chan, C. W., Spathis, R., Reiff, D. M., McGrath, S. E., Garruto, R. M., & Lum, J. K. (2012). Diversity of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfCRT*) exon 2 haplotypes in the pacific from 1959 to 1979. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030213>
- Chang, C. (2021). Recent Advancements in Aptamer-Based Surface Plasmon Resonance Biosensing Strategies. *Biosensors (Basel)*, 11(233), 1–21. <https://doi.org/10.3390/bios11070233>
- Chang, H., Cheng, T., & Wang, A. H. (2021). Structure , catalysis , and inhibition mechanism of prenyltransferase. *IUBMB Life*, 73, 40–63. <https://doi.org/10.1002/iub.2418>
- Chanthap, L., Arie, F., Socheat, D., Tsuyuoka, R., & Bell, D. (2010). Low-technology cooling box for storage of malaria RDTs and other medical supplies in remote areas. *Malaria Journal*, 9(1), 1–7.

<https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-31>

- Chaudhari, R., Dey, V., Narayan, A., Sharma, S., & Patankar, S. (2017). Membrane and luminal proteins reach the apicoplast by different trafficking pathways in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PeerJ*, 2017(4). <https://doi.org/10.7717/peerj.3128>
- Chen, Z. W. (2013). Multifunctional immune responses of HMBPP-specific V $\alpha$ 2V $\beta$ 2 T cells in *M. tuberculosis* and other infections. *Cellular and Molecular Immunology*, 10(8), 58–64. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.46>
- Cheng, C., Chen, Y. H., Lennox, K. A., Behlke, M. A., & Davidson, B. L. (2013). In vivo SELEX for identification of brain-penetrating aptamers. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2(11), e67. <https://doi.org/10.1038/mtna.2012.59>
- Cheung, Y. W., Kwok, J., Law, A. W. L., Watt, R. M., Kotaka, M., & Tanner, U. A. (2013). Structural basis for discriminatory recognition of *Plasmodium lactate dehydrogenase* by a DNA aptamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), 15967–15972. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309538110>
- Chofor, R., Sooriyaarachchi, S., Risseeuw, M. D. P., & Pouyez, J. (n.d.). Synthesis and bioactivity of  $\beta$ -aryl-substituted fosmidomycin analogues targeting 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase. *Journal of Medical Chemistry*; 58(7). 2988-3001. <http://hdl.handle.net/1854/LU-5957369>.
- Choi, S. J., & Ban, C. (2016). Crystal structure of a DNA aptamer bound to PvLDH elucidates novel single-stranded DNA structural elements for folding and recognition. *Scientific Reports*, 6(September), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep34998>
- Christianson, D. W. (2017). Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chemical Reviews*, 117, 11570–11648. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00287>
- Civit, L., Theodorou, I., Frey, F., Weber, H., Lingnau, A., Gröber, C., Blank, M., Dambrune, C., Stunden, J., Beyer, M., Schultze, J., Latz, E., Ducongé, F., Kubbutat, M. H. G., & Mayer, G. (2019). Targeting hormone refractory

- prostate cancer by *in vivo* selected DNA libraries in an orthotopic xenograft mouse model. *Scientific Reports*, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41460-2>
- Clancy, C. J., & Hong Nguyen, M. (2020). Coronavirus disease 2019, superinfections, and antimicrobial development: What can we expect? *Clinical Infectious Diseases*, 71(10), 2736–2743. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa524>
- Clarke, A. (2022). The thermal limits to life on Earth. 13(2), 141–154. <https://doi.org/10.1017/S1473550413000438>
- Cline, J., Braman, J. C., & Hogrefe, H. H. (1996). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 24(18), 3546–3551. <https://doi.org/10.1093/nar/24.18.3546>
- Cobb, R. E., Bae, B., Li, Z., Desieno, M. A., Nair, S. K., & Zhao, H. (2015). Structure-guided design and biosynthesis of a novel FR-900098 analogue as a potent *Plasmodium falciparum* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (Dxr) inhibitor. *Chemical Communications*, 51(51), 2526–2528. <https://doi.org/10.1039/c4cc09181g>
- Cohen, J., Dupas, P., & Schaner, S. (2015). Price subsidies, diagnostic tests, and targeting of malaria treatment: Evidence from a randomized controlled trial. *American Economic Review*, 105(2), 609–645. <https://doi.org/10.1257/aer.20130267>
- Contreras-Ochoa, C., & Ramsey, J. M. (2004). Gametocitos de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*: etapas relegadas en el desarrollo de vacunas. *Salud Pública de México*, 46(1), 64–70. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342004000100009>
- Cowman, A. F., Berry, D., & Baum, J. (2012). The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *Journal of Cell Biology*. 198; 6, 961–971 [www.jc](http://www.jc) <https://doi.org/10.1083/jcb.201206112>
- Cranmer, S. L., Magowan, C., Liang, J., Coppel, R. L., & Cooke, B. M. (1997). An alternative to serum for cultivation of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(3),

363–365. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(97\)90110-3](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(97)90110-3)

- Cristobal Bernal, Celia Palacin, Albert Boronat, S. I. (2005). A colorimetric assay for the determination of 4-diphosphocytidyl-2- C -methyl- D -erythritol 4-phosphate synthase activity. *Analytical Biochemistry*, 337(1), 55–61.
- Dahl, E. L., & Rosenthal, P. J. (2007). Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3485–3490. <https://doi.org/10.1128/AAC.00527-07>
- Dai, S., Wan, T., Wang, B., Zhou, X., Xiu, F., Chen, T., Wu, Y., & Cao, X. (2005). More efficient induction of HLA-A\*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA) - Specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. *Clinical Cancer Research*, 11(20), 7554–7563. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0810>
- David S Roos, Michael J Crawford, Robert G K Donald, Jessica C Kissinger, Leszek J Klimczak, B. S. (1999). Origin , targeting , and function of the apicomplexan plastid. *Current Opinion in Microbiology*, 2(4), 426–432. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80075-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80075-7).
- Davies, D. R., Gelinias, A. D., Zhang, C., Rohloff, J. C., Carter, J. D., O'Connell, D., Waugh, S. M., Wolk, S. K., Mayfield, W. S., Burgin, A. B., Edwards, T. E., Stewart, L. J., Gold, L., Janjic, N., & Jarvis, T. C. (2012). Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(49), 19971–19976. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213933109>
- de Kraker, M. E. A., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Medicine*, 13(11), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
- De Niz, M., Stanway, R. R., Wacker, R., Keller, D., & Heussler, V. T. (2016). An ultrasensitive NanoLuc-based luminescence system for monitoring *Plasmodium berghei* throughout its life cycle. *Malaria Journal*, 15(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1291-9>

- Deng, L. (2013). *Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase by Lipophilic*. *J Med Chem.* 54(13), 4721–4734. <https://doi.org/10.1021/jm200363d.Inhibition>
- Deng, L., Endo, K., Kato, M., Cheng, G., Yajima, S., & Song, Y. (2011). *Structures of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase/lipophilic phosphonate complexes*. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2(2), 165–170. <https://doi.org/10.1021/ml100243r>
- Desai, S. A. (2015). *How do antimalarial drugs reach their intracellular targets ?*. *Frontiers in Pharmacology*; 6(May), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00091>
- Dhiman, R. K., Schaeffer, M. L., Bailey, A. M., Testa, C. A., Scherman, H., & Crick, D. C. (2005). *1-Deoxy- D -Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase ( IspC ) from Mycobacterium tuberculosis: towards Understanding Mycobacterial Resistance to Fosmidomycin*. *Journal of Bacteriology*; 187(24), 8395–8402. <https://doi.org/10.1128/JB.187.24.8395>
- Diao, J., & Cai, G. (2013). *Antimalarial and Structural Studies of Pyridine-Containing Inhibitors of 1- Deoxyxylulose-5-phosphate Reductoisomerase*. *Med. Chem. Lett.* 4, 278–282. <https://doi.org/10.1021/ml300419r>
- Dirkzwager, R. M., Kinghorn, A. B., Richards, J. S., & Tanner, J. A. (2015). *APTEC: Aptamer-tethered enzyme capture as a novel rapid diagnostic test for malaria*. *Chemical Communications*, 51(22), 4697–4700. <https://doi.org/10.1039/c5cc00438a>
- Dougan, H., Lyster, D. M., Vo, C. V., Stafford, A., Weitz, J. I., & Hobbs, J. B. (2000). *Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood*. *Nuclear Medicine and Biology*, 27(3), 289–297. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(99\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(99)00103-1)
- Drabovich A, B. M., Krylov, S. N., Krylov', S. articles by 'Sergey N., & SN, K. (2005). *Selection of smart aptamers by equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures ( ECEEM )*. *Journal of the American Chemical Society*, 127(32), 11224–11225. <https://doi.org/10.1021/ja0530016>
- Duff, M. R., Grubbs, J., & Howell, E. E. (2011). *Isothermal titration calorimetry*

