



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

IDENTIFICACIÓN DE APTÁMEROS QUE  
RECONOCEN PÉPTIDOS DE  
*Trypanosoma cruzi*

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

KATHERIN LIZET PEÑARANDA MANRIQUE

LIMA – PERÚ

2018



## **ASESORES**

**Manuela Verástegui Pimentel, PhD**

**Pohl Milón Mayer, PhD**

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres.**

Por su apoyo incondicional, aún en momentos de indecisión. Gracias a ellos, que cimentaron un camino de oportunidades para mí a base de su esfuerzo, que me han permitido convertirme en quien soy.

## **AGRADECIMIENTO**

Al CONCYTEC (Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación), por brindarme la posibilidad y el financiamiento para especializarme en la maestría de Bioquímica y Biología Molecular

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia que me dio las bases y las oportunidades para desarrollarme como investigadora.

A la Dra. Manuel Verástegui por su apoyo y contribución que me han permitido desarrollar los temas enfocados *Trypanosoma cruzi*.

Al Dr. Pohl Milón por su mentoría que me ha permitido mejorar como investigadora y su contribución que me ha permitido desarrollar los aspectos tecnológicos en este estudio.

A mis compañeros de laboratorio involucrados en esta investigación por concederme su valioso tiempo, apoyo técnico y motivacional.

## FINANCIAMIENTO

El presente proyecto se realizó en el marco de financiamiento del Programa de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular con Convenio de Gestión N°031-2015-FONDECYT. Los costos operativos fueron financiados por el proyecto eBiophy con Convenio N°137-2016-FONDECYT. El equipamiento utilizado en el proyecto fue financiado por INNOVATEPERU con Convenios N°382-PNICEP-PIBA-2014, N°135-PNICEP-PIAP-2015 y N°297-INNOVATEPERU-EC-2016.



## TABLA DE CONTENIDOS

	Páginas
INTRODUCCIÓN.....	1-2
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	3-15
1.1 Planteamiento del problema.....	4
1.2 Marco teórico.....	5-14
1.2.1 Enfermedad de Chagas.....	5-8
1.2.1.1 Etiología y ciclo de vida del parásito.....	5-6
1.2.1.2 Desarrollo de la enfermedad.....	6-7
1.2.1.3 Diagnóstico.....	7-8
1.2.2 Aptámeros y SELEX.....	8-14
1.2.2.1 SELEX.....	8-10
1.2.2.2 Definición de aptámero.....	11
1.2.2.3 Propiedades de los aptámeros .....	11-12
1.2.2.4 Ventajas sobre otros biosensores.....	12-13
1.2.2.5 Aplicaciones de los aptámeros.....	13-14
1.3 Justificación del estudio.....	15
1.4 Objetivos .....	16
1.4.1 Objetivo general.....	16
1.4.2 Objetivos específicos.....	16

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA.....	17-36
2.1 Diseño del estudio.....	18
2.2 Procedimientos y técnicas.....	19-35
2.2.1 Análisis para la selección de blancos de interés de <i>T. cruzi</i> .....	19-20
2.2.2 Síntesis de moléculas blanco de <i>T. cruzi</i> .....	20
2.2.3 Acoplamiento de blancos biotinilados a beads magnéticos.....	21
2.2.4 SELEX y purificación del aptámero .....	21-27
2.2.4.1 Selección.....	21-24
2.2.4.2 Amplificación de biblioteca.....	25-27
2.2.4.3 Evaluación de calidad.....	27
2.2.5 Acerca del SELEX Unitarget y SELEX Multitarget.....	28-29
2.2.6 DiVe (Diversity Visualization by Endonuclease) .....	29-30
2.2.7 Secuenciamiento de bibliotecas .....	31-33
2.2.7.1 Análisis bioinformático de candidatos a aptámeros.....	31-32
2.2.7.2 Síntesis de oligonucleótidos.....	33
2.2.8 Evaluación de capacidad de unión.....	33-35
2.2.8.1 ELONA (Enzyme Linked Oligonucleotide Assays).....	33-35
2.3 Consideraciones éticas .....	35
2.4 Plan de análisis.....	36



## CAPÍTULO III:

RESULTADOS.....	37-73
3.1 Selección bioinformática de blancos.....	38-45
3.2 SELEX Multitarget y Unitarget.....	46-58
3.2.1 Evaluación de calidad de la biblioteca .....	47-52
3.2.2 Variación cuantitativa de intermedios de amplificación de ligandos.....	53-56
3.2.3 Evaluación de enriquecimiento ligandos mediante DiVE.....	57-58
3.3 Identificación de secuencias nucleotídicas de potenciales aptámeros..	59-62
3.3.1 Descubrimiento y enriquecimiento de motivos .....	60-61
3.3.2 Predicción de estructura secundaria de potenciales aptámeros.....	62
3.4 Ensayos de evaluación de capacidad de unión de aptámeros .....	63-73
3.4.1 Unión a péptidos.....	63-66
3.4.2 Reacción cruzada en secuencias provenientes del SELEX Multitarget.....	67-68
3.4.3 Unión a péptido TC1 en muestras biológicas de lisados de cultivos de <i>T. cruzi</i> .....	68-71
3.4.4 Uso de aptámeros en lisados de <i>T. cruzi</i> .....	72-73
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....	74-83
4.1 Aptámeros de Tc1, identificación y características.....	75-78
4.2.1 SELEX Multitarget, posibilidades.....	78-81
4.3 Biomarcadores y problemática en Chagas.....	81-83
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	84-85
CAPÍTULO VI: REFERENCIAS Y LIMITACIONES.....	86-87
CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88-98

## Lista de Figuras y Gráficas

### Figuras

Figura.1- Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* en triatóminos y en el humano.

Figura 2.- Esquema de SELEX basado en beads magnéticos.

Figura 3.- Flujograma experimental

Figura 4. - Esquema de elementos en el péptido sintético.

Figura 5. Variación de las condiciones de selección a lo largo de los ciclos de SELEX.

Figura 6. Esquema de un ciclo de SELEX.

Figura 7.- Esquema del SELEX Unitarget y Multitarget.

Figura 8.- Principio y estandarización del ensayo DiVE

Figura 9.- Esquema de análisis de datos de secuenciamiento para determinar candidatos a aptámeros.

Figura 10.- Alineamiento tBLASTn de la proteína hipotética del gen TcCLB.510323.60.

Figura 11.- Predicciones estructurales de TcCLB.510323.60

Figura 12.- Identificación de péptidos en la proteína TcCLB.510323.60.

Figura 13.-Análisis de antigenicidad, hidrofobicidad y desorden de la proteína TcCLB.510323.60

Figura 14. Esquema de evaluación de calidad.

Figura 15.- Geles de control de calidad del ciclo 1 al 9 de SELEX Unitarget y Multitarget.

Figura 16.- Geles de control de calidad del ciclo 10 al 13 de SELEX Unitarget y Multitarget.

Figura 17. Productos de amplificación por PCR y transcripción *in vitro*.

Figura 18.- Productos de amplificación por transcripción reversa

Figura 19.- Evaluación de la diversidad en SELEX Unitarget y Multitarget.

Figura 20.- Motivo más significativo en las bibliotecas finales del SELEX Unitarget y Multitarget identificado por MEME suite.

Figura 21.- Potenciales estructuras secundarias de candidatos a aptámeros.

Figura 22. Esquema del mecanismo del ensayo ELONA.

Figura 23.- Ensayos de unión a péptidos Tc1, Tc2 y E27

Figura 24.- Verificación del bloqueo de péptidos biotinilados

Figura 25.- Ensayos de reacciones cruzadas de aptámeros candidatos del SELEX Multitarget.

Figura 26.- Ensayo de unión de péptido TC1 en lisados

Figura 27.- Ensayo de unión a Lisados

### **Tablas**

Tabla 1.- Ventajas de los aptámeros.

Tabla 2. Condiciones de selección para los 13 ciclos de SELEX.

Tabla 3.- Lista de proteínas más traducidas en el estadio de tripomastigote metacíclico (MT).

Tabla 4.- Péptidos seleccionados a través de GenScript Optimum Antigen™.

Tabla 5.- Péptidos seleccionados por búsqueda bibliográfica

Tabla 6.- Listado total de péptidos seleccionados y sintetizados

Tabla 7.- Controles de reacción ELONA

## Resumen

El Mal de Chagas es una enfermedad infecciosa que genera una gran morbilidad, con aproximadamente 6 millones de infectados mundialmente y 2 millones de personas en riesgo de infección en el Perú. A pesar de que los determinantes clínicos de esta enfermedad han sido muy estudiados, la detección del parásito causante de la enfermedad de Chagas sigue siendo un desafío. En este trabajo se emplearon técnicas bioinformáticas y de evolución *in vitro* (SELEX) para identificar posibles nuevos biomarcadores y desarrollar aptámeros como nuevos biosensores. Se identificaron diez proteínas altamente expresadas como potenciales biomarcadores, siendo seleccionada como la mejor candidata la proteína codificada por el gen TcCLB.510323.60. Cinco péptidos (Tc1-Tc5) generados a partir de esta proteína se utilizaron para desarrollar aptámeros mediante la técnica de SELEX. Se identificaron secuencias de ADN con un motivo rico en guaninas, de las cuales cinco evidenciaron unión específica con el péptido Tc1. Un ensayo tipo ELISA indicó cualitativamente la capacidad de unión de estas secuencias de ADN al péptido biomarcador y a lisados de cultivos de *T. cruzi*, confirmándose así su condición de aptámeros. Los aptámeros fueron capaces de unir el péptido TC1 diferencialmente ( $p < 0.05$ ) y mostraron reactividades 2 a 3 veces mayores que el cut-off establecido en lisados (0.071196 para proteína soluble total y 0.082576 para proteína de membrana). Los ensayos con lisados crudos de *T. cruzi* sugieren la presencia de la proteína codificada por el gen TcCLB.510323.60 en la membrana del parásito. Estos aptámeros podrían ser utilizados para desarrollar un ensayo de detección directa de *T. cruzi* en muestras biológicas como también para enriquecer muestras con una baja carga parasitaria.

**Palabras claves:** Aptámeros, *Trypanosoma cruzi*, Biosensores, Biomarcadores, Chagas

## Abstract

Chagas disease is an infectious disease that generates great morbidity, with approximately 6 million infected worldwide and 2 million at risk of infection in Peru. Although the clinical determinants of this disease have been well studied, detection of the parasite that causes Chagas disease remains a challenge. In this work, bioinformatic and *in vitro* evolution techniques (SELEX) were used to identify possible new biomarkers and to develop aptamers as new biosensors. Ten highly expressed proteins were identified as potential biomarkers and the protein encoded by the TcCLB.510323.60 gene was selected as the best candidate. Five peptides (Tc1-Tc5), generated from this protein, were used to develop aptamers using SELEX. Many DNA sequences with a guanine-rich motif were identified, of these five showed specific binding for the Tc1 peptide. A qualitatively ELISA-type assay showed the binding capacity of these sequences to the peptide and to lysates of *T. cruzi* cultures, thus confirming their status as aptamers. The aptamers were able to bind the peptide TC1 differentially ( $p < 0.05$ ) and showed reactivities 2 to 3 times greater than the cut-off established in lysates (0.071196 for total soluble protein and 0.082576 for membrane protein). Reactions with crude *T. cruzi* lysates suggest the presence of the protein encoded by the TcCLB.510323.60 gene in the parasite membrane. These aptamers could be used to develop a direct detection assay for *T. cruzi* in biological samples as well as to enrich samples with a low parasitic load.

**Keywords:** Aptamers, *Trypanosoma cruzi*, Biosensor, Biomarker, Chagas

## Introducción

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria transmitida por vectores de la subfamilia *Triatominae* (chinchas) y causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad de Chagas posee una fuerte relación con factores socio-económicos al afectar estratos sociales con pobreza, extrema pobreza y zonas rurales(1). Al ser una enfermedad olvidada, existen una serie de interrogantes aún por contestar acerca del parásito(2), como conocer e identificar el gran número de proteínas hipotéticas encontradas en su genoma(3)(4), caracterizar nuevos antígenos presentes en las muestras de los individuos chagásicos y su aplicación en el diagnóstico(5), y realizar más trabajos de investigación que nos ayuden a comprender como estas proteínas interactúan con el hospedero(6).

Estas incógnitas retrasan el desarrollo de mejoras de métodos diagnósticos o estandarizaciones de nuevos métodos. Para superar estas limitaciones es necesario descubrir y caracterizar nuevos biomarcadores y desarrollar nuevos sistemas de detección. Ante la necesidad de nuevos esquemas de detección de *T. cruzi*, surge la posibilidad de utilizar aptámeros como biosensores que permitan el estudio de potenciales biomarcadores (7) y complementen alternativas de detección existentes.

Un aptámero es un ligando de ARN o ADN de hebra simple que une con gran afinidad una molécula blanco y es generado a través de la técnica SELEX (del inglés, Systematic Evolution of Ligands By Exponential Enrichment)(8). Los aptámeros presentan ciertas ventajas frente a los otros métodos de ensayo, como anticuerpos. Estos poseen mayor estabilidad química, facilidad de síntesis, reproducibilidad y baja probabilidad de generar respuesta inmune(9). Además, los aptámeros presentan la ventaja de poder unir un amplio espectro de moléculas de diferente

naturaleza química y tamaño, al no estar limitados por la inmunogenicidad(10). Esto resulta útil, debido a que los biomarcadores tradicionales en Chagas corresponden a antígenos(11), por lo que existe una ventana de potenciales biomarcadores no abarcada, proteínas del parásito altamente expresadas no necesariamente inmunogénicas.

En este estudio se combinan aproximaciones moleculares y bioinformáticas para desarrollar aptámeros con capacidad de unión a nuevos biomarcadores de *T. cruzi*. Apoyándose en información cuantitativa obtenida por el método de Ribosome profiling, que determina huellas de traducción en cada transcrito(12),se realizó una búsqueda de péptidos de proteínas abundantes de *T. cruzi* y se identificaron potenciales nuevos biomarcadores a través de herramientas bioinformáticas. Con la finalidad de ampliar el rango de blancos trabajados, se establecieron dos metodologías de SELEX para la selección de aptámeros. Los aptámeros resultantes fueron evaluados cualitativamente mediante ELONA (Enzyme Linked Oligonucleotide Assays) usando sus respectivos blancos como también lisados de cultivos de *T. cruzi*.

## **CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**



## 1.1 Planteamiento del problema

La enfermedad de Chagas es una enfermedad que afecta a las poblaciones más pobres, causando la muerte de miles de personas anualmente(13), alta morbilidad(14) y pérdidas económicas(15). La diversidad de medios de dispersión vectorial(16) como no vectorial(17) y el cambio en el perfil epidemiológico en las últimas décadas(18), la convierten en un potencial riesgo a mayor escala y acentúan la necesidad de un control adecuado del parásito, el vector y sus hospederos. Para lograr este control en países endémicos, como el Perú, es necesario un mayor conocimiento del parásito y medios que identifiquen moléculas circulantes propias de *T. cruzi* para futuros métodos de detección sensibles, específicos, fáciles y de bajo costo.

Debido a los diferentes estadios del parásito durante su ciclo biológico y el carácter muchas veces asintomático de la infección, el diagnóstico se hace difícil, ya que depende de la fase de desarrollo de la enfermedad. Los métodos inmunológicos, más usados, muestran discordancias entre poblaciones, reactividad cruzada con especies cercanas y muchas de estas pruebas no pueden ser usadas en Chagas congénito, pacientes inmunosuprimidos, ni pueden ser aplicadas para determinar la eficacia del tratamiento(19)(20). Por ello es necesario desarrollar alternativas de detección que sean de bajo costo, que reconozcan directamente al antígeno y/o biomarcador propio de *T. cruzi*.

Los aptámeros ofrecen una alternativa novedosa para detectar biomarcadores no inmunogénicos e inmunogénicos. La utilidad de los aptámeros ha sido observada para diagnóstico de VIH, hepatitis C, Influenza(21)(9); como fármaco y terapia se utilizaron en degeneración macular de la retina (Macugen)(22) como también para descubrimiento de biomarcadores en cáncer(23)(24).

## 1.2 Marco teórico

### 1.2.1 Enfermedad de Chagas

#### 1.2.1.1 Etiología y ciclo de vida del parásito

La enfermedad de Chagas es principalmente transmitida de manera vectorial por hemípteros (chinchas) de la subfamilia *Triatominae*, los cuales inoculan la infección durante la picadura al depositar heces contaminadas cerca de esta, de cortes abiertos o membranas mucosas como los ojos y la boca(1)(25). Sin embargo, existen otras vías de infección, no vectoriales, como transfusiones de sangre, transmisión congénita, trasplantes de órganos o vía oral por alimentos contaminados(13).

El ciclo de vida de *T. cruzi* (**Figura. 1**) consiste en cuatro estadios. Primero, el vector se alimenta de sangre contaminada del hospedero mamífero y dentro del vector, *T. cruzi* se transforma en epimastigote, forma reproductiva asexual. Luego pasa al estadio de tripomastigote metacíclico en el intestino del vector, forma infecciosa que es depositada en las heces durante la picadura y permite el ingreso al mamífero(17).

Una vez dentro del hospedero, *T. cruzi* ingresa a células sanas, preferentemente células cardíacas e intestinales, pasa a la forma reproductiva asexual de amastigote para luego ser liberado a la sangre como tripomastigote sanguíneo. Este último infectará nuevas células hasta que un vector vuelva a alimentarse del mamífero contaminado y continúe el ciclo(26).

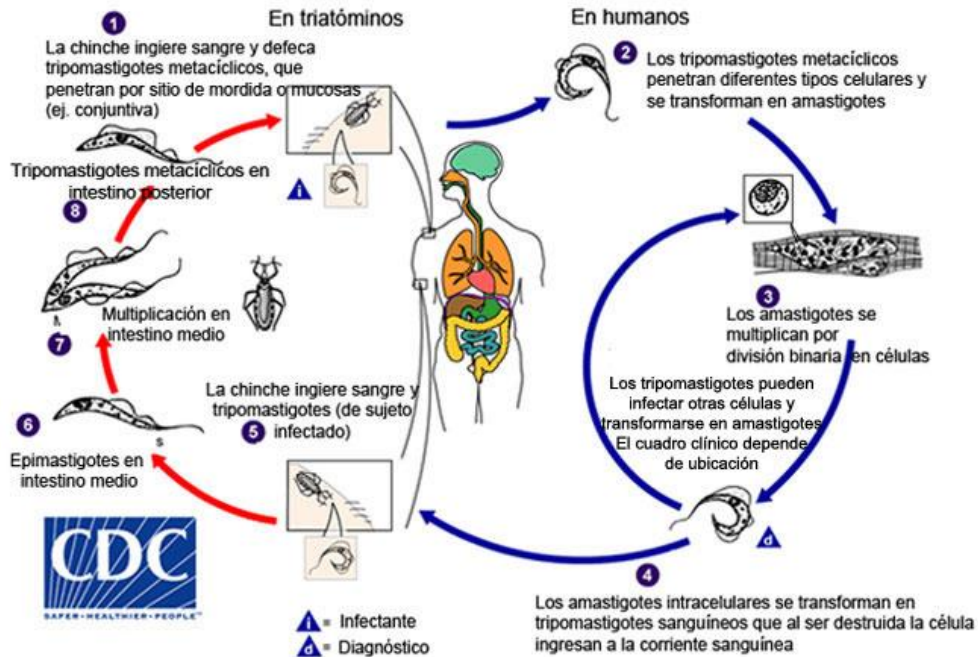


Figura.1- Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* en triatóminos y en el humano. Fuente: CDC

### 1.2.1.2 Desarrollo de la enfermedad

Dentro del desarrollo de la enfermedad se observan dos fases: aguda y crónica. La fase aguda corresponde a los primeros dos meses de la infección, la cual suele ser asintomática, por lo que no suele ser detectada(27). Solo el 5% de la población produce un cuadro sintomático con fiebre, malestar, hepatoesplenomegalia y un conteo atípico de linfocitos (16). Otra característica de esta fase es el chagoma y el signo de Romaña en la zona de inoculación, que son nódulos epiteliales y edemas prolongados en el párpado, respectivamente(28).

La fase crónica puede mostrar cuatro cuadros: indeterminado, cardíaco, digestivo o mixto. La fase crónica indeterminada es totalmente asintomática, los cálculos revelan que aproximadamente el 50% de los pacientes infectados se mantendrán en esta fase por el resto de su vida, sin secuelas a largo plazo, pero constituyendo un reservorio del parásito(1). Aquellas personas que pasan la fase indeterminada,

usualmente luego de 10 a 20 años del inicio de la infección, generarán un cuadro crónico con secuelas, generando cardiomiopatías en el 20-30% de los casos y problemas en el tracto digestivo en el 15- 20% de los casos o ambos cuadros(17).

### **1.2.1.3 Diagnóstico**

La Organización Panamericana de la Salud recomienda tener dos pruebas serológicas positivas para decir que un paciente es positivo a Chagas, en caso ser negativo al diagnóstico parasitológico. Sin embargo, las pruebas moleculares de PCR y qPCR son de gran ayuda para confirmar la presencia del parásito(5). Estas pruebas moleculares son de ayuda sobre todo cuando hay discordancia entre pruebas serológicas o la presencia de reacción cruzada con *Leishmania sp.* y *T. rangelli* (29). Debido a que las pruebas serológicas se basan en la detección de anticuerpos circulantes (detección de IgG) contra el parásito, no es una opción viable para el diagnóstico en Chagas congénito, en pacientes inmunosuprimidos, ni para el monitoreo de terapias anti-chagásicas(20). Como se sabe, el Chagas congénito es causado por la transmisión transplacentaria del parásito de la madre infectada a su hijo. Además, anticuerpos (IgG)maternos son capaces de pasarla barrera placentaria imposibilitando el uso de pruebas serológicas(IgG anti *T. cruzi*) durante los primeros 6 meses de edad(19).

En el caso de pacientes inmunosuprimidos, como aquellos que presentan coinfecciones con el Virus de Inmuno Deficiencia Humana (VIH), estos poseen una baja respuesta inmunitaria y por lo tanto las pruebas serológicas presentan baja sensibilidad(20). Por otro lado, el progreso del tratamiento de la enfermedad no puede ser monitoreado por pruebas serológicas, debido a la permanencia de los

anticuerpos aún después de eliminado el parásito(6).

Para el diagnóstico durante la fase aguda se utiliza microscopía o PCR, ambas técnicas limitadas por la parasitemia presente, ya que el número de parásitos circulantes puede llegar a ser menor que el límite detectable por ambas. Otro aspecto que considerares el costo, la infraestructura y tener un personal técnico capacitado para realizar las pruebas moleculares como PCR o qPCR, lo que limita el uso de estas técnicas en las zonas endémicas(30).

## **1.2.2 Aptámeros y SELEX**

### **1.2.2.1 SELEX**

El primer experimento de SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) fue realizado en 1990 por Craig Tuerk mientras estudiaba la autorregulación del fago T4, la cual se produce a través de la unión de la proteína del gen 43(T4 DNA polimerasa) con su propio ARN mensajero(31). Esta unión proteína-ARN responde a la formación de una estructura secundaria, de tipo horquilla, que presenta un tallo y un lazo con un motivo de 8 bases. Con la finalidad de conocer la importancia de cada nucleótido de este motivo, Tuerk realizó una biblioteca de secuencias de ARN con mutaciones aleatorias en las 8 bases del lazo y la enfrentó a la proteína del gen 43 en ensayos de unión de manera repetitiva, con lo que descubrió al final de estos ciclos que sólo dos secuencias unían exitosamente la proteína: la secuencia original y una secuencia con 4 mutaciones(32).

Este hallazgo cimentó las bases metodológicas del SELEX y generó la idea de utilizar este método con la intención de seleccionar oligonucleótidos de hebra

simple con fines aplicados y comerciales, a los cuales se les denominó aptámeros(33).

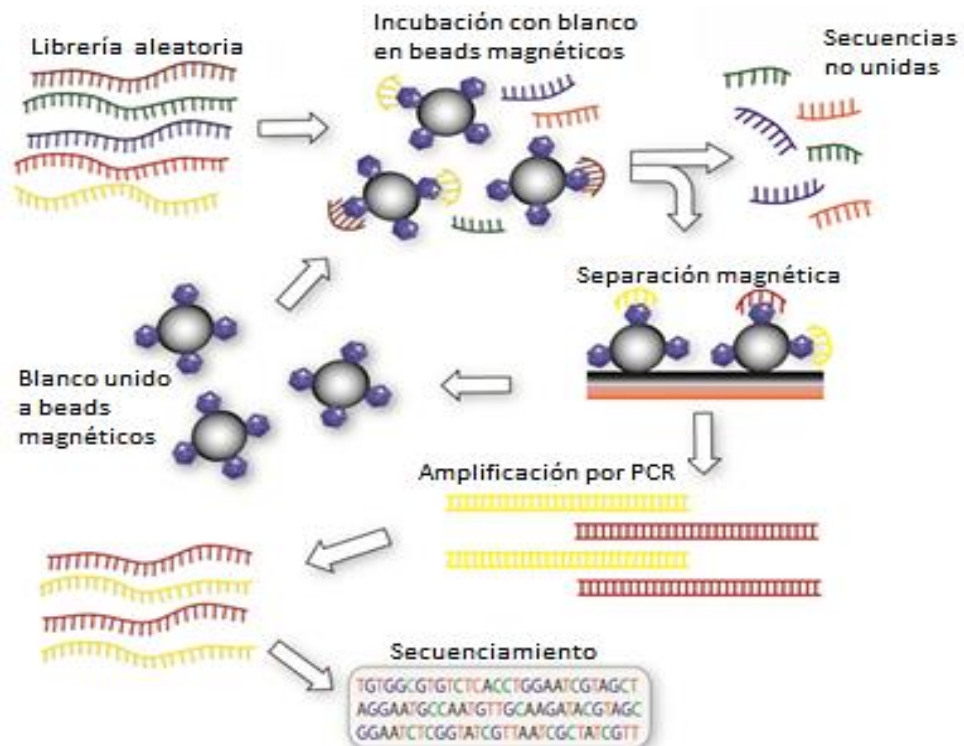
El método de SELEX describe en su nombre su principio de trabajo: “Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial”. En este se utiliza una biblioteca químicamente sintetizada de ARN o ADN de hebra simple que posee una zona central aleatoria y dos extremos fijos complementarios a sondas específicas para amplificar el ácido nucleico. La hipótesis bajo la que trabaja todo SELEX es la siguiente: *En una biblioteca tan diversa existe al menos una secuencia de alta afinidad a la molécula blanco*(34).

Esta biblioteca es incubada con moléculas blanco en condiciones controladas con la finalidad de separar aquellas secuencias capaces de unirse al blanco de aquellas que no. Las secuencias capaces de unirse son luego amplificadas a través de PCR, con sondas específicas a los extremos fijos de la secuencia, generando una nueva biblioteca menos diversa y más enriquecida con secuencias capaces de unir el blanco.

Este proceso de incubación y amplificación que se realiza de manera repetitiva se conoce como ciclo de SELEX y las condiciones durante estos ciclos se vuelven cada vez más estrictas con la finalidad de aumentar el enriquecimiento y afinidad de los oligonucleótidos al blanco. Finalmente, a partir de las bibliotecas enriquecidas se obtienen potenciales aptámeros a través de secuenciamiento, los cuales son evaluados para determinar su capacidad de unión y cinética(32)(35).

La metodología convencional establecida por Tuerk en 1990 requería de 20 ciclos a más. Sucesivamente se reportaron variaciones del método con la finalidad de

acortar el tiempo de trabajo requerido para seleccionar un aptámero(36)(37). Métodos como SELEX usando electroforesis capilar, SELEX basado en partículas magnéticas, Cell-SELEX, in vivo-SELEX, etc. (revisado en estudios de Ruml (35)). Dentro de estos uno de los más utilizados es el SELEX con partículas o beads magnéticos, ya que facilita el proceso de separación (**Figura. 2**). En este método se unen las moléculas blanco a beads magnéticos los cuales son enfrentados a la biblioteca, luego de un periodo de incubación se procede a la separación con un imán, que facilita el retiro de las moléculas que no fueron capaces de unirse al blanco. SELEX usando beads llevó a obtener aptámeros para moléculas como 4-cloroanilina, 2,4,6-tricloroanilina and pentaclorofenol L(38).



