



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

“SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
APTÁMEROS DE ADN CAPACES DE  
RECONOCER PÉPTIDOS DERIVADOS  
DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE  
*LEISHMANIA BRAZILIENSIS*”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

ALEXANDRA VICTORIA POMA ESPINOZA

LIMA – PERÚ

2023



**ASESORES**

Jorge Arévalo Zelada, Dr.Sc.

Vanessa Adui Sichei, Ph.D.

**JURADO DE TESIS**

DRA. MONICA JEHNKY PAJUELO TRAVEZAÑO

PRESIDENTE

DR. MIRKO JUAN ZIMIC PERALTA

VOCAL

DR. LUIS JULIO CESAR DE STEFANO BELTRAN

SECRETARIO

## **DEDICATORIA.**

*A Emiliana Lévano Uchuya por enseñarme sobre el fruto del arduo trabajo y confiar en mí hasta el final. A Jesús Poma Claros, por su amor incondicional y su sabiduría infinita que trascienden más allá de todo.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la doctora Vanessa Adai, por su dedicación y tiempo invertido para lograr culminar exitosamente este proyecto. Su guía, apoyo y motivación fueron claves para mi desarrollo en esta área de investigación. A Katherin Peñaranda por su paciencia infinita, por confiar en mis habilidades y ayudarme a resolver todo tipo de dudas sobre la metodología realizada. Al doctor Pohl Milón por aceptarme con los brazos abiertos en su laboratorio, por enseñarme con paciencia a aprender de mis errores. Al doctor Jorge Arévalo por su apoyo y orientación en el desarrollo del proyecto. A Luis Cabrera y Jose Alberto Nakamoto por la excelente selección bioinformática de los péptidos diana para la captura de *Leishmania braziliensis*. Al Dr. Mirko Zimic, la Dra. Patricia Sheen, Stefany Quiñones y Edith Málaga por su apoyo incondicional en la facilitación de materiales y consejos en los momentos más necesitados. A todos los integrantes del Laboratorio de Biomoléculas del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), por crear un gran ambiente de trabajo, por su compañerismo y momentos compartidos. A mi mamá, por mostrarme siempre la luz en mis días tristes con su alegría contagiosa. A mis hermanos por su cariño y admiración que me motiva día a día a ser mejor persona. A mi papá por todo el esfuerzo que dedicó en hacerme el camino de la vida menos arduo. Y finalmente a mi mejor amiga Karen, que supo acompañarme y apoyarme siempre que lo necesité.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO.**

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto de investigación: Desarrollo de una plataforma biosensora basada en CRISPR para la detección rápida y ultrasensible de microorganismos patógenos de importancia médica: leishmaniosis como “prueba de concepto”, financiado por ProCiencia, CONCYTEC-Banco Mundial mediante convenio de subvención N° 036-2019-FONDECYT-BM-INC.INV.

# SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE APTÁMEROS DE ADN CAPACES DE RECONOCER PÉPTIDOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS

## INFORME DE ORIGINALIDAD



## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://journals.plos.org">journals.plos.org</a> Fuente de Internet	1%
2	<a href="http://www.mdpi.com">www.mdpi.com</a> Fuente de Internet	<1%
3	<a href="http://www.thno.org">www.thno.org</a> Fuente de Internet	<1%
4	<a href="http://researchexperts.utmb.edu">researchexperts.utmb.edu</a> Fuente de Internet	<1%
5	<a href="http://repositorio.unb.br">repositorio.unb.br</a> Fuente de Internet	<1%
6	<a href="http://mts.intechopen.com">mts.intechopen.com</a> Fuente de Internet	<1%
7	Pooja Kumari, Abhijeet Dhiman, Surabhi Lavania, Pratibha Sharma et al. "Assessment of DNA aptamers targeting GlcB and HspX antigens for application in the diagnosis of abdominal tuberculosis", Tuberculosis, 2022	<1%

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCION	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	3
III. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Epidemiología de Leishmaniasis y Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA)	5
3.2 Inmunopatogénesis de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana	7
3.3 Diagnóstico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana	12
IV. OBJETIVOS	21
IV.1. Objetivo general	21
4.2. Objetivos específicos	21
V. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Diseño de estudio	22
5.2. Procedimientos y técnicas	22
5.4 Consideraciones éticas	35
5.5 Plan de análisis	35
VI. RESULTADOS	37
VI.1 Identificación de potenciales biomarcadores peptídicos	37
VI.2 Amplificación de secuencias seleccionadas mediante X-Aptamers	40
3.4 Análisis bioinformático para la selección de las mejores secuencias candidatas a aptámeros	43
6.4 Optimización de ELONA para péptidos y validación de unión entre dianas peptídicas y aptámeros	46
VII. DISCUSIÓN	53
VIII. CONCLUSIONES	64
IX. LIMITACIONES	65
X. RECOMENDACIONES	66
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	

## RESUMEN

La Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA) es una enfermedad parasitaria endémica de zonas tropicales que afecta a la piel y las mucosas, siendo Perú uno de los países que registra el mayor número de casos en América Latina. El protozooario *Leishmania braziliensis* es el principal agente etiológico de LTA. La detección es clave en el control de la enfermedad. Se reporta que el número de parásitos de *Leishmania* presentes en las lesiones es generalmente bajo, lo que reduce significativamente la sensibilidad de las pruebas de diagnóstico directas que consisten en la visualización del agente infeccioso mediante el microscopio. Asimismo, las herramientas de diagnóstico molecular de Leishmaniasis requieren una gran infraestructura, equipos y capacitación avanzada de personal. Por ende, el diagnóstico de laboratorio de Leishmaniasis sigue siendo un reto en las zonas endémicas rurales de mayor prevalencia de la enfermedad debido a que no cuentan con recursos e infraestructura necesarios.

Este trabajo de investigación propone la selección e identificación de aptámeros de ADN capaces de reconocer con alta afinidad y de forma específica péptidos de proteínas de membrana de *L. braziliensis*. Primero, se identificaron péptidos de membrana presentes en estadios de promastigote y amastigote de *Leishmania* spp. mediante el análisis de datos reportados en la literatura y herramientas bioinformáticas. Los péptidos diana fueron empleados en la selección *in vitro* de aptámeros mediante el método SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) usando el kit X-Aptamers. Posteriormente, se identificaron los aptámeros candidatos mediante secuenciación y análisis bioinformático. Finalmente, se realizaron ensayos ELONA (ensayo de

oligonucleótidos ligados a enzimas) para determinar la caracterización *in vitro* de los aptámeros candidatos. Se observó que las cinco secuencias seleccionadas como aptámeros candidatos presentaron afinidad *in vitro* para sus respectivas dianas (péptido 2 y péptido 3). Mediante la razón entre ensayos con el péptido diana (*cognate*) y un péptido no-diana (*non-cognate*), se determinó el mejor candidato por la especificidad y alta afinidad por su péptido diana. Se demostró que el sistema X-Aptamers permite la adecuada selección de aptámeros usando péptidos diana con un gran porcentaje de éxito, ya que todas las secuencias seleccionadas mostraron afinidad por las dianas. Del mismo modo, se concluye que la técnica ELONA permite una caracterización primaria de aptámeros. Estos resultados representan el primer paso hacia el desarrollo de un sistema de captura *in vitro* que permita el enriquecimiento celular de *L. braziliensis* en muestras biológicas o su detección mediante biosensores.

## **PALABRAS CLAVES**

**APTÁMEROS, *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*, PÉPTIDOS, SELEX, ELONA**

## ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a parasitic disease endemic to tropical areas that affects the skin and mucous membranes, with Peru being one of the countries with the highest number of cases in Latin America. The protozoan *Leishmania braziliensis* is the main etiological agent of LTA. Detection is key in disease control. It is reported that the number of *Leishmania* parasites present in the lesions is generally low, which significantly reduces the sensitivity of direct diagnostic tests that consist of visualizing the infectious agent under the microscope. Likewise, molecular diagnostic tools for Leishmaniasis require a large infrastructure, equipment and advanced training of personnel. Finally, the laboratory diagnosis of Leishmaniasis continues to be a challenge in rural endemic areas with the highest prevalence of the disease because they do not have the necessary resources and infrastructure.

This research work proposes the selection and identification of DNA aptamers capable of recognizing with high affinity and specifically peptides of membrane proteins of *L. braziliensis*. First, membrane peptides present in the promastigote and amastigote stages of *Leishmania* spp. through the analysis of data reported in the literature and bioinformatic tools. The target peptides were used in the *in vitro* selection of aptamers by the SELEX method (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) using the X-Aptamers kit. Subsequently, suitable candidates were identified by sequencing and bioinformatic analysis. Finally, ELONA (enzyme-linked oligonucleotide assay) assays were performed to determine the *in vitro* characterization of the candidate aptamers. The fact that the five sequences selected as candidate aptamers showed *in vitro* affinity for their

respective targets (peptide 2 and peptide 3) were ruled out. By means of the ratio between assays with the target peptide (cognate) and a non-target peptide (non-cognate), the best candidate for specificity and high affinity for its target peptide is bloomed. It is broken that the X-Aptamers system allows the adequate selection of aptamers using target peptides with a high percentage of success, since all the selected sequences showed affinity for the targets. Similarly, it is concluded that the ELONA technique allows a primary characterization of aptamers. These results represent the first step towards the development of an *in vitro* capture system that allows the cellular enrichment of *L. braziliensis* in biological samples or its detection by biosensors.