- for measuring macromolecule-ligand affinity. *Journal of Visualized Experiments*, 55, e2796, 1-4. <https://doi.org/10.3791/2796>
- Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
- Takahashi S., Kuzuyama T., Watanabe H., and Seto H. (1998). A 1-deoxy- D - xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2- C - methyl- D -erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(August), 9879–9884.
- Eubanks, L. M. and P. D. C. (2003). *Rhodobacter capsulatus* 1-Deoxy- D - xylulose 5- Phosphate Synthase : Steady-State Kinetics and Substrate Binding. *Biochemistry*, 42(4), 1140–1149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bi0205303>
- Fatih, F. A., Staines, H. M., Siner, A., Ahmed, M. A., Woon, L. C., Pasini, E. M., Kocken, C. H., Singh, B., Cox-Singh, J., & Krishna, S. (2013). Susceptibility of human *Plasmodium knowlesi* infections to anti-malarials. *Malaria Journal*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-425>
- Rohdich F., Eisenreich W., Wungsintaweekul J., Hecht S., C. A. S. and A. B. (2001). Biosynthesis of terpenoids. 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodiumfalciparum*. *European Journal of Biochemistry*, 268, 3190–3197. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_121](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_121)
- Rohdich F., Kis K., Bacher A., Eisenreich W.(2001). The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes , enzymes and intermediates. *Current Opinion in Chemical Biology*; 5, 5, 535-540. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00240-4](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00240-4).
- Figueroa-Miranda, G., Feng, L., Shiu, S. C. C., Dirkwager, R. M., Cheung, Y. W., Tanner, J. A., Schöning, M. J., Offenhäusser, A., & Mayer, D. (2018). Aptamer-based electrochemical biosensor for highly sensitive and selective malaria detection with adjustable dynamic response range and reusability. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 255, 235–243.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.117>

Foth, B. J., & McFadden, G. I. (2003). *The apicoplast: A plastid in Plasmodium falciparum and other apicomplexan parasites*. *Int Rev Cytol*, 224, 57–110. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)24003-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)24003-2)

Fraser, L. A., Kinghorn, A. B., Dirkzwager, R. M., Liang, S., Cheung, Y. W., Lim, B., Shiu, S. C. C., Tang, M. S. L., Andrew, D., Manitta, J., Richards, J. S., & Tanner, J. A. (2018). *A portable microfluidic Aptamer-Tethered Enzyme Capture (APTEC) biosensor for malaria diagnosis*. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.001>

Frith, K. A., Fogel, R., Goldring, J. P. D., Krause, R. G. E., Khati, M., Hoppe, H., Cromhout, M. E., Jiwaji, M., & Limson, J. L. (2018). *Towards development of aptamers that specifically bind to lactate dehydrogenase of Plasmodium falciparum through epitopic targeting*. *Malaria Journal*, 17(191), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2336-z>

Froger, A., & Hall, J. E. (2007). *Transformation of Plasmid DNA into E. Coli using the heat shock method*. *Journal of Visualized Experiments*, 6, 2007. <https://doi.org/10.3791/253>

Gabrielsen, M., Kaiser, J., Rohdich, F., Eisenreich, W., Laupitz, R., Bacher, A., Bond, C. S., & Hunter, W. N. (2006). *The crystal structure of a plant 2 C -methyl- D -erythritol 4-phosphate cytidyltransferase exhibits a distinct quaternary structure compared to bacterial homologues and a possible role in feedback regulation for cytidine monophosphate*. *FEBS Journal*, 273, 1065–1073. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05133.x>

Gabrielsen, M., Rohdich, F., Eisenreich, W., Gräwert, T., Hecht, S., Bacher, A., & Hunter, W. N. (2004). *Biosynthesis of isoprenoids*. *European Journal of Biochemistry*, 271(14), 3028–3035. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04234.x>

Gachelin, G., Garner, P., Ferroni, E., Tröhler, U., & Chalmers, I. (2017). *Evaluating Cinchona bark and quinine for treating and preventing malaria*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 110(1), 31–40. <https://doi.org/10.1177/0141076816681421>

- Gao, P., Yang, Y., Xiao, C., Liu, Y., & Gan, M. (2012). Identification and validation of a novel lead compound targeting 4- methylerythritol synthetase ( IspD ) of mycobacteria. *Eur J Pharmacol.* 694 (1-3):45-52. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.08.012>
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., ... Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906), 498–511. <https://doi.org/10.1038/nature01097>
- Gitta, B., & Kilian, N. (2020). Diagnosis of Malaria Parasites *Plasmodium spp .* in Endemic Areas : Current Strategies for an Ancient Disease. *BioEssays*; 42, 1, 1–12. <https://doi.org/10.1002/bies.201900138>
- Godonoga, M., Lin, T.-Y., Oshima, A., Sumitomo, K., Tang, M. S. L., Cheung, Y.-W., Kinghorn, A. B., Dirkzwager, R. M., Zhou, C., Kuzuya, A., Tanner, J. A., & Heddle, J. G. (2016). A DNA aptamer recognising a malaria protein biomarker can function as part of a DNA origami assembly. *Scientific Reports.* 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep21266>
- Goldberg, D. E., & Sigala, P. A. (2017). *Plasmodium* heme biosynthesis : To be or not to be essential?. *PLoS Pathog* 13(9): e1006511. 1-6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006511>.
- González, D., & González Pacanowska, D. (2005). Nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la malaria. *Enf Emerg*; ;7(1), 40-43.
- Goodman, C. D., & McFadden, G. I. (2013). Targeting apicoplasts in malaria parasites. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets*; 17 (2), 167–177. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.739158>
- Guasch-Girbau, A. (2021). Review of the Current Landscape of the Potential of Nanotechnology for Future Malaria Diagnosis , Treatment , and Vaccination Strategies. *Pharmaceutics*, 13(2189), 1–26. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122189>
- Guggisberg, A. M., Amthor, R. E., & Odom, A. R. (2014). Isoprenoid

- biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell*, 13(11), 1348–1359. <https://doi.org/10.1128/EC.00160-14>
- Gupta, A., Anand, A., Jain, N., Goswami, S., Anantharaj, A., Patil, S., Singh, R., Kumar, A., Shrivastava, T., Bhatnagar, S., & Medigeshi, G. R. (2021). A novel G-quadruplex aptamer-based spike trimeric antigen test for the detection of SARS-CoV-2. *Molecular Therapy: Nucleic Acid*, 26(December), 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.06.014>
- Hand, C. C., & Meshnick, S. R. (2011). Is chloroquine making a comeback?. *Journal of Infectious Diseases*, 203(1), 11–12. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq002>
- Handa, S., Ramamoorthy, D., Spradling, T. J., Guida, W. C., Adams, J. H., Bendinskas, K. G., & Merkler, D. J. (2013). Production of recombinant 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase from *Plasmodium vivax* in *Escherichia coli*. *FEBS Open Bio*, 3, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.01.007>
- He, C. Y., Shaw, M. K., Pletcher, C. H., Striepen, B., Tilney, L. G., & Roos, D. S. (2001). A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *PNAS*, 98(3), 330–339.
- Heath, R. J., Yu, Y. T., Shapiro, M. A., Olson, E., & Rock, C. O. (1998). Broad spectrum antimicrobial biocides target the *FabI* component of fatty acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30316–30320. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30316>
- Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D., & Rohdich, F. (2001). Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE ( *IspG* ) protein. *PNAS*, 98(26), 14837–14842.
- Hellman, L. M., & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, 2(8), 1849–1861. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>
- Hemben, A., & Ashley, J. (2017). Development of an Immunosensor for Pf HRP 2 as a Biomarker for Malaria Detection. *Biosensors*, 7(28), 1–14.

<https://doi.org/10.3390/bios7030028>

Henkel, S., Frohnecke, N., Maus, D., McConville, M. J., Laue, M., Blume, M., & Seeber, F. (2022). *Toxoplasma gondii* apicoplast-resident ferredoxin is an essential electron transfer protein for the MEP isoprenoid-biosynthetic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 298(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101468>

Hernandez, J. A., Castro, V. L., Reyes-nava, N., Montes, L. P., & Quintana, A. M. (2019). Mutations in the zebra fi sh *hmgcs1* gene reveal a novel function for isoprenoids during red blood cell development. *Blood Advances*, 3(8), 1244–1254. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018024539>

Heuston, S., Begley, M., Davey, M., Eberl M., Casey P., Hill C. and Gahan, C. (2012). *HmgR* , a key enzyme in the mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis , is essential for growth of *Listeria monocytogenes* EGDe. *Microbiology*, 158, 1684–1693. <https://doi.org/10.1099/mic.0.056069-0>

Howe, R., Kelly, M., Jimah, J., Hodge, D., & Odom, R. (2013). Isoprenoid Biosynthesis Inhibition Disrupts Rab5 Localization and Food Vacuolar Integrity in *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell*; 12(2), 215–223. <https://doi.org/10.1128/EC.00073-12>

Hsu, E. (2006a). Reflections on the “discovery” of the antimalarial qinghao. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 61(6), 666–670. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02673.x>

Hsu, E. (2006b). The history of qing hao in the Chinese materia medica. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(6), 505–508. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.09.020>

Hu, L., Yang X., Rong X., Huang X., Yu P., He Z., and Liu Y. (2021). Combination of AgNPs and Domiphen is Antimicrobial Against Biofilms of Common Pathogens. *International Journal of Nanomedicine*, 16(October), 7181–7194. <https://doi.org/10.2147/IJN.S334133>.