**Figura 2.- Esquema de SELEX basado en beads magnéticos.** La biblioteca es incubada con beads magnéticos cubiertos de moléculas blanco, luego se utiliza fuerza magnética para separar las secuencias unidas de las no unidas y se procede a amplificarlas por PCR. Esto se repite hasta obtener enriquecimiento, momento donde se secuencia y analiza los potenciales aptámeros. Fuente: Darmostuk *et al.*, 2014

### **1.2.2.2 Definición de aptámero**

El término Aptámero fue utilizado por primera vez en el trabajo de Ellington y Szostak en 1990(39), que desarrolló de manera independiente la misma estrategia que Tuerk y Gold del mismo año(32). Este viene del griego Aptus y Meros, cuyas acepciones en inglés son “to fit” y “particle” que en español se traduciría a “partícula que une” o “partícula que encaja”.

Un aptámero es una secuencia corta de ARN o ADN de hebra simple con ~15- 100 nucleótidos cuya configuración 3D le otorga afinidad y especificidad con otras especies químicas. El rango de posibles blancos de unión es amplio, iones(40), pequeñas moléculas(41) hasta células(42) han sido utilizadas exitosamente para la selección de aptámeros.

Aunque los estudios iniciales seleccionaron aptámeros de ARN(32)(39), aptámeros de ADN de hebra simple también han sido seleccionados exitosamente(38)(43). El gran avance de los primeros se debe a dos aspectos: son biológicamente relevantes, como en el fago T4(32), y son estructuralmente más versátiles. Los aptámeros presentan grandes ventajas al ser poco costosos, simples de sintetizar y de mayor estabilidad, por lo que su selección se encuentra en aumento(44).

### **1.2.2.3 Propiedades de los aptámeros**

Evidencia estructural obtenida por cristalografía permitió verificar que los aptámeros deben su capacidad de unión a su estructura terciaria(45). Estos poseen motivos estructurales conocidos como horquillas, tallos, lazos y G-cuádruplex(46)(44) que permiten la formación de bolsillos de unión, donde se



producen interacciones de unión débiles con la molécula blanco(33). Se han identificado enlaces *van der Waals*, puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas entre grupos cargados, interacciones hidrofóbicas y apilamientos(44). Además, algunos aptámeros generan cambios conformacionales adaptativos una vez unidos al blanco que les permiten la unión con gran afinidad(47). La especificidad lograda con aptámeros ha permitido discriminar moléculas estructuralmente muy similares como teofilina y cafeína(48), que sólo difieren en un grupo metilo, y enantiómeros como L-arginina y D-arginina(49).

#### **1.2.2.4 Ventajas sobre otros biosensores**

Los aptámeros presentan ciertas ventajas respecto a otros biosensores, como anticuerpos. Estas ventajas son debido a su naturaleza química, su método de selección y la forma de producción (**Tabla 1**). Al ser ácidos nucleicos poseen bajas probabilidades de generar inmunogenicidad y poseen alta estabilidad, especialmente los aptámeros de ADN. A diferencia de las proteínas, pueden pasar por procesos cíclicos de denaturación y renaturación(50), característica que les permite ser transportados a temperatura ambiente y mantenerse en almacenamiento por largos periodos de tiempo(51).

Poseen una fácil y costo-efectiva producción, al ser sintetizados químicamente, lo cual genera una nula o mínima variación entre lotes de producción en comparación con tejidos y animales como es el caso de anticuerpos. Además, facilita realizar modificaciones que aumenten la resistencia a nucleasas, incorporen fluoróforos u otros grupos químicos, permitiendo generar biosensores rápidamente(44).

Por último, el método de selección permite una gran variedad de condiciones ambientales, posibilitando la selección de aptámeros estables en condiciones variables, a diferencia de las condiciones fisiológicas propias de anticuerpos. Por otro lado, el abanico de posibilidades es amplio ya que permite la selección de aptámeros afines a moléculas no inmunogénicas, tóxicas u otras especies químicas. En su conjunto, las propiedades arriba mencionadas convierten a los aptámeros en biosensores muy versátiles(52).

Características	Ventajas
Los Aptámeros son identificados a través de un proceso in vitro (SELEX)	-Condiciones de selección variables -Aptámeros pueden seleccionarse para proteínas no inmunogénicas o toxinas.
Producción por síntesis química	-Nula/Poca variación entre lotes -Permite modificaciones -Bajo costo de producción
Los Aptámeros son oligonucleótidos	-Almacenamiento a largo plazo por estabilidad y transporte a temperatura ambiente -Baja probabilidad de generar inmunogenicidad -Pequeño tamaño favorece entrada a célula o compartimientos -Facilidad de renaturación

**Tabla 1.- Ventajas de los aptámeros.**

Fuente: González *et al.*, 2016.

### **1.2.2.5 Aplicaciones de los aptámeros**

En salud los aptámeros tienen dos aplicaciones de principal interés, en diagnóstico y terapia. Como biosensores permiten el desarrollo o adaptación de métodos diagnósticos de enfermedades, ya que poseen afinidades en el rango nM- $\mu$ M y una alta estabilidad. Los apta sensores hasta ahora probados, explotan reacciones electroquímicas, fluorescentes y colorimétricas(53).

Como herramientas terapéuticas, los aptámeros pueden actuar como drogas, inhibir directamente o indirectamente de manera específica proteínas o moléculas vitales(54). Además, pueden facilitar el transporte específico de drogas en unión con micelas(52). Otras aplicaciones posibles son en bio-imágenes, detección de toxinas, análisis de muestras en agricultura, ganadería, entre otras(53)(55).

### 1.3 Justificación del estudio

Chagas es una enfermedad infecciosa que genera gran morbilidad, con aproximadamente 6 millones de infectados mundialmente (18) y 2 millones de personas en riesgo en Perú (56). El control de esta enfermedad posee dos limitaciones: métodos diagnósticos poco eficientes respecto a tiempo y dinero, y enfoques terapéuticos tóxicos(57). Identificar aptámeros capaces de reconocer con alta afinidad y sensibilidad una proteína o péptidos de una proteína abundante y conservada en *T. cruzi* generará la posibilidad de desarrollar a futuro métodos diagnósticos alternativos a los existentes(30),de bajo costo e idealmente de fácil aplicación. La identificación y caracterización funcional de nuevos aptámeros permitirían proponer métodos de reconocimiento directo antígeno del parásito, ideales para el diagnóstico en Chagas congénito, coinfecciones, pacientes inmunosuprimidos y para el monitoreo de carga parasitaria en terapias. Además, estos aptámeros desarrollados contra elementos esenciales de patógenos podrían ser usados como blancos terapéuticos que permitan bloquear funciones vitales del parásito. Todas estas posibilidades responden a las actuales limitaciones del control *low-cost* de *T. cruzi*, dado que la producción de aptámeros es 10 a 50 veces menos costosa que la de anticuerpos monoclonales y no requiere costosos equipos (58).

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Seleccionar aptámeros contra un potencial nuevo biomarcador de *Trypanosoma cruzi* y evaluar su capacidad de reconocimiento en muestras biológicas provenientes de cultivos del parásito.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- A. Analizar bioinformáticamente el traductoma de *T. cruzi* para identificar potenciales biomarcadores, abundantes y conservados de *T. cruzi*
- B. Producir péptidos estructurados, estables y expuestos a partir de los biomarcadores potenciales identificados para utilizarlos como blanco en el desarrollo de aptámeros.
- C. Comparar un método Multitarget (mezcla de blancos) de SELEX con el método Unitarget convencional (blanco único).
- D. Identificarlas secuencias nucleotídicas de potenciales aptámeros en base a su representación y enriquecimiento a lo largo del proceso de SELEX.
- E. Comprobar la capacidad de unión de aptámeros a sus respectivos blancos de selección y a lisados de cultivos de *T. cruzi*, a través de la evaluación cualitativa de reactividades en un método ELONA.

## **CAPÍTULO II: METODOLOGÍA**

## 2.1 Diseño del estudio

El presente es un estudio cuantitativo experimental, que implica desarrollo tecnológico, investigación bioinformática, de biología molecular y bioquímica *in vitro*. Este califica como un estudio de desarrollo tecnológico, ya que su objetivo es producir nuevas herramientas para la investigación de la enfermedad de Chagas en base a tecnologías y conocimiento científico actualmente disponible. Además, busca comparar formas metodológicas clásicas y personalizadas para esta producción tecnológica.

El proyecto califica como un estudio de investigación bioinformática, ya que buscará y evaluará potenciales biomarcadores de *Trypanosoma cruzi* a través de herramientas bioinformáticas, obteniendo predicciones que encaminarán el diseño experimental. Por último, califica como un estudio de biología molecular y bioquímica *in vitro*, debido al tipo de herramientas de producción y evaluación que utiliza, basándose en Transcripciones, PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), reacciones enzimáticas e imágenes. El flujograma experimental seguido es el siguiente:



**Figura 3.- Flujograma experimental**

## 2.2 Procedimientos y técnicas

### 2.2.1. Análisis para la selección de blancos de interés de *T. cruzi*

Se realizó una búsqueda utilizando las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (59) (NCBI) para identificar estudios del genoma, transcriptoma y proteoma de *Trypanosoma spp.* La información obtenida de los artículos científicos seleccionados fue comparada con los datos disponibles en Tritrypdb (60). Con estos datos, se seleccionó una proteína con las siguientes características:

- Abundancia: alta expresión en estadios de Tripomastigote/Tripomastigote metacíclico.
- Localización en la membrana o en el citosol: a través de bibliografía y/o reconocimiento/predicción de dominios.
- Especificidad: se determinó a través de alineamientos en tBLASTn y BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool) para proteínas(61).
- Patrón de expresión durante el ciclo vital de *T. cruzi*: A través de bibliografía y evidencia experimental entre estadios de *T. cruzi* por Microarrays(62) y Ribosome profiling(63).
- Estructuras 3D: búsqueda de estructura cristalizada en el Protein Data Bank (PDB) o modelamiento por homología a través de Swiss-model de Expasy(64).

Con la finalidad de identificar péptidos estables, estructurados y expuestos, representativos de la proteína blanco durante el SELEX, se utilizó la herramienta Genscript (Piscataway, NJ, USA): OptimumAntigen™ design tool. Esta herramienta



evalúa múltiples aspectos, incluyendo antigenicidad, hidrofobicidad, probabilidad de ubicarse en la superficie de la membrana o de estar integrada a ésta, homología, regiones flexibles, regiones hélices, péptido señal y modificaciones. Péptidos descritos en la bibliografía cuyo potencial en diagnóstico ya había sido probado fueron incluidos.

### 2.2.2. Síntesis de moléculas blanco de *T. cruzi*

Se optó por dos estrategias para la síntesis de moléculas blanco: síntesis por expresión recombinante de proteínas, y síntesis química de péptidos pertenecientes a las primeras.

- Expresión recombinante del gen TcCLB.510323.60

El plásmido pET-24a (+) con el gen TcCLB.510323.60 fue sintetizado por GenScript (USA, NJ) y fue transformado en la cepas BL21(DE3) y Rosetta™(DE3) de *E. coli* a través del kit “Mix & Go *E. coli* Transformation Kit & Buffer Set” de ZYMO RESEARCH (USA,CA). Las pruebas de expresión se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) en una matriz de condiciones de temperatura, concentración de IPTG y tiempo de expresión.

- Péptidos

Los péptidos identificados fueron sintetizados por Genscript (USA) con una modificación en N-terminal con Ahx-Biotina.



**Figura 4. - Esquema de elementos en el péptido sintético.**  
Ahx: ligando flexible 6-aminohexanóico

### **2.2.3. Acoplamiento de blancos biotinilados a beads magnéticos**

Para inmovilizar los péptidos se utilizaron los beads magnéticos Streptavidin Mag Sepharose de General Electric Healthcare Life Science (USA) con una capacidad de unión de 10 pmol/μL de beads. Luego de equilibrar los beads con buffer de unión (50 mM Hepes, pH:7.1, 100 mM NaCl, 10% Glycerol), se incubaron con los péptidos de *T. cruzi* por 40 min a temperatura ambiente y en constante movimiento. Para asegurar la saturación de los beads, se incubó con tres a cinco magnitudes de exceso de péptido en relación a la capacidad de unión de la cantidad de beads preparados (pmol de saturación de péptido = 3\*volumen beads (μL) \*capacidad de unión (10 pmol/μL)). La cantidad de pmol de péptido en cada ciclo de SELEX se determinó como volumen de Beads (μL) por capacidad de unión de Beads (pmol/μL).

### **2.2.4. SELEX y purificación del aptámero**

#### **2.2.4.1 Selección**

La técnica de SELEX consiste en la repetición de ciclos de selección de ligandos a partir de bibliotecas heterogéneas, donde las condiciones se vuelven cada vez más restrictivas con la finalidad de sólo mantener aquellas secuencias de ADN altamente afines al blanco. Para iniciar este proceso es necesario definir tres elementos: el blanco unido a una matriz (péptidos-beads magnéticos), la biblioteca de ADN de hebra simple o ARN y la solución de selección.

El buffer de selección se denominó SELEX buffer (50mM Tris HCl (pH: 7.4), 100mM de NaCl, 1.5mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, y 6 mM de 2-Betamercaptoetanol). Se utilizó la biblioteca de ADN de hebra simple de la marca TriLink Biotechnologies (CA, USA), la cual consta de una región aleatoria de 40

nucleótidos (N40) que está flanqueada por regiones de 23 nucleótidos (nt) a las que se unen primers, dando un total de 86 nt, y un peso molecular promedio de 26 kDa.

Esta biblioteca posee la siguiente estructura:

5' TAG GGA AGA GAA GGA CAT ATG AT (N40) TTG ACT AGT ACA TGA  
CCA CTT GA 3'

Se utilizaron los siguientes primers para los pasos de amplificación:

Forward Primer: 5' TAG GGA AGA GAA GGA CAT ATG AT 3'

Reverse Primer: 5' TCA AGT GGT CAT GTA CTA GTC AA 3'

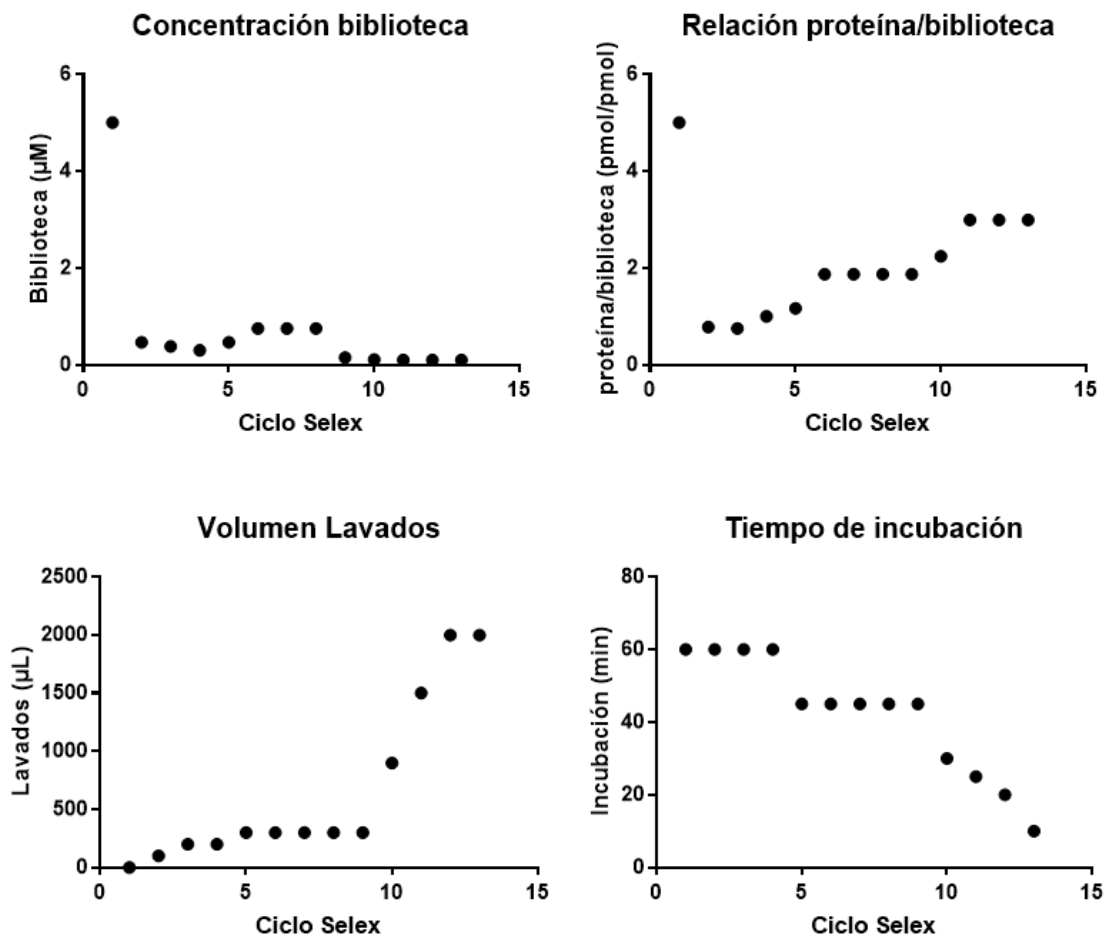
Reverse T7 Primer: 5' TTC AGG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG TCA  
AGT GGT CAT GTA CTA GTC AA 3'

Las condiciones de selección fueron definidas anticipadamente de acuerdo con la siguiente Tabla:

Ciclo de SELEX	Tiempo incubación (min)	Número de lavados	Volumen por lavado (µL)	Volumen reacción (µL)	Péptido (pmol)
1	60	0	0	200	200
2	60	1	100	200	120
3	60	2	100	200	100
4	60	2	100	200	60
5	45	3	100	200	80
6	45	3	100	200	80
7	45	3	100	200	80
8	45	3	100	200	80
9	45	3	100	1000	80
10	30	3	300	1000	50
11	25	3	500	1500	50
12	20	4	500	1500	50
13	10	4	500	1500	50

**Tabla 2. Condiciones de selección para los 13 ciclos de SELEX.** Los tiempos de incubación de la selección positiva y negativa fueron los mismos. Fuente: Elaboración propia.

Existen 4 puntos de rigurosidad posibles en SELEX: concentración de la biblioteca, relación proteína/biblioteca, lavados y tiempo de incubación (**FIG. 5**). La variación progresiva de estos dirigiría el enriquecimiento de la biblioteca de ADN hacia moléculas siempre de mayor afinidad. Se determinó que la concentración de la biblioteca alrededor de los 13 ciclos se mantuviese similar y menor a  $0.7 \mu\text{M}$  y se aumentó progresivamente el ratio molar de proteína /biblioteca(pmol/pmol) y el volumen de lavados. Por último, el tiempo de incubación disminuyó a lo largo de los ciclos.



**Figura 5. Variación de las condiciones de selección a lo largo de los ciclos de SELEX.** Los ciclos de SELEX fueron graficados en el eje X y cada condición en el eje Y. Fuente: Elaboración propia.

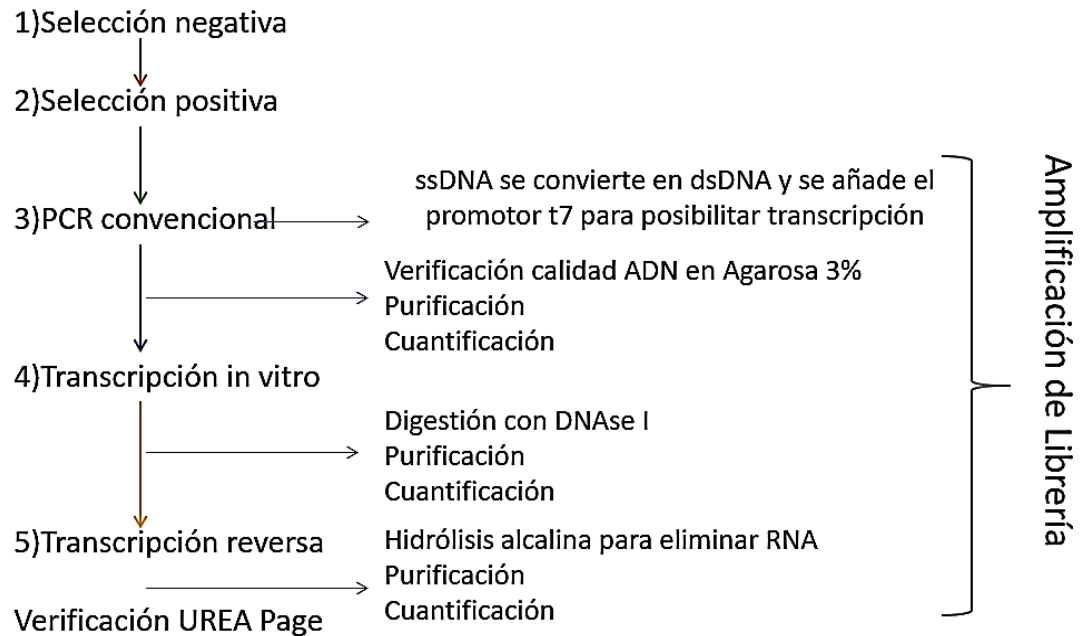
Para iniciar la selección se preparó la biblioteca en SELEX buffer 1x. Para ello, en el ciclo 1 de SELEX se utilizó 10  $\mu\text{L}$  de la biblioteca stock a 100  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{L}$  de SELEX Buffer 5x y agua libre de nucleasas hasta un volumen total de 200  $\mu\text{L}$ . Una vez preparada la biblioteca, se calentó a 95°C por 5 minutos e inmediatamente después se enfrió en hielo por al menos 5 minutos.

Con la finalidad de disminuir la población de secuencias afines a la matriz y a estreptavidina, el primer ciclo de SELEX presentó una selección negativa antes de la selección positiva. Por ello, se agregó 10  $\mu\text{L}$  de beads magnéticos solos anteriormente equilibrados en buffer SELEX 1x y se incubó por 60 min en movimiento a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de incubación, se recuperó el sobrenadante que se volvió a calentar a 95°C por 5 min y a enfriar por 5 min en hielo. La biblioteca sobrenadante de la selección negativa fue utilizada inmediatamente para iniciar la selección positiva.

Para la selección positiva del ciclo 1 del SELEX la biblioteca preparada fue agregada a 10  $\mu\text{L}$  de beads magnéticos acoplados con los péptidos e incubada a temperatura ambiente en constante movimiento por 60 minutos. Terminado este tiempo, se separaron los beads con ayuda de un magneto y se realizaron lavados según el diseño (**Tabla 2**). Los beads fueron resuspendidos en 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas e incubados a 95°C por 5 min con la finalidad de degradar la estreptavidina y liberar las secuencias unidas. En los siguientes ciclos el proceso fue similar, pero la cantidad de beads, tiempo de incubación, número de lavados, volumen de lavado y volumen de reacción fue variando según el diseño de la **Tabla 2** y la **Figura 5**, por lo que los volúmenes utilizados se ajustaron.

### 2.2.4.2 Amplificación de biblioteca

Una vez finalizada la selección, se posee una pequeña cantidad de cadenas de ADN de hebra simple unidas al blanco que deben ser amplificadas con la finalidad de volver a iniciar otro ciclo de selección. Para ello se utilizó el siguiente esquema de amplificación (**Figura 6**).



**Figura 6. Esquema de un ciclo de SELEX.** Cada ciclo de SELEX involucra una etapa de selección y de amplificación. 1) y 2) corresponden a la etapa de selección y 3,4,5, corresponden a la etapa de amplificación de la biblioteca seleccionada. Todo ciclo de SELEX se finalizó verificando la calidad de la biblioteca por Urea-PAGE 12%.

- PCR convencional

El primer paso de la amplificación consistió en una PCR convencional, donde se añadió la secuencia del promotor T7, necesaria para la transcripción *in vitro*. Se utilizó 50 µL finales de la selección, 0.5µM forward primer, 0.5 µM reverse T7 primer, Maxima Hot Start PCR Master Mix (1X) en un volumen final de 300 µL. Las condiciones de termociclador utilizadas consistieron en 5 min a 95°C denaturación inicial, 8-15 ciclos de 45 segundos a 95°C de denaturación, 45 segundos a 52°C de annealing, 40 segundos a 72°C de extensión y 5 minutos a 72°C extensión final. Se evaluó la calidad del producto a través de un gel de TBE agarosa 2-3% a 60V por 30 minutos con un marcador de tamaño de 50 pares de bases (bp) (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder) y un producto con banda de tamaño verificado. Se purificó el producto de PCR con Oligo Clean & Concentrator kit de ZYMO RESEARCH (USA, CA) y se eluyó en agua libre de nucleasas. El producto purificado se cuantificó por quintuplicado con el kit Quant-it dsDNA Assay Broad Range (Thermo Fisher scientific, USA, MA) en un NanoDrop™ 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher scientific, USA, MA).

- Transcripción *in vitro*

El segundo paso de la amplificación consistió en una reacción de transcripción *in vitro* con el TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Fisher scientific, USA, MA). Cada reacción de 20 µL utilizó 80-200ng de ADN del paso anterior en 1X buffer de reacción TranscriptAid. Se incubó la reacción a 37°C por 2 h y se purificó con el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit (ZYMO RESEARCH, USA, CA). Se realizó una digestión en columna del ADN molde con 30 U

ADNasa 1 por 15 minutos a temperatura ambiente en buffer de digestión (100 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mM espermina, 0.5 mM espermidina). El ARN obtenido se cuantificó por quintuplicado con el Quant-iT RiboGreen RNA Assay kit en el NanoDrop™ 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher scientific, USA, MA).

- Transcripción reversa

Por último, con la finalidad de regenerar la biblioteca a hebra simple de ADN se utilizaron dos reacciones del RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher scientific, USA, MA) con un volumen total de 40 µL. Cada reacción contó con 200 pmoles de ARN y 190 pmoles de primer forward. Se incubó 1h a 43°C y 5 min a 70°C. Se realizó una hidrólisis alcalina en Buffer de hidrólisis (0.2 M EDTA y 0.4 M NaOH concentración final) por 30 min a 65°C. Se purificó con una columna de Oligo Clean & Concentrator kit (ZYMO RESEARCH, USA, CA) y se eluyó en agua libre de nucleasas. Este purificado se cuantificó por quintuplicado con el kit Qubit ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher scientific, USA, MA) en un NanoDrop™ 3300 Fluorospectrometer.

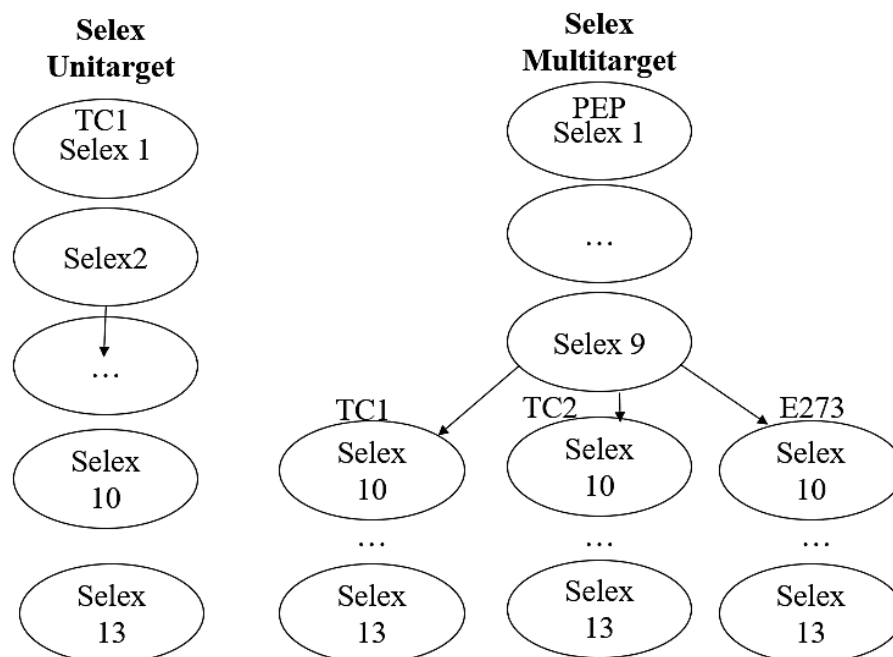
#### **2.2.4.3 Evaluación de calidad**

En cada ciclo de SELEX se evaluó la calidad de la biblioteca en los pasos de amplificación a través de un Urea-PAGE 12% en TBE, 200V por 50 min con tinción en azul de metileno (0.02%) por 30 minutos. Se analizaron los tres productos de amplificación: dsADNT7, ARN y ssADN, verificando que fueran del tamaño correcto con marcadores y/o preparaciones de referencia y que no tuviesen contaminantes extras propias de sobre amplificación.