#### **KEY WORDS**

APTAMERS, *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*, PEPTIDES, SELEX, ELONA

## I. INTRODUCCION

La Leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) es una enfermedad que afecta a la piel y las mucosas. Esta es causada por diversas especies del género *Leishmania* (Protozoa, Trypanosomatida, Trypanosomatidae) y transmitida a través de la picadura de moscas del género *Lutzomyia*. La LTA pertenece al grupo de las enfermedades desatendidas a nivel mundial, relacionada con la pobreza, tiene un impacto significativo en la salud pública, siendo Perú uno de los países que registra el mayor número de casos (tasa de incidencia promedio de 15,23 / 100.000 habitantes en los últimos seis años (1). La LTA es causada por varias especies de protozoarios del género *Leishmania*, siendo *L. braziliensis* el principal agente causal en América Latina (2). El diagnóstico requiere una combinación de pruebas de laboratorio, principalmente parasitológicas y moleculares. La sensibilidad de la detección es influenciada por el número de parásitos de *Leishmania* presentes en las lesiones, generalmente bajo (3). Por tanto, se espera que el desarrollo de herramientas de enriquecimiento celular del parásito para su uso durante el procesamiento de muestras clínicas (muestras tomadas de lesiones de pacientes afectados por Leishmaniasis cutánea o mucosa) para fines de diagnóstico mejore la sensibilidad de las pruebas de diagnóstico. Previamente, se ha reportado el uso de aptámeros para la detección de agentes patógenos. Estos son secuencias cortas, monocatenarias, del tipo ADN o ARN capaces de unirse específicamente a una diana con alta afinidad, de producción sencilla y bajo costo (4). El objetivo de este estudio fue la selección e identificación de aptámeros de ADN capaces de reconocer con alta afinidad y de forma específica péptidos de proteínas de membrana de *L. braziliensis*. Para ello, se utilizó el kit X-Aptamers como alternativa al SELEX

convencional, la tecnología de secuenciación de próxima generación, herramientas bioinformáticas y finalmente la caracterización mediante 'peptide-ELONA' para la selección de los mejores aptámeros. Con los resultados obtenidos se propone la biofuncionalización de los aptámeros obtenidos hacia el desarrollo de un sistema de captura *in vitro* o un biosensor para la detección de *Leishmania* spp.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La Leishmaniasis es considerada como una de las enfermedades tropicales más desatendidas a nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (5, 6). Una forma específica de Leishmaniasis conocida como Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA) incluye diversas manifestaciones de lesiones que afectan la piel y mucosas. La LTA es endémica principalmente en zonas rurales, está asociada a la pobreza y tiene un impacto significativo en la salud pública en Latinoamérica y el Caribe. Perú es uno de los países que registra una de las mayores tasas de incidencia de LTA en Latinoamérica (promedio de 15,4 / 100.000 habitantes en los últimos seis años) (1). En ausencia de una vacuna para Leishmaniasis humana, las principales medidas necesarias para el manejo clínico y control de la enfermedad son el diagnóstico temprano y la quimioterapia. Sin embargo, se observa una limitada sensibilidad de detección del agente patógeno por las pruebas parasitológicas convencionales (microscopía y cultivo), debido a la escasa o nula presencia del parásito en las lesiones, particularmente en lesiones de mayor tiempo de evolución o crónicas (7). De otro lado, las técnicas moleculares permiten detectar e identificar la especie de parásito causal con alta sensibilidad y especificidad, pero estas técnicas no son aplicables en áreas endémicas rurales de bajos recursos debido a la necesidad de infraestructura y personal entrenado. Por tanto, se requieren métodos de detección eficientes, asequibles y adaptables a laboratorios de infraestructura pobre, presentes en las regiones rurales, siendo estas las que presentan una mayor prevalencia de la enfermedad. Identificar aptámeros con capacidad de reconocimiento altamente específica y sensible de péptidos derivados de proteínas de membrana de *Leishmania braziliensis* permitirá el futuro

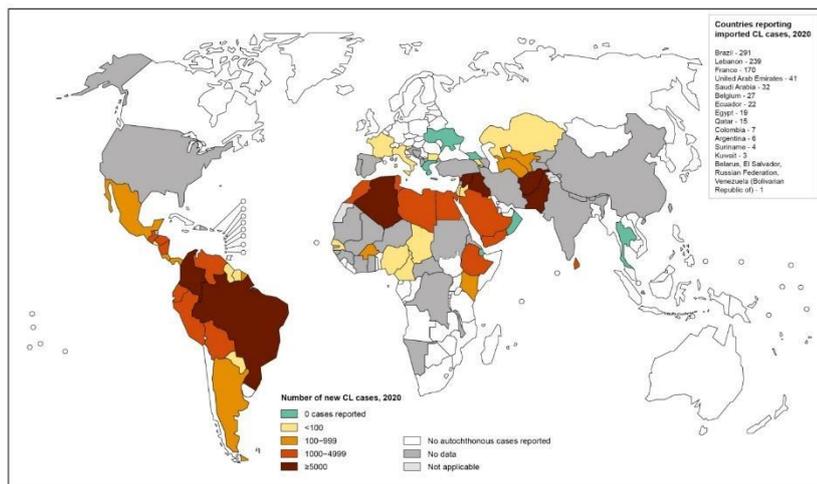
desarrollo de herramientas de enriquecimiento celular y detección, de bajo costo y aplicables en laboratorios de limitada infraestructura, para el agente patógeno causante de Leishmaniasis. De esta manera, la generación de aptámeros en este estudio, para ser empleados a futuro como moléculas de alta afinidad para la captura de células del parásito en muestras biológicas, brinda la posibilidad de incrementar la sensibilidad y especificidad de las herramientas diagnósticas de la enfermedad.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Epidemiología de Leishmaniasis y Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA)

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos intracelulares del género *Leishmania*. Es endémica en más de 98 países en Asia, África, América y Europa y según la OMS es una de las 10 enfermedades tropicales más importantes y desatendidas (NTD, *neglected tropical diseases*) (6). La prevalencia mundial a la actualidad se estima entre 12 y 15 millones de casos, con una incidencia anual de 1,5 a 2 millones de casos y valores de 70,000 muertes al año (8). La Leishmaniasis cutánea es la forma clínica más común (Figura 1) entre las manifestaciones clínicas de Leishmaniasis. Actualmente, se describe la falta de datos sobre la incidencia, la duración y el impacto de los síndromes asociados. Además, se reporta que la carga de morbilidad ampliamente citada para la Leishmaniasis es inexacta y desactualizada (9).

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2020



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2021. All rights reserved.

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (CNTD)  
World Health Organization



**Figura 1:** Distribución mundial de la incidencia de Leishmaniasis cutánea, año 2020. Fuente: OMS (5).

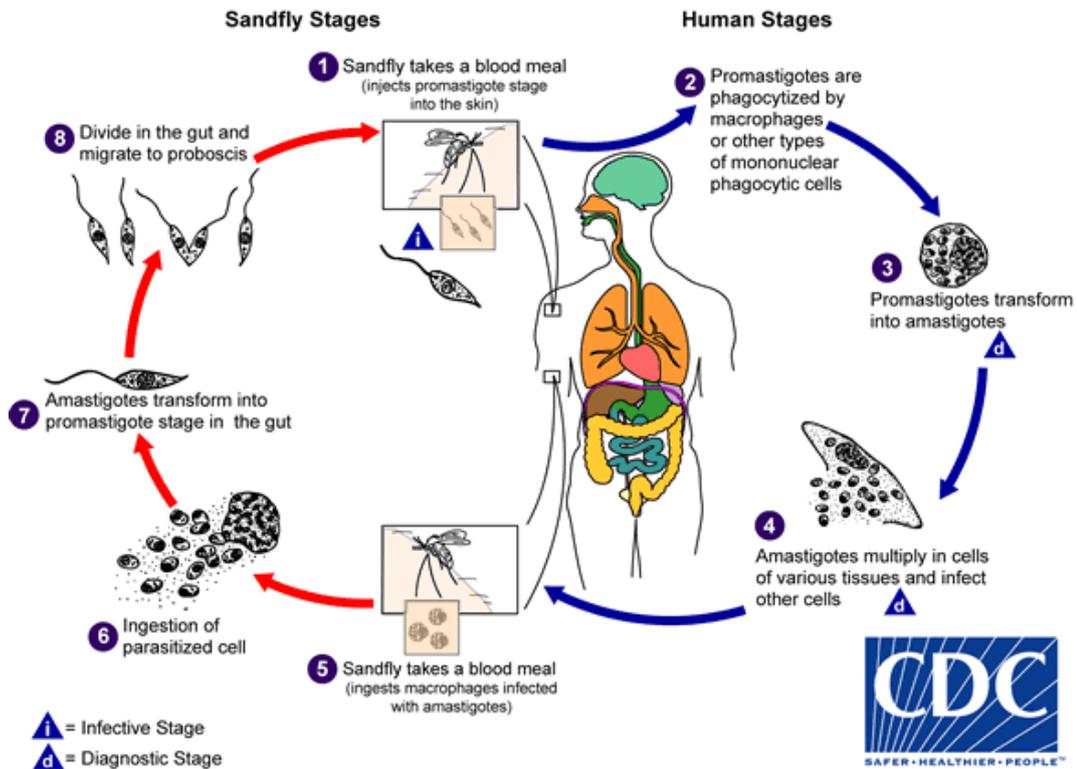
Asimismo, se ha demostrado que la pobreza es el mayor factor determinante de Leishmaniasis (10). Se han reportado ingresos per cápita extremadamente bajos en los pacientes diagnosticados con Leishmaniasis en: India, Nepal, Bangladesh y Brasil (11). La malnutrición y otras enfermedades infecciosas relacionadas con la pobreza aumentan el riesgo de que las infecciones por *Leishmania* progresen; vinculado a esto, la falta de acceso a servicios de salud ocasiona retraso en el diagnóstico y tratamiento acentuando la morbilidad y mortalidad de Leishmaniasis (12). Por otro lado, análisis previos de costo-beneficio de enfermedades han mostrado que la reducción de la Leishmaniasis podría contribuir a la reducción de la pobreza, la mejora del bienestar económico de la comunidad local y la mejora de los años de vida limitados por discapacidad (10). Esto se ve reflejado en la alta prevalencia e incidencia de la enfermedad en países en vías de desarrollo de América Latina. En ese contexto, las Américas presentan aproximadamente 56,000 casos nuevos de Leishmaniasis cutánea (LC) y Leishmaniasis mucosa (LM), y 3,800 casos de Leishmaniasis visceral (LV) cada año con una letalidad del 7%. La LTA comprende a las formas clínicas cutánea, mucosa y mucocutánea (esta última cuando las lesiones cutáneas y mucosas se presentan simultáneamente en un paciente). Se estima una incidencia de 700,000 a 1.2 millones de casos nuevos cada año (6). Esta se ha reportado en 20 países y es endémica en 18 (Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana Francesa, Guyana, Honduras, Nicaragua, México, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam, y