Huang, R. H., Fremont, D. H., Diener, J. L., Schaub, R. G., & Sadler, J. E. (2009). A Structural Explanation for the Antithrombotic Activity of ARC1172, a DNA Aptamer that Binds von Willebrand Factor Domain A1. *Structure*,

17(11), 1476–1484. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.09.011>

IACG. (2019). *No Time To Wait: Securing the Future From Drug-Resistant Infections. Report To the Secretary-General of the United Nations April 2019, 2.* <https://www.who.int/publications/i/item/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections>

Imlay, L. S., Armstrong, C. M., Masters, M. C., Li, T., Kathryn, E., Edwards, R. L., Mann, K. M., Li, L. X., Stallings, C. L., Neil, G., Neill, P. M. O., & Odom, A. R. (2016). *Plasmodium IspD (2-C-Methyl-D-erythritol 4-Phosphate Cytidyltransferase), an Essential and Druggable Antimalarial Target.* *ACS Infect Dis.* 1(4), 157–167. <https://doi.org/10.1021/id500047s>.

Jain, P., Chakma, B., Singh, N. K., Patra, S., & Goswami, P. (2016). *Aromatic Surfactant as Aggregating Agent for Aptamer-Gold Nanoparticle-Based Detection of Plasmodium Lactate Dehydrogenase.* *Molecular Biotechnology*, 58(7), 497–508. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9946-x>

Jain, S. K., Jain, J., Singha, S. K., & Shariat-Madar, Z. (2018). *Revisiting Malaria Elimination: Prevention, Diagnosis and Treatment.* *EC Pharmacology and Toxicology*; 6.4, 216-227.

Janouškovec, J., Tikhonenkov, D. V., Burki, F., Howe, A. T., Kolísko, M., Mylnikov, A. P., & Keeling, P. J. (2015). *Factors mediating plastid dependency and the origins of parasitism in apicomplexans and their close relatives.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), 10200–10207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423790112>

Jaramillo-Arango, J. (1949). *A Critical Review of the Basic Facts in the History of Cinchona.* *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 53(352), 272–311. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1949.tb00419.x>

Jayasena, S. D. (1999). *Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies.* *Clinical Chemistry*, 45(9), 1628–1650. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.74>

Jenison, R., Good, G., & Pardi, A. (1994). *High-Resolution Molecular Discrimination by RNA.* *Sci*, 263(11), 1425–1429.

<https://doi.org/10.1126/science.7510417>

- Jeon, W., Lee, S., Dh, M., & Ban, C. (2013). A colorimetric aptasensor for the diagnosis of malaria based on cationic polymers and gold nanoparticles. *Analytical Biochemistry*, 439(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.03.032>
- Jérôme de Ruyck, Johan Wouters, and C. D. P. (2011). Inhibition Studies on Enzymes Involved in Isoprenoid Biosynthesis: Focus on Two Potential Drug Targets: DXR and IDI-2 Enzymes. *Curr Enzym Inhib.* 7(2). <https://doi.org/10.2174/157340811796575317>.Inhibition
- Jing, M., & Bowser, M. T. (2011). Methods for measuring aptamer-protein equilibria: A review. In *Analytica Chimica Acta*; 686, 1–2, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.032>
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., & Hintz, M. (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, 285(5433), 900098. <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1573>
- Joseph, D. F., Nakamoto, J. A., Garcia Ruiz, O. A., Peñaranda, K., Sanchez-Castro, A. E., Castillo, P. S., & Milón, P. (2019). DNA aptamers for the recognition of HMGB1 from *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE*, 14(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211756>
- Jürgen Bongs et al. (1997). Continuous production of erythrose using transketolase in a membrane reactor. *Biotechnology Letters*, 19(March), 213–216.
- Kalra, P., Dhiman, A., Cho, W. C., Bruno, J. G., & Sharma, T. K. (2018). Simple Methods and Rational Design for Enhancing Aptamer Sensitivity and Specificity. *Frontiers in Molecular Biosciences*; 5(41), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00041>
- Karlsen, K. K., & Wengel, J. (2012). Locked nucleic acid and aptamers. *Nucleic Acid Therapeutics*, 22(6), 366–370. <https://doi.org/10.1089/nat.2012.0382>
- Katilius, E., Flores, C., & Woodbury, N. W. (2007). Exploring the sequence

- space of a DNA aptamer using microarrays. *Nucleic Acids Research*; 35(22), 7626–7635. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm922>
- Kaur, H., Bruno, J. G., Kumar, A., & Sharma, T. K. (2018). Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines. *In Theranostics* 8, 15,4016–4032. <https://doi.org/10.7150/thno.25958>
- Kemp, L. E., Bond, C. S., & Hunter, W. N. (2003). Structure of a tetragonal crystal form of *Escherichia coli* 2-C-methyl-D- erythritol 4-phosphate cytidyltransferase. *Acta Cryst.*, D59(April 2003), 607–610. <https://doi.org/10.1107/S090744490202365X>
- Kennedy, K., Cobbold, S. A., Hanssen, E., Birnbaum, J., Spillman, N. J., McHugh, E., Brown, H., Tilley, L., Spielmann, T., McConville, M. J., & Ralph, S. A. (2019). Delayed death in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is caused by disruption of prenylation-dependent intracellular trafficking. *PLoS Biology*, 17(7), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000376>
- Kim, J., Lim, D. H., Mihn, D., Nam, J., Jang, W. S., & Lim, C. S. (2021). Clinical Usefulness of LabChip Real-Time PCR Using Lab-On-a-Chip Technology for Diagnosing Malaria. *Korean J Parasitol*, 59(1), 77–82. <https://doi.org/10.3347/kjp.2021.59.1.77>.
- Koram, K. A., & Molyneux, M. E. (2007). When is “malaria” malaria? The different burdens of malaria infection, malaria disease, and malaria-like illnesses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(SUPPL. 6), 1–5. [https://doi.org/77/6\\_Suppl/1](https://doi.org/77/6_Suppl/1) [pii]
- Krampa, F. D., Aniweh, Y., & Kanyong, P. (2020). Recent Advances in the Development of Biosensors for Malaria Diagnosis. *Sensors*, 20(799), 1–21. <https://doi.org/doi:10.3390/s20030799>
- Kuntz, L., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C., Hemmerlin, A., Willem, A., Bach, T. J., & Rohmer, M. (2005). Isoprenoid biosynthesis as a target for antibacterial and antiparasitic drugs: phosphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase. *In Biochem. J*, 386, 127–135. <https://doi.org/DOI 10.1042/BJ20041378>

- Lakhin, A. V, Tarantul, V. Z., & Gening, L. V. (2013). *Aptamers: Problems, Solutions and Prospects. Acta Naturae; 5 (19), 34-43.*  
<http://aptamer.icmb.utexas.edu>
- Lanaspa, M., Moraleda, C., Machevo, S., González, R., Serrano, B., Macete, E., & Cisteró, P. (2012). *Inadequate Efficacy of a New Formulation of Fosmidomycin- Clindamycin Combination in Mozambican Children Less than Three Years Old with Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 56(6), 2923–2928.*  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00018-12>
- Lantero, E., Belavilas-Trovas, A., Biosca, A., Recolons, P., Moles, E., Sulleiro, E., Zarzuela, F., Ávalos-Padilla, Y., Ramírez, M., & Fernández-Busquets, X. (2020). *Development of DNA Aptamers Against Plasmodium falciparum Blood Stages Using Cell-Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment. Journal of Biomedical Nanotechnology, 16(3), 315–334.*  
<https://doi.org/10.1166/jbn.2020.2901>
- Ledermann D., W., & Valle B., G. (2009). *Ética E Investigación En La Historia De La Malaria. Revista Chilena de Infectología, 26(5), 466–471.*  
<https://doi.org/10.4067/s0716-10182009000600014>
- Lee, S., Manjunatha, D. H., Jeon, W., & Ban, C. (2014). *Cationic surfactant-based colorimetric detection of Plasmodium lactate dehydrogenase, a biomarker for malaria, using the specific DNA aptamer. PLoS ONE, 9(7).*  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100847>
- Lell, B., Ruangweerayut, R., Wiesner, J., Missinou, M. A., Schindler, A., Baranek, T., Hintz, M., Hutchinson, D., Jomaa, H., & Kremsner, P. G. (2003). *Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(2), 735–738.*  
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.735-738.2003>
- Lijuan, C. (2017). *Development of an aptamer-ampicillin conjugate for treating biofilms. Biochemical and Biophysical Research Communication; 483(2), 847–854.*
- Lim, L., & McFadden, G. I. (2010). *The evolution, metabolism and functions of*