### 2.2.5 Acerca del SELEX Unitarget y SELEX Multitarget

Se realizaron dos métodos de SELEX que difieren en el número de blancos por selección. El método tradicional, que utiliza una única molécula como blanco/target, al cual se le denominó Unitarget, y un nuevo método, basado en la selección con una mezcla de moléculas blancos/targets y la posterior separación de la selección de manera individual, a la cual se le denominó Multitarget. En el SELEX Unitarget se seleccionó aptámeros contra el péptido TC1 y en el SELEX Multitarget se seleccionaron aptámeros contra una mezcla de ocho péptidos inicialmente y luego se realizaron selecciones individuales para tres péptidos de los ocho: TC1, TC2 y E27. Las selecciones para ambos métodos se realizaron de manera paralela bajo las mismas condiciones con la finalidad de ser comparadas y se estableció que los pmol totales de la mezcla de 8 péptidos representaría la suma de cantidades equivalentes de cada uno de los péptidos integrantes (**Tabla 2**). En el método Unitarget se realizaron selecciones negativas en los ciclos 1, 5, 9, 10, 11, 12 y 13 con beads magnéticos; mientras que en el método Multitarget, se realizaron selecciones negativas en los ciclos 1, 5, 9 con beads magnéticos y los ciclos 10 al 13 con los péptidos restantes de la mezcla de 8 péptidos. La **Figura 7** muestra el proceso de ambos métodos.

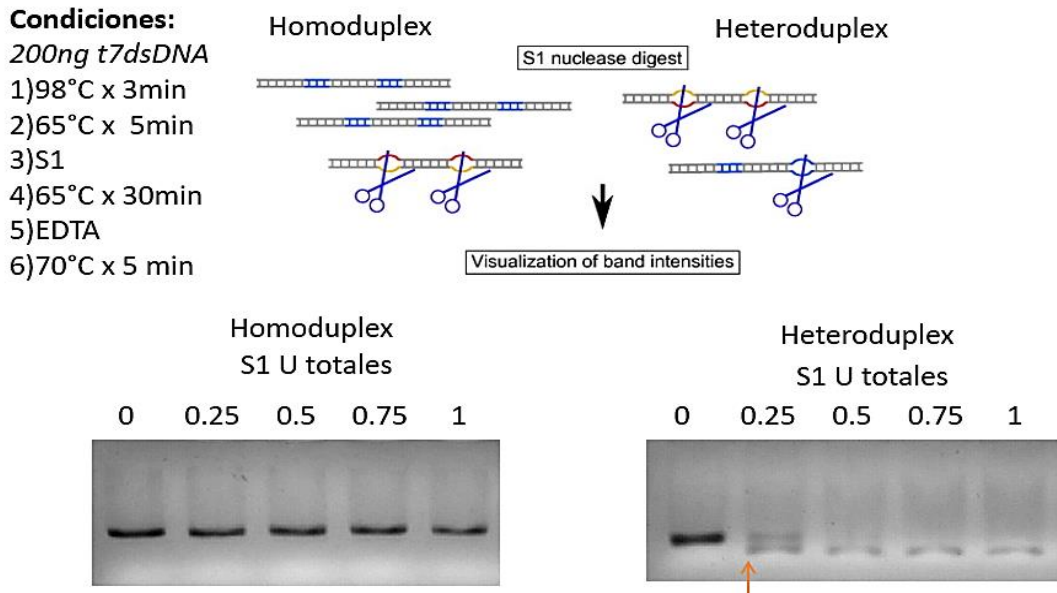


**Figura 7.- Esquema del SELEX Unitarget y Multitarget.** El método SELEX Unitarget consiste en la selección individual de aptámeros contra el péptido Tc1 durante 13 ciclos seguidos. El método SELEX Multitarget selecciona aptámeros contra una mezcla de 8 péptidos (PEP) por 9 ciclos y luego utilizando la biblioteca de ADNc del ciclo 9 realiza selecciones individuales contra los péptidos integrantes de PEP: Tc1, Tc2, E27. Fuente: Elaboración Propia

### 2.2.6 DiVe (Diversity Visualization by Endonuclease)

Cada reacción constó de 4  $\mu\text{L}$  de buffer 5X de la nucleasa S1 (200 mM CH<sub>3</sub> COONa, 1.5 M NaCl, 10 mM ZnSO<sub>4</sub>, pH 4.5), 200 ng de ADN de doble hebra (dsDNA T7) y agua a un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . Se incubó los tubos a 98°C por 5 min e inmediatamente a 65°C por 5 min. Al finalizar el tiempo, se añadió 1  $\mu\text{L}$  de 0.5U/ $\mu\text{L}$  de nucleasa S1 y se incubó por 30 min a 65°C. La reacción finalizó a 70°C por 5 min con 2  $\mu\text{L}$  de EDTA 26 mM y el producto digerido se observó en agarosa 2-3% TBE a 60V por 40 min. Se realizó un control positivo de digestión con una muestra de alta diversidad proveniente

del sobrenadante del ciclo 1 de SELEX y un control negativo de digestión con una muestra de baja diversidad correspondiente a la amplificación de un único gen. Un control sin enzima S1, descartó degradación de la biblioteca en condiciones experimentales. (**Figura 8**).



**Figura 8.- Principio y estandarización del ensayo DiVE.**

Muestras heterogéneas (heteroduplex) poseen porciones no apareadas con presencia de hebras simples de ADN que son digeridas por la endonucleasa S1. **Estandarización:** el homoduplex muestra una banda de tamaño e intensidad similar antes y después de agregar la enzima S1 (0 vs 0.25, 0.5, 0.75 U totales S1) exceptuando cantidades elevadas de S1 (1 U total) que fueron evitadas. El heteroduplex muestra variación en la intensidad y tamaño de sus bandas, observándose la aparición de sub-productos de digestión (0 vs 0.25, 0.5, 0.75, 1 U totales). Las condiciones ideales de S1 se establecieron en 0.5 U totales por 30 min a 65°C. Fuente: Lim TS (2011) y elaboración propia.

## 2.2.7 Secuenciamiento de bibliotecas

Una vez verificada la calidad de las bibliotecas y asegurado el enriquecimiento por el método de DiVE, se procedió a secuenciarlas mediante secuenciamiento de alto rendimiento en MiSeq 2000 (Illumina, USA, CA). Se aplicó un análisis evolutivo de las secuencias a lo largo de los ciclos de enriquecimiento de SELEX. Para la aproximación de SELEX Unitarget se utilizaron las muestras de los ciclos S5, S10, S13, mientras que para el SELEX Multitarget de los ciclos S5, S9, S13. La preparación de los materiales y bibliotecas de secuenciamiento se realizó utilizando el Kit 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, USA, CA).

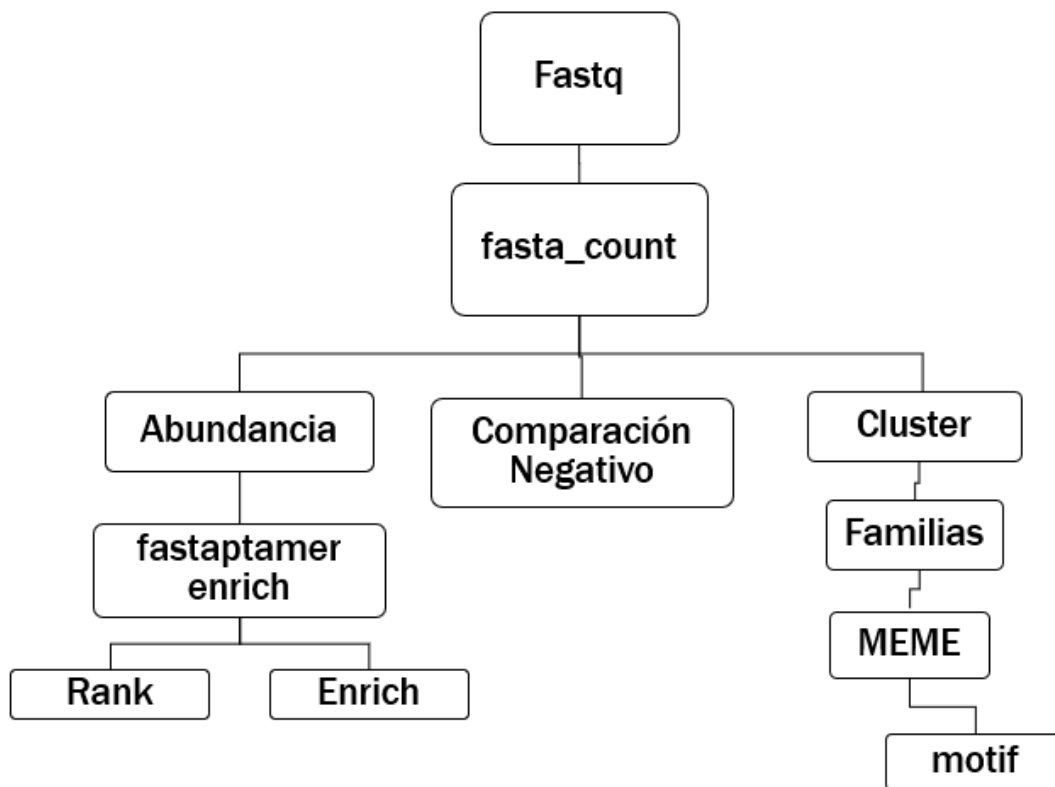
### 2.2.7.1 Análisis bioinformático de candidatos a aptámeros

Los resultados del secuenciamiento en formato fastq se procesaron por Galaxy Project (<https://usegalaxy.org/>)(66) para complementar los archivos con la fastq forward y reverse. El análisis bioinformático se realizó a través del software FASTAptamer(67) siguiendo el esquema de análisis en la **Figura 9**.

Se normalizaron los reads obtenidos a RPM (ReadsPer Million:  $\text{reads}/\text{reads totales} \times 10^6$ ), obteniéndose archivos Fasta con secuencias únicas a través del comando `fasta_count`. En base a estos formatos se hicieron tres análisis: clasificación por abundancia/enriquecimiento, filtrado de secuencias inespecíficas y formación de clusters con motivos comunes. Primero se analizó en relación a la abundancia con el comando `fastaptamer_enrich`; identificando aquellas secuencias mejor clasificadas y enriquecidas. En la Unitarget se comparó 5 vs 10, 5 vs 13 y 10 vs 13 y en la Multitarget: 5 vs 13, 5 vs 19 y 9 vs 13.

El segundo análisis se realizó con el comando `fastaptamer_compare` y consistió en

comparar estas secuencias abundantes y/o enriquecidas con las secuencias más abundantes en el control negativo, descartándose aquellas secuencias con similar número de RPMs que el negativo. Por último, el tercer análisis se realizó con el comando `fastaptamer_cluster`, con el cual se obtuvieron familias de secuencias similares, las cuales luego fueron analizadas en MEME(68) (<http://meme-suite.org/tools/meme>) donde se descubrieron los motivos más representados. A través de Mfold se predijo posibles estructuras secundarias de las secuencias seleccionadas a través de este esquema de análisis.



**Figura 9.- Esquema de análisis de datos de secuenciación para determinar candidatos a aptámeros.** Fuente: Elaboración Propia

### **2.2.7.2 Síntesis de oligonucleótidos**

Las secuencias de primers y de aptámeros fueron sintetizadas por la empresa MacroGen (Seoul, Korea), a través de su servicio de Oligo DNA synthesis, sin ninguna modificación. Se sintetizó una sonda similar al primer Reverse de la biblioteca con una modificación en el extremo 5' de una biotina para los ensayos de unión por ELONA (5' TCA AGT GGT CAT G 3').

## **2.2.8 Evaluación de capacidad de unión**

### **2.2.8.1 ELONA (Enzyme Linked Oligonucleotide Assays)**

La prueba de ELONA se caracteriza por adaptar el sistema de las pruebas inmunológicas a la nueva tecnología de los aptámeros. Fue descrita por primera vez en 1996 por el grupo de Romig y consiste en la fijación de la molécula blanco en una placa, bloqueo con una mezcla compleja neutra, incubación con aptámeros afines al blanco y visualización de la unión a través de peroxidasa de rábano (HRP) y un sustrato(69).

Para todas las pruebas de evaluación se utilizó una placa Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher scientific, USA, MA) y buffer SELEX con 0.05% Tween (**buffer ST**). De acuerdo con el tipo de blanco utilizado durante la evaluación, los pasos de bloqueo variaron.

Primero se evaluaron los aptámeros contra el blanco para el que fueron seleccionados. Se incubó 10  $\mu\text{M}$  de péptido biotinilado con 12  $\mu\text{M}$  de estreptavidina en buffer SELEX por 20 min a temperatura ambiente. Luego se diluyó esta mezcla en buffer carbonato 9.6 pH a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$  de péptido y 1.2  $\mu\text{M}$  de estreptavidina. Se añadió 100  $\mu\text{L}$  por cada pocillo y se

incubó por una hora en movimiento a temperatura ambiente y luego a 4°C durante toda la noche. Para el control negativo, se utilizó sólo 1.2 µM de estreptavidina por pocillo en un volumen de 100 µL.

Después de la fijación del blanco, se lavó 5 veces con 200 µL de buffer ST por pocillo y se bloqueó por 2 h a temperatura ambiente con buffer ST+5% leche en movimiento. Terminada esta incubación se lavó 4 veces con buffer ST a 200 µL/pocillo y se bloqueó con 4 µM de biotina y un volumen final de 100 µL por pocillo por 10 min a temperatura ambiente con movimiento. Se lavó 4 veces más con buffer ST a 200 µL/pocillo y se procedió a incubar por 2 h el aptámero (1 µM) hibridado con la sonda biotinilada (0.8 µM) usando 100 µL/pocillo de ST suplementado con 0.1% leche. La hibridación del aptámero con la sonda se realizó previamente a la incubación, se calentó a 95°C por 5 min y se enfrió inmediatamente en hielo por otros 5 min.

Terminada dicha incubación, se lavó 5 veces con 200 µL/pocillo de buffer ST y se incubó con el conjugado estreptavidina-HRP (dilución 1:1000 de la preparación comercial, Thermo Fisher scientific, USA, MA). Se usó 100 µL de la solución de estreptavidina-HRP por pocillo y se incubó por 1h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 5 veces con buffer ST y se utilizaron 100 µL de TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine para revelar la actividad enzimática de la HRP. La reacción se incubó por 3 minutos y se detuvo con 50 µL de 2N HCl. La actividad enzimática se midió por absorbancia a 450 nm en la lectora ELISA EMR-500 de Labomed.inc (CA, USA) o equivalente. Se incluyeron dos blancos de reacción por triplicado para cada péptido que se probó. El primer blanco no se incubó con

aptámero ni sonda biotinilada y el segundo blanco se incubó sólo con sonda biotinilada a 0.8 uM por pocillo de 100 µL.

Luego se probaron las secuencias candidatas con mezclas provenientes de lisados de cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* cepa “Y”, disponibles en el laboratorio. La cepa “Y” de *T. cruzi*, es una línea celular proveniente de parásitos aislados de la sangre de una paciente en etapa aguda en el año 1953 (70). Estos parásitos en forma de tripomastigote fueron utilizados para infectar células LLC-MK2 como es descrito en los trabajos de Eufrosina (71). Después de cuatro días de infección, el sobrenadante conteniendo tripomastigotes fue recolectado, centrifugado a 3000 g por 10 minutos y congelado para su almacenamiento. Se utilizaron dos tipos de lisados: lisados sonicados (proteínas solubles totales) y lisados tratados con TritónX-100 (proteínas solubles de membrana). Estos fueron fijados a las placas en presencia y ausencia del péptido TC1. Al ser lisados provenientes de cultivos celulares de tripomastigotes, se espera la presencia de la proteína TcCLB.510323.60 (que da origen a los péptidos TC1-TC5), lo cual podría contribuir a las lecturas finales en el ensayo.

### **2. 3 Consideraciones éticas**

El presente trabajo es un proyecto experimental *in vitro*, por lo que no involucra a personas y/o animales, ni muestras provenientes de ninguno de los anteriores. Por sus características, este proyecto (SIDISI 66634) fue exonerado de la evaluación por el Comité Institucional de Ética en Humanos o en Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.



## 2.4 Plan de análisis

Los datos fueron graficados y analizados usando GraphPad Prism version 7.03 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). Todas las mediciones cuantitativas se realizaron por quintuplicado o como se indica en las respectivas leyendas, y se calculó un promedio y desviación estándar. En los ensayos de ELONA, las mediciones con coeficientes de variación mayores a 20% fueron descartadas. Los promedios fueron evaluados para determinar diferencias significativas, analizándose normalidad por el test de Shapiro-Wilk e igualdad de varianzas por la prueba F. Se utilizó ANOVA de dos vías y el test de comparaciones múltiples de Tukey para comparar reactividad del aptámero con el péptido o con lisados con un intervalo de confianza del 95% (72). Y se añadió un cut-off del promedio del Blanco2 + 2 Desviaciones estándar para la evaluación de unión específica de los aptámeros con los péptidos Tc1, Tc2 y E27.

## **CAPÍTULO III: RESULTADOS**

### 3.1 Selección bioinformática de potenciales biomarcadores

Una ventaja de los aptámeros, aparte de su bajo costo una vez identificados y su estabilidad, es que permiten reconocer elementos no inmunogénicos, expandiendo notablemente el número de posibles biomarcadores a descubrir. Con esta finalidad, se realizó una búsqueda bioinformática de una proteína blanco con los siguientes criterios:

- Abundancia en el traductoma, especialmente en estadio de tripomastigote
- Tamaño pequeño/mediano o dominio conservado
- Posible proteína de secreción/excreción o de membrana,
- Alto grado de conservación dentro de varias cepas de *T. cruzi*
- Baja similitud con proteínas de parásitos problema que puedan causar reacciones cruzadas.
- Baja similitud con proteínas del proteoma humano

A través de una búsqueda bioinformática y bibliográfica, se halló el primer estudio de Ribosome profiling en *T. cruzi* publicado el 2015 (63). Ribosome profiling es una tecnología reciente que permite evidenciar la ocupación del ARN mensajero (ARNm) por el ribosoma (12). Este trabajo señaló cuantitativamente aquellas proteínas expresadas diferencialmente entre el tripomastigote metacíclico y el epimastigote. De esta manera se pudieron identificar proteínas con gran presencia en el tripomastigote metacíclico, forma infecciosa de interés (63). Para ello se comparó en la **Tabla 3** parte del traductoma en el epimastigote (nRPK E) con parte del traductoma en el tripomastigote metacíclico (nRPK MT), donde nRPK son lecturas normalizadas por kilobase de ARNm e indican una aproximación cuantitativa de la síntesis de una proteína. Dicha aproximación nos permitió obtener candidatos a biomarcadores en base su abundancia en el proteoma de *T. cruzi*. Se seleccionaron las 10

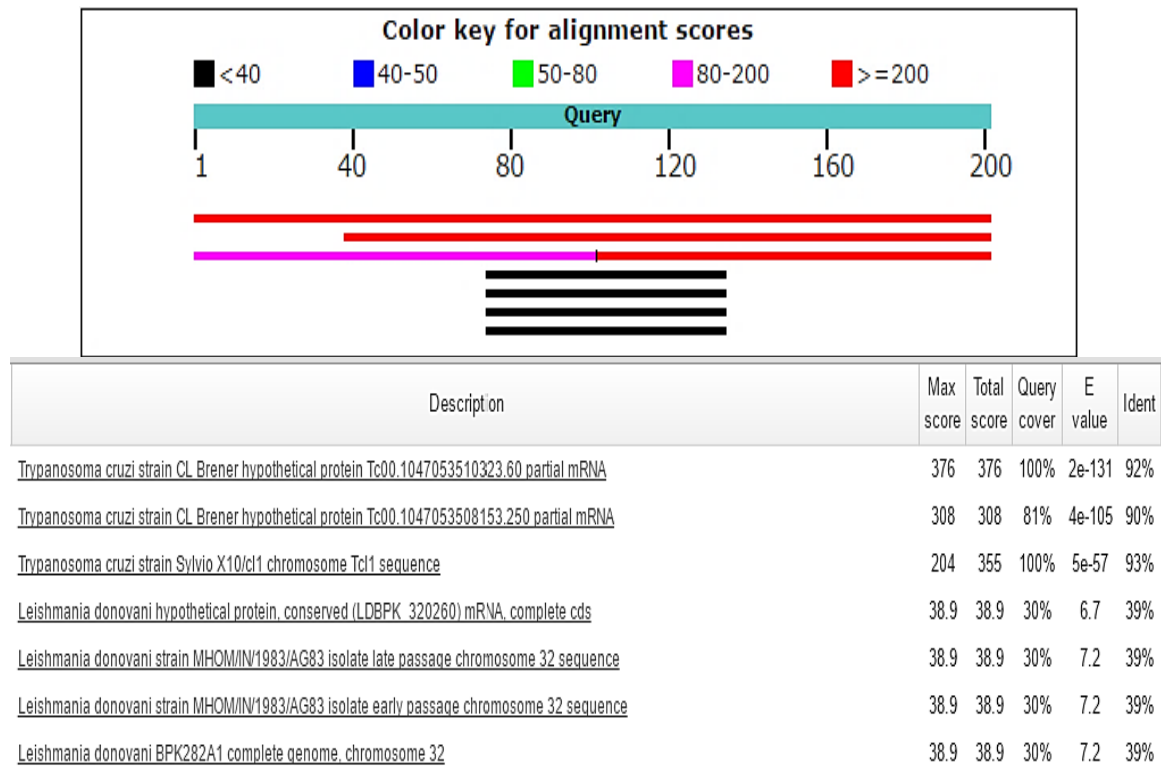
primeras opciones de esta lista y fueron analizadas a través de alineamientos en tBLASTn y BLASTp (61) contra toda la base de datos para determinar el grado de conservación al interior del género *Trypanosoma*.

A través del análisis con tBLASTn, se encontraron diversas proteínas, si bien abundantes, pero que presentaban similitud con proteínas de otras especies (>50% identidad). Sin embargo, el análisis de Ribosome Profiling seguido por tBLASTn evidenció que la proteína codificada por TcCLB.510323.60 es abundante y genéticamente específica para *T. cruzi*. Este gen codifica para una proteína hipotética de 202 aa y 22 kDa sin función asignada. TcCLB.510323.60 que presentó entre 90 a 93% de identidad en los genomas de *Trypanosoma cruzi strain CL Brener* y *Trypanosoma cruzi strain Sylvio X10/cl1*. Además, sólo alineó con una especie más de toda la base de datos, *Leishmania donovani* con 39% identidad y una cobertura del 30% como se puede observar en la **Figura 10**.

Traductoma				
ID	nRPK E	nRPK MT	log2FC(MT/E)	Anotación
TcCLB.428999.20	143.73	198915.22	10.43	receptor-type adenylate cyclase putative
TcCLB.510323.60	48.19	188065.36	11.93	hypothetical protein
TcCLB.509455.70	151.63	143101.66	9.88	DNA polymerase delta subunit 2 putative
TcCLB.504427.75	768.89	139679.28	7.51	hypothetical protein conserved pseudogene
TcCLB.509455.140	79.99	82531.21	10.01	cyclin putative
TcCLB.511545.170	93.49	72912.20	9.61	hypothetical protein conserved
TcCLB.510877.160	150.28	52416.80	8.45	hypothetical protein conserved
TcCLB.509007.50	35.04	49562.27	10.47	hypothetical protein
TcCLB.506777.70	3581.91	46963.54	3.71	protein kinase putative cyclin
TcCLB.506797.110	520.21	41140.45	6.31	hypothetical protein conserved

**Tabla 3.- Lista de proteínas más traducidas en el estadio de tripomastigote metacíclico (MT).**

Comparación de lecturas normalizadas por Kilobase (nRPK) en epimastigote (nRPK E) y tripomastigote metacíclico (nRPK MT). La relación de la cantidad de lecturas entre ambos ciclos del parásito está expresada por log2FC(MT/E). Fuente: Anexo Smircich *et al.*, 2015 (63).

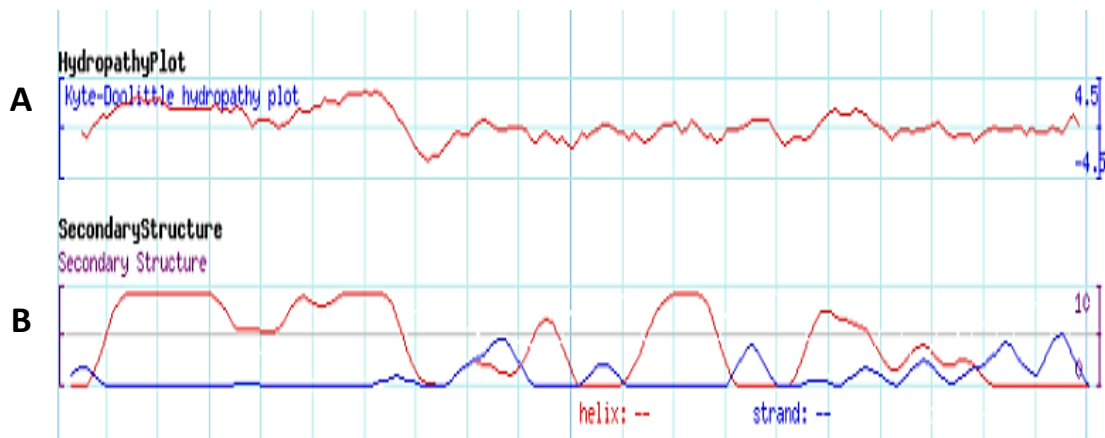


**Figura 10.-Alineamiento tBLASTn de la proteína hipotética del gen TcCLB.510323.60.**

La gráfica muestra las coordenadas y longitud del gen TcCLB.510323.60 en la barra superior verde (Query). Las barras horizontales representadas debajo del Query corresponden a secuencias halladas por BLAST (hits), que muestran colores, posiciones y longitudes diferentes. En este alineamiento, las tres primeras barras corresponden a *T. cruzi* y las 4 últimas a un fragmento de *L. donovani*. El código de colores establecido sobre el Query indica el p-value del hit, yendo de “peor” a “mejor”, siendo rojo un p-value de 1e-200 a 0.0 En la zona inferior se encuentran los datos detallados de los hits, ordenados según medidas estadísticas de significación.

Es importante destacar que, si bien la selección de biomarcadores candidatos se realizó en un principio entre proteínas abundantes en el estadio tripomastigote metacíclico respecto del estadio epimastigotes por sólo disponerse de información cuantitativa para estas 2 formas a nivel de proteína, estudios a nivel de transcripción sugieren que la proteína podría estar presente también en niveles significativos en amastigotes y tripomastigotes sanguíneos (73)(74).

La proteína seleccionada tiene un PI predicho de 7.92, por lo que en condiciones fisiológicas tendrá carga neutra o ligeramente positiva(75). Modelados estructurales mediante Kyte-Doolittle mostraron que su estructura cuenta con un péptido señal del aminoácido 1 al 31 y un dominio transmembrana entre el aminoácido 12 y el 66. Las predicciones indican que la proteína TcCLB.510323.60 contiene elementos para dirigir su inserción a la membrana del protozoo. El gráfico de hidropatía mostró que existe una zona inicial de alta hidrofobicidad entre el aminoácido 10 y el 66, seguida por una zona anfipática que bordea la línea media del gráfico de Kyte-Doolittle (76) (**Figura 11- A**).



**Figura 11.- Predicciones estructurales de TcCLB.510323.60.** A) Gráfico de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle; la sección superior indica un índice alto de hidrofobicidad y la sección inferior baja hidrofobicidad. B) Probabilidad de formación de estructura secundaria; rojo:hélices y azul:lineal.