Venezuela). En Perú, la LTA es considerada uno de los principales problemas de salud pública por afectar predominantemente a la población más pobre, su amplia distribución geográfica y la dificultad para controlar la transmisión al tratarse de una zoonosis que se transmite mediante moscas vectores (2, 13). Entre el 2000 y el 2018, el Ministerio de Salud (MINSA) reportó 135 233 casos confirmados, con una incidencia de 7117 casos anuales, de los cuales el 94% (6685 casos) fueron de la forma cutánea y el 6% (432) fueron de las formas mucosa y mucocutánea. Cabe destacar que, en 2018, las regiones de Madre de Dios y Cusco representaban el 25% del total de los casos reportados (1, 14). De la misma manera, entre el 2000-2017 en un pueblo de Huánuco, Ambo, se registraron 1,312 casos de Leishmaniasis tegumentaria, de los cuales 1.092 casos (83,2%) presentaban la forma cutánea y 220 casos (16,7%) la forma mucocutánea.

### **3.2 Inmunopatogénesis de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana**

La LTA se puede manifestar de 1 a 3 meses (incluso años) después de la infección por distintas especies del género *Leishmania* (13). Este género incluye a protozoarios flagelados intracelulares obligados, pertenecientes al orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae. La LTA se presenta clínicamente como lesiones ulcerosas no cicatrizantes en la piel y mucosa. Sin embargo, estas lesiones pueden evolucionar a lesiones crónicas y desfigurativas que afectan la mucosa oral, faríngea, laríngea y el área otorrinolaringológica. Los síntomas reportados son dolor moderado, odinofagia, caquexia y disfagia, según la gravedad de la enfermedad; y en casos extremos puede resultar fatal (15). El protozoario *Leishmania* presenta dos tipos de morfología celular: promastigote (que reside en el insecto vector) y

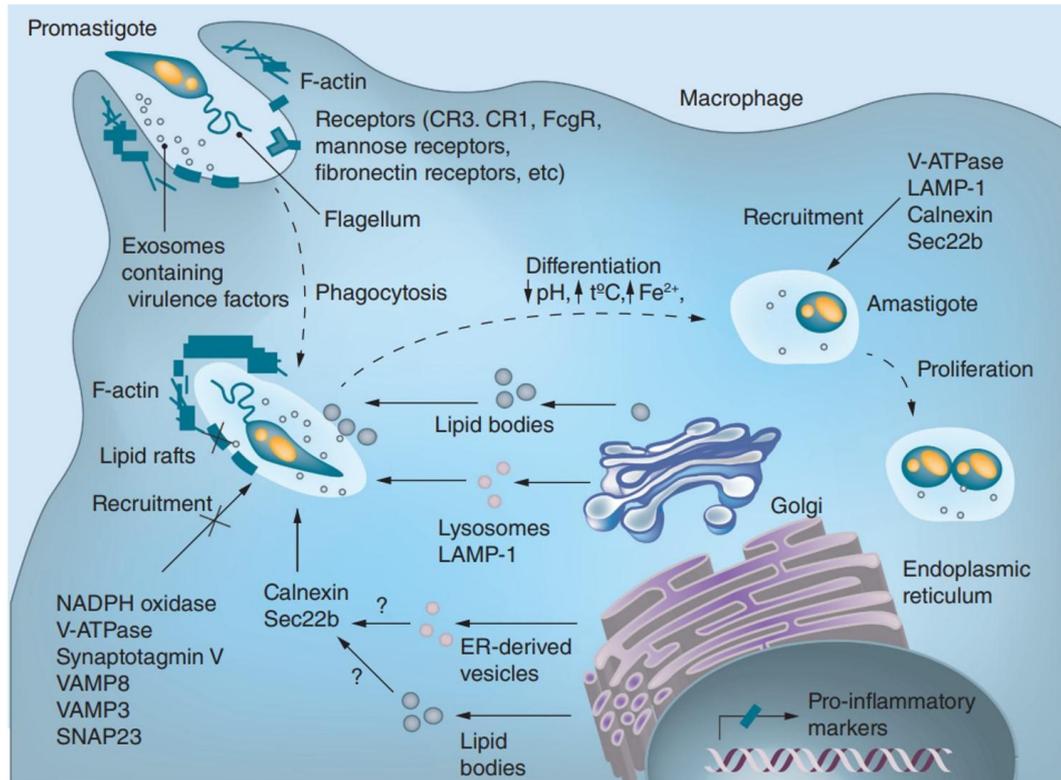
amastigote intracelular (en el hospedero mamífero). Posee aparato de Golgi, mitocondria, kinetoplasto entre el cuerpo basal y el núcleo; el ADN mitocondrial se conecta directamente al cuerpo basal desde donde se extiende el flagelo. Este último posee una invaginación que constituye la bolsa flagelar (única región de endocitosis y exocitosis) (16). La transmisión del parásito inicia con la picadura de la mosca hembra del género *Lutzomyia*; este contiene promastigotes altamente infecciosos en el intestino medio embebidos en proteofosfoglicanos que propician la regurgitación de la mosca inmediatamente después de picar al hospedero (Figura 2). El inóculo contiene adicionalmente el péptido maxadilán perteneciente a la saliva del insecto vector, que funciona como un vasodilatador a través del receptor de tipo I para el péptido activador de monofosfato de adenosina cíclico (AMP) pituitario. Se estima que, por cada picadura, el vector transmite aproximadamente 1000 promastigotes (17).



**Figura 2:** Ciclo biológico de *Leishmania* spp. en insectos flebótomos y en el hospedero humano. Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

Al ingresar, los promastigotes interactúan con queratinocitos, células de Langerhans, neutrófilos y macrófagos de la dermis. Inicialmente sobreviven dentro de los neutrófilos como promastigotes, hasta la apoptosis de los mismos. Esta infección es transitoria, luego, infectan a los macrófagos que son importantes células hospederas para el establecimiento y proliferación del parásito. La primera interacción del macrófago y el promastigote se da mediante el flagelo y diferentes tipos de receptores de membrana del macrófago, desencadenando la activación de factores de supervivencia intracelulares en el parásito y, como consecuencia, la modulación de la actividad fagocítica del macrófago; según el receptor con el que

interactúe se desenvolverá de manera diferente la respuesta inmune (18). Una vez dentro del macrófago, el promastigote recluta una vacuola parasitófora que interactúa con endosomas y lisosomas, formando el fagolisoma. Dentro de este, la disminución del pH, el aumento de la temperatura y la producción de peróxido de hidrógeno a partir de ROS (por sus siglas en inglés, especies reactivas de oxígeno) promueven la transformación del promastigote a amastigote (Figura 3). Para evadir las defensas del hospedero, *Leishmania* usa diferentes mecanismos. Con el fin de frenar la inflamación, *Leishmania* spp. manipula citoquinas para estimular la activación alternativa del macrófago, lo que favorece la supervivencia del parásito dentro de éste. Asimismo, regula negativamente el receptor de IFN- $\gamma$  e induce la expresión del supresor de citoquinas SOCS3. De la misma manera, para evitar el estrés oxidativo, *Leishmania* spp. evita el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa y degrada el hierro. Finalmente, promueve la autofagia para infectar a más macrófagos y diseminar la infección, contribuyendo a la gravedad de la enfermedad y el aumento del tamaño de las lesiones (19).



**Figura 3:** Interacción de *Leishmania* spp. con el macrófago. Fuente: Podinovskaia, M., & Descoteaux, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiology*. (2015)

Frente a la infección por *Leishmania*, la respuesta inmune celular es considerada la principal defensa del hospedero mamífero (20). Se ha propuesto que la activación de los macrófagos a través de células T es el mayor mecanismo protector contra la infección por *Leishmania*. Las células T secretan IFN- $\gamma$  y junto con IL-2, TNF- $\alpha$  y GM-CSF se activan los macrófagos para eliminar a los amastigotes. Otro factor protector del hospedero frente a la infección es la activación y diferenciación de células efectoras T CD4<sup>+</sup> hacia un tipo de respuesta Th1, que promueve la secreción de IL-2, IFN- $\gamma$  y linfotóxina. Se ha demostrado la existencia de una correlación entre susceptibilidad a la infección y la activación de una respuesta Th2 (20). Sin

embargo, esta correlación no determina totalmente la respuesta inmune, es necesario incluir otras moléculas efectoras debido a que es un proceso complejo (21). Otras enfermedades coexistentes y coinfecciones (22), malnutrición, edad y deficiencia inmunológica o estado de inmunosupresión influyen mucho en el desarrollo y progresión de Leishmaniasis, por eso es importante tener en cuenta la condición del paciente.