- the apicoplast. In Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences; 365,1541, 749–763. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0273>*
- Lim, L., Sayers, C. P., Goodman, C. D., & McFadden, G. I. (2016). Targeting of a transporter to the outer apicoplast membrane in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159603>
- Lim, T. S., Schütze, T., Lehrach, H., Glökler, J., & Konthur, Z. (2011). Diversity visualization by endonuclease: A rapid assay to monitor diverse nucleotide libraries. *Analytical Biochemistry*, 411(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.12.024>
- López, A. C., Quan, J. C., Mejía, R. E., Banegas, E., & Fontecha, G. (2012). Comparación de gota gruesa y PCR para la detección de infecciones maláricas en Honduras. *Revista Ciencia y Tecnología*, 0(9), 68–81. <https://doi.org/10.5377/rct.v0i9.708>
- Lorenz, C., Gesell, T., Zimmermann, B., Schoeberl, U., Bilusic, I., Rajkowitsch, L., Waldsich, C., von Haeseler, A., & Schroeder, R. (2010). Genomic SELEX for Hfq-binding RNAs identifies genomic aptamers predominantly in antisense transcripts. *Nucleic Acids Research*, 38(11), 3794–3808. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq032>
- Lorenz, Christina, von Pelchrzim, F., & Schroeder, R. (2006). Genomic systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Genomic SELEX) for the identification of protein-binding RNAs independent of their expression levels. *Nature Protocols*, 1(5), 2204–2212. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.372>
- Lou, X., Qian, J., Xiao, Y., Viel, L., Gerdon, A. E., Lagally, E. T., & Atzberger, P. (2009). Micromagnetic selection of aptamers in microfluidic channels. *PNAS*, 106(9), 2989–2994. <https://doi.org/doi/10.1073/pnas.0813135106>
- Lyth, O., Vizcay-Barrena, G., Wright, K. E., Haase, S., Mohring, F., Najer, A., Henshall, I. G., Ashdown, G. W., Bannister, L. H., Drew, D. R., Beeson, J. G., Fleck, R. A., Moon, R. W., Wilson, D. W., & Baum, J. (2018). Cellular

- dissection of malaria parasite invasion of human erythrocytes using viable *Plasmodium knowlesi* merozoites. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28457-z>
- MacKinnon, M. C., Sargeant, J. M., Pearl, D. L., Reid-Smith, R. J., Carson, C. A., Parmley, E. J., & McEwen, S. A. (2020). Evaluation of the health and healthcare system burden due to antimicrobial-resistant *Escherichia coli* infections in humans: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00863-x>
- Malico, A. A. (2021). Synthetic Biology, Combinatorial Biosynthesis, and Chemo\_Enzymatic Synthesis of Isoprenoids. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 47(9–10), 675–702. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02306-3>. Synthetic
- Mandel, M. A., Feldmann, K. A., Herrera-estrella, L., Rocha-sosa, M., & Lebn, P. (2001). CLA 1 , a novel gene required for chloroplast development , is highly conserved in evolution. *The Plant Journal*, 9(1996), 649–658.
- Maomian Fan, Shelly Roper McBurnett, Carrie J. Andrew, Amity M. Allman, J. G. B. and J. L. K. (2008). Aptamer Selection Express A Novel Method for Rapid Single Step Selection. *Journal of Biomolecular Techniques*, 19, 311–321.
- Marõ, L., Lois, Â., Rodrõ Águez-Concepcio, M., Gallego, F., Campos, N., & Boronat, A. (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal*, 22(6), 503–513.
- Maryam Ghavami. (2018). S Public AcBiological Studies and Target Engagement of the 2-C-Methyl-D- Erythritol 4-Phosphate Cytidylyltransferase (IspD)-Targeting Antimalarial Agent (1R,3S)-MMV008138 and Analogs. *ACS Infect Dis.*, 4(4), 549–559. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Masini, T., & Hirsch, A. K. H. (2014). Development of inhibitors of the 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway enzymes as potential anti-infective agents. In *Journal of Medicinal Chemistry*; 57, 23, 9740–9763.

<https://doi.org/10.1021/jm5010978>

Mathews, E. S., & Jezewski, A. J. (2021). Protein Prenylation and Hsp40 in Thermotolerance of *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites. *mBio*. 12, June, 1–18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00760-21>. Editor

Mathews, E. S., & Odom John, A. R. (2018). Tackling resistance: emerging antimalarials and new parasite targets in the era of elimination. *F1000Research*, 7(0), 1170. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14874.1>

Mccormick, A. M., Jarmusik, N. A., Endrizzi, E. J., & Leipzig, N. D. (2014). Expression , Isolation , and Purification of Soluble and Insoluble Biotinylated Proteins for Nerve Tissue Regeneration. *Bioengineering*; 83, e51295. <https://doi.org/10.3791/51295>

Mckenney, E. S., Sargent, M., Khan, H., Uh, E., Jackson, E. R., Jose, S., Couch, R. D., Dowd, C. S., & Hoek, M. L. Van. (2012). Lipophilic Prodrugs of FR900098 Are Antimicrobial against *Francisella novicida* In Vivo and In Vitro and Show GlpT Independent Efficacy. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038167>

Ménard, S., Haddou, T. Ben, Ramadani, A. P., Ariey, F., Iriart, X., Beghain, J., Bouchier, C., Witkowski, B., Berry, A., Mercereau-Puijalon, O., & Benoit-Vical, F. (2015). Induction of multidrug tolerance in *Plasmodium falciparum* by extended artemisinin pressure. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1733–1741. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150682>

Minopoli, A., Della Ventura, B., Campanile, R., Tanner, J. A., Offenhäusser, A., Mayer, D., & Velotta, R. (2021). Randomly positioned gold nanoparticles as fluorescence enhancers in apta-immunosensor for malaria test. *Microchimica Acta*, 188(3). <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04746-9>

Misono T. & Kumar P. (2005). Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance. *Anal Biochem*. 342(2), 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.04.013>

Misic, A. M., Cain, C. L., Morris, D. O., Rankin, S. C., & Beiting, D. P. (2016). Divergent Isoprenoid Biosynthesis Pathways in *Staphylococcus* Species

- Constitute a Drug Target for Treating Infections in Companion Animals* .  
*MSphere*, 1(5), 1–11. <https://doi.org/10.1128/msphere.00258-16>
- Miyachi, Y., Shimizu, N., Ogino, C., & Kondo, A. (2010). Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research*, 38(4), 1–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1101>
- Mombo-Ngoma, G., Remppis, J., Sievers, M., Zoleko Manego, R., Endamne, L., Kabwende, L., Veletzky, L., Nguyen, T. T., Groger, M., Lötsch, F., Mischlinger, J., Flohr, L., Kim, J., Cattaneo, C., Hutchinson, D., Duparc, S., Moehrle, J., Velavan, T. P., Lell, B., ... Kremsner, P. G. (2018). Efficacy and Safety of Fosmidomycin-Piperaquine as Nonartemisinin-Based Combination Therapy for Uncomplicated *Falciparum* Malaria: A Single-Arm, Age De-escalation Proof-of-Concept Study in Gabon. *Clinical Infectious Diseases*, 66(12), 1823–1830. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1122>
- Montoya, A. E., Menco, J., Osorio, N., Zuluaga, M. A., Duque, J., Torres, G., & Restrepo, M. (2008). Concordancia entre gota gruesa , inmunocromatografía y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de malaria. *Biomédica*, 28, 252–261.
- Mueller, C., Schwender, J., Zeidler, J., & Lichtenthaler, H. K. (2000). Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Biochemical Society Transactions*, 28(6), 792–793. <https://doi.org/10.1042/bst0280792>
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Informe Mundial sobre el Paludismo 2016 - Resumen. <http://apps.who.int/bookorders>.
- Munos, J. W., Pu X., Mansoorabadi S. Kim H., and Liu H. (2009). A Secondary Kinetic Isotope Effect Study of the 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase-Catalyzed Reaction: Evidence for a Retroaldol-Aldol Rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(6), 2048–2049.
- Muñoz, J., Rojo-Marcos, G., Ramírez-Olivencia, G., Salas-Coronas, J., Treviño, B., Perez Arellano, J. L., Torrús, D., Muñoz Vilches, M. J., Ramos, J. M., Alegría, I., López-Vélez, R., Aldasoro, E., Perez-Molina, J. A., Rubio, J. M., & Bassat, Q. (2015). Diagnosis and treatment of imported malaria in Spain:

- Recommendations from the Malaria Working Group of the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health (SEM-TSI). In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 33, 6, 1–13. Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.12.014>
- Murkin, A. S., Manning, K. A., & Kholodar, S. A. (2014). Mechanism and inhibition of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase. *Bioorganic Chemistry*, 57, 171–185. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.06.001>
- Nag, S., Kofoed, P. E., Ursing, J., Lemvigh, C. K., Allesøe, R. L., Rodrigues, A., Svendsen, C. A., Jensen, J. D., Alifrangis, M., Lund, O., & Aarestrup, F. M. (2018). Direct whole-genome sequencing of *Plasmodium falciparum* specimens from dried erythrocyte spots. *Malaria Journal*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2232-6>
- Nair, S. C., Brooks, C. F., Goodman, C. D., Strurm, A., McFadden, G. I., Sundriyal, S., Anglin, J. L., Song, Y., Moreno, S. N. J., & Striepen, B. (2011). Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Experimental Medicine*, 208(7), 1547–1559. <https://doi.org/10.1084/jem.20110039>
- Ndayisaba, G., Yeka, A., Asante, K. P., Grobusch, M. P., Karita, E., & Mugerwa, H. (2021). Hepatic safety and tolerability of cipargamin ( KAE609 ), in adult patients with *Plasmodium falciparum* malaria: a randomized , phase II , controlled , dose - escalation trial in sub - Saharan Africa. *Malaria Journal*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-04009-1>
- Neill, J. O. ' . (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. Uk Government; (Issue December), 1-17.*
- Nishida, M. (1982). Pharmacokinetics of Fosmidomycin, a New Phosphonic Acid Antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21(2), 224–230.
- Nitsche, A., Kurth, A., Dunkhorst, A., Pänke, O., Sielaff, H., Junge, W., Muth, D., Scheller, F., Stöcklein, W., Dahmen, C., Pauli, G., & Kage, A. (2007). One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX. *BMC Biotechnology*, 7(48), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-48>

- Noedl, H., Se, Y., Schaecher, K., Smith, B. L., Socheat, D., & Mark, M. (2008). Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med.*, 359(24), 2619–2620. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0805011>
- Tucker, W., Shum K., Tanner, J. (2012). G-quadruplex DNA Aptamers and their Ligands: Structure, Function and Application. In *Current Pharmaceutical Design*. 18, 14, 2014–2026. <https://doi.org/10.2174/138161212799958477>
- O'Rourke, P. E., Kalinowska-Tłuścik, J., Fyfe, P. K., Dawson, A., & Hunter, W. N. (2014). Crystal structures of IspF from *Plasmodium falciparum* and *Burkholderia cenocepacia*: Comparisons inform antimicrobial drug target assessment. *BMC Structural Biology*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-14-1>
- Obiol-Pardo, C., Rubio-Martinez, J., & Imperial, S. (2011). The methylerythritol phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis as a target for the development of new drugs against tuberculosis. *Current Medicinal Chemistry*, 18(9), 1325–1338.
- Olesenlarsen, S. (2012). Development and evaluation of a multiplex screening assay for *Plasmodium falciparum* exposure. *Journal of Immunological Methods*, 384(1–2), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.07.009>.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Requesting malaria strategy 2016-2030. 1-13. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186671/1/9789243564999\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186671/1/9789243564999_spa.pdf)
- Ospina-Villa, J. D., López-Camarillo, C., Castañón-Sánchez, C. A., Soto-Sánchez, J., Ramírez-Moreno, E., & Marchat, L. A. (2018). Advances on aptamers against protozoan parasites. In *Genes*; 9, 584, 1–15. <https://doi.org/10.3390/genes9120584>
- Pagano, B., Mattia, C. A., & Giancola, C. (2009). Applications of isothermal titration calorimetry in biophysical studies of G-quadruplexes. In *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 7, 2935–2957. <https://doi.org/10.3390/ijms10072935>
- Paloque, L., Ramadani, A. P., Mercereau-Puijalon, O., Augereau, J. M., & Benoit-Vical, F. (2016). *Plasmodium falciparum*: multifaceted resistance to

- artemisinin. In *Malaria Journal*; 15, 1. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1206-9>
- Pan, Q., Luo, F., Liu, M., & Zhang, X. L. (2018). Oligonucleotide aptamers: promising and powerful diagnostic and therapeutic tools for infectious diseases. In *Journal of Infection*; 77, 2, 83–98. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.04.007>
- Parhizgar, A. R. (2017). Introducing new antimalarial analogues of chloroquine and amodiaquine: A narrative review. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 42(2), 115–128.
- Pasternak, A., Hernandez, F. J., Rasmussen, L. M., Vester, B., & Wengel, J. (2011). Improved thrombin binding aptamer by incorporation of a single unlocked nucleic acid monomer. *Nucleic Acids Research*, 39(3), 1155–1164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq823>
- Peng, L. U., Stephens, B. J., Bonin, K., Cubicciotti, R., & Guthold, M. (2007). A Combined Atomic Force/Fluorescence Microscopy Technique to Select Aptamers in a Single Cycle From a Small Pool of Random Oligonucleotides. *Microsc Res Tech*, 70(4), 372–381.
- Pereira, M. P., Elia, M. A. D., Troczynska, J., & Brown, E. D. (2008). Duplication of Teichoic Acid Biosynthetic Genes in *Staphylococcus aureus* Leads to Functionally Redundant Poly ( Ribitol Phosphate ) Polymerases □ †. *Journal of Bacteriology*, 190(16), 5642–5649. <https://doi.org/10.1128/JB.00526-08>
- Pichersky, E., & Raguso, R. A. (2018). Why do plants produce so many terpenoid compounds?. *New Phytologist*, 220, 692–702. <https://doi.org/10.1111/nph.14178>
- Pines, G., Oh, E. J., Bassalo, M. C., Choudhury, A., Andrew, D., Fankhauser, R. G., Eckert, C. A., Gill, R. T., States, U., Engineering, B., States, U., States, U., Renewable, N., & States, U. (2019). Genomic Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase (DXR) Mutations Conferring Resistance to the Antimalarial Drug Fosmidomycin in *E. coli*. *ACS Synth Biol.*, 7(12), 2824–2832. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00219>. Genomic

- Pluijm, R. W. Van Der, Imwong, M., Chau, N. H., Hoa, N. T., Thuy-nhien, N. T., Thanh, N. V., Jittamala, P., Huy, R., Dhorda, M., Chotivanich, K., Ashley, E. A., Mukaka, M., Waithira, N., Cheah, P. Y., Maude, R. J., Amato, R., Pearson, R. D., Gonçalves, S., Jacob, C. G., and Winterberg, M. (2019). Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet Infect Dis*, 201, 19, 952–961. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30391-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30391-3)
- Potapov, V., & Ong, J. L. (2017). Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. *PLoS ONE*, 12(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169774>
- Price, K. E., Armstrong, C. M., Imlay, L. S., Hodge, D. M., Pidathala, C., Roberts, N. J., Park, J., Mikati, M., Sharma, R., Lawrenson, A. S., Tolia, N. H., Berry, N. G., O'Neill, P. M., & John, A. R. O. (2016). Molecular Mechanism of Action of Antimalarial Benzoisothiazolones: Species-Selective Inhibitors of the *Plasmodium* spp. MEP Pathway enzyme, *IspD*. *Scientific Reports*, 6(October), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep36777>
- Pringle, J. C., Carpi, G., Almagro-Garcia, J., Zhu, S. J., Kobayashi, T., Mulenga, M., Bobanga, T., Chaponda, M., Moss, W. J., & Norris, D. E. (2018). RTS,S/AS01 malaria vaccine mismatch observed among *Plasmodium falciparum* isolates from southern and central Africa and globally. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24585-8>
- Qidwai, T., Jamal, F., Khan, M. Y., & Sharma, B. (2014). Exploring drug targets in isoprenoid biosynthetic pathway for *Plasmodium falciparum*. In *Biochemistry Research International*; 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/657189>
- Ragavan, K. V, Kumar, S., Swaraj, S., & Neethirajan, S. (2018). Advances in biosensors and optical assays for diagnosis and detection of malaria. *Biosens Bioelectron*; 105, 188–210. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.037>
- Rahimizadeh, K., Alshamaileh, H., Fratini, M., & Chakravarthy, M. (2017).