Con el fin de aproximar una posible estructura de TcCLB.510323.60, se modeló la proteína hipotética a través de SWISS-MODEL(77)(78)(64) de ExpASy. Se obtuvieron coeficientes de predicción estables a partir de la posición 90 hasta la 142, que correspondería a la región expuesta después de la zona transmembrana. La predicción estructural muestra la formación de dos hélices y loops en concordancia con la **Figura 11 B**.

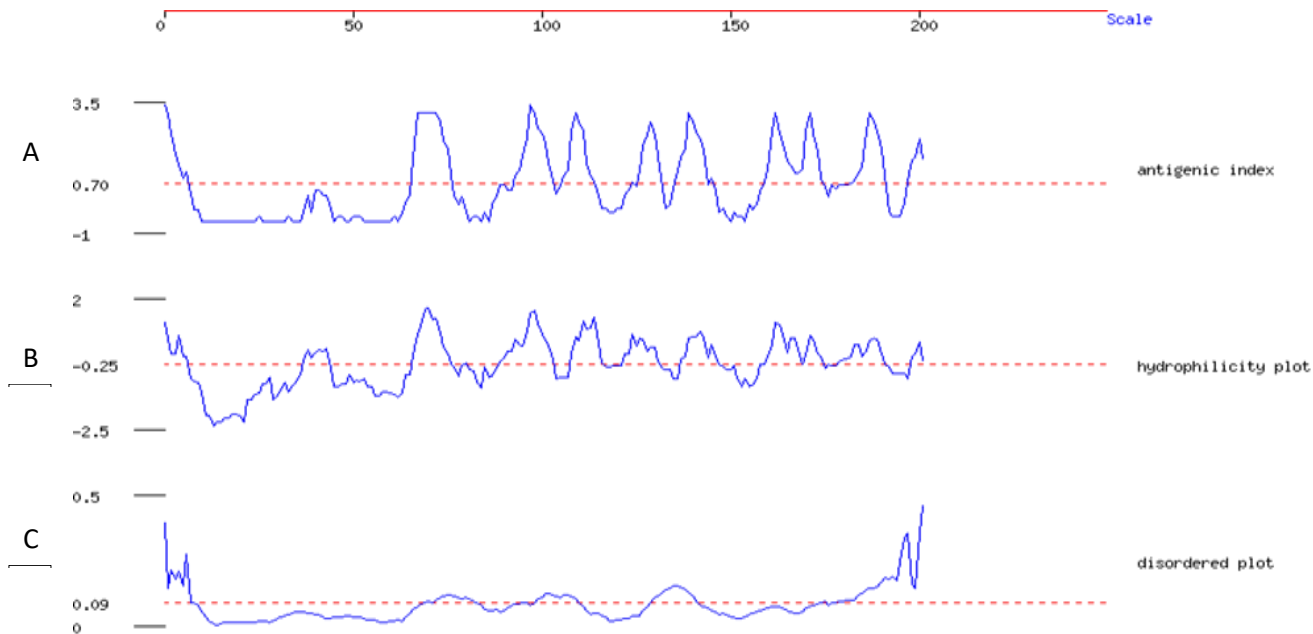
A través de BLASTp, se buscaron proteínas homólogas, siendo la proteína más similar una proteína hipotética de *T. rangeli*, SC58, con 42% de identidad y una cobertura del 70%. Además, se buscaron homólogos en especies de interés que suelen causar reacciones cruzadas, como *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. peruviana*, y se hallaron secuencias que cubrían menos del 20% de la proteína blanco con una identidad menor al 50%.

La producción recombinante de la proteína no fue exitosa en ninguna de las condiciones probadas de temperatura e inducción. Por ello, se optó por una estrategia de producción de péptidos representativos. Con el fin de abarcar zonas estructuradas de alta exposición, se realizó un análisis de péptidos de la proteína TcCLB.510323.60 utilizando como base la herramienta GenScript Optimum Antigen tool. El análisis evidenció diversas secuencias peptídicas al interior de TcCLB.510323.60 con coeficientes antigénicos variando entre (-1 a 2) (**Figura 12**).

Los análisis de antigenicidad, hidrofobicidad y desorden (**Figura 13**) mostraron una concordancia entre exposición/hidrofilicidad e índice antigénico en cinco zonas post-transmembrana, a partir del aminoácido 60 hasta el 200, si bien la herramienta desestimó el péptido 1 por antigenicidad, analizando desde la zona 2 a la 5 como se observa en la **Tabla 4**. El péptido1 fue añadido por su estabilidad y estructura para maximizar zonas de la proteína a abarcar, añadiéndose manualmente (**Tabla 5**).

MRGKIYGDLPFFFFFLYLFVYLLFWRVCVSFLFTSSICMAKELTTLQVVLSASVCIMVALVGILLC  
 CRGRRQDHPSTTMSCYKPLLFYRSSHVARKCGDRGPFMFPLSPS DKCRISEWLLEVQRAIDNSGN  
 SLAVPGLSDPRNPTVVDSLAMMATVQFCSDTSEKIIMESSASEYATYSPRVSAVEGSTEPLTFHLD  
 PLIR

**Figura 12.- Identificación de péptidos en la proteína TcCLB.510323.60.** Las secciones en azul indican zonas antigénicas, las secciones sombreadas en gris identifican zonas transmembrana y las secciones subrayadas identifican secciones desordenadas.



**Figura 13.- Análisis de antigenicidad, hidrofobicidad y desorden de la proteína TeCLB.510323.60.** A) Gráfico de antigenicidad, muestra 5 zonas antigénicas entre el aminoácido 50 al 200 correspondientes a los 5 péptidos identificados. B) Gráfico de hidrofobicidad, muestra un patrón de hidrofobicidad concordante con el índice de antigenicidad. C) Gráfico de desorden, permite predecir zonas de la proteína son más desordenadas (mayor índice) y más estables estructuralmente (menor índice). La proteína en general muestra un bajo score de desorden.

No	Inicio	Secuencia	aa	Antigenicidad/ Superficie/ Hidrofilicidad	Desorden Score	Mus_musculus   Rattus_norvegicus   Oryctolagus_cuniculus blast
2	98	CGDRGPSEFMPLSPS	14	1.94/0.93/0.30	0.1066	42%   49%   49%
3	161	CSDTSEKIIMESSAS	14	1.94/0.93/0.44	NONE	64%   42%   42%
4	129	CNSGNSLAVPGLSDP	14	1.64/0.93/-0.02	0.1226	57%   64%   49%
5	179	CYSPRYSAVEGSTEP	14	1.42/0.79/0.14	0.1229	64%   56%   50%

**Tabla 4.-Péptidos seleccionados a través de GenScript Optimum AntigenTM.** Se detallan datos del análisis realizado, con los scores de desorden, antigenicidad, superficie e hidrofobicidad. El resultado de los alineamientos contra organismos de interés se muestra como porcentajes de identidad.

Las 4 zonas analizadas por el algoritmo mostraron un tamaño estándar de 14 aa y un índice de antigenicidad entre 1.4-1.9, con una alta probabilidad de encontrarse en superficie (índices entre 0.8-0.93) y una homología variable (entre 40-64%) con respecto a proteínas de otras especies de interés.



También se realizó la selección de péptidos ya probados exitosamente en diagnóstico, identificándose 7 candidatos a partir de la búsqueda en la bibliografía (4)(79)(80). De estos, los péptidos más prometedores fueron los descubiertos por Reis-Cunha en el 2014 a través de un screening del genoma, en el cual identificó a C6-30 y E27-300(4), que mostraron alta sensibilidad y especificidad en ensayos de ELISA con suero de ratón: 89.66% y 98.2%, 96.55% y 94.83%, respectivamente.

Péptidos	Secuencia	Gen	Proteína
C6-30:	GTTNSENDDTDEPY	Tc00.1047053510421.310	XP_819174.1
E27-300:	PRGESPARPAWNQNR	Tc00.1047053511623.20	XP_804108.1
TSKB20	ANYKFTLV	Tc00.1047053508229.60	XP_807804

**Tabla 5.-Péptidos seleccionados por búsqueda bibliográfica.**

Con el fin de identificar regiones con alto potencial biomarcador, en este estudio se realizaron análisis de homología, predicción de zonas estructuradas y se verificó su relativa abundancia en estudios de transcriptómica y/o proteómica para cada uno de los candidatos encontrados en la bibliografía. Los seleccionados están en la **Tabla 5** y tienen las siguientes características:

-C6-30 es parte de una proteína de 927 aa codificada por el gen TcCLB.510091.60, la cual es más expresada en el tripomastigote metacíclico que en el epimastigote a través de espectrometría de masas y ribosome profiling (81)(82). A través de BLASTp (61) se identificó proteínas homólogas con menos del 70% de identidad. En el caso de la proteína hipotética A4HEH3 de *L. braziliensis* solo existió un 35% de identidad en una sección de la secuencia que correspondió al 20% del total.

-E27-300 es parte de una proteína de 404 aminoácidos codificada por el gen Tc00.1047053511623.20. Por espectrometría de masas y microarrays se determinó una mayor expresión durante el estadio de epimastigote y tripomastigote metacíclico (83). A través de BLASTp (61), se identificó que sus homólogas poseen menos del 70% de identidad, siendo la más similar una proteína hipotética de *T. rangeli* con 65% de identidad y 100% de cobertura; en el caso de la proteína hipotética conservada A4HG04 de *L. braziliensis* solo existe un 24% de identidad en una sección de la secuencia que corresponde al 60% del total.

-TSKB20 es parte de la proteína de membrana trans-sialidasa, enzima capaz de transferir ácido siálico de las células hospederas a las mucinas que recubren al parásito, permitiendo su evasión del sistema inmune innato y adaptativo al ya no ser reconocido como agente extraño(84). La secuencia de esta proteína se alinea con diferente grado de identidad con otros tripanosomátidos, pero no se encuentra similitud en el proteoma humano.

Los resultados del análisis bibliográfico y bioinformático permitieron identificar 8 péptidos provenientes de 4 proteínas de *T. cruzi* que cumplen con varios de los criterios arriba mencionados, es decir, son abundantes, poseen dominios estructurales descritos o modelables, están conservadas en *T. cruzi*, y poseen mínima identidad con proteínas de patógenos similares u hospederos (**Tabla 6**).

### 3.2 SELEX Multitarget y Unitarget

Los péptidos seleccionados fueron sintetizados químicamente en pequeña escala y alto grado de pureza (>90%) debido a que SELEX requiere alta homogeneidad de moléculas blanco. Se incluyó un espaciador (Ahx) unido a biotina para facilitar la inmovilización de los péptidos en superficies sólidas y beads, con el fin de facilitar la separación de aptámeros unidos de aquellos no unidos. Tradicionalmente SELEX usa un blanco a la vez para seleccionar aptámeros (aquí denominado SELEX Unitarget). En el presente proyecto se incluyó también una alternativa de selección múltiple, que permitiría seleccionar o enriquecer ligandos para múltiples targets. Esta aproximación alternativa se denominó SELEX Multitarget. Con el fin de hacer un seguimiento de los eventos de selección se utilizó un péptido en común (Tc1) para ambas metodologías de SELEX y se agruparon de la siguiente manera: SELEX Unitarget (péptido TC1) y SELEX Multitarget (8 péptidos incluyendo TC1). Las secuencias e identificadores se encuentran en la Tabla 6. Ambas metodologías de SELEX fueron realizadas en paralelo bajo condiciones similares, usando la misma biblioteca de ADN de hebra simple con 40 posiciones aleatorias centrales.

Proteínas	Secuencias	MW (g/mol)
TC1	ALVGILLCCRGRRRQDHPSTT	2536.02
TC2	CGDRGPSFMPLSPS	1790.1
TC3	CSDTSEKIIMESSAS	1927.19
TC4	CNSGNSLAVPGLSDP	1770
TC5	CYSPRVSAVEGSTEP	1921.17
C6-30	QRMSNASGGGGGMRQNE	2133.36
E27300	PRGESPARPAWNQNR	2075.32
TSKB20	ANYKFTLV	1294.57

**Tabla 6.-Listado total de péptidos seleccionados y sintetizados**

### 3.2.1 Evaluación de calidad de la biblioteca

El método de SELEX se puede dividir en una fase de selección de ligandos de ADN de hebra simple seguida de una fase de amplificación de estos. Esta última es propensa a generar productos secundarios de alto peso molecular derivados de la amplificación de PCR donde la misma biblioteca puede hacer de primer (85). La generación de dichos productos se puede acentuar debido a la repetitividad del método de SELEX, requiriendo entre 10-25 ciclos de amplificación tras cada selección.

Con el fin de reducir la probabilidad de formación de productos secundarios, se utilizaron dos pasos de amplificación de ligandos de ADN, PCR y transcripción *in vitro* seguida de retro transcripción (**Figura 14**). Ambas, Unitarget y Multitarget, fueron sujetas al mismo procedimiento. Adicionalmente, en cada ciclo se evaluó cuantitativa y cualitativamente los productos de amplificación mediante Urea-PAGE 12% o electroforesis en geles de agarosa, y espectroscopia de absorbancia.

El primer producto de amplificación para cada ciclo de SELEX, resultado de PCR con primers que agregan un promotor T7, fue de 112 pares de bases. El tamaño del producto de ADN de doble hebra fue verificado por agarosa 2-3% y urea-page 12% con la finalidad de descartar la presencia de productos de sobre-amplificación o degradación de la biblioteca (**Figura 14-3**). Del ciclo 1 al 9 se observó un producto único, sin presencia significativa de productos de mayor o menor tamaño. A partir del ciclo 10 hasta el 13 se observó la aparición de productos difuminados de mayor tamaño y la presencia de un producto abundante y más grande que el producto t7dsADN (**Figura 15 y 16**).

El producto del segundo paso de amplificación, ARN proveniente de una transcripción *in vitro*, fue de aproximadamente 90bp. La calidad de este producto se evaluó mediante

electroforesis en geles denaturantes (8M UREA) con el fin de estimar la propagación de productos secundarios resultantes de la PCR en productos de ARN (**Figura 14-4**). Desde el ciclo 1 al 9 de selección se observó una banda intensa y definida con la presencia de una banda superior de muy baja intensidad en algunos ciclos (**Figura 15**). A partir del ciclo 10 se observó la aparición de productos difuminados y un producto de mayor tamaño definido. Este fue incrementando en intensidad en cada ciclo. La presencia de este producto secundario concordó con lo observado en el ciclo 10 en el T7dsADN (**Figura 16**). La formación y enriquecimiento de este producto secundario a lo largo de los ciclos de selección y a través de dos reacciones de amplificación distintas indica que el producto secundario posee la secuencia del promotor T7 como también zonas de unión para los primers de PCR.

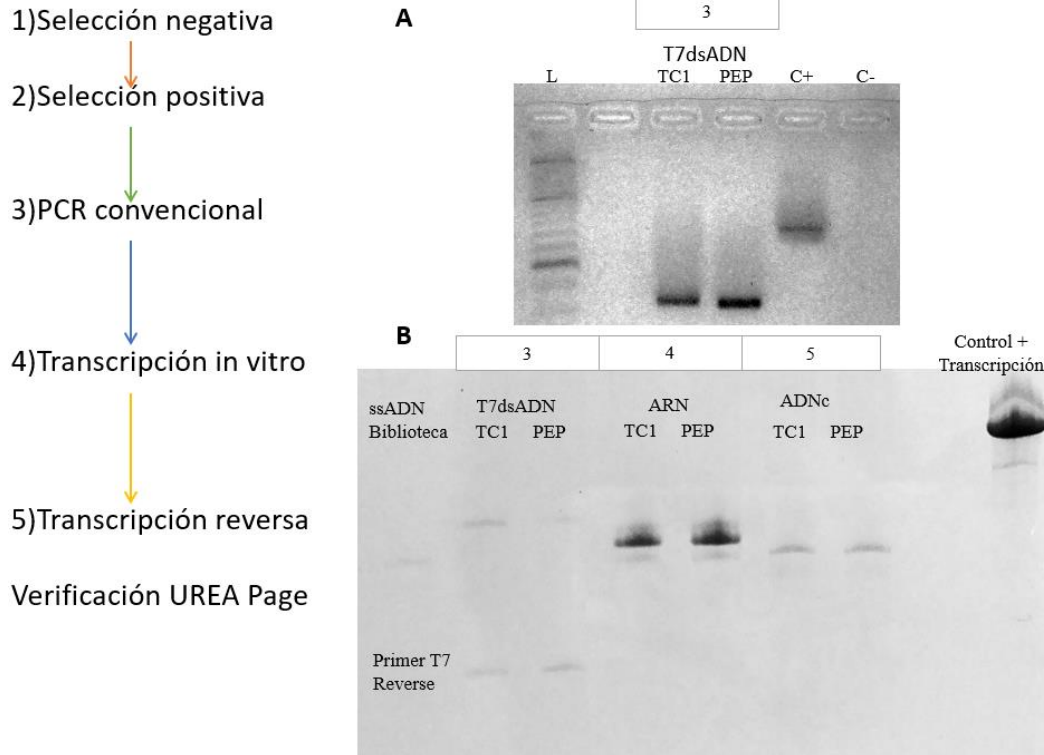
El tercer paso de la amplificación de ligandos se realizó mediante retro-transcripción y resultó en una biblioteca de ADNc de hebra única. Esta es el substrato para la selección sucesiva. El producto de retro transcripción se caracterizó por un tamaño de aproximadamente 86 bp, correspondientes al tamaño de la biblioteca (**Figura 14-5**). El análisis cualitativo de este producto permitió verificar la homogeneidad de la biblioteca para iniciar el siguiente ciclo de SELEX. De manera concordante con los productos de amplificación intermedios, T7dsADN y el ARN, el ADNc presentó productos heterogéneos a partir del ciclo de SELEX 10 hasta el 13 (**Figura 15 y 16**). Los intentos para eliminar este producto secundario a través de repeticiones del ciclo 10 o extracciones a partir del gel fueron infructuosos, probablemente debido a que este producto reaparecía en el paso de PCR. En el último ciclo de SELEX se extrajo del gel el producto de ADNc correspondiente al tamaño esperado para así proceder al

secuenciamiento, evitando de esta manera los contaminantes heterogéneos que se forman en ciclos tardíos del SELEX (**Figura 16 D-E**).

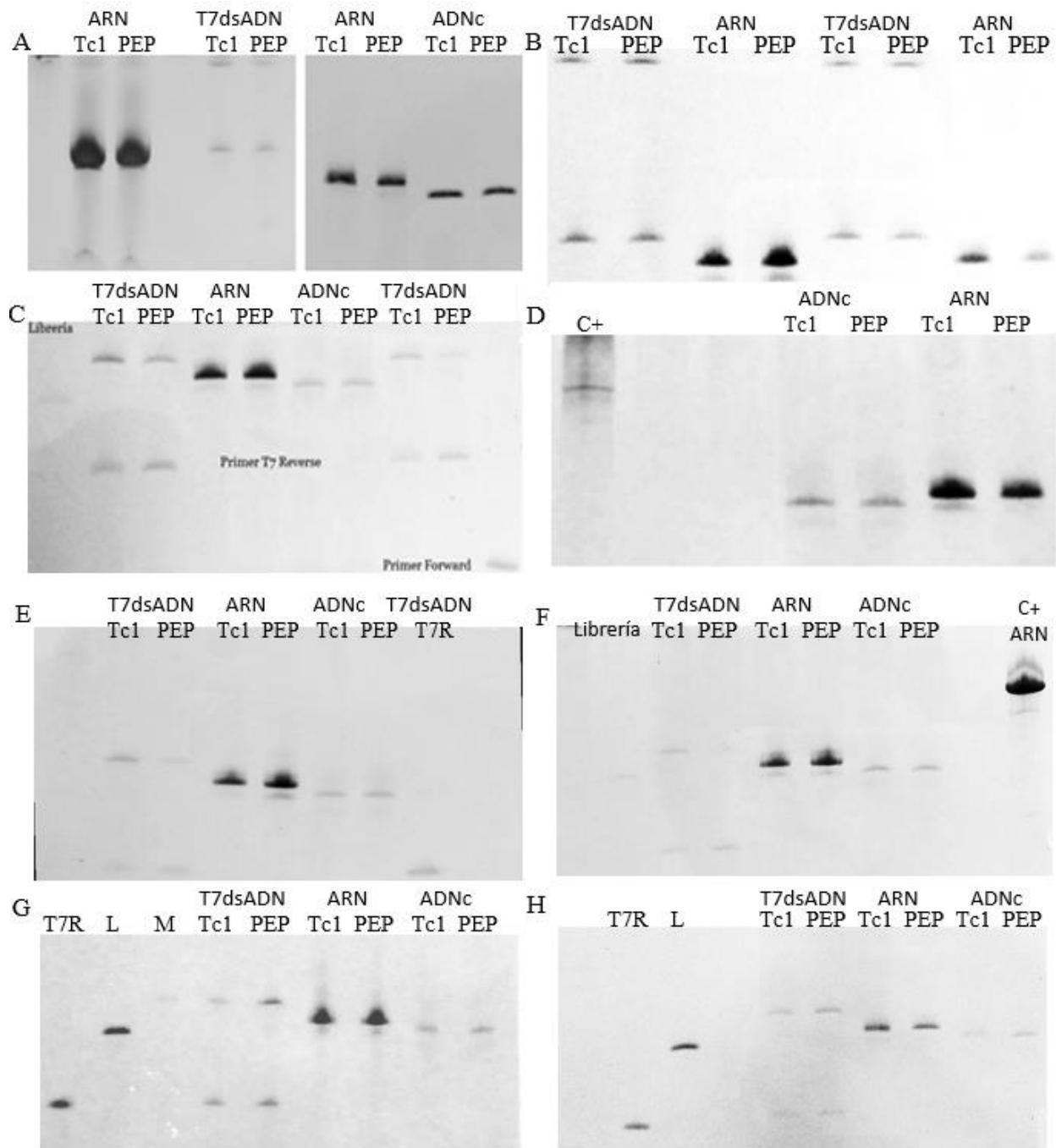
Para el SELEX Multitarget se utilizó una mezcla de 8 péptidos sintetizados (PEP) durante los primeros 9 ciclos y se ramificó la selección a partir del ciclo 10. A partir de este ciclo se seleccionó de manera individual contra 3 péptidos (TC1, TC2 y E27) hasta el ciclo 13. Cada ciclo involucró los mismos pasos de amplificación (**Figura 14**) y evaluación cualitativa arriba mencionados. Se utilizaron a su vez las mismas condiciones de rigor que en el SELEX Unitarget. De manera similar al SELEX Unitarget, hasta el ciclo nueve se observan productos homogéneos de dsADN, ARN y ADNc con una leve presencia de productos heterogéneos (**Figura 15**). Con la finalidad de comparar la eficacia del nuevo método, a partir del ciclo 10 hasta el 13 (selecciones individuales) se usaron tres péptidos de los ocho que conformaban la mezcla inicial de blancos, incluyendo TC1. Los productos de los pasos de amplificación de SELEX para TC2 y E27 mostraron una elevada homogeneidad hasta el ciclo 13, mientras que la selección contra TC1 mostró la presencia de productos heterogéneos a partir del ciclo 12, de manera similar al proceso Unitarget.

La formación de productos aberrantes durante las fases de amplificación de ligandos parece tener un componente definido por el blanco utilizado, como también debido al enriquecimiento de productos derivados de las reacciones involucradas. Se espera que el enriquecimiento de una población con respecto a las demás determine una mayor probabilidad de que sus productos de PCR sean a su vez cebadores para reacciones sucesiva. Debido que estos productos secundarios son de mayor tamaño y su síntesis compite con la formación de los ligandos deseados, se esperaría que la cantidad total de

ADN o ARN purificado después de cada paso de amplificación aumente a lo largo de los ciclos de SELEX en el caso de formación de productos aberrantes. De manera contraria, se esperaría que la concentración total de oligonucleótidos se mantenga estable en ausencia de una formación preferente de productos heterogéneos de mayor peso molecular.

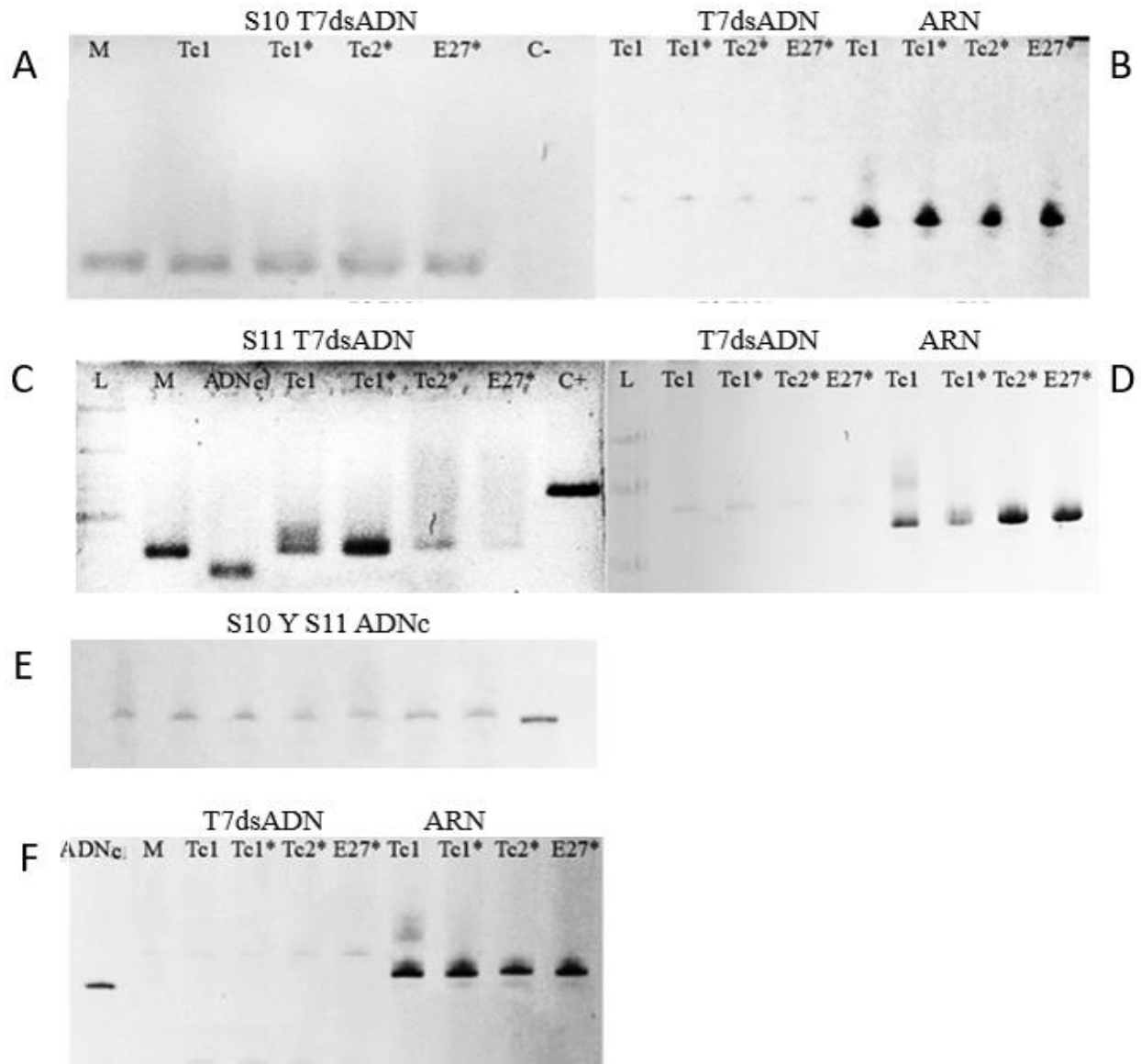


**Figura 14.- Esquema de evaluación de calidad.** **3)** El primer paso de amplificación corresponde a una PCR convencional cuyo producto es ADN de doble hebra con el promotor T7 (T7dsADN); este paso fue evaluado por un gel de agarosa 2-3% a 60 V por 40 min en TBE1x (A) y en un gel Urea-PAGE TBE1x a 200 V por 60 min (B). El gel A estuvo conformado por un determinador de tamaño, un Ladder (L) de 100 o 50 pb o un marcador correspondiente a un producto T7dsADN previamente comprobado con un Ladder; los productos T7dsADN de los SELEX Unitarget y Multitarget (TC1 y PEP); un control positivo (c+) y negativo (c-) de PCR. El gel B estuvo conformado por los productos T7dsADN (TC1 y PEP). **4)** El segundo paso de amplificación correspondiente a la transcripción *in vitro*, cuyo producto es ARN, fue evaluado en B, donde se adicionó en algunos ciclos controles positivos de transcripción *in vitro*. **5)** El tercer paso de amplificación correspondiente a la retro-transcripción, cuyo producto es ADNc, fue evaluado en B, donde se utilizó un marcador de tamaño (ssADN Biblioteca) proveniente de la biblioteca comercial original.