### **3.3 Diagnóstico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana**

El diagnóstico de LTA consiste principalmente en la demostración de la presencia del agente etiológico en la lesión del paciente. Existe una gran variedad de pruebas: directas, como la observación al microscopio del frotis de la lesión teñida con Giemsa, histopatología, cultivo de parásitos y técnicas moleculares; e indirectas, como la detección de anticuerpos producidos por el paciente (23). Debido a la limitada cantidad de parásitos recuperables de las lesiones, se describen valores de sensibilidad para la detección directa (microscopía) mediante la identificación de amastigotes en tejido de lesiones que fluctúan entre el 50-70% en Europa y Asia, y del 15-30% para América Latina. Estos rangos aumentan a 44-58% cuando se cultivan las muestras, y a 38-52% cuando se inyecta el aspirado de las lesiones en modelos *in vivo* (7). Las pruebas serológicas actuales son de uso limitado para LC y LM, debido a su baja sensibilidad (27.7% mediante inmunofluorescencia y 70% mediante ELISA) (dado que en ambas formas clínicas predomina la respuesta inmune celular), así como la baja especificidad debido a una frecuente reactividad cruzada principalmente con *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de

Chagas (7,3). Por otro lado, las técnicas moleculares presentan una elevada sensibilidad a comparación de las técnicas parasitológicas convencionales y permiten la identificación de la especie de *Leishmania* (17). Entre ellas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método más común, se considera una técnica muy sensible y específica y posee la ventaja de poder detectar el ADN de *Leishmania* spp. directamente en muestras clínicas, aún en condiciones de reducida carga parasitaria si se usa una diana genética multicopia. Este método tiene como principio la repetición de ciclos de calentamiento y enfriamiento de fragmentos de ADN molde permitiendo su replicación enzimática en presencia de cebadores de ADN, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), magnesio y un buffer para el adecuado funcionamiento de la enzima ADN polimerasa. La PCR presenta una sensibilidad del 75-98% al usar al ADN del kinetoplasto de *Leishmania* como diana (24, 25). Otros métodos moleculares usados son PCR-RFLP y RT-PCR. El primero usa enzimas de restricción con el fin de generar fragmentos de diferentes tamaños en el amplicón (producto de PCR) de la diana seleccionada, formando un patrón específico para cada especie de *Leishmania*. De otro lado, la PCR en tiempo real (RT-PCR) añade sondas o tintes fluorescentes que se unen al ADN de doble hebra previamente amplificado por PCR permitiendo la cuantificación del ácido nucleico diana y menores límites de detección. A pesar de su alta sensibilidad, estas técnicas moleculares no son usadas rutinariamente en países en vías de desarrollo, como Perú, debido a que las regiones endémicas de Leishmaniasis pertenecen a zonas rurales donde no se posee la infraestructura, equipamiento adecuado y personal capacitado para realizar un diagnóstico eficiente (2, 26). También se han reportado técnicas de amplificación isotérmica como RPA (Amplificación por la

recombinasa) y LAMP (Amplificación isotérmica mediada por bucle), sin embargo requieren optimización y validación para su uso, además de ser acopladas a técnicas eficientes de para la correcta lectura e interpretación de la señal (27-30). Las técnicas moleculares están confinadas a centros de referencia y laboratorios de investigación. Por estas razones, se refiere a la microscopía directa como la técnica más usada (31, 32, 33). Estudios previos en Perú reportan que el uso de microscopía directa está asociada a elevados diagnósticos inexactos, conllevando en ocasiones tratamientos innecesarios y cursos prolongados de la enfermedad (34). Cabe resaltar que en las regiones endémicas de Leishmaniasis es común el uso de tratamientos tradicionales por los individuos afectados, tales como la aplicación tópica de plantas, sustancias químicas o calor en las lesiones. Un estudio realizado en Perú sugiere que esta manipulación podría estar asociada a la disminución de la carga parasitaria y alteración de la morfología de las lesiones, lo que obstaculiza el diagnóstico certero oportuno. Vinculado a esto, se impediría el inicio del tratamiento oportuno y gratuito proporcionado por el Ministerio de Salud, que tiene como requisito la demostración de la presencia del agente causal (35).

#### **3.4. Aptámeros: herramientas emergentes en biotecnología**

Con el paso de los años y el desarrollo de la biología molecular, la teoría evolutiva de Darwin ha sido extrapolada a la teoría del caldo primitivo de Oparin, en la cual se describe la formación de vida a partir de biomoléculas. La tecnología ha permitido demostrar que mediante la selección *in vitro* es posible la evolución de una población de ácidos nucleicos y proteínas en tubos de ensayo; estos experimentos han sido claves en la selección artificial de moléculas capaces de

interactuar con diferentes dianas e incluso interferir con su actividad (36). Una de estas tecnologías es SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment), cuyo principal objetivo es generar moléculas de oligonucleótidos de alta afinidad y especificidad de unión a la diana seleccionada. La diana se presenta unida a una superficie y es incubada con una biblioteca altamente diversa ( $10^{13}$ - $10^{15}$ ) de oligonucleótidos, de los cuales sólo aquellos más afines y de unión específica van a permanecer unidos. Después de realizar los lavados para separar aquellos oligonucleótidos menos afines, las secuencias unidas son amplificadas por PCR; y este proceso de incubación, lavado y amplificación se repite varias veces (10 a 15) y en condiciones más restrictivas, hasta obtener una población de secuencias de oligonucleótidos enriquecida (alta afinidad por la molécula diana) (37, 38). Posteriormente, estas secuencias son identificadas con diversas herramientas; actualmente la más común es la secuenciación de próxima generación. Y una vez caracterizadas cuando su función ha sido demostrada, se denominan aptámeros. Los aptámeros, cuyo nombre brindado por Andy Ellington proviene de los términos en latín “aptus” que significa encajar y el término griego “mera” que significa molécula (39), son cadenas cortas de ácidos nucleicos cuya estructura 3D les permite interactuar de manera específica con diferentes moléculas diana a través de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, efectos hidrofóbicos, fuerzas de Van Der Waals y sobre todo por complementariedad de forma (40). Se pueden presentar en la naturaleza como riboswitches; sin embargo, la mayoría se diseñan *in vitro* dirigidos a una diana de interés en condiciones determinadas (41). Los aptámeros presentan múltiples ventajas frente a los anticuerpos por la facilidad de síntesis y reproducibilidad en su producción, bajo

costo, capacidad para ser seleccionados en múltiples condiciones de selección y variedad de dianas, mayor estabilidad a altas temperaturas y plegamiento reversible, además de baja inmunogenicidad (42). Asimismo, la modificación de los extremos mediante la unión de diferentes grupos funcionales como polietilenglicol y biotina permite controlar la orientación de estos después de su inmovilización. También se describe el uso de modificaciones químicas en las bases nitrogenadas con el fin de proveer estabilidad frente a la degradación por enzimas (43). La importancia de los aptámeros recae en la capacidad de estos para ser fácilmente usados en sensores y accionadores de sistemas de detección (4). La versatilidad de estas moléculas permite desarrollar múltiples aplicaciones, entre ellas, visualización de tumores, detección de analitos, captura de agentes patógenos, antimicrobianos, biosensores, entrega de fármacos, plataformas de detección de patógenos, etc. (44).

### **3.5. Antecedentes en la selección de aptámeros para patógenos**

Como se ha mencionado previamente, un factor importante para el control de las enfermedades infecciosas es el diagnóstico preciso a tiempo. Existen diversas técnicas diagnósticas usadas en el laboratorio, cada una con sus respectivas ventajas y desventajas; por lo tanto, el desarrollo de herramientas de detección rápidas y costo-efectivas proporciona grandes beneficios en el sector salud. Anteriormente, se han reportado múltiples estudios donde se evidencia el uso de aptámeros para la detección de diversos agentes patógenos y diferentes plataformas, debido a su sencilla producción en masa y gran versatilidad.

Kumari y col. (2019) usaron un biomarcador y aptámero previamente reportados (45), para el desarrollo de un test para el diagnóstico rápido de tuberculosis pleural.

La sensibilidad del test desarrollado usando líquido pleural fue comparada con el test de ELISA (*Enzyme-Linked Immobilized Sorbent Assay*), obteniéndose una sensibilidad estadísticamente mayor en el novedoso test a base de aptámeros ALISA (*Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay*) (93% en ALISA vs. 24% en ELISA)(46). La detección de agentes patógenos en la industria alimentaria es de suma importancia para la protección de la salud pública. Bayrac y col. (2017) desarrollaron un test colorimétrico de tipo *sandwich* basado en aptámeros de ADN para la detección de *Salmonella enteritidis*, visualmente detectable. Los aptámeros fueron seleccionados mediante Cell-SELEX, similar al SELEX convencional, con la variante de usar una célula completa. En dicho estudio se logró un límite de detección de 103 UFC/mL (47). Asimismo, Shin y col. lograron desarrollar un método de detección colorimétrico a partir de una tira de papel, propuesta como plataforma POC (*point-of-care*) para zonas con acceso limitado a centros de salud y laboratorios altamente equipados para el diagnóstico de *Vibrio fischeri*. Se logró una capacidad de detectar desde  $4 \times 10$  hasta  $4 \times 10^5$  UFC/mL de *V. fischeri* (48). Otra herramienta biotecnológica muy útil y usada actualmente para el diagnóstico de diferentes patógenos es CRISPR/Cas12a. Recientemente, Li y col. (2021) lograron acoplar esta herramienta a aptámeros para el desarrollo de una plataforma ultrasensible de detección capaz de reconocer diferentes tipos de biomarcadores y capaz de adaptarse a diferentes tipos de *readouts* como absorbancia, fluorescencia o usando equipos de microfluídica(49).