*Development of Cell-Specific Aptamers: Recent. Molecules*, 22, 1–13.  
<https://doi.org/10.3390/molecules22122070>

Ralph, S. A., van Dooren, G. G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M. J., Foth, B. J., Tonkin, C. J., Roos, D. S., & McFadden, G. I. (2004). *Metabolic maps and functions of the Plasmodium falciparum apicoplast. Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 203–216.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro843>

Ramya, T. N. C., Mishra, S., Karmodiya, K., Surolia, N., & Surolia, A. (2007a). *Inhibitors of nonhousekeeping functions of the apicoplast defy delayed death in Plasmodium falciparum. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), 307–316. <https://doi.org/10.1128/AAC.00808-06>

Ramya, T. N. C., Mishra, S., Karmodiya, K., Surolia, N., & Surolia, A. (2007b). *Inhibitors of nonhousekeeping functions of the apicoplast defy delayed death in Plasmodium falciparum. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), 307–316. <https://doi.org/10.1128/AAC.00808-06>

Redfield, R. R., Kent, C. K., Leahy, M. A., Martinroe, J. C., Spriggs, S. R., Yang, T., Doan, Q. M., King, P. H., Maitland, P. D., Starr, T. M., Yang, M., Jones, T. F., Boulton, M. L., Caine, V. A., Daniel, K. L., Fielding, J. E., Fleming, D. W., Halperin, W. E., Holmes, K. K., and Schaffner, W. (2018). *Morbidity and Mortality Weekly Report Malaria Surveillance-United States, 2015. Surveillance Summaries Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Editorial Board.*

Reinhart H. (1974). *A Linear Steady-State Treatment of Enzymatic Chains. European Journal of Biochemistry*, 42, 89–95.

Reuter, K., Sanderbrand, S., Jomaa, H., Wiesner, J., Steinbrecher, I., Beck, E., Hintz, M., Klebe, G., & Stubbs, M. T. (2002). *Crystal Structure of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase, a Crucial Enzyme in the Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis\*. Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5378–5384. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109500200>

Richard, S B, Bowman, M. E., Kwiatkowski, W., Kang, I., Chow, C., Lillo, A. M., Cane, D. E., & Noel, J. P. (2001). *Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C-*

*methylerythritol synthetase involved in mevalonate- independent isoprenoid biosynthesis. Nature Structural Biology, 8(7), 641–648.*  
<https://doi.org/10.1038/89691>

Richard, S B., Lillo, A. M., Tetzlaff, C. N., Bowman, M. E., Noel, J. P., & Cane, D. E. (2004). Kinetic Analysis of *Escherichia coli* 2-C-Methyl- d -erythritol-4-phosphate Cytidyltransferase, Wild Type and Mutants, Reveals Roles of Active Site Amino Acids †. *Biochemistry, 43(38), 12189–12197.*  
<https://doi.org/10.1021/bi0487241>

Riley, K. R., Gagliano, J., Xiao, J., Libby, K., Saito, S., Yu, G., Cubicciotti, R., Macosko, J., Colyer, C. L., Guthold, M., & Bonin, K. (2015). Combining capillary electrophoresis and next-generation sequencing for aptamer selection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 407, 1527–1532.*  
<https://doi.org/10.1007/s00216-014-8427-y>

Rocamora, F., Zhu, L., Liong, K. Y., Dondorp, A., Miotto, O., Mok, S., & Bozdech, Z. (2018). Oxidative stress and protein damage responses mediate artemisinin resistance in malaria parasites. *Plos Phogens, 14(3), 1–29.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006930>

Rodriguez-Concepcion, M. (2004). Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during *Arabidopsis* Seedling Development. *The Plant Cell, 16(1), 144–156.*  
<https://doi.org/10.1105/tpc.016204>

Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., & Zenk, M. H. (1999). Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(21), 11758–11763.*  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.11758>

Rohdich, F., Zepeck, F., Adam, P., Hecht, S., Kaiser, J., Laupitz, R., Gräwert, T., Amslinger, S., Eisenreich, W., Bacher, A., & Arigoni, D. (2003). The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: Studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by *IspG* and *IspH* protein.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1586–1591. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337742100>
- Rohmer, M. (1999). *The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants*. *Natural Product Reports*, 16(5), 565–574. <https://doi.org/10.1039/a709175c>
- Röhrich, R. C., Englert, N., Troschke, K., Reichenberg, A., Hintz, M., Seeber, F., Balconi, E., Aliverti, A., Zanetti, G., Köhler, U., Pfeiffer, M., Beck, E., Jomaa, H., & Wiesner, J. (2005). *Reconstitution of an apicoplast-localised electron transfer pathway involved in the isoprenoid biosynthesis of Plasmodium falciparum*. *FEBS Letters*, 579(28), 6433–6438. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.037>
- Romero-López, C., & Berzal-Herranz, A. (2017). *Aptamers: Biomedical interest and applications*. In *Pharmaceuticals*, 10, 1, 1–3. <https://doi.org/10.3390/ph10010032>
- Roos, D. S., Crawford, M. J., Donald, R. G. K., Fraunholz, M., Harb, O. S., He, C. Y., Kissinger, J. C., Shaw, M. K., & Striepen, B. (2002). *Mining the Plasmodium genome database to define organellar function: What does the apicoplast do?*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1417), 35–46. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1047>
- Rowe, J. A., Claessens, A., Corrigan, R. A., & Arman, M. (2009). *Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: Molecular mechanisms and therapeutic implications*. In *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11, 1–29). <https://doi.org/10.1017/S1462399409001082>
- Ryoichi Asai, Shin I. Nishimura, T. A. & K. T. (2005). *In Vitro Selection of DNA Aptamers on Chips Using a Method for Generating Point Mutations*. *Analytical Letters*, 37(4), 645–656. <https://doi.org/10.1081/AL-120029741>
- Saggu, G. S., Pala, Z. R., Garg, S., & Saxena, V. (2016). *New insight into isoprenoids biosynthesis process and future prospects for drug designing in plasmodiu*. In *Frontiers in Microbiology*; 7, 1421,1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01421>

- Sangari, F. J., Pérez-gil, J., Carretero-paulet, L., & García-lobo, J. M. (2010). A new family of enzymes catalyzing the first committed step of the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria. *PNAS*, 107(32), 14081–14086. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001962107>
- Campos N., Sauret-Güeto, S., Gallego, F., Guez-concepcio, M. R., Lois, L., & Boronat, A. (2001). *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate: a novel system for the genetic analysis of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochemical*, 353, 59–67.
- Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., Stephan, P., Curtis, R., Stephan, S., Benjamin, S., Jean-Yves, T., Daniel, J. W., Volker, H., Kevin, E., Pavel, T., & Albert, C. (2019). Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji>
- Schmidt, K. S., Borkowski, S., Kurreck, J., Stephens, A. W., Bald, R., Hecht, M., Friebe, M., Dinkelborg, L., & Erdmann, V. A. (2004). Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function. *Nucleic Acids Research*, 32(19), 30–33. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh862>
- Schmitt, E. K., Ndayisaba, G., Yeka, A., Asante, K. P., Grobusch, M. P., Karita, E., Mugerwa, H., & Asiiimwe, S. (2021). Efficacy of Cipargamin (KAE609) in a Randomized , Phase II Dose-Escalation Study in Adults in Sub-Saharan Africa With Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria. *Clinical Infectious Diseases*, 4, 1–9.
- Sefah, K., Yang, Z., Bradley, K. M., Hoshika, S., Jiménez, E., & Zhang, L. (2014). In vitro selection with artificial expanded genetic information systems. *PNAS*; 111(4), 1449–1454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311778111>
- Shahid M. Nimjee, Rebekah R. White, Richard C. Becker, and B. A. S. (2017). Aptamers as Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 6(57), 61–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558.Aptamers>

- Sharma, S. K., Kapoor, M., Ramya, T. N. C., Kumar, S., Kumar, G., Modak, R., Sharma, S., Surolia, N., & Surolia, A. (2003). Identification, Characterization, and Inhibition of *Plasmodium falciparum*  $\beta$ -Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein Dehydratase (FabZ). *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45661–45671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304283200>
- Sherman, I. W. (1979). *Biochemistry of Plasmodium (Malarial Parasites)*. In *Microbiological Reviews*; 43, 4, 453-495.
- Shigdar, S., Macdonald, J., O'Connor, M., Wang, T., Xiang, D., Shamaileh, H. Al, Qiao, L., Wei, M., Zhou, S. F., Zhu, Y., Kong, L., Bhattacharya, S., Li, C. G., & Duan, W. (2013). Aptamers as theranostic agents: Modifications, serum stability and functionalisation. *Sensors (Switzerland)*, 13(10), 13624–13637. <https://doi.org/10.3390/s131013624>
- Sidhu, A., Verdier-Pinard, D., & Fidock, D. A. (2002). Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr*t mutations. *Science*, 298(5591), 210–213. <https://doi.org/10.1126/science.1074045>. Chloroquine
- Singh, N. K., Thungon, P. D., Estrela, P., & Goswami, P. (2019). Development of an aptamer-based field effect transistor biosensor for quantitative detection of *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase in serum samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 123, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.085>
- Singh, V. K., & Ghosh, I. (2013a). Methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids: Kinetic modeling and in silico enzyme inhibitions in *Plasmodium falciparum*. 587, 2806–2817. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.024>
- Singh, V. K., & Ghosh, I. (2013b). Methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids: Kinetic modeling and in silico enzyme inhibitions in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Letters*, 587(17), 2806–2817. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.024>
- Sola, M., Menon, A. P., Moreno, B., Meraviglia-crivelli, D., Soldevilla, M. M., Cartón-garcía, F., & Pastor, F. (2020). *Aptamers Against Live Targets: Is*