**Figura 15.- Geles de control de calidad del ciclo 1 al 9 de SELEX Unitarget y Multitarget.** Urea-PAGE 12% en buffer TBE 1x a 200V por 45min. **A)** T7dsADN, ARN, ADNc del SELEX 1 **B)** T7dsADN y ARN de SELEX 2 y SELEX 3 **C)** T7dsADN, ARN, ADNc del SELEX 4 y T7dsADN SELEX 5 **D)** ADNc y ARN del SELEX 5 **E)** T7dsADN, ARN, ADNc SELEX 6 **F)** T7dsADN, ARN, ADNc SELEX 7 **G)** T7dsADN, ARN, ADNc del SELEX 8 **H)** T7dsADN, ARN, ADNc del SELEX 9. Tc1 corresponde al péptido 1, blanco del SELEX Unitarget, y PEP corresponde a la mezcla de 8 péptidos, blancos del SELEX Multitarget hasta el ciclo 9. Biblioteca, corresponde a ssADN de la biblioteca 40N utilizada. El primer T7 reverse (T7R) y el primer Forward se utilizaron de marcadores en algunos geles.





**Figura 16.- Geles de control de calidad del ciclo 10 al 13 de SELEX Unitarget y Multitarget.**

Tc1, corresponde al SELEX Unitarget, mientras que Tc1\*, Tc2\* y E27\* corresponden a la ramificación del SELEX Multitarget. **A)** M: marcador T7dsADN; T7dsADN: producto de PCR convencional del SELEX 10 en agarosa 2% TBE 1x a 60V por 40 min. **B)** T7dsADN y ARN de SELEX 10 Unitarget y Multitarget en Urea-PAGE 12% TBE 1x. **C)** L: Ladder; M: marcador de tamaño T7dsADN; ADNc: marcador de tamaño de la biblioteca; T7dsADN Tc1, Tc1\*, Tc2\* y E27\* del SELEX 11 en agarosa 2% TBE 1x. **D)** L: Ladder; T7dsADN y ARN de SELEX 11 Unitarget y Multitarget. **E)** ADNc: producto de retro-transcripción del SELEX 10 y 11. **F)** ADNc: marcador de tamaño de biblioteca; M: marcador de tamaño de T7dsADN; T7dsADN y ARN de SELEX 12 Unitarget y Multitarget.

### 3.2.2 Variación cuantitativa de intermedios de amplificación de ligandos

Con el objetivo de verificar una progresión cuantitativa de intermedios de ADN y ARN durante SELEX, se utilizó espectroscopia de fluorescencia y absorbancia para medir la concentración total de productos intermedios purificados (**Figura 6**). A partir de las concentraciones medidas se calculó la masa total obtenida lo largo de los 13 ciclos del SELEX (**Figura 17 y 18**).

En general, la cantidad obtenida de dsADN, tanto en la Unitarget como en la Multitarget, se encontró en el rango de 0.1 a 4 µg totales, con promedios de 2.02, 1.92, 1.7 y 1.77 µg totales en Tc1 Unitarget, Tc1 Multitarget, Tc2 Multitarget y E27 Multitarget respectivamente. Se observan eventos en los cuales la masa total obtenida aumenta, en general en correspondencia con los aumentos de ciclos de PCR necesarios. Dichos cambios se realizaron de manera similar en ambos métodos de SELEX, aumentando al inicio del proceso (ciclo 2 y 3), estabilizándose, y volviendo a aumentar a partir del ciclo 9 en la Unitarget y del 8 en la Multitarget. Las condiciones de amplificación por PCR se aproximan a la región lineal de la amplificación (entre 6-15 ciclos de PCR) por lo que las variaciones producto de dsADN a lo largo del SELEX parecen no estar relacionadas a la formación de productos no deseados.

El producto de la transcripción *in vitro* no mostró un patrón definido en ninguno de los dos métodos de SELEX, como es de esperarse al realizar la amplificación en condiciones de máximo consumo de substratos (NTPs). En dicha reacción, pequeñas variaciones del substrato de ADN son compensadas por una larga incubación. El ARN obtenido en promedio fue de 46.52, 47.78, 50.90, 51.18 µg totales en TC1 Unitarget, TC1 Multitarget, TC2 Multitarget y E27 Multitarget respectivamente (**Figura 17**).

El último paso de amplificación de ligandos, esto es la producción de ADNc, resultó en un patrón lineal de aumento con respecto a los ciclos de selección. El mismo patrón de aumento lineal se observó independientemente de la aproximación de SELEX, Unitarget o Multitarget (**Figura 18**). La pendiente de las rectas para cada aproximación fue similar independientemente del blanco, Tc1 Unitarget ( $0.6014 \pm 0.1057$ ), Tc1 Multitarget ( $0.723 \pm 0.1237$ ), Tc2 Multitarget ( $0.5625 \pm 0.1433$ ) y E27 Multitarget ( $0.6481 \pm 0.1128$ ), respectivamente. Esto indica que el aumento no depende del blanco, del tipo de SELEX usado o de otras variables comunes a todos. Tampoco debería estar relacionado al rigor de los pasos de selección debido a que las variaciones de ligandos seleccionados son filtradas durante la amplificación por PCR y mediante la subsiguiente transcripción *in vitro*.

Es posible, que el aumento lineal de ADNc con respecto al ciclo de SELEX esté indicando un aumento de productos heterogéneos de mayor peso molecular. En particular la reacción de retro-transcripción está limitada por el substrato de ARN y no es cíclica, a diferencia de la PCR y la transcripción. En consecuencia, dicho paso de amplificación sería más sensible a la acumulación de productos de mayor tamaño. Sin embargo, dichos productos no se observaron mediante electroforesis en gel de acrilamida. Existe la posibilidad de que dichos productos alternativos posean un elevado grado de heterogeneidad, explicando ambos resultados obtenidos en este proyecto.

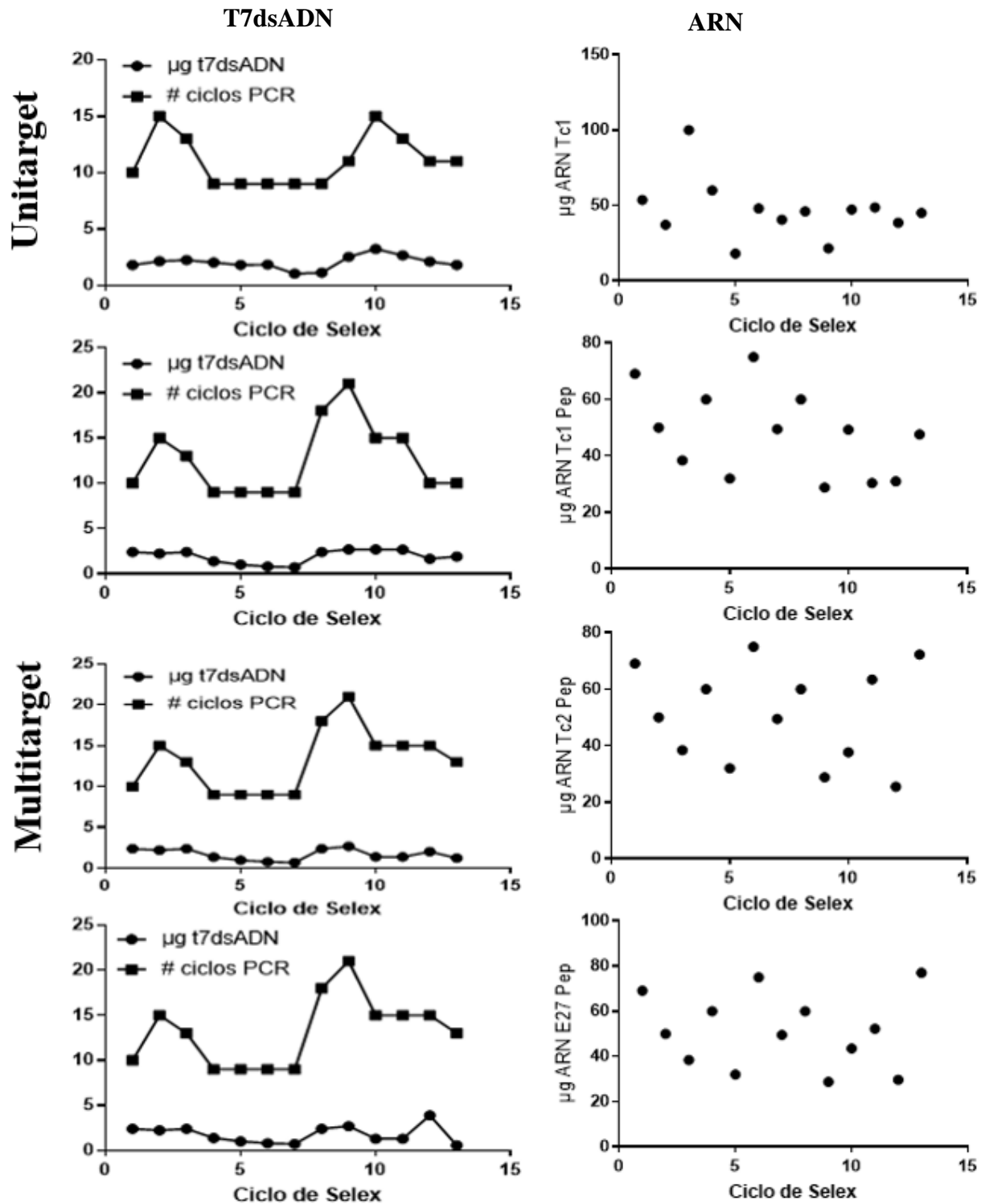
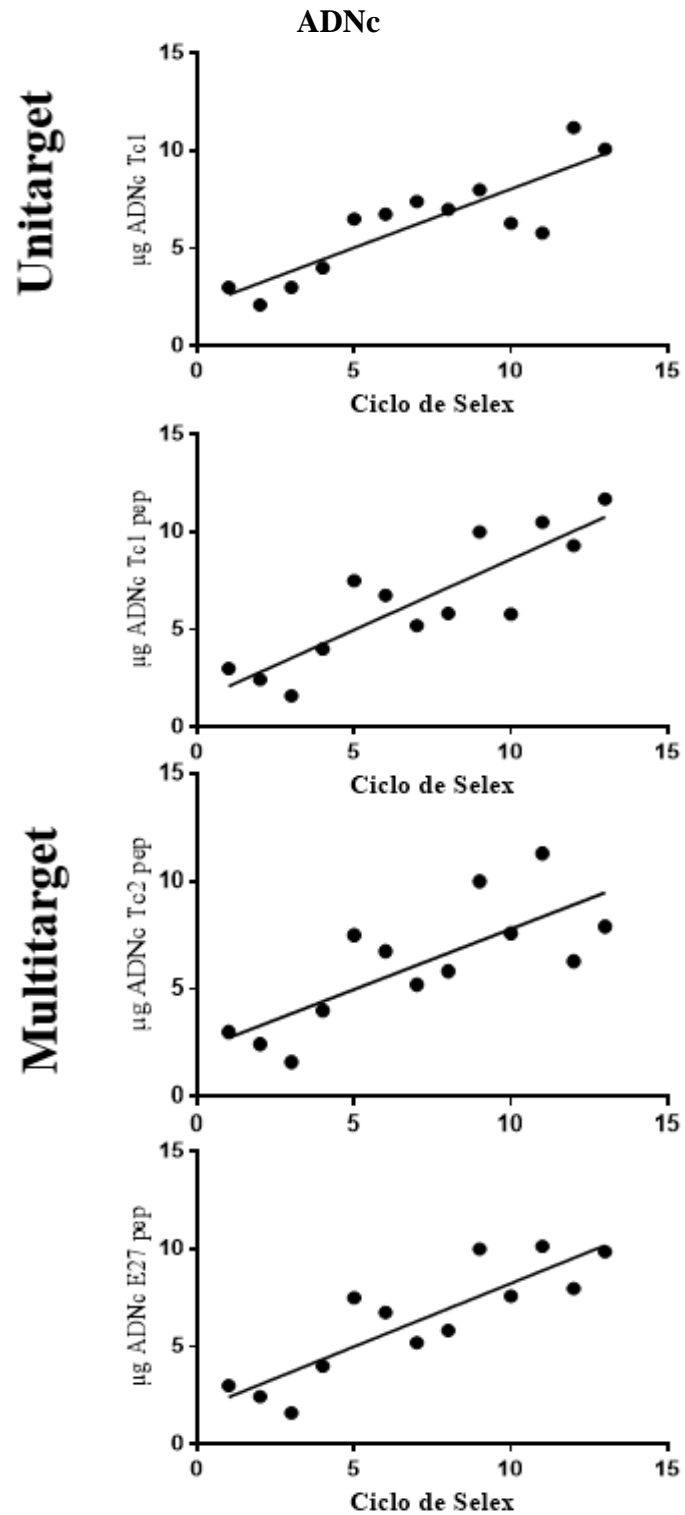


Figura 17.- Productos de amplificación por PCR y transcripción *in vitro*. El eje X corresponde a los ciclos de SELEX. A) Eje Y corresponde a µg de T7dsADN y a ciclos de PCR. B) Eje Y corresponde a µg de ARN. No se observan patrones concordantes con enriquecimiento.

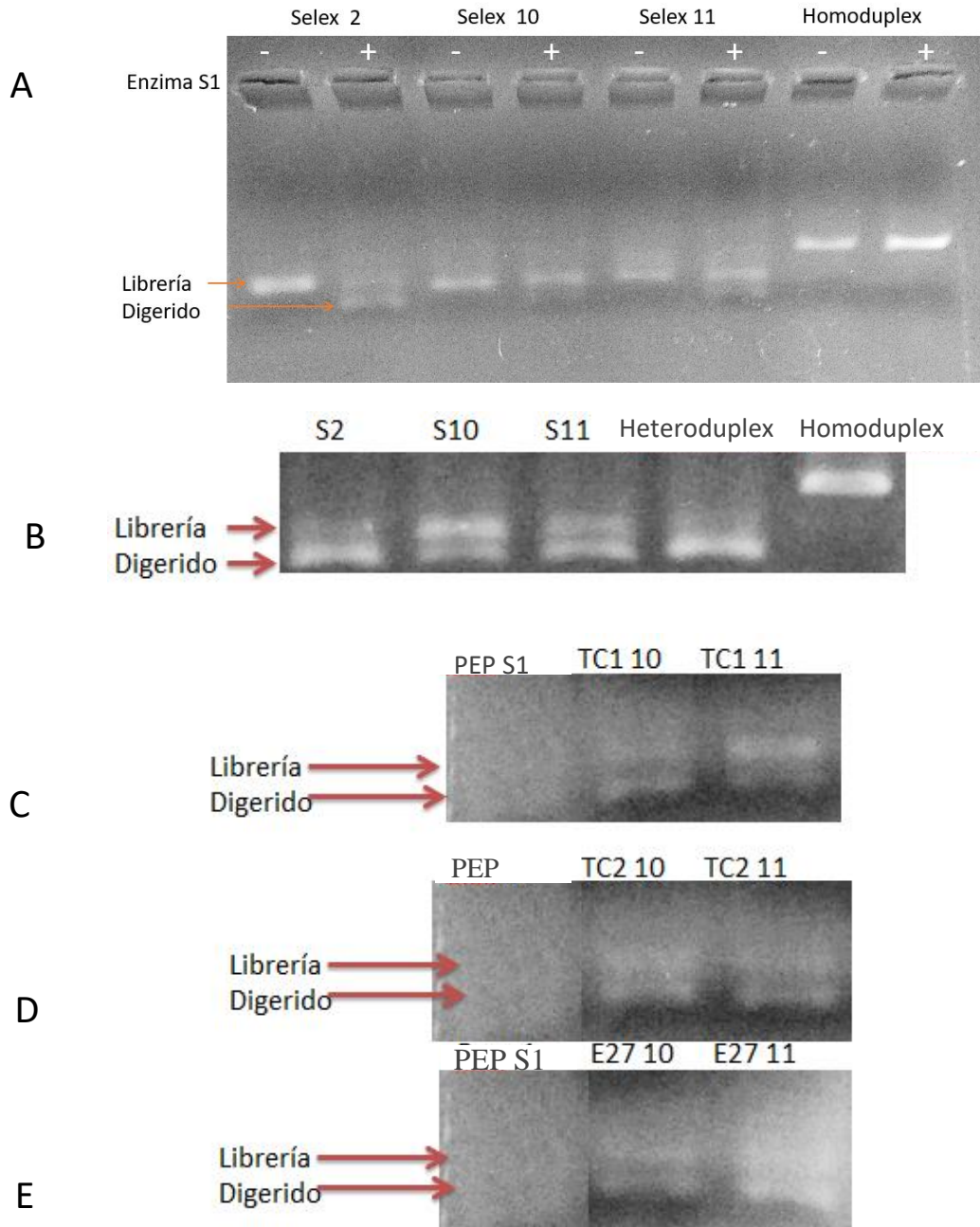


**Figura 18.- Productos de amplificación por transcripción reversa.** El eje X corresponde a ciclos de SELEX y el eje Y corresponde a µg de ADNc. Se observa una tendencia de aumento lineal.

### 3.2.3 Evaluación de enriquecimiento de ligandos mediante DiVE

Con la finalidad de evaluar el proceso de enriquecimiento de las bibliotecas se realizó el ensayo DiVE (Visualización de la Diversidad por Endonucleasa) usando la endonucleasa S1 capaz de cortar hebras simples de ADN. El principio de esta técnica consiste en que muestras más diversas tienen mayor probabilidad de formar heteroduplexes que aquellas menos diversas; esto implica formación de loops o regiones no apareadas que pueden ser digeridos por S1, por lo que muestras más diversas son más digeridas que muestras menos diversas. Una banda definida después de la digestión con S1 indica una biblioteca enriquecida y la ausencia o baja intensidad de la banda refleja un cierto grado de diversidad en el producto de amplificación y falta de enriquecimiento. Esta prueba se utilizó para estimar los ciclos necesarios que permitiesen lograr una biblioteca enriquecida con candidatos a aptámeros.

Se realizó la prueba en el SELEX Unitarget y Multitarget luego del ciclo 11 (S11) como se puede observar en la **Figura 19**. Se observó enriquecimiento en el Unitarget a partir del S10 (A y B) y en el Multitarget en TC1 a partir del S11 (C) y parcialmente en el TC2 y E27 S11 (D). Se utilizó un homoduplex de 140bp y un heteroduplex de la biblioteca inicial como control positivo y negativo. Controles internos sin enzima permitieron verificar la calidad de la biblioteca y la ausencia de nucleasas en la muestra o reactivos (**Figura 19 A-B**). Debido a que TC2 y E27 no lograron un enriquecimiento a la par que TC1, se decidió realizar dos ciclos más de SELEX hasta S13 con condiciones más restrictivas (**Tabla 2**). En general, se observó un enriquecimiento para los péptidos TC1 provenientes de ambas metodologías de SELEX, y parcialmente para TC2 y E27 provenientes del SELEX Multitarget. El enriquecimiento observado presenta una base sólida para identificar las secuencias de nucleótidos que las componen mediante secuenciación.



**Figura 19.- Evaluación de la diversidad en SELEX Unitarget y Multitarget.** A) DiVE de ciclo 2, 10 y 11 de TC1 Unitarget, donde (-) sin enzima (+) con enzima S1. Homoduplex corresponde a un producto de PCR de una secuencia única de 250 pb. Se observa enriquecimiento a partir de la banda + SELEX 10. B) DiVE de ciclo 2, 10 y 11 de TC1 Unitarget con enzima S1. Heteroduplex corresponde a un producto de PCR de biblioteca inicial 40N de 112 pb. Se observa enriquecimiento a partir del ciclo 10. C) DiVE de PEP S1 (ciclo 1), TC1 S10 (ciclo 10) y TC1 S11 (ciclo 11) de SELEX Multitarget. Se observa enriquecimiento a partir del ciclo 11. D) DiVE de PEP S1 (ciclo 1), TC2 S10 (ciclo 10) y TC2 S11 (ciclo 11) de SELEX Multitarget. E) DiVE de PEP S1 (ciclo 1), E27 S10 (ciclo 10) y E27 S11 (ciclo 11) de SELEX Multitarget. Agarosa 3% TBE 1x a 60 V por 40 min. Las bandas correspondientes a la biblioteca y al producto digerido por S1 son indicadas por una flecha en la imagen.

### 3.3 Identificación de secuencias nucleotídicas de aptámeros potenciales

El uso de un sistema de Secuenciación de Nueva Generación (NGS), tecnología de alto rendimiento, permitió una amplia cobertura de las bibliotecas enriquecidas (86) y permitió utilizar una aproximación evolutiva para el análisis e identificación de ligandos. En búsqueda de bibliotecas que aportaran información del proceso de enriquecimiento y con apoyo de los resultados de la prueba DiVE se seleccionaron muestras de alta, mediana y baja diversidad, correspondientes al ciclo S5, S10 y S13 en el SELEX Unitarget y al ciclo S5, S9 y S13 en el SELEX Multitarget.

Con el objetivo de identificar las secuencias de aptámeros potenciales, los productos dsADN de los ciclos determinados de SELEX Unitarget y Multitarget fueron amplificados por PCR en el rango lineal de esta. Se utilizaron primers compatibles con el sistema Illumina para una secuenciación masiva y paralela de todas secuencias presentes en cada uno de los ciclos intermedios de SELEX. Para una mayor eficiencia y menor error cruzado, se utilizaron primers que incluyen códigos de barras identificativos para cada una de las muestras y se secuenciaron todas las muestras en un mismo evento experimental. De esta manera cada muestra podrá ser identificada y analizada bioinformáticamente por separado.

Siguiendo el esquema de análisis mostrado en la **Figura 9**, la identificación de candidatos se realizó analizando las secuencias más abundantes y enriquecidas a través de la comparación entre bibliotecas en el programa Fastapmer (67), el análisis detallado se muestra en el **Anexo I**. A partir del análisis de abundancia se obtuvieron en el SELEX Unitarget dos secuencias candidatas (TC1rank1Ry TC1rank1F) y en el SELEX Multitarget siete secuencias candidatas (TC1peprank1, TC1peprank5,



TC2rankF1,TC2rankF2, E27pepRank1, E27pepRank2, E27pepRank3). A partir del análisis de enriquecimiento se obtuvieron tres secuencias candidatas en el SELEX Multitarget (TC1enrich1F, TC2enrich1ZXR, E27enrichzyF1). Algunas secuencias más abundantes también fueron las más enriquecidas; los detalles se encuentran en el **Anexo I**. En total se obtuvieron 5 secuencias de potenciales aptámeros para el péptido TC1, 3 para el péptido TC2 y 4 para el péptido E2, las cuales se encuentran identificadas con numerales.

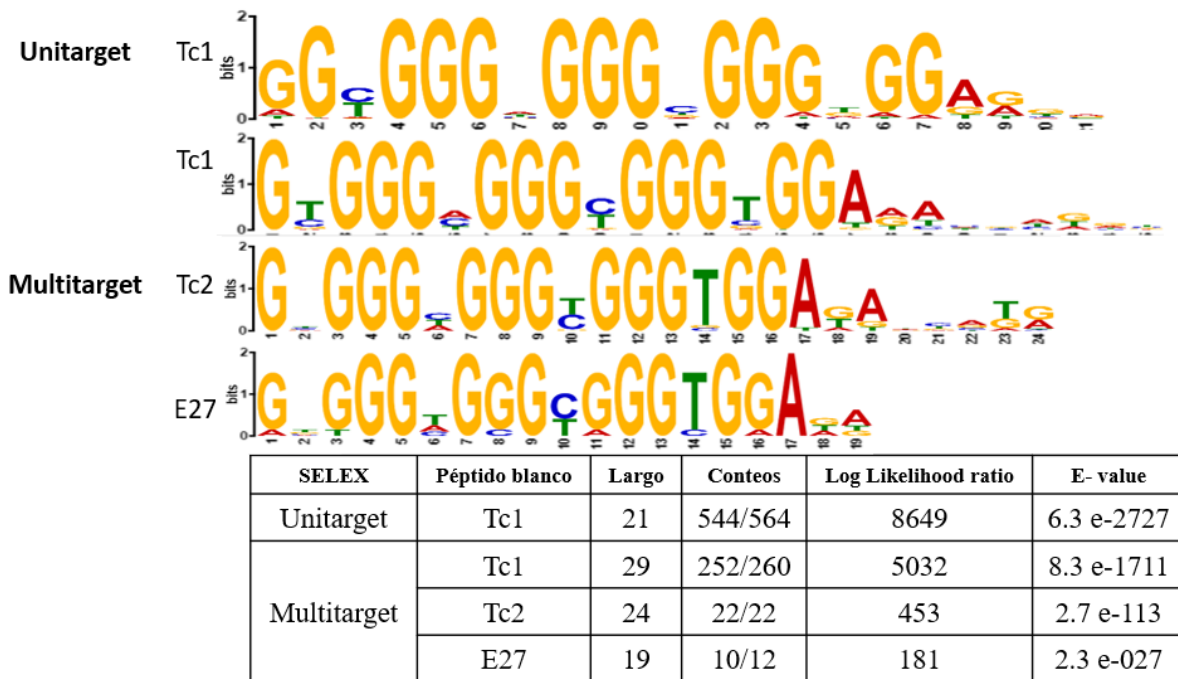
### 3.3.1 Descubrimiento y enriquecimiento de motivos

Siguiendo el flujo de análisis (**Figura 9**), después de analizar abundancia y enriquecimiento se buscó clusters/familias de secuencias dentro de las bibliotecas. Para ello se utilizaron dos herramientas: la función Cluster del programa Fastaptamer (67) y la función MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) de MEME suite (87). Para cada biblioteca final, se agruparon todas las secuencias únicas en familias obteniendo un archivo cluster, el cual fue procesado por MEME para descubrir secuencias consenso (motivos). Los dos motivos con mayor significación estadística (menor E-value) fueron evaluados según su tamaño, longitud y ubicación en las bibliotecas finales de SELEX Unitarget TC1 y SELEX Multitarget TC1, TC2 y E27 (**Figura 20**).

Un motivo característico se encontró en todos los casos, mostrando el menor E-value: GG(N)GGG(N)GGG(N)GGG(N)GG. La única diferencia entre el SELEX Unitarget y el Multitarget fue la ausencia de la primera G del motivo. Este último no poseía una ubicación fija en las secuencias y se encontraba en más del 90% de los conteos totales. Adicionalmente, se analizó el enriquecimiento de este motivo a lo largo de los ciclos de SELEX. Se halló que en el SELEX Unitarget este motivo rico en guaninas fue

enriquecido entre los ciclos 5 y 10, mientras que en el SELEX Multitarget se dio entre los ciclos 5 y 9.