En Perú, la identificación de aptámeros para el reconocimiento de péptidos derivados de proteínas de membrana de parásitos, se ha realizado previamente. Peñaranda (2018), identificó 5 aptámeros capaces de unirse de manera específica a

un péptido derivado de una proteína de membrana de *Trypanosoma cruzi*, usando SELEX convencional y ensayos de ELONA (por sus siglas en idioma inglés: *Enzyme-linked oligonucleotide assay*) para determinar la capacidad de unión de manera cualitativa (50).

Del mismo modo, Huanachin (2018), logra aislar un aptámero afín a un péptido derivado de proteínas secretadas y abundantes del metacéstode de *Taenia solium*. Además, logra determinar el valor de la constante de disociación de unión mediante ensayos de Stopped-flow (51).

Asimismo, Joseph y col. (2019) identificaron y caracterizaron aptámeros capaces de reconocer de manera específica la proteína HMGB1 (*High-Mobility Group Box-1*) de *Plasmodium falciparum*, esta proteína diana fue seleccionada a partir de data de *ribosome profiling* y modelamiento estructural, con el fin de seleccionar un buen candidato a ser evaluado como biomarcador del agente patógeno. La afinidad de unión de los aptámeros fue determinada mediante termoforesis de micro-escala y cinética rápida, obteniéndose valores de afinidad en el rango nanomolar (52).

La identificación y caracterización de aptámeros específicos para el reconocimiento de diferentes especies de *Leishmania* ha sido realizada por escasos grupos de investigación. Previamente, Ramos y col. (2007) identificaron (mediante SELEX) una población de aptámeros con alta especificidad para el antígeno H2A de *L. infantum* y ninguna reacción cruzada con BSA, con un límite de detección de 50 ng de proteína usando ELONA. Sin embargo, en lisados de células humanas de pacientes infectados, la población de aptámeros mostró una sensibilidad muy baja así como el reconocimiento no específico de otras proteínas. Se espera que con

selecciones adicionales de la población de aptámeros, descartando aquellos de uniones inespecíficas a proteínas humanas, potencialmente puedan ser usados en plataformas de detección y diagnóstico (53). Igualmente, el mismo grupo de investigación seleccionó una población de aptámeros específicos para el antígeno H3 de *L. infantum* como blanco, demostrando que potencialmente también podría aplicarse para la detección de *Leishmania* en una plataforma ELONA (53). Asimismo, Martín y col. (2013) aislaron y caracterizaron dos aptámeros (AptLiH2A 1 y AptLiH2A 2) para H2A de *L. infantum* a partir de poblaciones de aptámeros previamente seleccionadas. Usando SELEX y mediante ensayos de *pull-down* se seleccionó los de mayor afinidad y especificidad. A pesar de poseer distintas estructuras primarias y secundarias entre ellos, ambos aptámeros se dirigen a los mismos péptidos en la proteína H2A y fueron capaces de identificar las proteínas H2A nativa (endógena del parásito) y recombinante.

Posteriormente, en una plataforma ELONA se logró determinar el número de parásitos a partir de cultivos celulares. Sus resultados demostraron que estos aptámeros pueden ser usados potencialmente como herramientas de diagnóstico, así como para la purificación por afinidad de la diana a partir de lisados celulares y considerarse potencialmente para su uso en muestras de sangre, orina, etc (54).

Posteriormente, Guerra-Pérez y col. (2015), seleccionaron una población de aptámeros afines y específicos para la proteína PABP (*poly (A)-binding protein*) de *L. infantum*. Estos aptámeros fueron caracterizados con ensayos de ELONA y Slot-blot mostrando un límite de detección de proteína endógena correspondiente a 2500

promastigotes de *L. infantum*. Asimismo, demostraron la capacidad de purificar LiPABP a partir de mezclas complejas (55).

De la misma forma, Moreno y col. (2003) diseñaron una nueva metodología de SELEX usando oro coloidal para seleccionar secuencias de hebra simple de ADN capaces de unirse con gran afinidad a KMP-11 de *Leishmania infantum*, que corresponde a una proteína presente en la membrana de kinetoplastidos (56). Este mismo grupo de investigación usó electrodeposición selectiva de oro ligado a proteínas en electrodos serigrafiados para la detección de KMP-11 en *Leishmania infantum* como prueba de concepto (57), aplicando los aptámeros previamente identificados y caracterizados en el estudio previo a una plataforma de detección. Esta plataforma ofrece la ventaja de poder controlar la orientación de la diana, reducir uniones inespecíficas y permitir un mejor acceso a los aptámeros para un adecuado reconocimiento. Los investigadores lograron un límite de detección de 2.27 mM de KMP-11 de *L. infantum*, considerado relativamente alto, sin embargo, con posibles optimizaciones podría ser muy útil (57).

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV.1. Objetivo general**

Seleccionar e identificar aptámeros de ADN específicos para el reconocimiento de péptidos derivados de proteínas de membrana de *Leishmania braziliensis*.

### **4.2. Objetivos específicos**

1. Identificar *in silico* potenciales biomarcadores proteicos como dianas de captura de *Leishmania braziliensis* y de éstos seleccionar péptidos expuestos para ser usados como moléculas diana en la selección de aptámeros.
2. Seleccionar *in vitro* potenciales secuencias de ácidos nucleicos (aptámeros candidatos) afines a biomarcadores peptídicos diana mediante el método SELEX.
3. Identificar las mejores secuencias candidatas a aptámeros de unión específica a biomarcadores peptídicos de *Leishmania braziliensis*.
4. Evaluar el reconocimiento entre aptámeros candidatos y biomarcadores peptídicos mediante ELONA.

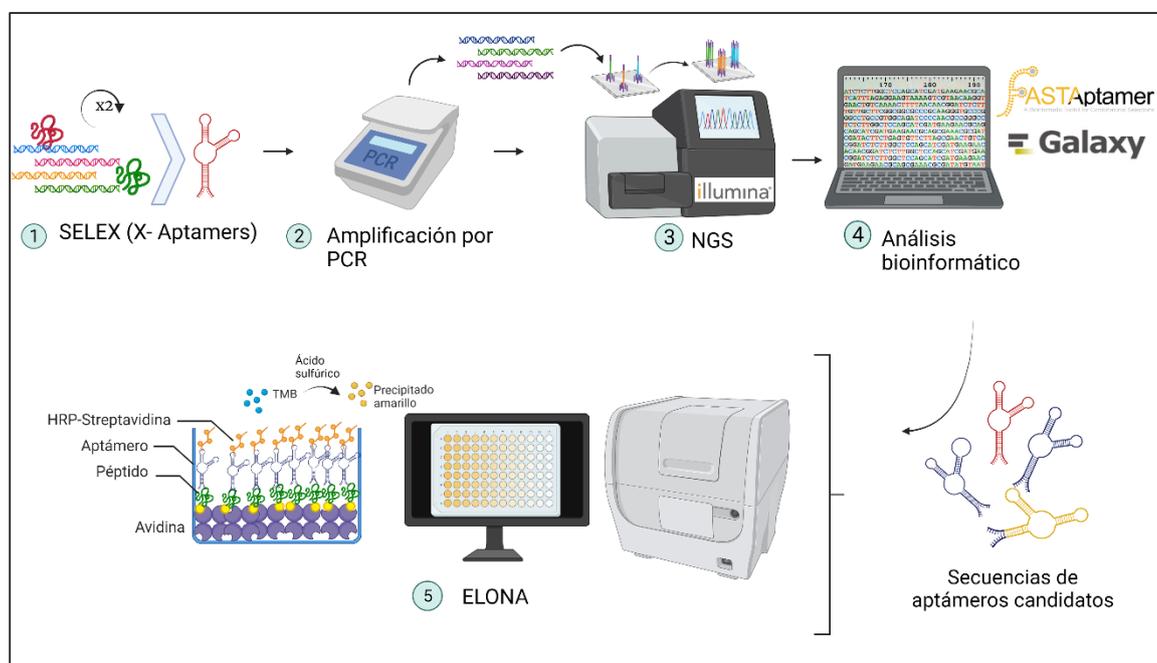
## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Diseño de estudio

Experimental *in vitro*, analítico.

### 5.2. Procedimientos y técnicas

Las diferentes etapas del trabajo experimental y análisis bioinformático realizados en este estudio se muestran esquematizadas en la Figura 4.