- In Vivo SELEX Finally Coming to the Edge ?*. *Molecular Therapy: Nucleic Acid*, 21(September), 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.05.025>
- Sosic, A., Meneghello, A., Cretaio, E., & Gatto, B. (2011). *Human thrombin detection through a sandwich aptamer microarray: Interaction analysis in solution and in solid phase*. *Sensors*, 11(10), 9426–9441. <https://doi.org/10.3390/s111009426>
- Stanlis, K. K. H., & McIntosh, J. R. (2003). *Single-strand DNA Aptamers as Probes for Protein Localization in Cells*. *J Histochem Cytochem*. 51(6), 797–808.
- Steinbacher, S., Kaiser, J., Eisenreich, W., Huber, R., Bacher, A., & Rohdich, F. (2003). *Structural Basis of Fosmidomycin Action Revealed by the Complex with 2- C -Methyl- D -erythritol 4-phosphate Synthase ( IspC )*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18401–18407. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300993200>
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., & Strehlitz, B. (2005). *FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383(1), 83–91. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3388-9>
- Stoltenburg, Regina, Reinemann, C., & Strehlitz, B. (2007). *SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands*. *Biomolecular Engineering*, 24(4), 381–403. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.06.001>
- Stovall, G. M., Bedenbaugh, R. S., Singh, S., Meyer, A. J., Hatala, P. J., Ellington, A. D., & Hall, B. (2014). *In vitro selection using modified or unnatural nucleotides*. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, SUPPL.56. <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0906s56>
- Stovall, G. M., Cox, J. C., & Ellington, A. D. (2004). *Automated Optimization of Aptamer Selection Buffer Conditions*. *Journal of Laboratory Automation*, 9(3), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2004.04.010>
- Straimer, J., Gandhi, P., & Renner, K. C. (2021). *High Prevalence of Plasmodium falciparum K13 Mutations in Rwanda Is Associated With Slow*

- Parasite Clearance After Treatment With. In The Journal of Infectious Diseases; Issue September 2020, 1-4.*
- Surolia, N., & Surolia, A. (2001). *Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of Plasmodium falciparum. Nature Medicine, 7(2), 167–173. <https://doi.org/10.1038/84612>*
- Sussmann, R. A. C., Fotoran, W. L., Kimura, E. A., & Katzin, A. M. (2017). *Plasmodium falciparum uses vitamin E to avoid oxidative stress. Parasites & Vectors, 10(461), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2402-3>*
- Swierczewska, M., Lee, K. C., & Lee, S. (2015). *What is the future of PEGylated therapies?. Expert Opinion on Emerging Drugs, 20(4), 531–536. <https://doi.org/10.1517/14728214.2015.1113254>*
- Tang, M., Odejinmi, S. I., Allette, Y. M., Vankayalapati, H., & Lai, K. (2011). *Identification of novel small molecule inhibitors of 4-diphosphocytidyl-2- C-methyl-d-erythritol (CDP-ME) kinase of Gram-negative bacteria. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 19(19), 5886–5895. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.08.012>*
- Tasdemir, D., Lack, G., Brun, R., Rüedi, P., Scapozza, L., & Perozzo, R. (2006). *Inhibition of Plasmodium falciparum fatty acid biosynthesis: Evaluation of FabG, FabZ, and FabI as drug targets for flavonoids. Journal of Medicinal Chemistry, 49(11), 3345–3353. <https://doi.org/10.1021/jm0600545>*
- Teng, J., Yuan, F., Ye, Y., Zheng, L., Yao, L., Xue, F., Chen, W., & Li, B. (2016). *Aptamer-based technologies in foodborne pathogen detection. Front. Microbiol. 7:1426, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01426>*
- Tilley, L., Straimer, J., Gnädig, N. F., Ralph, S. A., & Fidock, D. A. (2016). *Artemisinin Action and Resistance in Plasmodium falciparum. In Trends in Parasitology; 32, 9, 682–696. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.010>*
- Tizifa, T. A., Kabaghe, A. N., McCann, R. S., van den Berg, H., Van Vugt, M., & Phiri, K. S. (2018). *Prevention Efforts for Malaria. In Current Tropical Medicine Reports; 5, 1, 41–50. <https://doi.org/10.1007/s40475-018-0133-y>*
- Tok, J. B. H., & Fischer, N. O. (2008). *Single microbead SELEX for efficient*

- ssDNA aptamer generation against botulinum neurotoxin. *Chemical Communications*, 16, 1883–1885. <https://doi.org/10.1039/b717936g>
- Tse, E. G., Korsik, M., & Todd, M. H. (2019). The past, present and future of anti-malarial medicines. *Malaria Journal*, 18(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2724-z>
- Uddin, T., McFadden, G. I., & Goodman, C. D. (2018). Validation of putative apicoplast-targeting drugs using a chemical supplementation assay in cultured human malaria parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1), 1–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01161-17>
- Ulrich, H., Magdesian, M. H., Ju, M., Alves, M., & Colli, W. (2002). In Vitro Selection of RNA Aptamers That Bind to Cell Adhesion Receptors of *Trypanosoma cruzi* and Inhibit Cell Invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20756–20762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111859200>
- Umeda, T., Tanaka, N., Kusakabe, Y., Nakanishi, M., Kitade, Y., & Nakamura, K. T. (2010). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of 1-deoxy-d-xylulose 5-Phosphate reductoisomerase from *Plasmodium falciparum*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(3), 330–332. <https://doi.org/10.1107/S1744309110001739>
- Umeda, T., Tanaka, N., Kusakabe, Y., Nakanishi, M., Kitade, Y., & Nakamura, K. T. (2011). Molecular basis of fosmidomycin's action on the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In *Scientific Reports*; 1, 9, 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep00009>
- Vance, D., Goldberg, I., Mitsuhashi, O., Bloch, K., Omura, S., & Nomura, S. (1972). Inhibition of fatty acid synthetases by the antibiotic cerulenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(3), 649–656. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(72\)90397-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(72)90397-X)
- Vanga, H. B., Franetich, J. F., Soulard, V., Sossau, D., Tefit, M., Kane, B., Vaillant, J. C., Borrmann, S., Müller, O., Bosquet, N. D., Grand, R. Le, Silvie, O., & Mazier, D. (2018). Differential activity of methylene blue against erythrocytic and hepatic stages of *Plasmodium*. *Malaria Journal*,

17(143), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2300-y>

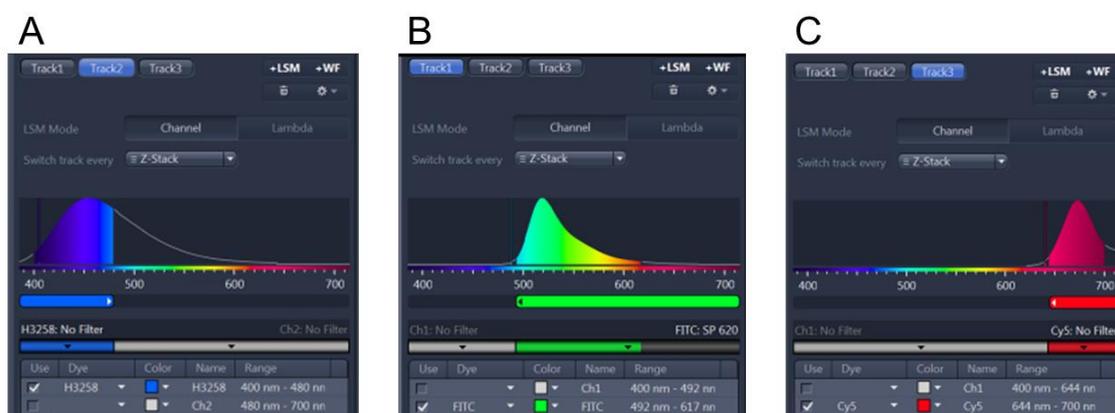
- Vásquez, A. M., Zuluaga, L., Tobón, A., Posada, M., Vélez, G., González, I. J., Campillo, A., & Ding, X. (2018). Diagnostic accuracy of loop - mediated isothermal amplification ( LAMP ) for screening malaria in peripheral and placental blood samples from pregnant women in Colombia. *Malaria Journal*, 61, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2403-5>
- Waller, R. F., Ralph, S. A., Reed, M. B., Su, V., Douglas, J. D., Minnikin, D. E., Cowman, A. F., Besra, G. S., & McFadden, G. I. (2003). A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 297–301. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.297-301.2003>
- Wan, Q., Liu, X., & Zu, Y. (2021). Theranostics Oligonucleotide aptamers for pathogen detection and infectious disease control. *Theranostics*, 11(18), 33–61. <https://doi.org/10.7150/thno.61804>
- Wang, X., & Dowd, C. S. (2020). The MEP pathway: Promising drug targets in the fight against tuberculosis. *ACS Infect Dis.*, 4(3), 278–290. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00176>.The
- White, N. J. (1997). Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(7), 1413–1422.
- White, Nicholas J, Pukrittayakamee, S., Phil, D., Phyo, A. P., Rueangweerayut, R., Nosten, F., & Jittamala, P. (2015). Europe PMC Funders Group Spiroindolone KAE609 for *Falciparum* and *Vivax* Malaria. *N Engl J Med.*, 371(5), 403–410. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1315860>.Spiroindolone
- Wiley, J. D., Merino, E. F., Krai, P. M., McLean, K. J., Tripathi, A. K., Vega-Rodríguez, J., Jacobs-Lorena, M., Klemba, M., & Cassera, M. B. (2015). Isoprenoid precursor biosynthesis is the essential metabolic role of the apicoplast during gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell*, 14(2), 128–139. <https://doi.org/10.1128/EC.00198-14>
- Winzeler, E. A. (2008). Malaria research in the post-genomic era. *Nature*, 455(7214), 751–756. <https://doi.org/10.1038/nature07361>