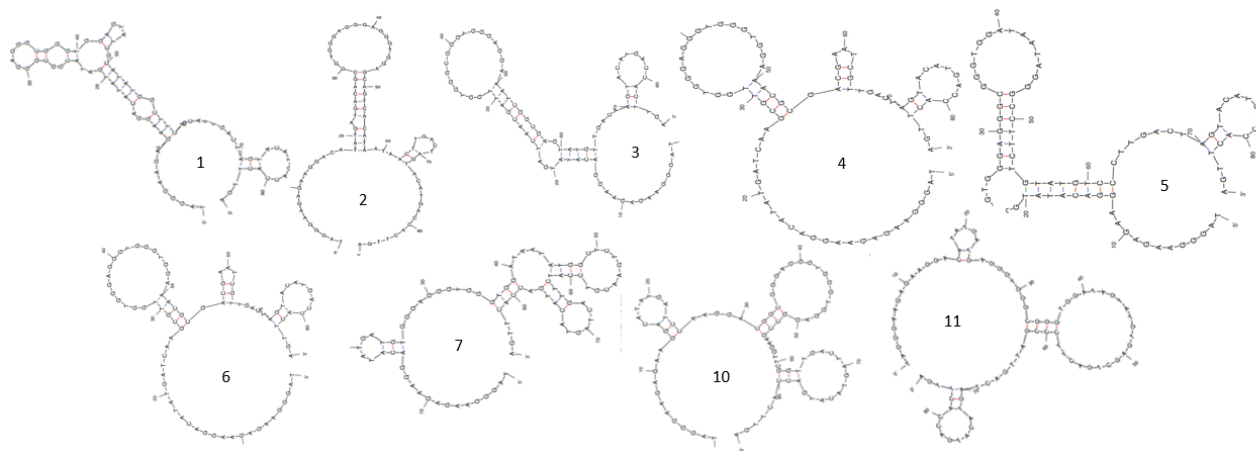
Los resultados obtenidos muestran la presencia de un motivo común en el Unitarget y en todas las ramas del Multitarget. Este podría ser una zona de unión específica al péptido TC1 o un artefacto producto de las condiciones de amplificación. El motivo ya se ve muy enriquecido desde el ciclo 9 del SELEX Multitarget, un ciclo antes de la ramificación; por lo que, de ser un motivo de unión al péptido TC1, significaría que fue enriquecido antes de las selecciones individuales del SELEX Multitarget. En base a estas posibilidades, se realizó el diseño de las evaluaciones de capacidad de unión, con la intención de identificar reacciones cruzadas entre las ramas del Multitarget.



**Figura 20.- Motivo más significativo en las bibliotecas finales del SELEX Unitarget y Multitarget identificado por MEME suite.** Los motivos se encuentran presentados con logos, donde el tamaño relativo de cada base ejemplifica su frecuencia. La tabla inferior muestra el E-value, el ratio de verosimilitud o likelihood, el número de conteos con relación al número total de secuencias y la longitud del motivo.

### 3.3.2 Predicción de estructura secundaria de potenciales aptámeros

Las secuencias seleccionadas de potenciales aptámeros fueron evaluadas en Mfold Web server (88) para predecir estructuras secundarias características. Las estructuras halladas se encuentran en la **Figura 21** junto a los aptámeros potenciales seleccionados por análisis de abundancia y enriquecimiento. Las secuencias 1-8 presentan dos horquillas características, una rica en guaninas y otra rica en adeninas y timinas. Del 9-12 aparece una tercera horquilla de tamaño y composición diversa. Las tres horquillas descritas podrían representar sitios de interacción con el péptido blanco.



N°	1	2	3	4	5	6
Nombre	TC1rank1R	TC1rank1F	TC1enrich1F	TC1peprank1	TC1peprank5	TC2rankF1
N°	7	8	9	10	11	12
Nombre	TC2rankF2	TC2enrich1ZXR	E27enrichzyF1	E27pepRank1	E27pepRank2	E27pepRank3

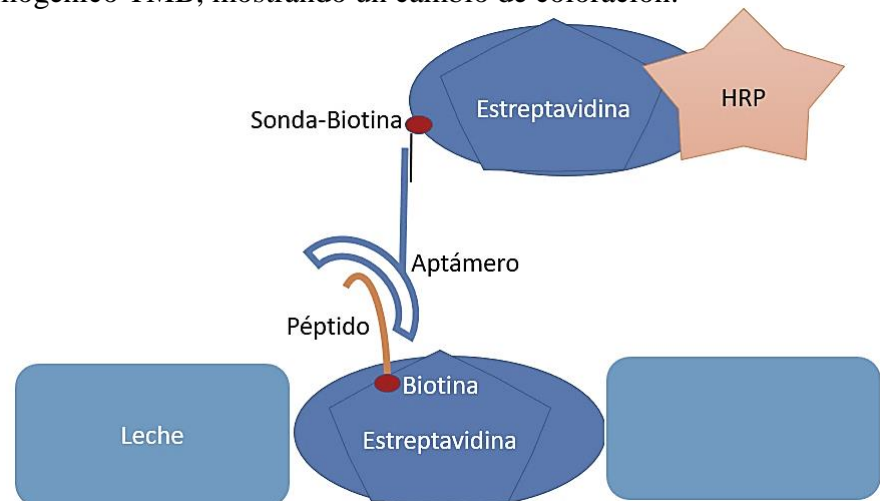
**Figura 21.- Potenciales estructuras secundarias de candidatos a aptámeros.** La tabla inferior presenta un número identificador y el nombre de cada secuencia seleccionada.

### 3.4 Ensayos de evaluación de capacidad de unión de aptámeros

#### 3.4.1 Unión a péptidos

ELONA (Enzyme Linked Oligonucleotide Assays) es un método de evaluación similar a un ELISA, con la diferencia que utiliza aptámeros en vez de anticuerpos. El sistema funciona de la siguiente manera: estreptavidina y péptido biotinilado pre-incubados se inmovilizan en una placa de ELISA, con la intención de bloquear la biotina del péptido y de exponerlo. Luego se usa leche y biotina libre con el fin de bloquear zonas libres de la placa y de la estreptavidina, respectivamente.

El péptido expuesto se incuba con una mezcla de aptámero y una sonda de ADN biotinilado complementario a las 12 bases finales de la región 3' del aptámero. De esta incubación se obtendrá un sistema en el cual el péptido será reconocido por el aptámero y a su vez el aptámero se encontrará unido por complementariedad a la sonda de ADN biotinilado como se observa en la **Figura 22**. El sistema se completa incubando estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) y posteriormente con el sustrato cromogénico TMB, mostrando un cambio de coloración.



**Figura 22. Esquema del mecanismo del ensayo ELONA.** El péptido pre-incubado con estreptavidina (strp) es fijado en la placa y bloqueado por 2h con leche/biotina. Luego de incubar con el aptámero + la sonda biotinilada por 2h, se añade strp-HRP seguido de TMB para la detección colorimétrica.

Para validar cada reacción positiva se realizaron controles de la especificidad de la reacción; por ello se evaluaron tres elementos del sistema: péptidos, aptámeros y sonda biotinilada. La conjugación de estos tres elementos generó tres opciones de control: control (Strp) con estreptavidina + aptámero + sonda biotinilada, cuya función fue mostrar la unión inespecífica del aptámero; Blanco1, cuya función fue mostrar la unión inespecífica de la estreptavidina-HRP; y Blanco2 con estreptavidina + péptido +sonda biotinilada, cuya función fue mostrar la unión inespecífica de la sonda biotinilada (**Tabla 11**). El control negativo (Strp) se realizó por duplicado para cada aptámero, y los Blancos 1 y 2 por triplicado para cada péptido.

<b>Elementos</b>	Control	Blanco1	Blanco2
Péptido	0	+	+
Aptámero	+	0	0
Sonda Biotinilada	+	0	+

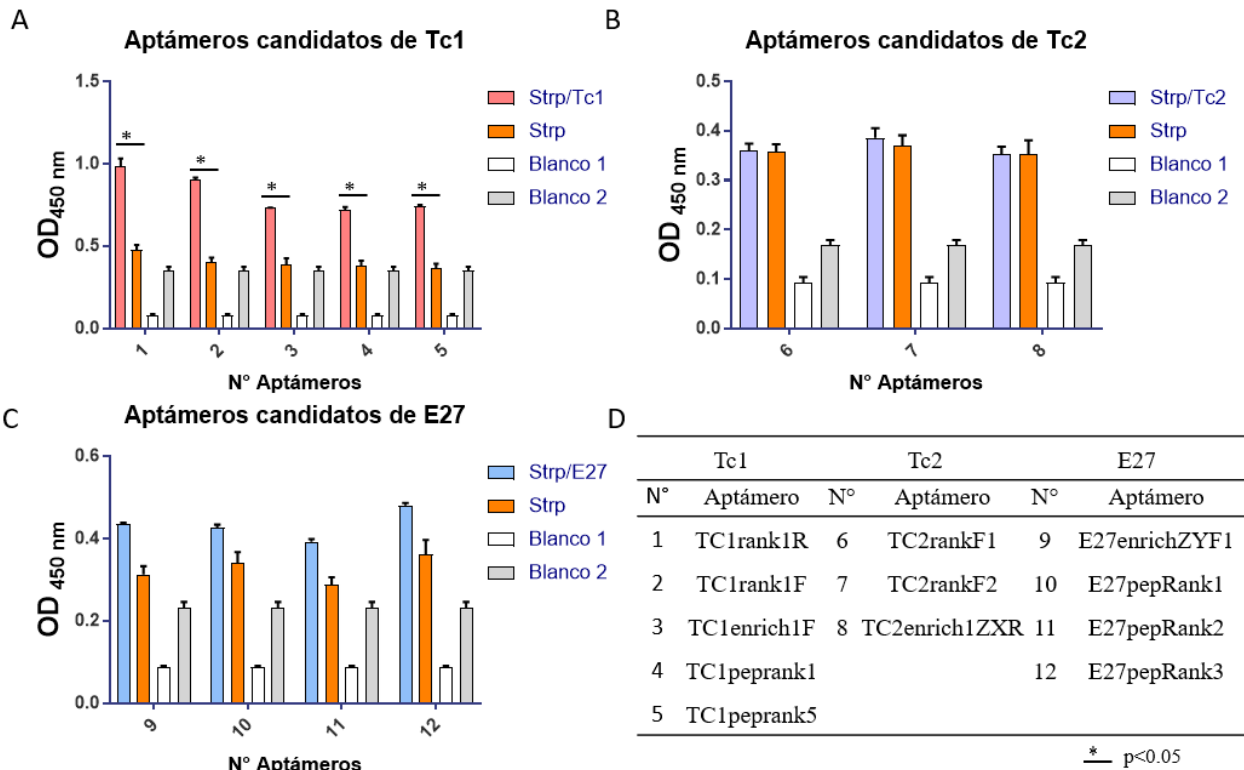
**Tabla 11.- Controles de reacción ELONA**

Se realizó la prueba ELONA con las secuencias candidatas seleccionadas para cada uno de los péptidos, con los controles correspondientes. Los candidatos 1-5 fueron probados con el péptido Tc1, los 6-8 con Tc2 y los 9-12 con E27 en las mismas condiciones y concentraciones por duplicado. En TC1 se observó que, en presencia del péptido, el aptámero y la sonda biotinilada (Strp/TC1), la reactividad fue aproximadamente 2 veces la de los controles con todas las secuencias, y estuvo por encima del cut-off ( $>0.444$ ). A través de un T-test no pareado, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las reactividades en presencia y ausencia de TC1 con las 5 secuencias de aptámeros. Además, la reactividad del Control (Strp) fue similar a la del Blanco2 con todas las secuencias. Debido a estos resultados se determinó que las secuencias candidatas a

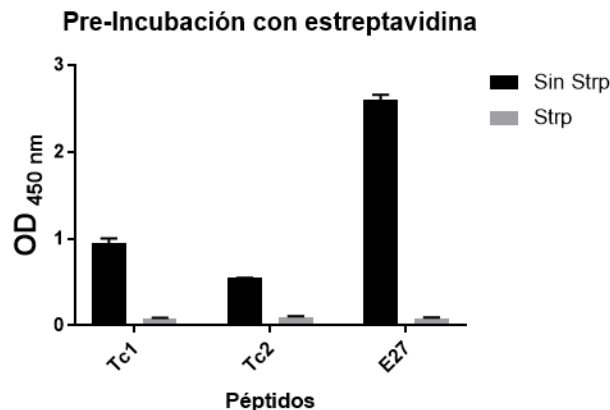
aptámeros 1,2,3,4 y 5 podían unir a la molécula con la que fueron seleccionadas, considerándose aptámeros de TC1 (**Figura 23-A**).

En TC2 se observó que la reacción del péptido con el aptámero (Strp/TC2) fue igual a la del control Strp y en E27 se observó que la reactividad de este con el aptámero (Strp/E27) fue ligeramente mayor que el control Strp. Ambas reactividades en presencia y ausencia del péptido (Strp/péptido y Strp) fueron mayores al cut-off de TC2 ( $>0.21$ ) y E27 ( $>0.295$ ). El Blanco 1 y 2 tuvieron una baja reactividad en ambos casos. Debido a la similitud de la reactividad en presencia y ausencia del péptido, se determinó que las secuencias 6, 7, 8 no tenían la capacidad de unir TC2 y las secuencias 9,10,11 y 12 no tenían la capacidad de unir E27 (**Figura 23 B-C**).

El Blanco 1 en los tres péptidos mostró valores similares, mientras que el Blanco2 mostró absorbancias diferentes en el siguiente orden: TC1, E27, TC2. Con la finalidad de comprobar que el péptido biotinilado fue correctamente bloqueado, se añadió un control sin pre-incubación con estreptavidina con los siguientes elementos: péptido biotinilado+Streptavidina-HRP. En los tres casos las reactividades sin bloqueo de estreptavidina (sin strp) fueron mayores a las reactividades bloqueadas (Strp) (**Figura 24**).



**Figura 23.- Ensayos de unión a péptidos Tc1, Tc2 y E27.** El eje x corresponde al número identificador del aptámero observado en la tabla D y el eje Y corresponde a la absorbancia medida (OD450nm). A) ELONA de secuencias candidatas seleccionadas con el péptido Tc1. El aptámero 1, 2 y 3 son del SELEX Unitarget, y 4 y 5 del SELEX Multitarget. Strp/TC1 muestra la reactividad en presencia del péptido. B) ELONA de secuencias candidatas seleccionadas con el péptido TC2, donde Strp/TC2 muestra la reactividad en presencia del péptido. C) ELONA de secuencias candidatas seleccionadas con el péptido E27, donde Strp/E27 muestra la reactividad en presencia del péptido. D) Tabla de Identificadores de aptámeros candidatos con número y nombre. Strp corresponde al control negativo, donde Strp: estreptavidina.



**Figura 24.- Verificación del bloqueo de péptidos biotinilados.** Se observa la reactividad obtenida con los tres péptidos biotinilados sin bloquearlos con estreptavidina (sin Strp) y bloqueándolos con estreptavidina (Strp) antes de fijarlos a la placa de ELONA. El eje X corresponde al péptido y el eje Y corresponde a la absorbancia medida (OD<sub>450nm</sub>). Strp: estreptavidina.

### 3.4.2 Reacción cruzada en secuencias provenientes del SELEX Multitarget

La reacción cruzada de las secuencias obtenidas a través del *SELEX* Multitarget fue probada a través de las siguientes combinaciones:

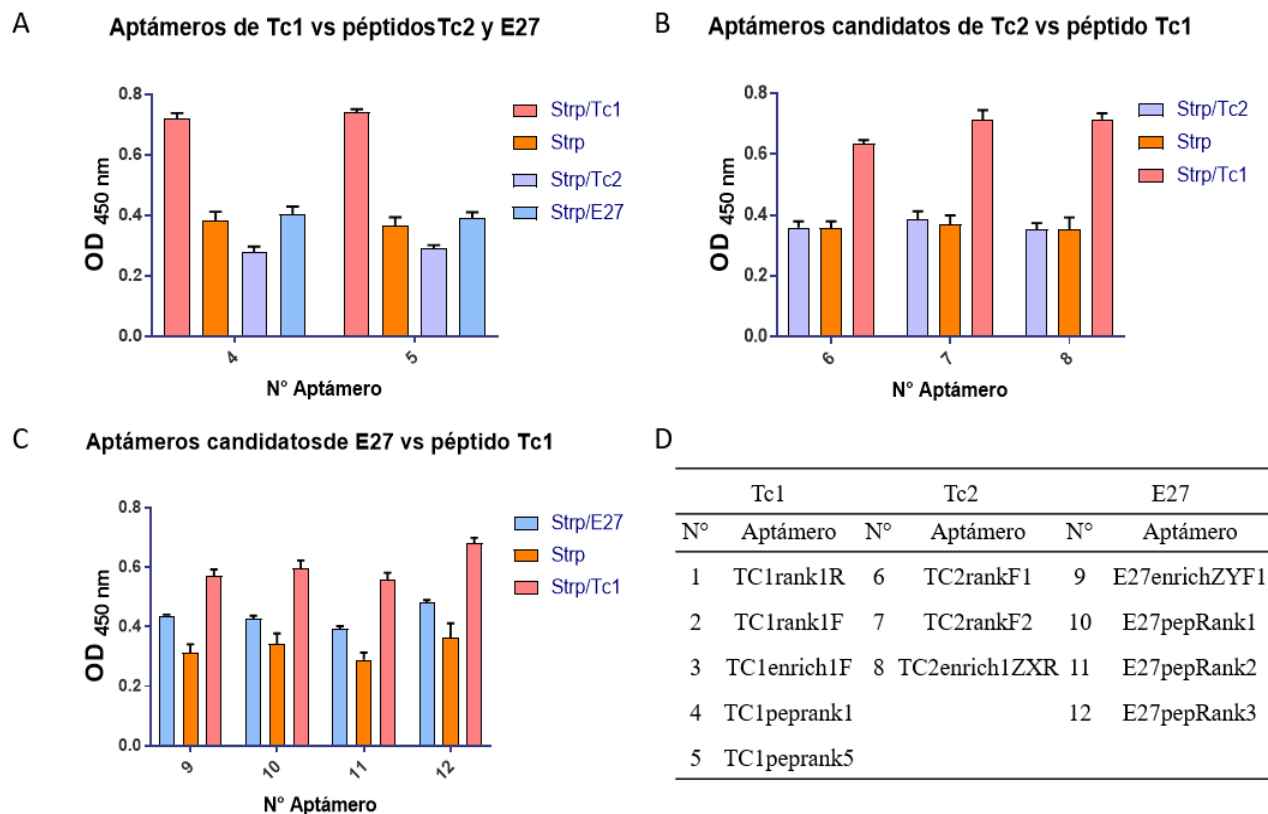
- A. Aptámeros TC1 4 y 5 vs péptido TC2 y E27
- B. Aptámeros candidatos seleccionados con TC2 vs péptido TC1
- C. Aptámeros candidatos seleccionados con E27 vs péptido TC1

La **Figura 25 A** muestra que la reactividad de los Aptámeros 4 y 5 de TC1 al péptido TC1 es aproximadamente 2 veces mayor que la reactividad al péptido E27 y aproximadamente 3 veces mayor que con el péptido TC2. Estas reactividades fueron menores o iguales a las reactividades obtenidas con el control Strp y/o el Blanco 2, demostrando la especificidad de unión de los aptámeros TC1 4 y 5 al péptido TC1.

La **Figura 25 B** muestra que la reactividad al péptido TC2 de los aptámeros candidatos seleccionados con Tc2 es menor que la reactividad al péptido Tc1 ( $\leq 2$  veces) e igual que el control Strp. Esto indica que las secuencias seleccionadas en la rama de TC2 del SELEX Multitarget no son específicas para TC2 y son más afines a TC1.

Por último, la **Figura 25 C** muestra que la reactividad al péptido E27 de los aptámeros candidatos seleccionados con E27 es ligeramente mayor que el control Strp, pero menor que la reactividad al péptido TC1. Esto indica que las secuencias seleccionadas en la rama E27 del SELEX Multitarget no son específicas para E27 y son más afines a TC1.





**Figura 25.- Ensayos de reacciones cruzadas de aptámeros candidatos del SELEX Multitarget.** El eje X corresponde al número identificador del aptámero y el eje Y corresponde a la absorbancia medida (OD450nm). A) ELONA de aptámeros TC1 4 y 5 contra péptidos TC2 (Strp/TC2) y E27 (Strp/E27). B) ELONA de aptámeros candidatos TC2 contra péptido TC1 (Strp/TC1). C) ELONA de aptámeros candidatos E27 contra péptido TC1 (Strp/TC1). Strp corresponde al control negativo, donde Strp: estreptavidina.

### 3.4.3 Unión a péptido TC1 en muestras biológicas de lisados de cultivos de *T. cruzi*

Con la finalidad de determinar si los aptámeros TC1 identificados eran capaces de detectar el péptido TC1 en muestras biológicas, se probó la unión aptámero-péptido en dos mezclas provenientes de cultivos de *T. cruzi*: lisados sonicados a los que se denominó proteínas solubles totales (P.soluble) y lisados tratados con TritónX-100 a los que se denominó proteínas de membrana solubles totales (Membrana). Las 5 primeras secuencias, seleccionadas contra TC1 fueron el principal foco de evaluación, pero las secuencias seleccionadas contra TC2 y E27 también fueron probadas por la fuerte reacción cruzada demostrada anteriormente (**Figura 25 B-C**).

En general se realizaron los siguientes controles: el Blanco 1 consistió sólo en lisados sin aptámero ni sonda biotinilada y el Blanco 2 consistió en la muestra compleja más la sonda biotinilada. El Blanco 1 mostró la reactividad por unión inespecífica de estreptavidina-HRP y el Blanco 2 mostró la reactividad por unión inespecífica de la sonda biotinilada. Inicialmente se realizó el ELONA con proteínas de membrana, donde se comprobó la capacidad de unión de los aptámeros al péptido TC1 en una mezcla compleja. Se utilizó por pocillo 100 pmol de TC1 pre-incubados con 120 pmol de estreptavidina junto a 400 ng de proteína de membrana para los aptámeros 1-5, 8 y 12, con sus respectivos Blancos 1 y 2. En presencia de TC1 se obtuvieron absorbancias de 9 a 10 veces mayores que el Blanco 1, y de 3 a 4 veces mayores que el Blanco 2 (**Figura 26 A**).

En el ELONA con proteínas totales solubles se utilizó por pocillo 100 pmol de TC1 pre-incubados con 100 pmol de estreptavidina junto a 1 µg de proteína soluble total para los aptámeros 1-7, 10 y 11. Además de realizarse los Blancos 1 y 2, se añadieron dos controles negativos, el primer control (P.soluble+strp) en ausencia de péptido TC1 evaluó la unión inespecífica del aptámero a estreptavidina y el segundo control (IF8) evaluó la unión inespecífica de los aptámeros a una proteína flagelar de *T. cruzi* (**Figura 26 B**). La contribución de la proteína nativa TcCLB.510323.60 a la señal detectada podría esclarecerse a través del primer control P.soluble+strp, debido a que presenta el lisado y el aptámero en ausencia del péptido TC1 en las mismas condiciones experimentales. La señal de este control muestra una contribución leve por parte de la proteína nativa en el lisado, con reactividades entre 0.12-0.15, correspondiente a  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{1}{2}$  de la señal de Prot+Strep/TC1, dependiendo del aptámero utilizado. Ello sugiere que todos los aptámeros probados mantienen una afinidad aproximada constante por la proteína nativa,

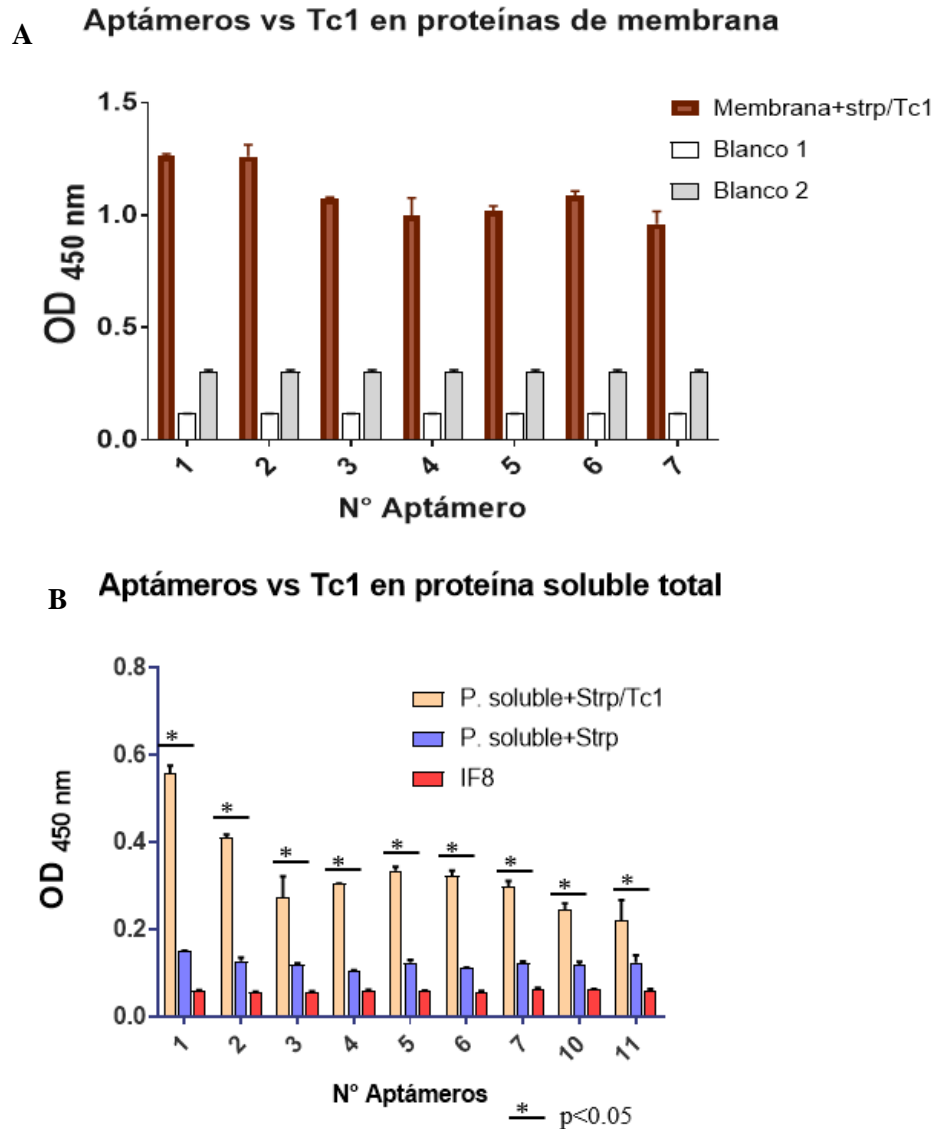
mientras que su afinidad por el péptido TC1 varía de manera más marcada.

Todas las reactividades de los controles fueron constantes y similares entre sí. Se comparó las reactividades obtenidas en presencia del péptido con los dos controles negativos para todas las secuencias de aptámeros probadas, mediante un ANOVA de dos vías (89). Este test evalúa la influencia de dos variables independientes (secuencia de aptámero y condición de ELONA) en una variable dependiente continua (reactividad medida en OD 450 nm). Con un  $p < 0.0001$  se determinó que existían diferencias significativas en las reactividades de las tres condiciones evaluadas y entre secuencias de aptámeros probados.

En base a estos resultados se realizó un test de comparaciones múltiples de Tukey que permitió evaluar si existían diferencias significativas entre las tres condiciones probadas de manera particular. Se determinó que la reactividad de Prot+Strep/TC1 era significativamente diferente a la de Prot/Strep y a la de IF8 con  $p < 0.0001$  en todos los aptámeros y que ambos controles diferían significativamente entre ellos con un  $p < 0.05$  en todos los aptámeros. Prot/Strep presenta 2 veces más reactividad que el control IF8 y que los Blancos 1 y 2, siendo el único control mayor al cut-off establecido (0.059). Esta mayor reactividad de podría deberse a la interacción del aptámero con la proteína nativa en lisados. Estos resultados muestran la capacidad de unión de los aptámeros usados al péptido TC1 en muestras de lisados.

IF8, proteína flagelar de unión a calcio de 24 kDa codificada por el gen TcCLB.506749.20, fue utilizada como control negativo. Esta proteína se encuentra ligeramente más traducida en el epimastigote que en el tripomastigote (81) y ha sido

probada exitosamente por su capacidad antigénica (90). La reacción diferencial en presencia de lisados y no en presencia de IF8, presente en el lisado, apoya la existencia de una detección de la proteína TcCLB.510323.60 o del péptido TC1 que la conforma.