**Figura 4:** Flujograma de la metodología de trabajo.

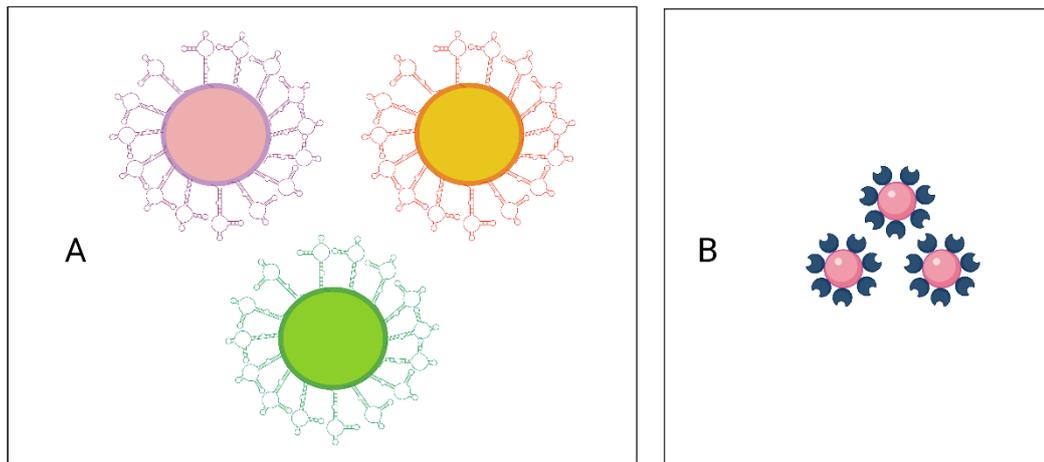
### Selección de péptidos de membrana como posibles dianas de captura de *Leishmania braziliensis*

Las dianas de captura requieren ser proteínas relativamente abundantes y estar localizadas en la superficie de la membrana externa de *Leishmania*. Previamente,

se partió de bases de datos disponibles de proteoma y secretoma de *Leishmania braziliensis*, y del análisis secundario de data reportada de *ribosome profiling* (análisis de perfiles de ribosomas) para *Leishmania donovani* (58). Este último refleja la expresión génica global, particularmente la síntesis y abundancia de proteínas, lo que permite identificar proteínas con alta especificidad y abundancia en *Leishmania*. Se escogieron proteínas presentes en la membrana externa de acuerdo a data reportada en la literatura. Los modelos estructurales de las proteínas homólogas en la cepa *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 de las proteínas seleccionadas se predijeron *in silico* utilizando el servidor Swiss Model para buscar regiones externas expuestas de acuerdo a data reportada en la literatura. La estructura de esas regiones se predijo mediante modelamiento por *threading*. Se seleccionaron péptidos de 20-30 residuos de la región externa para cada proteína diana según la presencia de una estructura secundaria. Finalmente, las secuencias se alinearon contra el proteoma humano usando BLASTp de NCBI para descartar estructuras secundarias similares, obteniéndose cuatro péptidos candidatos. La estructura de estos péptidos fue modelada por homología usando 3 programas bioinformáticos diferentes (PyMOL, Modeller y Swiss Model). Para la selección de los péptidos diana, se tomó en cuenta el grado de expresión (abundancia) de la proteína correspondiente (previamente reportado en la literatura) y la estabilidad de sus estructuras secundarias, priorizando las estructuras de alfa hélice. Los péptidos seleccionados se sintetizaron a pedido con modificaciones de biotina en el extremo 5'.

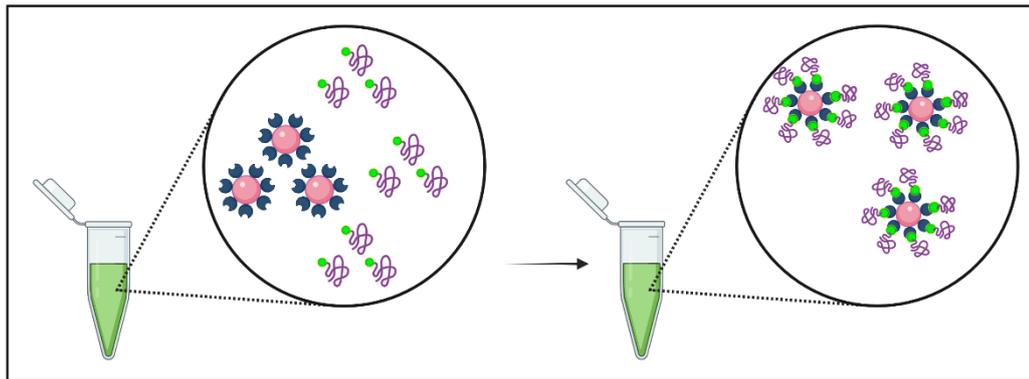
### **Selección de aptámeros específicos para péptidos**

Los péptidos liofilizados seleccionados se resuspendieron en una solución con dimetilformamida (DMF) al 10%, 2N NaOH al 2% y agua libre de nucleasas. Para la selección de aptámeros de ADN *in vitro*, se usó el kit X-Aptamers (AM Biotechnologies, LLC, USA). Este kit se basa en el principio básico de SELEX, con la diferencia de contar con una biblioteca de oligonucleótidos adherida a perlas con secuencias repetidas en toda la superficie de cada perla, de manera que requiere menos repeticiones de selección y amplificación. Siguiendo el protocolo del kit, las reacciones se realizaron en buffer A (1x PBS pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Tween 20 (0.05%), BSA 0.5%) y buffer B (1x PBS pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Tween 20 (0.05%)) a 25°C (TA). El kit proporciona la biblioteca de secuencias adheridas a perlas (beads) de poliestireno y cada perla contiene la misma secuencia repetida miles de veces en toda su superficie, también proporciona 1 cebador *forward* que es común para todas las secuencias de la biblioteca y 7 cebadores *reverse* que permiten identificar las secuencias pertenecientes a cada una de las 7 condiciones diferentes de selección secundaria. Sin embargo, para poder usar el kit es necesario adicionar perlas magnéticas que permitan la interacción con la molécula diana y la recuperación de las perlas de poliestireno con secuencias afines a la diana, mediante un rack magnético. Las perlas magnéticas usadas en este estudio fueron Dynabeads (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) asociadas a estreptavidina, con la finalidad de usar dianas biotiniladas (Figura 5).



**Figura 5:** Diferentes tipos de perlas para el proceso de selección de aptámeros candidatos mediante el kit X-Aptamers. (A) Perlas de poliestireno cubiertas con la misma secuencia repetida en toda su superficie, que juntas conforman la biblioteca de secuencias randomizada de ADN de hebra simple. (B) Perlas magnéticas asociadas a estreptavidina (Dynabeads) para la incubación con los péptidos diana biotinilados y la recuperación de secuencias que interactúan con las dianas.

Con el fin de que el ADN de la biblioteca adopte la estructura 3D favorecida termodinámicamente, este se activó a través de una incubación a 95°C durante 5 minutos, posteriormente se enfrió a 25°C (TA) durante 30 minutos para el adecuado plegamiento (*folding*). Después de la preparación de la biblioteca, se procedió a recubrir las perlas magnéticas asociadas a estreptavidina con los péptidos diana biotinilados a usar (péptido 2 y 3), incubándolos con un exceso de diana, durante 30 minutos a TA, para garantizar el recubrimiento completo de las perlas (Figura 6).



**Figura 6:** Incubación de perlas magnéticas asociadas a estreptavidina con péptidos diana biotinilados.

Posteriormente, se realizaron 3 selecciones (Figura 7):

**a) Selección negativa:**

Se enfrentaron 125  $\mu$ L de la biblioteca con perlas magnéticas sin diana adherida en la superficie durante 1 hora a 25°C (TA) y en movimiento. Las perlas de poliestireno con la biblioteca de secuencias adheridas que no se unieron a las perlas magnéticas en esta selección negativa se colocaron en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL para proceder con la siguiente selección.

**b) Primera selección positiva:** La biblioteca restante de la anterior selección se incubó con los péptidos acoplados individualmente a perlas magnéticas en buffer A durante 90 minutos a TA con rotación. Mediante lavados se eliminó aquellas perlas de poliestireno que no interactuaron con las perlas magnéticas asociadas a dianas. Posteriormente, se procedió a separar las secuencias de ADN de las perlas de poliestireno a través de hidrólisis alcalina con NaOH 1N a 65°C.