- Witschel, M. C., Höffken, H. W., Seet, M., Parra, L., Thater, F., Niggeweg, R., Röhl, F., Illarionov, B., Kaiser, J., Fischer, M., Bacher, A., & Diederich, F. (2011). *Inhibitors of the herbicidal target IspD: allosteric site binding*. *Angewandte Chemie*, 50(34), 7931-7935. <https://doi.org/10.1002/anie.201102281>.
- World Health Organization (WHO). (2014). *Antimicrobial resistance - global report on surveillance*. *World Health Organization*, 61(3), 383–394. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247201> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2536104&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- World Health Organization (WHO). (2022). *COVID-19 Weekly Epidemiological Update*. *World Health Organization*, 77(1), 1–15. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---1-february-2022>
- World Health Organization (WHO). (2010). *Directrices para el tratamiento de la malaria*. ISBN: 9789275332207.
- World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO), World Organisation for Animal Health (OIE), U. E. P. (UNEP). (2021). *Antimicrobial Resistance and The united Nations Sustainable Development Cooperation Framework*. <https://doi.org/9789240036024>
- World Health Organization. (2019). *World malaria report 2019*. [www.who.int/malaria](http://www.who.int/malaria)
- World Health Organization (WHO). (2020). *World Malaria Report: 20 years of global progress and challenges*. In *World Health: Vol. WHO/HTM/GM (Issue December)*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>
- World Health Organization (WHO). (2021a). *World Malaria report 2021*. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>
- World Health Organization (WHO) (2021b). *Global Tuberculosis Report 2021*.
- Yajima, S. (2002). *Crystal Structure of 1-Deoxy-D-xylulose Reductoisomerase*

- Complexed with Cofactors: Implications Flexible Loop Movement upon Substrate. *J. Biochem.*, 131, 313–317.
- Yang, X., Bassett, S. E., Li, X., Luxon, B. A., Herzog, N. K., Shope, R. E., Aronson, J., Prow, T. W., Leary, J. F., Kirby, R., Ellington, A. D., & Gorenstein, D. G. (2002). Construction and selection of bead-bound combinatorial oligonucleoside phosphorothioate and phosphorodithioate aptamer libraries designed for rapid PCR-based sequencing. *Nucleic Acids Research*, 30(23), 1–8.
- Yang, X., Li, N., & Gorenstein, D. G. (2011). Strategies for the discovery of therapeutic aptamers. In *Expert Opinion on Drug Discovery*; 6, 1, 75–87. <https://doi.org/10.1517/17460441.2011.537321>
- Yeh, E., & DeRisi, J. L. (2011). Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage plasmodium falciparum. *PLoS Biology*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001138>
- Zhang, B., Watts, K., Hodge, D., Kemp, L., Hunstad, D., Hicks, L., and A. R. O. (2011). A second target of the antimalarial and antibacterial agent fosmidomycin revealed by cellular metabolic profiling. *Biochemistry*, 50(17), 3570–3577. <https://doi.org/10.1021/bi200113y.A>
- Zhang, C., Lv, X., Han, X., Man, Y., Saeed, Y., Qing, H., & Deng, Y. (2015). Whole-cell Based Aptamer Selection for Selective Capture of Microorganisms in the Microfluidic Device Analytical Methods. *Analytical Methods*, 7(June), 6339–6345. <https://doi.org/10.1039/C5AY01016K>
- Zhang, M., Wang, C., Oberstaller, J., Thomas, P., Otto, T. D., Casandra, D., Boyapalle, S., Adapa, S. R., Xu, S., Button-simons, K., Mayho, M., Rayner, J. C., Ferdig, M. T., Jiang, R. H. Y., & Adams, J. H. (2021). The apicoplast link to fever-survival and artemisinin-resistance in the malaria parasite. *Nature Communications*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24814-1>
- Zhang, N., Chen, Z., Liu, D., Jiang, H., Zhang, Z., Lu, A., Zhang, B., Yu, Y., & Zhang, G. (2021). Structural Biology for the Molecular Insight between

- Aptamers and Target Proteins. Int. J. Mol. Sci.*, 22(4093).  
<https://doi.org/10.3390/ijms22084093>
- Zhao, L., Chang, W., Xiao, Y., Liu, H., & Liu, P. (2013). *Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 497–530. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052010-100934>
- Zhou, D., & White, R. H. (1991). *Early steps of isoprenoid biosynthesis in Escherichia coli. Biochem. J*, 273, 627–634.
- Zhou, J., Yang, L., DeColli, A., Freel Meyers, C., Nemeria, N. S., & Jordan, F. (2017). *Conformational dynamics of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase on ligand binding revealed by H/D exchange MS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(35), 9355–9360. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619981114>
- Zimmermann, B., Gesell, T., Chen, D., Lorenz, C., & Schroeder, R. (2010). *Monitoring genomic sequences during SELEX using high-throughput sequencing: Neutral SELEX. PLoS ONE*, 5(2), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009169>
- Zuker, M. (2003). *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

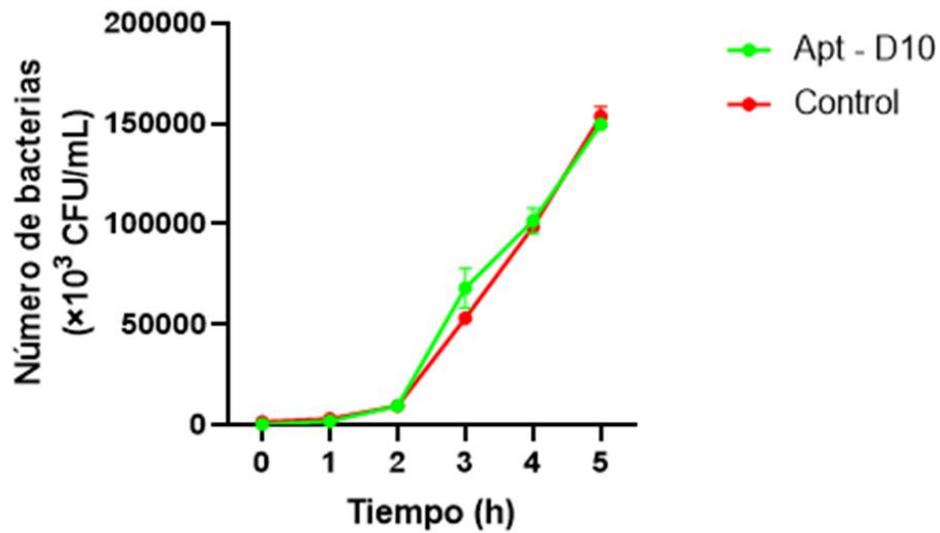
## ANEXO A



**Las imágenes de microscopía confocal fueron adquiridas en secuencial.**

A. El espectro azul corresponde al usado para la visualización del Hoechst y lleva un filtro con rango de 400 nm – 480 nm. B. El espectro verde corresponde al usado para la visualización de los aptámeros D10 y 700 marcados con 6 FAM y lleva un filtro de rango 492 nm – 617 nm. C. El espectro rojo corresponde al usado para la visualización del aptámero HDL marcado con Cy5.5 y del anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 647 (647 nm) anti-IgG de conejo usado para detección del anticuerpo anti-FXR, y lleva un filtro de rango 644 nm – 700 nm.

## ANEXO B



Seguimiento del crecimiento de células *E. coli* tratadas con el aptámero D10 por cuantificación de colonias en placa de agar LB (UFC/mL). Concentración de aptámero 50  $\mu$ M. Error y media, SD.