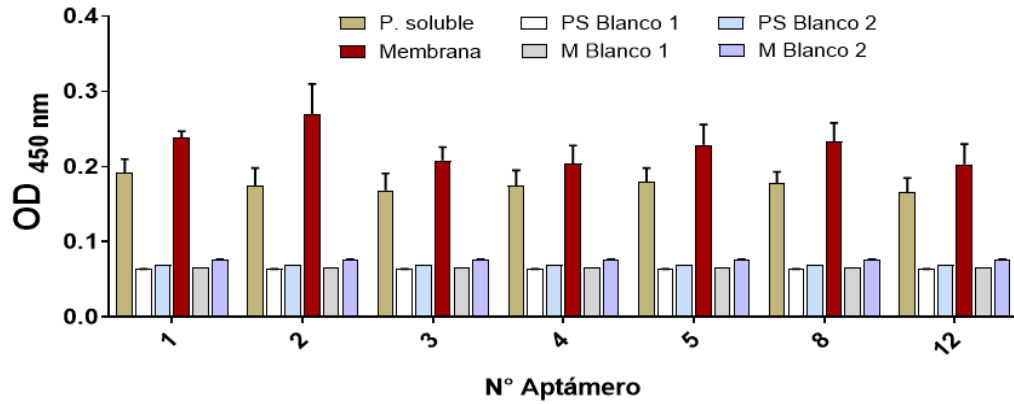
**Figura 26.- Ensayo de unión de péptido TC1 en mezclas complejas.** El eje X corresponde al número identificador del aptámero y el eje Y corresponde a la absorbancia medida (OD450nm). A) ELONA con péptido TC1 en proteína de membrana total soluble de *T. cruzi* (Membrana+strp/TC1) B) ELONA con péptido TC1 en proteínas solubles totales de *T.cruzi* (P.soluble+strp/TC1). Strp: estreptavidina, Membrana: lisados tratados con TritónX-100 de cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y, P.soluble: lisados sonicados de cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y. Mediciones por duplicado y controles por triplicado. IF8, proteína flagelar de unión a calcio codificada por el gen TcCLB.506749.20.

### 3.4.4 Uso de aptámeros en lisados de *T. cruzi*

Con la finalidad de determinar si los aptámeros TC1 identificados son capaces de reaccionar de manera diferencial a muestras de proteínas de *T. cruzi*, se realizó ensayos de unión contra proteínas solubles totales (P. Soluble) y proteínas de membrana solubles totales (Membrana) de un cultivo de tripomastigotes. Para ello, se fijó 400 ng de proteína de cada uno de los extractos por pocillo y se incubó junto a los aptámeros 1-5, 8 y 12, con sus respectivos Blancos 1 y 2, en las mismas condiciones que los experimentos de la Figura 26 A. Se estableció un cut-off (promedio+ 2desviaciones estándar) que fue de 0.071196 para P. Soluble y 0.082576 para Membrana.

Comparando ambas mezclas complejas, se observó que el blanco 1 y 2 en proteínas solubles y de membrana eran similares, mostrando que la unión inespecífica de la sonda biotinilada a estas mezclas es mínima. La reactividad de los aptámeros a lisados fue 2 a 3 veces mayor que sus respectivos cut-off. La reactividad a proteínas de membrana fue mayor que a las proteínas totales solubles con todos los aptámeros, siendo más reactivos los aptámeros obtenidos en el SELEX Unitarget 1 y 2. La mayor reactividad a proteínas de membrana es concordante con la localización de la proteína de TC1 (**Figura 27**). Las lecturas obtenidas en Prot/Strep de la figura 26 B son similares a las lecturas obtenidas en P. soluble de la figura 27, lo que se explica por la presencia de la proteína nativa en los lisados. Sin embargo, comparaciones inter-ensayo de este tipo se encuentran dentro de las limitaciones de la técnica de ELONA adaptada en el presente estudio y requerirían que todos los ensayos compartan condiciones experimentales.

### Aptámeros vs Lisados



**Figura 27.- Ensayo de unión a lisados.** El eje x corresponde al número identificador del aptámero y el eje Y corresponde a la absorbancia medida (OD450nm). ELONA con proteínas solubles y proteínas de membrana de *T. cruzi*. Membrana: proteínas solubles de membrana de cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y, P. soluble: proteínas totales solubles de cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y. Mediciones por duplicado y controles por triplicado.

## **CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN**

#### 4.1.- Aptámeros de Tc1, identificación y características

A través del análisis de enriquecimiento se identificaron 5 aptámeros potenciales para el péptido TC1, 2 aptámeros potenciales para el péptido TC2 y 3 aptámeros potenciales para el péptido E27. Las pruebas de evaluación de unión por ELONA mostraron que el péptido TC1 fue un blanco exitoso en ambas metodologías de SELEX, ya que los aptámeros de TC1 mostraron reactividad significativamente diferente a los controles tanto en mezclas simples como en mezclas complejas (**Figura 23A y 26**). Por el contrario, las secuencias de ADN seleccionadas para TC2 y E27 mostraron reactividades similares a los controles negativos con estreptavidina (**Figura 23 B-C**), descartándose la posibilidad de que fueran aptámeros para sus respectivos blancos. Además, los ensayos de unión cruzada demostraron que aún las secuencias seleccionadas contra TC2 y E27 reaccionaban diferencialmente en presencia de TC1. La raíz de esta reactividad cruzada se explica por contener secuencias y motivos comunes, que en contexto de la metodología Multitarget, se explicaría por un enriquecimiento preferencial de la biblioteca por el péptido TC1. Los aptámeros identificados que mostraron mayor reactividad en ensayos de unión a TC1 fueron Tc1rank1R y Tc1rank1F.

La capacidad de unión de los aptámeros depende tanto de su secuencia como de su estructura; por ello es útil analizar ambos en busca de motivos comunes y enriquecidos (91). El análisis de secuencias motivo mostró un patrón rico en guaninas (G) predominante en todas las bibliotecas [G(N)GGG(N)GGG(N)GGG(N)GG (**Figura 20**)] y presente en todas las secuencias de aptámeros seleccionadas en el análisis de enriquecimiento y abundancia. La presencia de este motivo fue identificada durante el análisis de estructuras secundarias en un loop común a todas las secuencias candidatas. La mayoría de las estructuras predichas presentaron la formación de dos horquillas, una



rica en guaninas de mayor tamaño y otra de menor tamaño diversamente compuesta. El enriquecimiento de este motivo rico en G podría deberse a un artefacto de la evolución *in vitro*, o a que posee una función estructural importante para la interacción con la molécula blanco. El éxito en los ensayos de evaluación de unión y de reacciones cruzadas a través de ELONA apoyan la segunda explicación, implicando que el motivo identificado se uniría al péptido TC1 de manera diferencial.

El patrón rico en guanina (G) encontrado se asemeja al de diversos estudios, como el reportado por Zhu y Jing (92) (GGGCGGGCGGGCGGGC) en un aptámero de ADN de Stat3 y por Mukundan *et al.* (93) (GTGGTGGGTGGGTGGGT) en un aptámero de ADN que inhibe la actividad de la integrasa de VIH-1. Existen otros motivos ricos en G similares (94), y como ha reportado el grupo de Neidle (95), los motivos ricos en G poseen una estructura característica que es prevalente y potencialmente funcional en el genoma humano, estructura conocida como G-cuádruplex.

Las estructuras de tipo G-cuádruplex no pueden ser predichas por Mfold, por lo que las horquillas analizadas en los aptámeros de TC1 son escenarios potenciales. Un G-cuádruplex es una estructura helicoidal que consiste en 2 o más planos de cuatro guaninas cada uno y que puede ser formado de manera intramolecular por 1 hebra de ADN o de manera intermolecular por 2 (96) o más hebras (97). Es una estructura común y útil biológicamente en regulación (98)(99), y posee propiedades biofísicas y bioquímicas inusuales. Los G-cuádruplex no son inmunogénicos, son altamente estables, son altamente resistentes a nucleasas y poseen facilidad para ingresar a la célula (94). Existen varios ejemplos de aptámeros seleccionados que contienen esta estructura, como el aptámero que une Trombina (TBA) (100), insulina (101), proteína A de *Staphylococcus*

*aureus* (102), Hemina (103), ATP (104), etc.

Si bien el motivo hallado en los aptámeros TC1 no cumple completamente con la “regla de formación de G-cuádruplex intramoleculares” deducida por los grupos de Neidle (95) y de Balasubramanian (99), se observa un gran parecido. Esta regla consiste en que debe haber una coincidencia con la secuencia consenso G(3–4)N(1–7)G(3–4)N(1–7)G(3–4)N(1–7)G(3–4), donde cuatro repeticiones de G de entre 3 a 4 nucleótidos se encuentran separadas por tres espaciadores de entre 1 a 7 nucleótidos. El motivo encontrado en este estudio cumple casi a la totalidad esta regla ya que posee tres tripletes de G centrales separados por 1 nucleótido espaciador y dos G a cada extremo. También existe la posibilidad de que el motivo rico en G observado forme G-cuádruplex intermoleculares con la participación de más de una hebra, como el aptámero de la proteína A reportado por el grupo de Strehlitz (105). Adicionalmente, las secuencias de los aptámeros más reactivos Tc1rank1R y Tc1rank1F presentan un motivo que podría formar G-cuádruplex intramoleculares a pesar de la presencia de la interrupción de una adenina (G(N)GGG(N)GGG(N)GGG(N)GGAG), ya que interrupciones similares que no interfieren en la formación de G-cuádruplex han sido reportadas en estudios de Mukundan *et al.* (93). Otro aspecto interesante y prometedor es la relación hallada por Curtis y Liu (98) en secuencias que presentan 1 nucleótido de espaciador, las cuales son hasta 10 veces más afines que motivos con espaciadores más largos, lo cual podría indicar la presencia de aptámeros de alta afinidad. Sin embargo, debido a que no toda secuencia rica en G forma esta estructura, como ha reportado el grupo de Ogasawara en aptámeros ricos en G que forman horquillas funcionales (106), para poder confirmar la importancia de la secuencia rica en G y la formación de G-cuádruplex se deberían

utilizar métodos de truncamiento o mutaciones (107) y dicroísmo circular (108).

Una razón por la cual la estructura G-cuádruplex tiende a ser favorecida en la selección podría ser su densidad de carga, que es doblemente negativa con respecto a la doble hélice del mismo largo (46). Esto genera una fuerte unión con superficies cargadas positivamente (109), pero otro tipo de fuerzas como interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y apilamientos participan para generar uniones específicas (110). Este tipo de estructura se observa tanto en aptámeros de ADN como de ARN, pero tiende a ser seleccionada usualmente al utilizarse bibliotecas de ADN (111). Esto posiblemente se explica porque es una de las estructuras terciarias más sofisticadas y que aporta más variedad en el ADN.

Algunos estudios se han enfocado en desarrollar aptámeros de ARN para *T. cruzi* usando lisados totales o proteínas totales excretadas y secretadas (TESA), como los realizados por el grupo de Debrabant (112)(113)(114). Ninguno de estos ha identificado moléculas específicas, ni aptámeros de ADN. Aunque las bibliotecas de ARN ofrecen gran versatilidad de estructuras 3-D (45), se ha seleccionado exitosamente aptámeros de ADN para muchos blancos como marcadores tumorales y de cáncer (115)(116), bacterias (105)(117), hormonas (101),etc. Este tipo de aptámeros ofrecen facilidad de síntesis química, mayor tiempo de vida media en almacenamiento por su mayor estabilidad y son fácilmente modificados para generar resistencia a nucleasas (118).

#### **4.2- SELEX multitarget, posibilidades**

Aunque el método de SELEX luce como un protocolo simple y directo, en realidad consume tiempo, trabajo y materiales. Adicionalmente, siempre existe la posibilidad de no seleccionar ligandos fuertes o específicos, debido a características propias del blanco o a condiciones no óptimas de selección (119). Con la finalidad de seleccionar de manera

más eficiente aptámeros para varias moléculas blanco a la vez, y bajo la premisa de que en una misma biblioteca diversa existen ligandos para todo tipo de blanco, se ideó el SELEX Multitarget. Esta estrategia consta de dos partes: los ciclos iniciales, donde se realizan selecciones contra una mezcla de blancos para enriquecer la biblioteca de manera direccionada, y los ciclos finales, donde se realizan selecciones individuales (ramas) con el fin de obtener aptámeros afines y específicos para un solo blanco. Siguiendo este diseño se realizó el SELEX Multitarget con una mezcla de 8 péptidos y se ramificó en el ciclo 9. Con la finalidad de validar la metodología, se utilizaron sólo 3 péptidos (TC1, TC2 Y E27) durante las selecciones individuales.

A través de este método se logró seleccionar aptámeros para el péptido TC1, pero no para los otros blancos. Los análisis de unión por ELONA demostraron la capacidad de unión de todas las secuencias de aptámeros identificados (aptámeros 4-12) con el péptido TC1, aún en el caso de aquellas secuencias provenientes de selecciones individuales con los otros blancos TC2 y E27 (Figura 25). La similitud entre secuencias identificadas, el hallazgo de las mismas secuencias entre ramas de selección individual, el enriquecimiento del mismo motivo rico G y las dificultades de enriquecimiento de las ramas TC2 y E27 según DiVE apoyan los resultados obtenidos por ELONA y sugieren que la biblioteca del SELEX Multitarget fue enriquecida preferencialmente con ligandos del péptido TC1 antes de la ramificación a selecciones individuales.

La prueba más cercana de esto se encontró en el análisis de enriquecimiento de motivos, donde se pudo observar en la transición del ciclo S5 al S9 la aparición del motivo rico en G, lo que indicaría que en el ciclo 10 donde se realizó la ramificación de la selección, la biblioteca poseía mayoritariamente ligandos de TC1. Esto podría deberse a características

del péptido TC1, características del ligando o a una combinación de ambos. Las secuencias ricas en G poseen mayor estabilidad y usualmente permiten la formación de G-cuádruplex, que poseen una carga negativa mayor que es favorecida en la selección, uniéndose fuertemente a ligandos positivos (46). Los péptidos TC1 y E27 fueron los únicos positivamente cargados a pH 7.4 y poseen proporciones muy similares de aminoácidos hidrofóbicos, ácidos, básicos y neutros, por lo que la preferencia del péptido TC1 podría explicarse por su mayor tamaño (20 aa vs 15 aa) que permite mayor superficie de exposición, o a su secuencia *per se*. El efecto del tamaño del blanco ha sido determinado con anterioridad en trabajos de Carothers *et al.* utilizando aptámeros para 8 blancos pequeños, concluyendo que el peso molecular del blanco es proporcional a la afinidad del aptámero resultante (blancos más grandes resultan en constantes de disociación menores)(120). Esto, en el diseño de la Multitarget, se podría ver reflejado en la preferencia por el blanco de mayor tamaño durante la selección. Sin embargo, en el mismo trabajo se indica que la secuencia y los grados de libertad de la estructura del blanco influyen en esta afinidad, encontrándose moléculas muy pequeñas de 180 Daltons con altas afinidades debido a su estabilidad estructural.

Para probar la capacidad de la aproximación Multitarget y verificar que los resultados se deben a una ramificación tardía, una estrategia sería retroceder al ciclo S5 y a partir de este generar selecciones individuales. Además, a partir de los resultados obtenidos, ciertas precauciones deberían ser tomadas en cuenta para futuros diseños de SELEX Multitarget. Los blancos a utilizar deben poseer puntos isoeléctricos similares, para evitar preferencias por carga; deben ser de tamaños similares y/o poseer grados de libertad similares en su estructura. Adicionalmente, una menor cantidad de blancos permitiría una evaluación más

simple de esta primera etapa de validación.

#### **4.3.-Biomarcadores, biosensores y problemática en Chagas**

La enfermedad de Chagas representa un fenómeno complejo, biológica (57)(2), cultural y económicamente (15). Al ser parte de las enfermedades desatendidas, presenta ciertas características que obstaculizan el desarrollo de soluciones para sus principales problemáticas: terapias tóxicas (57) y métodos diagnósticos no concluyentes (121). Actualmente la mayoría de métodos diagnósticos detecta antígenos derivados de lisados crudos (5)(121) y una gran parte del repertorio proteico y antigénico de *T. cruzi* se encuentra no caracterizado (122). La dinámica general de estudio de biomarcadores del parásito se basa en identificar componentes antigénicos a través de Western Blot y reportar bandas de tamaños característicos (123). Debido a esto, se han realizado intentos de caracterización y cuantificación de proteínas y antígenos utilizando métodos de alto procesamiento como microarrays de péptidos (62), ribosome profiling (81), espectrometría de masas (124). Sin embargo, estos intentos han sido insuficientes y gran parte del proteoma deducido de *T. cruzi* se encuentra por estudiar todavía (122).

El descubrimiento de biomarcadores nuevos y el desarrollo de blancos terapéuticos se encuentran supeditados a un conocimiento más profundo de moléculas propias del parásito que se diferencien de las del hospedero humano (57). Además, la detección de biomarcadores provenientes de moléculas propias de *T. cruzi* puede ser de utilidad en casos de Chagas congénito (123), enfermedades autoinmunes, coinfecciones con VIH (20), así como para el seguimiento de terapias (125). Basado en esto, se determinaron las características que definieron la búsqueda bioinformática de una proteína de interés: abundancia y grado de conservación en el parásito. La antigenicidad no fue uno de los rasgos de búsqueda establecido debido a la ventaja que presentan los aptámeros de ser

seleccionados contra compuestos generales (9) y porque se deseaba abarcar un grupo de biomarcadores potenciales no aprovechado en Chagas por el sesgo inmunológico que predomina en su detección y estudios.

La presencia de proteínas en *T. cruzi* se encuentra relacionada con mecanismos de regulación post-transcripcionales, como la regulación traduccional, la degradación de ARNm y proteínas (126). Es por ello que, para evaluar la abundancia de proteínas en tripanosomas, es necesario utilizar metodologías cuantitativas que evalúen la traducción, como Ribosome profiling. Esta técnica permite determinar la eficiencia de la traducción mediante huellas de ocupación del ribosoma en cada transcripto en un momento específico e identificar un traductoma completo que se encuentra mejor correlacionado con el proteoma que con el transcriptoma (81). Debido a que sólo existe un trabajo de este tipo en *T. cruzi*, sólo se contó con la información del traductoma en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, por lo que se utilizó este último estadio infeccioso como estadio de interés para detección (81). En base a ello, se determinó que la proteína hipotética de 22 kDa codificada por el gen TcCLB.510323.60 poseía gran potencial como biomarcador, al ser una proteína conservada con más de 90% de similitud entre cepas (**Figura 10**) y estar presente en gran abundancia en el parásito en el estadio de tripomastigote metacíclico (81)(**Tabla 3**). Esta proteína también podría encontrarse en cantidades significativas en estadios relevantes para el diagnóstico en humanos, de acuerdo a otros estudios de índole transcripcional que sí se encuentran disponibles para los 4 estadios del parásito (73).

La primera estrategia de producción de blancos, a través de la expresión recombinante de la proteína, no resultó exitosa en *E. coli*. En la segunda estrategia se optó por sintetizar

péptidos representativos de la proteína, estructurados y preferentemente en zonas expuestas. A diferencia de la selección de péptidos antigénicos, se priorizó estabilidad y exposición, incluyéndose el péptido TC1, estable, semi expuesto y con zonas transmembrana presentes. La viabilidad de esta estrategia se basó en dos antecedentes: la selección de aptámeros contra moléculas blanco con un amplio rango de tamaños como, por ejemplo, aptámeros contra L-arginina de 174.2 Daltons capaces de diferenciar a su enantiómero D-arginina (49), así como procesos de SELEX contra el epítipo viral Rev (127) y el marcador tumoral MUC-1 (115). En el presente trabajo, esta estrategia fue útil, ya que aptámeros seleccionados contra un péptido representativo de la proteína mostraron una reactividad de 2 a 3 veces mayor que el cut-off establecido (0.071196 para P. Soluble total y 0.082576 para Membrana) en presencia del lisado de cultivos de *T. cruzi*. Esta reacción demostraría la presencia del péptido o de la proteína dentro de los lisados del parásito probados. El éxito de este tipo de estrategia valida la posibilidad de utilizar péptidos como blancos para el desarrollo de biosensores con los que se podría detectar biomarcadores de difícil expresión y/o producción recombinante. Estas combinaciones de biomarcadores y biosensores brindan las bases para el desarrollo de métodos de tamizaje y/o detección que resultaban difíciles de lograr con otras tecnologías.

En suma, se lograron aislar e identificar aptámeros de ADN de hebra simple de 86 nucleótidos de largo capaces de unirse diferencialmente al péptido TC1 de 20 aa, perteneciente a la proteína TcCLB.510323.60 de *T. cruzi*. Estos aptámeros también presentaron reactividad diferencial en lisados de cultivos de *T. cruzi*, por lo que tienen un potencial para el diseño de pruebas de detección de la proteína en muestras biológicas.



## **CAPÍTULO V: CONCLUSIONES**

- Las dos estrategias de SELEX comparadas (Unitarget y Multitarget) permitieron la selección de aptámeros contra el péptido TC1, aptámeros que presentaron el mismo motivo rico en G enriquecido en las bibliotecas finales.
- La estrategia del SELEX Multitarget no logró seleccionar aptámeros para otros péptidos individuales en las condiciones probadas.
- Los cinco aptámeros identificados, TC1rank1R, TC1rank1F, TC1enrich1F, TC1peprank1 y TC1peprank5, se unen al péptido TC1 en lisados de proteínas totales y proteínas totales de membrana de cultivos de tripomastigote de *T. cruzi*.
- Los aptámeros contra TC1 reportados son los primeros aptámeros de ADN contra un péptido de *T. cruzi* hasta la fecha.

## **CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES**

Este trabajo se basó en la información de abundancia proporcionada por el trabajo de Smircich *et al.* (2015), identificando como potenciales biomarcadores a aquellas proteínas abundantes en el tructoma del tripomastigote metacíclico, al ser una forma infecciosa. Debido a la ausencia de ensayos de ribosome profiling en los estadios de amastigote y tripomastigote sanguíneo, no es posible asegurar si la abundancia del biomarcador seleccionado se mantiene en estos estadios, lo cual abre la posibilidad de que esta proteína se encuentre en niveles menores a lo detectable por aptámeros u otro biosensor. Sin embargo, estudios de transcriptómica muestran una expresión estable del gen TcCLB.510323.60 en los cuatro estadios (73) y durante el proceso de infección (74), confirmando la presencia de esta proteína en todos los estadios y abriendo la posibilidad de una abundancia estable en el estadio de tripomastigote sanguíneo y amastigote.

Existe la posibilidad de que los péptidos seleccionados (Tc1-Tc5) no se encuentren en muestras o se encuentren en una conformación que disminuya su afinidad con los aptámeros. Sin embargo, la unión diferencial de los aptámeros con lisados de cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* sugiere la detección de la proteína dentro de los lisados y da base para realizar futuros ensayos en diferentes condiciones en lisados, con el parásito completo y con muestras de pacientes con diferentes grados de parasitemia.

El ensayo ELONA utilizado para determinar la capacidad de unión de los aptámeros constituye una evaluación cualitativa, debido a la complejidad del sistema adaptado que genera una fuerte señal de fondo por la sonda biotinilada. Este sistema fue utilizado para obtener una señal de apagado y encendido (on/off) que permitió determinar si la secuencia era capaz de unir de manera específica el target o no, más no permitió una comparación inter-ensayo. Para disminuir esta señal de fondo y poder realizar ensayos comparativos y cuantitativos a futuro, los cinco aptámeros seleccionados serán sintetizados con modificaciones directas.

## CAPÍTULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stanaway JD, Roth G. The Burden of Chagas Disease. *Glob Heart* [Internet]. 2015;10(3):139–44. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221181601500174X>
2. Chatelain E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2017 [cited 2017 May 13];15:98–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28066534>
3. Grisard EC, Teixeira SMR, de Almeida LGP, Stoco PH, Gerber AL, Talavera-López C, et al. Trypanosoma cruzi Clone Dm28c Draft Genome Sequence. *Genome Announc* [Internet]. 2014 Jan 30 [cited 2017 Jul 10];2(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24482508>
4. Reis-Cunha JL, Mendes TA de O, de Almeida Lourdes R, Ribeiro DR dos S, Machado-de-Avila RA, de Oliveira Tavares M, et al. Genome-wide screening and identification of new Trypanosoma cruzi antigens with potential application for chronic Chagas disease diagnosis. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Aug 14];9(9):e106304. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4165580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Chirinos SVCNV. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis americana (enfermedad de Chagas). 2005;(511):93.
6. Sánchez Negrette O, Sánchez Valdéz FJ, Lacunza CD, García Bustos MF, Mora MC, Uncos AD, et al. Serological evaluation of specific-antibody levels in patients treated for chronic Chagas' disease. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2008 Feb [cited 2015 Nov 4];15(2):297–302. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2238061&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
7. Ulrich H, Wrenger C. Disease-specific biomarker discovery by aptamers. *Cytometry A* [Internet]. 2009 Sep [cited 2015 Oct 8];75(9):727–33. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20766>
8. Bunka DHJ, Stockley PG. Aptamers come of age - at last. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2006 Aug [cited 2015 Sep 22];4(8):588–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845429>
9. Jayasena SD. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clin Chem* [Internet]. 1999 Sep 1 [cited 2015 Nov 2];45(9):1628–50. Available from: <http://www.clinchem.org/content/45/9/1628.long>
10. Ulrich H, Trujillo CA, Nery AA, Alves JM, Majumder P, Resende RR, et al. DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications. *Comb Chem High Throughput Screen* [Internet]. 2006;9(8):619–32. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17017882](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17017882)
11. Pinho RT, Waghahi MC, Cardillo F, Mengel J, Antas PRZ. Scrutinizing the Biomarkers for the Neglected Chagas Disease: How Remarkable! *Front Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Sep 26];7:306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27563302>

12. Ingolia NT. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2014;15(3):205–13. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg3645>
13. OMS | La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). [cited 2015 Aug 13]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
14. Dias JCP. Evolution of Chagas Disease Screening Programs and Control Programs. *Glob Heart* [Internet]. 2015;10(3):193–202. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211816015001805>
15. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2013 Apr [cited 2015 Aug 28];13(4):342–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3763184&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Teixeira ARL, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Postgrad Med J* [Internet]. 2006 Dec [cited 2015 Nov 2];82(974):788–98. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2653922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
17. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2001 Sep 9 [cited 2015 May 30];1(2):92–100. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1473309901000652/fulltext>
18. Moncayo Á, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009 Jul [cited 2015 May 20];104:17–30. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762009000900005&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000900005&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
19. Martins-Melo FR, Lima M da S, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health* [Internet]. 2014 Aug [cited 2015 Nov 2];19(8):943–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24815954>
20. Almeida EA de, Ramos Júnior AN, Correia D, Shikanai-Yasuda MA. Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980 - 2010). *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2011 Dec [cited 2015 Oct 4];44(6):762–70. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822011000600021&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000600021&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
21. Wandtke T, Woźniak J, Kopiński P. Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections. *Viruses* [Internet]. 2015 Feb [cited 2015 Nov 2];7(2):751–80. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4353915&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
22. Stein CA, Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol Ther* [Internet]. 2017;25(5):1069–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.023>
23. Mustafa MG, Petersen JR, Ju H, Cicalese L, Snyder N, Haidacher SJ, et al. Biomarker discovery for early detection of hepatocellular carcinoma in hepatitis C-infected patients. *Mol Cell*

- Proteomics [Internet]. 2013 Dec [cited 2017 Jul 22];12(12):3640–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24008390>
24. Chang YM, Donovan MJ, Tan W. Using aptamers for cancer biomarker discovery. *J Nucleic Acids* [Internet]. 2013 [cited 2017 Jul 22];2013:817350. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401749>
  25. CORREA RR. [Triatoma in the State of São Paulo; its role in the transmission of Chagas' disease (Hemiptera: Reduviidae)]. *Rev Paul Med* [Internet]. 1951 Oct [cited 2017 Sep 27];39(4):379–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14900731>
  26. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2012 Oct 18 [cited 2015 Oct 8];34(6):753–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3498515&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  27. Bern C, Martin DL, Gilman RH. *Acute and Congenital Chagas Disease* [Internet]. 1st ed. Vol. 75, *Advances in Parasitology*. Elsevier Ltd.; 2011. 19-47 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2>
  28. Dias JC. [Cecílio Romaña, Romaña's sign and Chagas' disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. [cited 2017 Sep 27];30(5):407–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9380903>
  29. FRANK FM, FERNÁNDEZ MM, TARANTO NJ, CAJAL SP, MARGNI RA, CASTRO E, et al. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitology* [Internet]. 2003 Jan [cited 2015 Nov 2];126(1):31–9. Available from: [http://journals.cambridge.org/abstract\\_S0031182002002585](http://journals.cambridge.org/abstract_S0031182002002585)
  30. Nagarkatti R, de Araujo FF, Gupta C, Debrabant A. Aptamer Based, Non-PCR, Non-Serological Detection of Chagas Disease Biomarkers in *Trypanosoma cruzi* Infected Mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):25.
  31. Andrade M, Guild N, Hsu T, Gold L, Tuerk C, Karam J. DNA polymerase of bacteriophage T4 is an autogenous translational repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1988 Nov [cited 2017 Sep 27];85(21):7942–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3054876>
  32. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* [Internet]. 1990 Aug 3 [cited 2017 May 14];249(4968):505–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2200121>
  33. Gold L, Janjic N, Jarvis T, Schneider D, Walker JJ, Wilcox SK, et al. Aptamers and the RNA world, past and present. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2015 Oct 15];4(3). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3282410&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  34. Baird GS. Where Are All the Aptamers? *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2010;134(4):529–31. Available from: <http://ajcp.ascpjournals.org/cgi/doi/10.1309/AJCPFU4CG2WGGJKS>
  35. Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T. Current approaches in SELEX: An update to