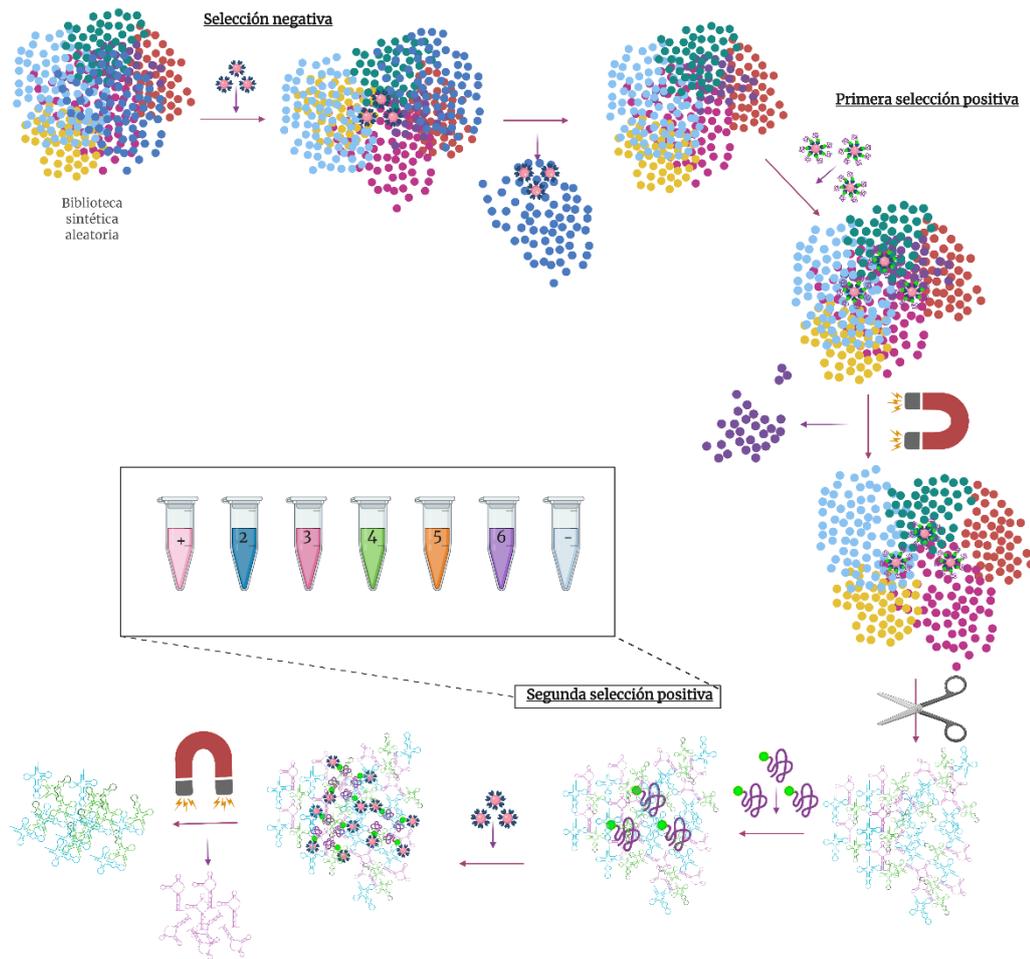
**c) Segunda selección positiva:** Usando las secuencias de ADN previamente separadas de las perlas de poliestireno (aquellas que interactuaron con las perlas

magnéticas unidas a la diana) mediante hidrólisis alcalina con NaOH 1N, se realizaron 7 selecciones individuales (Tabla 1). Los controles de selección se ubicaron en los tubos 1 y 7 (siendo el tubo #1 la biblioteca inicial y el tubo #7 el control negativo (ausencia de diana) de la segunda selección positiva); mientras que en las reacciones 2 a 6 se colocaron tres concentraciones diferentes del péptido 3 y dos concentraciones del péptido 2 (Tabla 1). Al finalizar la incubación de 1 hora a TA en movimiento, se recuperaron las secuencias más afines a la diana a través de las perlas asociadas a estreptavidina y un rack magnético.

**Tabla 1**

Condiciones de la segunda selección positiva con X-Aptamers.

1	Biblioteca inicial
2	Péptido 3 a 1500 nM
3	Péptido 3 a 150 nM
4	Péptido 3 a 15nM
5	Péptido 2 a 1500 nM
6	Péptido 2 a 150 nM
7	Control negativo de selección secundaria



**Figura 7:** Proceso de selección de secuencias usando el kit X-Aptamers.

### Amplificación de secuencias de ADN seleccionadas

Se amplificó las secuencias mediante PCR. Las condiciones de PCR por cada reacción fueron 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 1 U Taq ADN polimerasa, 0.4μM de cada cebador directo y reverso. Los cebadores usados fueron aquellos correspondientes a la secuencia flanqueante a la región aleatoria de la biblioteca del kit X-aptamers:

**Cebador directo:** 5'CAGGGGACGCACCAAGG 3'

**Cebador reverso:** 5'CAGCACGCGGGTCATGG 3'

La configuración del termociclador usada fue 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, y una extensión final de 72°C por 3 minutos.

Con el fin de determinar el número de ciclos óptimo (ausencia de productos secundarios, bandas claras y de grosor similar), se extrajo 10 µl de cada tubo en un intervalo de 4 ciclos, a excepción del control negativo de PCR (tubo N°8) cuyo contenido sólo se evaluó al finalizar el ciclo final.

Finalmente, la visualización y control de calidad del producto de PCR#1 se realizó a través de la observación mediante un transiluminador de luz UV de geles nativos de 10% poliacrilamida en buffer TBE teñidos con un baño de SYBR Gold tras la electroforesis. Tras la visualización de la integridad y pureza de los productos de la primera amplificación, se procedió a realizar la segunda amplificación con el fin de agregar los adaptadores para el proceso de secuenciación de próxima generación a usar y se repitió el proceso de corrida y visualización del gel de poliacrilamida al 12,5% (teñido con un baño de SYBR Gold 1x). La tercera PCR se realizó con el fin de agregar los índices (*indexes*) para la secuenciación; los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 0,8% con SYBR Gold mezclado con el loading buffer.

### **Purificación de productos y secuenciación de próxima generación**

Una vez obtenidos los productos del PCR #3, se realizó purificación usando AMPure XP (Beckman Coulter Inc, California, EE.UU.) para la secuenciación en

MiSeq 2000 (Illumina, CA, EE.UU.) usando el Kit *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* (Illumina, CA, EE.UU.). El procedimiento de secuenciación fue realizado por la empresa GenLab del Perú S.A.C. (Lince, Lima- Perú).

### **Análisis bioinformático de aptámeros candidatos**

Posterior a la secuenciación, se realizó un análisis bioinformático mediante el programa FASTAptamer (59) (<https://burkelab.missouri.edu/fastaptamer.html>). Con el fin de determinar la biblioteca ideal para realizar el análisis, se evaluó el número de secuencias totales y secuencias únicas presentes en el *output* demultiplexado (data con archivos separados de lecturas *forward* y *reverse*) y el *output* sin cebadores obtenido de la herramienta CutAdapt en galaxy.org. La frecuencia de las secuencias totales y únicas se determinó aplicando el comando FASTAptamer Count.

Con la biblioteca seleccionada se procedió a realizar el análisis de enriquecimiento de secuencias individuales en cada una de las 7 selecciones. Se establecieron nueve comparaciones (Tabla 2), después se procedió a aplicar los comandos considerando el parámetro  $-f = 2$  que permite filtrar aquellas secuencias que tengan menos RPM (*reads per million nucleotides*) del valor establecido. Las tablas obtenidas después de aplicar el comando Enrich proporcionan información de longitud, lecturas totales, lecturas por millón, ranking y valores de enriquecimiento entre las condiciones seleccionadas para su comparación (Tabla 2).

**Tabla 2**

Esquema de evaluación del enriquecimiento entre condiciones de selección.

enrich 1	Biblioteca inicial	V.S	Control negativo		
enrich 2	Biblioteca inicial	V.S	Péptido 3 a 1500 nM	V.S	Control negativo
enrich 3	Biblioteca inicial	V.S	Péptido 3 a 150 nM	V.S	Control negativo
enrich 4	Biblioteca inicial	V.S	Péptido 3 a 15nM	V.S	Control negativo
enrich 5	Péptido 3 a 1500 nM	V.S	Péptido 3 a 150 nM	V.S	Péptido 3 a 15nM
enrich 6	Biblioteca inicial	V.S	Péptido 2 a 1500 nM	V.S	Péptido 2 a 150 nM
enrich 7	Control negativo	V.S	Péptido 2 a 1500 nM	V.S	Péptido 2 a 150 nM
enrich 8	Péptido 2 a 1500 nM	V.S	Péptido 3 a 1500 nM		
enrich 9	Péptido 2 a 150 nM	V.S	Péptido 3 a 150 nM		

A continuación, se procedió a realizar el análisis de *cluster* o familias que permite agrupar secuencias en familias similares. Los parámetros a considerar fueron la distancia de Levenshtein (-d), siendo ésta el mínimo número de modificaciones requerido para considerar a dos secuencias diferentes; y los valores de RPM de las secuencias (-f). Para determinar los valores adecuados (mayor diversidad de familias) de los parámetros mencionados, se experimentó con diferentes valores de -d (3, 5, 7, 9 y 10) y -f (3, 4, 6 y 8).

Con las secuencias agrupadas se realizó el análisis de enriquecimiento de familias. Usando los valores de enriquecimiento, abundancia y lecturas en análisis individuales y de familias, se identificó las cinco mejores secuencias candidatas a aptámeros para cada diana usada (péptido 3 y péptido 2). Los potenciales aptámeros seleccionados se obtuvieron por pedido a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) con una modificación de TEG-biotina en el extremo 3'.

### **Optimización y validación de la interacción *in vitro* mediante ELONA**

La evaluación de la unión entre los aptámeros y péptidos diana se realizó mediante un ensayo de ELONA con péptidos (60). Éste consiste en la inmovilización de las dianas e incubación con sus respectivos ligandos para determinar la proporción entre ligandos unidos y libres a través de la determinación de la absorbancia del producto de la catálisis del sustrato por la enzima peroxidasa de rábano asociada con el complejo ligando-diana inmovilizado. Para la optimización del protocolo se evaluó un control negativo adecuado, sustancias bloqueantes, tiempo de incubación y controles.

Se recubrió los pocillos de una placa de 96 pocillos Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) con 100  $\mu\text{L}$  de avidina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en buffer carbonato bicarbonato (ph 9,6) e incubó durante la noche a 4°C. A la mañana siguiente, se procedió a lavar 4 veces cada pocillo con 200  $\mu\text{L}$  de buffer PBS-T (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM de buffer fosfato y Tween 20 0,05%). A continuación, se bloqueó la superficie con 200  $\mu\text{L}$  de BSA al 1% en buffer de lavado (PBS-T) durante 2h en movimiento a 37°C.