- aptamer selection technology. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2014;33(6):1141–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>
36. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2005 Sep 29 [cited 2017 Sep 27];383(1):83–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16052344>
  37. Arnold S, Pampalakis G, Kantiotou K, Silva D, Cortez C, Missailidis S, et al. One round of SELEX for the generation of DNA aptamers directed against KLK6. *Biol Chem* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2017 Sep 27];393(5):343–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22505517>
  38. Bruno JG. In Vitro Selection of DNA to Chloroaromatics Using Magnetic Microbead-Based Affinity Separation and Fluorescence Detection. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1997 May [cited 2017 Sep 6];234(1):117–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X97965177>
  39. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* [Internet]. 1990 Aug 30 [cited 2017 Sep 8];346(6287):818–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1697402>
  40. Zhou W, Saran R, Liu J. Metal Sensing by DNA. *Chem Rev* [Internet]. 2017 Jun 28 [cited 2017 Sep 8];117(12):8272–325. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28598605>
  41. Pfeiffer F, Mayer G. Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules. *Front Chem* [Internet]. 2016 [cited 2017 Sep 8];4:25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27379229>
  42. Wang J, Zhang Y, Chen Y, Hong S, Sun Y, Sun N, et al. In vitro selection of DNA aptamers against renal cell carcinoma using living cell-SELEX. *Talanta* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2017 Sep 8];175:235–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28841985>
  43. Chen H-L, Hsiao W-H, Lee H-C, Wu S-C, Cheng J-W. Selection and Characterization of DNA Aptamers Targeting All Four Serotypes of Dengue Viruses. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jan 25 [cited 2015 Oct 26];10(6):e0131240. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131240>
  44. Ku T-H, Zhang T, Luo H, Yen TM, Chen P-W, Han Y, et al. Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing. *Sensors (Basel)* [Internet]. 2015 Jul 6 [cited 2017 Sep 10];15(7):16281–313. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26153774>
  45. Feigon J, Dieckmann T, Smith FW. Aptamer structures from A to ?? *Chem Biol*. 1996;3(8):611–7.
  46. Gatto B, Palumbo M, Sissi C. Nucleic acid aptamers based on the G-quadruplex structure: therapeutic and diagnostic potential. *Curr Med Chem* [Internet]. 2009 [cited 2017 Jan 7];16(10):1248–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19355883>
  47. Wunnicke D, Strohbach D, Weigand JE, Appel B, Feresin E, Suess B, et al. Ligand-induced conformational capture of a synthetic tetracycline riboswitch revealed by pulse EPR. *RNA* [Internet]. 2011 Jan [cited 2017 Sep 10];17(1):182–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21097555>



48. Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* [Internet]. 1994 Mar 11 [cited 2017 Sep 10];263(5152):1425–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7510417>
49. Geiger A, Burgstaller P, von der Eltz H, Roeder A, Famulok M. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1996 Mar 15 [cited 2017 Sep 10];24(6):1029–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604334>
50. SantaLucia J, Hicks D. The Thermodynamics of DNA Structural Motifs. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* [Internet]. 2004 Jun 9 [cited 2017 Sep 11];33(1):415–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15139820>
51. González VM, Martín ME, Fernández G, García-Sacristán A. Use of Aptamers as Diagnostics Tools and Antiviral Agents for Human Viruses. *Pharmaceuticals (Basel)* [Internet]. 2016 Dec 16 [cited 2017 Sep 11];9(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27999271>
52. Moreno M, González VM. Advances on aptamers targeting Plasmodium and trypanosomatids. *Curr Med Chem* [Internet]. 2011;18(32):5003–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22050748>
53. Song KM, Lee S, Ban C. Aptamers and their biological applications. *Sensors*. 2012;12(1):612–31.
54. Takahashi T, Tada K, Mihara H. RNA aptamers selected against amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) inhibit the aggregation of A $\beta$ . *Mol Biosyst* [Internet]. 2009 Sep [cited 2017 Feb 2];5(9):986. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668864>
55. Kwok CK, Merrick CJ. G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological Application. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2017 Oct [cited 2017 Sep 25];35(10):997–1013. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28755976>
56. Casos Notificado e enfermedad de Chagas por distritos, Año 2015 [Internet]. [cited 2015 Oct 4]. Available from: [http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com\\_content&view=article&id=404:casos&catid=2:vigilancia-epidemiologica&Itemid=356](http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=404:casos&catid=2:vigilancia-epidemiologica&Itemid=356)
57. Sueth-Santiago V, Decote-Ricardo D, Morrot A, Freire-de-Lima CG, Lima MEF. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. *World J Biol Chem* [Internet]. 2017 Feb 26 [cited 2017 Jun 20];8(1):57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28289519>
58. Low SY, Hill JE, Peccia J. DNA aptamers bind specifically and selectively to (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucans. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009 Jan 23 [cited 2015 Oct 15];378(4):701–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X08022791>
59. NCBI Resource Coordinators NR. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 Jan 4 [cited 2017 Jun 14];44(D1):D7-19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26615191>
60. TriTrypDB : The Kinetoplastid Genomics Resource [Internet]. [cited 2015 Oct 9]. Available from: <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>
61. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol*

- Biol [Internet]. 1990 Oct 5 [cited 2017 Jun 14];215(3):403–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231712>
62. Carmona SJ, Nielsen M, Schafer-Nielsen C, Mucci J, Althech J, Balouz V, et al. Towards High-throughput Immunomics for Infectious Diseases: Use of Next-generation Peptide Microarrays for Rapid Discovery and Mapping of Antigenic Determinants. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2015 Jul [cited 2017 Sep 21];14(7):1871–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25922409>
  63. Smircich P, Eastman G, Bispo S, Duhagon MA, Guerra-Slombo EP, Garat B, et al. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Aug 17];16:443. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4460968&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  64. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2017 Jun 17];42(W1):W252–8. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gku340>
  65. Zymo Research T. Buffer Set. :0–6.
  66. Afgan E, Baker D, van?den?Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, ?ech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 Jul 8 [cited 2017 Jun 13];44(W1):W3–10. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw343>
  67. Alam KK, Chang JL, Burke DH. FASTAptamer: A Bioinformatic Toolkit for High-throughput Sequence Analysis of Combinatorial Selections. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 2015 Mar 3 [cited 2017 Jun 13];4(3):e230. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25734917>
  68. Machanick P, Bailey TL. MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* [Internet]. 2011 Jun 15 [cited 2017 Jun 14];27(12):1696–7. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btr189>
  69. Drolet DW, Moon-McDermott L, Romig TS. An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Biotechnol* [Internet]. 1996 Aug 1 [cited 2017 Jul 13];14(8):1021–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9631044>
  70. Amato Neto V. Origin of the “Y strain” of *Trypanosoma cruzi*. *Rev do Inst Med Trop S??o Paulo* [Internet]. 2010 Jun [cited 2017 Dec 12];52(3):171. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652010000300012&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652010000300012&lng=en&tlng=en)
  71. Junqueira AC, Camargo ME, Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N, Medicina I De, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital , acute , and chronic Chagas ?™ disease . Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital , Acute , . 1996;34(9):2143–7.
  72. Marusteri M, Bacarea V. Comparing groups for statistical differences: how to choose the right statistical test? *Biochem Medica* [Internet]. 2010 [cited 2017 Sep 13];15–32. Available from: <http://www.biochemia-medica.com/content/comparing-groups-statistical-differences-how-choose->

right-statistical-test

73. Minning TA, Weatherly DB, Atwood J, Orlando R, Tarleton RL. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* [Internet]. 2009 Aug 7 [cited 2017 Sep 27];10(1):370. Available from: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-370>
74. Li Y, Shah-Simpson S, Okrah K, Belew AT, Choi J, Caradonna KL, et al. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. Clayton C, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2016 Apr 5 [cited 2017 Nov 21];12(4):e1005511. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005511>
75. Kirkwood J, Hargreaves D, O’Keefe S, Wilson J. Using isoelectric point to determine the pH for initial protein crystallization trials. *Bioinformatics* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2017 Jun 17];31(9):1444–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25573921>
76. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* [Internet]. 1982 May 5 [cited 2017 Jun 17];157(1):105–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7108955>
77. Guex N, Peitsch MC, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2017 Jun 17];30(S1):S162–73. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200900140>
78. Bienert S, Waterhouse A, de Beer T P., Tauriello G, Studer G, Bordoli L, et al. The SWISS-MODEL Repository?new features and functionality. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2017 Jan 4 [cited 2017 Jun 17];45(D1):D313–9. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw1132>
79. Bhattacharyya T, Falconar AK, Luquetti AO, Costales JA, Grijalva MJ, Lewis MD, et al. Development of peptide-based lineage-specific serology for chronic Chagas disease: geographical and clinical distribution of epitope recognition. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 May [cited 2015 Aug 23];8(5):e2892. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4031129&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
80. Rosenberg CS, Martin DL, Tarleton RL. CD8+ T Cells Specific for Immunodominant Trans-Sialidase Epitopes Contribute to Control of *Trypanosoma cruzi* Infection but Are Not Required for Resistance. *J Immunol* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2017 Jan 6];185(1):560–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530265>
81. Smircich P, Eastman G, Bispo S, Duhagon MA, Guerra-Slompo EP, Garat B, et al. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* [Internet]. 2015 Dec 9 [cited 2017 Jul 2];16(1):443. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/16/443>
82. de Godoy LMF, Marchini FK, Pavoni DP, Rampazzo R de CP, Probst CM, Goldenberg S, et al. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *Proteomics* [Internet]. 2012 Aug [cited 2017 Jun 18];12(17):2694–703. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761176>
83. Minning TA, Weatherly DB, Atwood J, Orlando R, Tarleton RL. The steady-state transcriptome

- of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. BMC Genomics [Internet]. 2009 Aug 7 [cited 2017 Sep 27];10(1):370. Available from: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-370>
84. Miller III BR, Roitberg AE. *Trypanosoma cruzi trans* -sialidase as a drug target against Chagas disease (American trypanosomiasis). Future Med Chem [Internet]. 2013 Oct [cited 2017 Jun 20];5(15):1889–900. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24144418>
  85. Musheev MU, Krylov SN. Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: addressing the polymerase chain reaction issue. Anal Chim Acta [Internet]. 2006 Mar 30 [cited 2017 Sep 24];564(1):91–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005016430>
  86. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010;11(1):31–46.
  87. Bailey TL, Elkan C. Fitting a Mixture Model by Expectation Maximization to Discover Motifs in Bipolymers. Proc Second Int Conf Intell Syst Mol Biol [Internet]. 1994;28–36. Available from: [http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.121.7056&rep=rep1&type=pdf%5Chttp://www.cs.utoronto.ca/~brudno/csc2417\\_10/10.1.1.121.7056.pdf](http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.121.7056&rep=rep1&type=pdf%5Chttp://www.cs.utoronto.ca/~brudno/csc2417_10/10.1.1.121.7056.pdf)
  88. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2017 Sep 16];31(13):3406–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824337>
  89. Interpreting results: Two-way ANOVA [Internet]. [cited 2017 Sep 16]. Available from: [https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/how\\_to\\_think\\_about\\_results\\_from\\_two-way\\_anova.htm?toc=0&printWindow](https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/how_to_think_about_results_from_two-way_anova.htm?toc=0&printWindow)
  90. Godsel LM, Tibbetts RS, Olson CL, Chaudoir BM, Engman DM. Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. J Clin Microbiol [Internet]. 1995 Aug [cited 2017 Nov 21];33(8):2082–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559952>
  91. Hoinka J, Zotenko E, Friedman A, Sauna ZE, Przytycka TM. Identification of sequence-structure RNA binding motifs for SELEX-derived aptamers. Bioinformatics [Internet]. 2012 Jun 15 [cited 2017 Sep 25];28(12):i215-23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22689764>
  92. Zhu Q, Jing N. Computational study on mechanism of G-quartet oligonucleotide T40214 selectively targeting Stat3. J Comput Aided Mol Des [Internet]. 2007 Oct 22 [cited 2017 Oct 1];21(10–11):641–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10822-007-9147-6>
  93. Mukundan VT, Do NQ, Phan AT. HIV-1 integrase inhibitor T30177 forms a stacked dimeric G-quadruplex structure containing bulges. Nucleic Acids Res [Internet]. 2011 Nov [cited 2017 Oct 1];39(20):8984–91. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkr540>
  94. Viglasky V, Hianik T. Potential uses of G-quadruplex-forming aptamers. Gen Physiol Biophys [Internet]. 2013 Jun [cited 2017 Sep 25];32(2):149–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23459572>
  95. Todd AK, Johnston M, Neidle S. Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. Nucleic Acids Res [Internet]. 2005 [cited 2017 Oct 1];33(9):2901–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15914666>

96. Sundquist WI, Klug A. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* [Internet]. 1989 Dec 14 [cited 2017 Sep 23];342(6251):825–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/342825a0>
97. Sen D, Gilbert W. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* [Internet]. 1988 Jul 28 [cited 2017 Sep 23];334(6180):364–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/334364a0>
98. Curtis EA, Liu DR. Discovery of widespread GTP-binding motifs in genomic DNA and RNA. *Chem Biol* [Internet]. 2013 Apr 18 [cited 2017 Sep 25];20(4):521–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23601641>
99. Hänsel-Hertsch R, Di Antonio M, Balasubramanian S. DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2017 Feb 22 [cited 2017 Sep 25];18(5):279–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28225080>
100. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* [Internet]. 1992 Feb 6 [cited 2017 Sep 25];355(6360):564–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1741036>
101. Yoshida W, Mochizuki E, Takase M, Hasegawa H, Morita Y, Yamazaki H, et al. Selection of DNA aptamers against insulin and construction of an aptameric enzyme subunit for insulin sensing. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2017 Sep 25];24(5):1116–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644711>
102. Stoltenburg R, Krafčiková P, Víglašký V, Strehlitz B, Gan SD, Patel KR, et al. G-quadruplex aptamer targeting Protein A and its capability to detect *Staphylococcus aureus* demonstrated by ELONA. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Sep 21 [cited 2017 Jan 7];6:33812. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep33812>
103. Travascio P, Li Y, Sen D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex. [cited 2017 Sep 25]; Available from: [http://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521\(98\)90006-0.pdf](http://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521(98)90006-0.pdf)
104. Huizenga DE, Szostak JW. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry* [Internet]. 1995 Jan 17 [cited 2017 Sep 25];34(2):656–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7819261>
105. Stoltenburg R, Schubert T, Strehlitz B, Kuryavyi V, Maguire W, Heaney M. In vitro Selection and Interaction Studies of a DNA Aptamer Targeting Protein A. Barash D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jul 29 [cited 2017 Sep 14];10(7):e0134403. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0134403>
106. Ogasawara D, Hachiya NS, Kaneko K, Sode K, Ikebukuro K. Detection system based on the conformational change in an aptamer and its application to simple bound/free separation. *Biosens Bioelectron*. 2009;24(5):1372–6.
107. Stoltenburg R, Schubert T, Strehlitz B. In vitro Selection and Interaction Studies of a DNA Aptamer Targeting Protein A. Barash D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jul 29 [cited 2017 Sep 22];10(7):e0134403. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0134403>
108. Gray DM, Wen J-D, Gray CW, Repges R, Repges C, Raabe G, et al. Measured and calculated CD

- spectra of G-quartets stacked with the same or opposite polarities. *Chirality* [Internet]. 2008 Mar [cited 2017 Sep 25];20(3–4):431–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17853398>
109. Cocco MJ, Hanakahi LA, Huber MD, Maizels N. Specific interactions of distamycin with G-quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2017 Sep 25];31(11):2944–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771220>
  110. Lin P-H, Yen S-L, Lin M-S, Chang Y, Louis SR, Higuchi A, et al. Microcalorimetrics Studies of the Thermodynamics and Binding Mechanism between l -Tyrosinamide and Aptamer. *J Phys Chem B* [Internet]. 2008 May 29 [cited 2017 Sep 28];112(21):6665–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18457441>
  111. Tucker A, Tucker W, Shum K, Tanner J. G-quadruplex DNA aptamers and their ligands: Structure, function and application G-quadruplex DNA Aptamers and their Ligands: Structure, Function and Applica- tion. *Cit Curr Pharm Des Curr Pharm Des*. 2012;18(18):2014–26.
  112. de Araujo FF, Nagarkatti R, Gupta C, Marino AP, Debrabant A. Aptamer-Based Detection of Disease Biomarkers in Mouse Models for Chagas Drug Discovery. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015;9(1):e3451. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003451>
  113. Nagarkatti R, de Araujo FF, Gupta C, Debrabant A. Aptamer Based, Non-PCR, Non-Serological Detection of Chagas Disease Biomarkers in Trypanosoma cruzi Infected Mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):25.
  114. Nagarkatti R, Bist V, Sun S, Fortes de Araujo F, Nakhasi HL, Debrabant A. Development of an aptamer-based concentration method for the detection of trypanosoma cruzi in blood. *PLoS One*. 2012;7(8).
  115. Ferreira CSM, Matthews CS, Missailidis S. DNA Aptamers That Bind to MUC1 Tumour Marker: Design and Characterization of MUC1-Binding Single-Stranded DNA Aptamers. *Tumor Biol* [Internet]. 2006 [cited 2017 Sep 10];27(6):289–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17033199>
  116. Graham JC, Zarbl H. Use of cell-SELEX to generate DNA aptamers as molecular probes of HPV-associated cervical cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(4):1–9.
  117. Zimbres FM, Tárnok A, Ulrich H, Wrenger C. Aptamers: novel molecules as diagnostic markers in bacterial and viral infections? *Biomed Res Int* [Internet]. 2013 [cited 2017 Jul 22];2013:731516. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083239>
  118. Penner G. Commercialization of an aptamer-based diagnostic test. *IVD Technol* [Internet]. 2012;1–7. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Commercialization+of+an+apta mer-based+diagnostic+test#0>
  119. Lakhin A V, Tarantul VZ, Gening L V. Aptamers: problems, solutions and prospects. *Acta Naturae* [Internet]. 2013 Oct [cited 2017 Aug 2];5(4):34–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24455181>
  120. Carothers JM, Goler JA, Kapoor Y, Lara L, Keasling JD. Selecting RNA aptamers for synthetic biology: investigating magnesium dependence and predicting binding affinity. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2010 May [cited 2017 Dec 13];38(8):2736–47. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159999>

121. Duarte LF, Flórez O, Rincón G, González CI. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. *Colomb médica (Cali, Colomb [Internet]*. Jan [cited 2015 Aug 18];45(2):61–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4123583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
122. Balouz V, Agüero F, Buscaglia CA. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. *Adv Parasitol [Internet]*. 2017 [cited 2017 Sep 21];97:1–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28325368>
123. Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Sánchez G, Valencia Ayala E, et al. Use of a novel chagas urine nanoparticle test (chunap) for diagnosis of congenital chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis [Internet]*. 2014 Oct [cited 2015 Aug 19];8(10):e3211. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4183489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
124. Queiroz RML, Charneau S, Bastos IMD, Santana JM, Sousa M V, Roepstorff P, et al. Cell surface proteome analysis of human-hosted *Trypanosoma cruzi* life stages. *J Proteome Res [Internet]*. 2014 Aug 1 [cited 2015 May 3];13(8):3530–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/pr401120y>
125. Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MFAD, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop [Internet]*. 2013 Jan [cited 2015 Aug 17];125(1):23–31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X12003063>
126. Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol [Internet]*. 2012 Feb [cited 2017 Sep 21];181(2):61–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019385>
127. Xu W, Ellington AD. Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 1996;93(15):7475–80. Available from: <http://www.pnas.org/content/93/15/7475.short>

## Anexo I

### Análisis según abundancia y enriquecimiento

La identificación de candidatos se realizó analizando las secuencias más abundantes y enriquecidas a través de la comparación entre bibliotecas en el programa Fastapmer (67).

- Unitarget

Se identificaron las 5 secuencias con mayor número de lecturas normalizadas (RPM) tanto en el archivo F como en el R en la biblioteca final del SELEX (S13). Se halló que las 5 primeras secuencias en F correspondían a la secuencia 2 al 6 en el R, hallándose una secuencia adicional en Rank 1 R (Tabla 7).

Además, se analizó el enriquecimiento comparando las tres bibliotecas secuenciadas. Se comparó a través de fastaptamer\_enrich las bibliotecas 5 (X), 10 (Y) y 13 (Z), generando tres columnas que permitieron visualizar cómo fueron aumentando ciertas secuencias a lo largo de los ciclos de SELEX. Se observó que en F existen dos secuencias enriquecidas, Tc1enrich1F y Tc1enrich2F, las cuales se ven principalmente enriquecidas entre el ciclo 5 y 10, pero solo Tc1enrich1F tuvo un alto ratio de enriquecimiento 13/5 (56.44). Por otro lado, el análisis de R mostró más secuencias enriquecidas, el TC1enrich1F correspondió a TC1enrich2R con un ratio similar (55.3) y el TC1enrich1R correspondió a la misma secuencia de TC1rank1R con un ratio de enriquecimiento 13/5 de 1083.4.

El análisis arriba descrito permitió identificar como potenciales aptámeros a las secuencias Rank1 y Enrich1, seleccionándose las siguientes secuencias:

- TC1rank1R, cuya secuencia coincidió con Tc1enrich1R
- TC1rank1F
- TC1enrich1F



<b>Rank</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Enrich (10/5)</b>	<b>Enrich (13/10)</b>	<b>Enrich (13/5)</b>
1	TC1rank1F	TC1rank1R	23.43	2.41	56.44
2	TC1rank2F	TC1rank2R	7.53	0.91	6.84
3	TC1rank3F	TC1rank3R	316.30	3.43	1083.40
4	TC1rank4F	TC1rank4R	22.87	2.42	55.30
5	TC1rank5F	TC1rank5R	22.87	1.52	34.77
			7.53	0.87	6.56

**Tabla S1.- Secuencias candidatas seleccionadas a través de abundancia y enriquecimiento en SELEX Unitarget.** En la tabla izquierda se observan las 5 secuencias más abundantes en la secuenciación Forward y Reverse de la biblioteca final s13. En la tabla derecha se observan las secuencias enriquecidas del ciclo 5 al 10, 10 al 13 y del 5 al 13 en el SELEX Unitarget.

- Multitarget

En el caso de TC1, el análisis de abundancia mostró que las 5 primeras secuencias en los archivos F y R eran las mismas y se encontraban en el mismo orden (**Tabla 8**). El análisis de enriquecimiento se realizó comparando S5 (X), S9 (Y) y el S13 (Z) y se hallaron aquellas secuencias más enriquecidas. La comparación Z/Y (13/9), indicó que la secuencia Tc1peprank1 correspondía a la secuencia más enriquecida en F y R. El análisis Z/X (13/5) indicó que la secuencia Tc1peprank5 correspondía a la secuencia más enriquecida en R. Según esto se seleccionó a TC1peprank1 y a TC1peprank5 como potenciales candidatos a aptámeros.

<b>Rank Forward/Reverse</b>			<b>Enrich (10/5)</b>	<b>Enrich (13/10)</b>	<b>Enrich (13/5)</b>
		tc1pepenrich1ZYF	-	2453.40	-
1	TC1pepRank1	tc1pepenrich2ZYF	-	1063.27	-
2	TC1pepRank2	tc1pepenrich1ZYR	-	1152.39	-
3	TC1pepRank3	tc1pepenrich2ZYR	-	851.77	-
4	TC1pepRank4	tc1pepenrich1ZXF	-	-	255.08
5	TC1pepRank5	tc1pepenrich1ZXR	0.50	703.72	349.66

**Tabla S2.- Secuencias candidatas seleccionadas en SELEX Multitarget para péptido TC1.** La tabla de la izquierda corresponde a las 5 secuencias más abundantes en la secuenciación Forward y Reverse, y la tabla de la derecha a secuencias enriquecidas, donde x: 5, y: 10, z: 13.

En el caso de TC2, el análisis de abundancia mostró que las 5 primeras secuencias en F y R eran las mismas, pero con un orden diferente (**Tabla 9**). El análisis de enriquecimiento mostró que las secuencias más enriquecidas entre Z/Y (13/9) correspondían a secuencias TC2peprank1 y TC2peprank2 de F y R. La comparación Z/X (13/5) mostró que la secuencia más enriquecida en F también se encontraba en R como TC2pepenrich2ZXR. Según esto se seleccionó a TC2peprank1, TC2peprank2 y a TC2pepenrich1ZXF.

<b>Rank</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>		<b>Enrich (10/5)</b>	<b>Enrich (13/10)</b>	<b>Enrich (13/5)</b>
			tc2pepenrich1ZYF	-	48.06	-
1	TC2peprankF1	TC2peprankR1	tc2pepenrich2ZYF	-	39.05	-
2	TC2peprankF2	TC2peprankR2	tc2pepenrich1ZYR	-	40.55	-
			tc2pepenrich2ZYR	-	20.27	-
3	TC2peprankF3	TC2peprankR3	tc2pepenrich1ZXF	-	-	5.22
4	TC2peprankF4	TC2peprankR4	tc2pepenrich2ZXF	1.99	2.25	4.48
			tc2pepenrich1ZXR	0.50	13.52	6.72
5	TC2peprankF5	TC2peprankR5	tc2pepenrich2ZXR	-	-	6.72

**Tabla S3.- Secuencias candidatas seleccionadas en SELEX Multitarget para péptido TC2.** La tabla de la izquierda corresponde a las 5 secuencias más abundantes en la secuenciación Forward y Reverse, y la tabla de la derecha a secuencias enriquecidas, donde x: 5, y: 10, z: 13.

En el caso de E27, el análisis de abundancia mostró que las 3 primeras secuencias en F y R eran las mismas y poseían el mismo orden. Mientras que las secuencias Rank 4 y Rank 5 se encontraban invertidas en posición entre F y R (Tabla 10). El análisis de enriquecimiento mostró ratios muy bajos, se observó que la secuencia E27pepRankF3/E27pepRankR3 se encontraba dentro de las secuencias más enriquecidas correspondiente al análisis Z/Y. Según esto se seleccionó a E27peprank1, E27peprank2 y E27peprank3.

<b>Rank</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>		<b>Enrich (10/5)</b>	<b>Enrich (13/10)</b>	<b>Enrich (13/5)</b>
1	E27pepRankF1	E27pepRankR1	E27pepenrich1ZYF	-	13.31	-
			E27pepenrich2ZYF	-	7.99	-
2	E27pepRankF2	E27pepRankR2	E27pepenrich1ZYR	-	7.99	-
			E27pepenrich2ZYR	-	6.65	-
3	E27pepRankF3	E27pepRankR3	E27pepenrich1ZXF	-	-	3.97
			E27pepenrich2ZXF	0.50	6.65	3.31
4	E27pepRankF4	E27pepRankR4	E27pepenrich1ZXR	1.99	2.00	3.97
			E27pepenrich2ZXR	-	-	3.97

**Tabla S4.- Secuencias candidatas seleccionadas en SELEX Multitarget para péptido E27.**

La tabla de la izquierda corresponde a las 5 secuencias más abundantes en la secuenciación Forward y Reverse, y la tabla de la derecha corresponde a secuencias enriquecidas, donde x: 5, y: 10, z: 13.