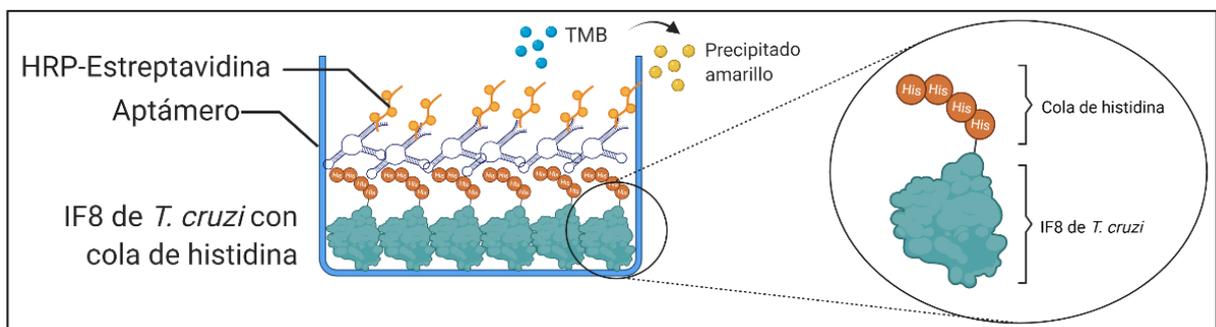
Después de la incubación y los 4 lavados, se procedió a agregar 100  $\mu\text{L}$  del péptido diana (1  $\mu\text{M}$ ) biotinilado resuspendido en buffer B (mismo buffer de selección de aptámeros) y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas en movimiento. Posteriormente, se lavó 4 veces los pocillos usando 200  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado y se procedió a agregar 100  $\mu\text{L}$  de aptámeros (1  $\mu\text{M}$ ) marcados con TEG-biotina en el extremo 3' en buffer B e incubó por 2 horas a TA. Al finalizar la incubación, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de una dilución de 1/1000 de peroxidasa de rábano (HRP)-estreptavidina y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y nuevamente se lavó 4 veces con buffer de lavado. Finalmente se reveló con 100  $\mu\text{L}$  de TMB durante 3 minutos en la oscuridad, se añadió 50  $\mu\text{L}$  de 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para detener la reacción y se leyó la absorbancia a 450 nm en el lector de placas Synergy H1 (BioTek, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.).

Posteriormente, se agregó al protocolo un segundo bloqueo con 100  $\mu\text{L}$  de biotina a 0,4  $\mu\text{M}$  después de la incubación de los péptidos diana, a fin de bloquear el resto de sitios libres de la avidina. Además, se agregó BSA al 0,1% en el buffer de lavado

usado y se aumentó el volumen de la solución bloqueante a 300  $\mu\text{L}$  con el fin de reducir la señal de ruido de fondo (*background*).

Una vez seleccionados los mejores aptámeros candidatos con los resultados del ELONA previamente mencionado, se procedió a realizar la titulación del mejor aptámero candidato para cada diana. Las concentraciones de aptámero usadas fueron: 0  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ . Los controles usados para determinar que el ensayo había sido realizado de manera correcta fueron los siguientes:

**Control positivo de ensayo:** Fijación de la proteína diana con cola de histidina (IF8 de *Trypanosoma cruzi*, producida como proteína recombinante en *E. coli* en el Laboratorio de Biomoléculas-UPC por Katherin Peñaranda (50) vs. Aptámeros afines a cola de histidina previamente reportados (61) (Figura 8).



**Figura 8:** Representación de control positivo de ensayo.

**Control negativo de ensayo:** Fijación de BSA al 5% vs. Aptámero afín a cola de histidina usado en el control positivo de ensayo.

**Control cruzado de aptámeros para péptidos de *Leishmania braziliensis*:** Péptido biotinilado derivado de una proteína de membrana de *Leishmania braziliensis* usado en la selección primaria con X-Aptamers, fijado a través de

avidina previamente incubada *overnight* en los pocillos, vs. Aptámero inespecífico.

**Ejemplo:** Péptido 2 vs. aptámero 5 seleccionado específicamente para el péptido 3.

**Control negativo (*non-cognate*):** Péptido derivado de proteína de membrana de *Leishmania braziliensis* biotinilado, no usado en la selección primaria con X-Aptamers (péptido 1) y fijado a través de avidina previamente incubada *overnight* en los pocillos vs. cualquiera de los aptámeros candidatos seleccionados en este estudio.

#### 5.4 Consideraciones éticas

Este estudio se llevó a cabo después de la revisión y aprobación por la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Asimismo, fue exonerado de revisión por el Comité Institucional de Ética en Humanos o en Animales.

El presente trabajo, registrado con el código SIDISI 203837, cuenta con la exoneración de revisión por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la UPCH (carta del CAREG-ORVEI N° 044-22 recibida el día 17/03/2022).

#### 5.5 Plan de análisis

Se evaluó la diferencia estadística entre los ratios de absorbancia de los aptámeros candidatos con su respectiva diana *versus* los controles negativos y cruzados (diana inespecífica) usando la prueba t de Student, tomando en cuenta un nivel de significancia ( $\alpha < 0,05$ ). Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados mostrados en las gráficas representan el promedio de los resultados

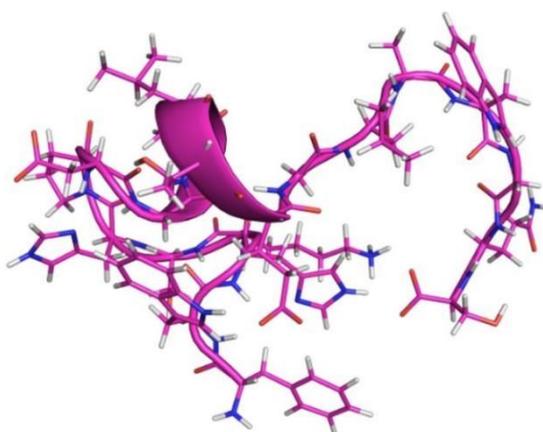
obtenidos. Para la determinación de la afinidad de manera cualitativa, se comparó los valores de absorbancia entre los aptámeros candidatos con su respectiva diana versus la absorbancia del control positivo (aptámeros anti-HIStag). Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 9.3.1 (disponible en [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism y la herramienta virtual BioRender (<https://biorender.com/>).

## VI. RESULTADOS

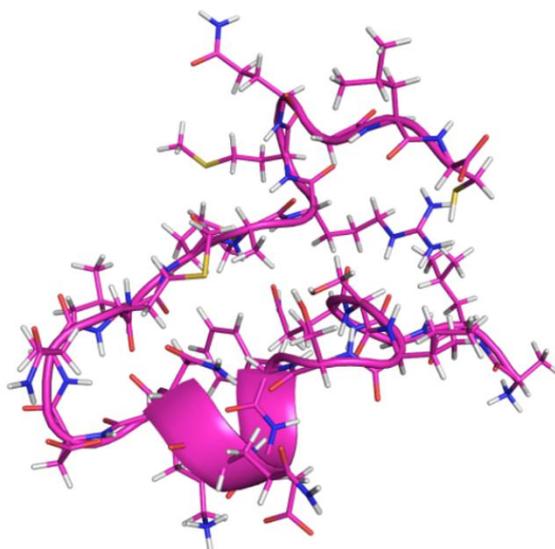
### VI.1 Identificación de potenciales biomarcadores peptídicos

Se partió del análisis de la data de experimentos de *ribosome profiling* reportados por Bifeld *et al.* (2018) para *Leishmania donovani* (54), considerándose la abundancia relativa (*protected sites/ RNA reads per coding sequence*), correspondiente al número de lecturas (obtenidas por secuenciación de ARN) de fragmentos de ARN mensajero (ARNm) protegidos por el ribosoma en relación a las lecturas de ARNm total. Específicamente este parámetro permite distinguir ARNm que se traduce activamente en un punto de tiempo dado en una célula, y asimismo refleja la eficiencia de la traducción, es decir, la cantidad de proteína sintetizada en un determinado tiempo en una célula. A partir de dicho análisis se identificó cuatro proteínas con dominio transmembrana (tabla en anexo) expresadas en ambos estadios (promastigote y amastigote) de *Leishmania* (62-65). Posterior al análisis de predicción estructural *in silico*, se seleccionaron aquellos péptidos expuestos como dianas para la selección de aptámeros.

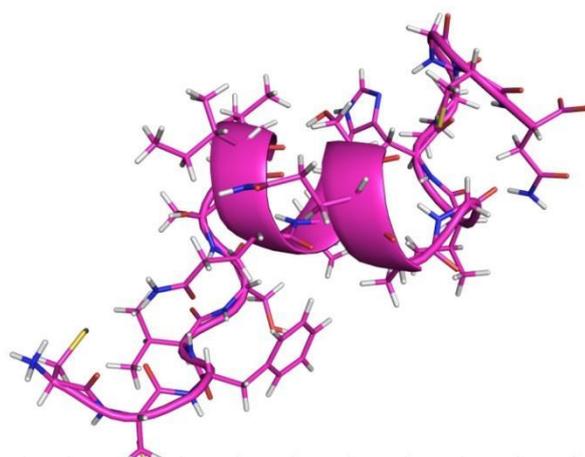
A partir del modelamiento por homología de los péptidos diana usando diferentes programas de modelamiento (PyMOL, Modeller y Swiss Model), se obtuvieron diferentes estructuras (Figuras 9-12). Los análisis *in silico* permitieron la selección de las estructuras secundarias más estables, sobre todo estructuras alfa hélice, presentes en los péptidos 3 y 2, los cuales fueron escogidos como blancos para SELEX.



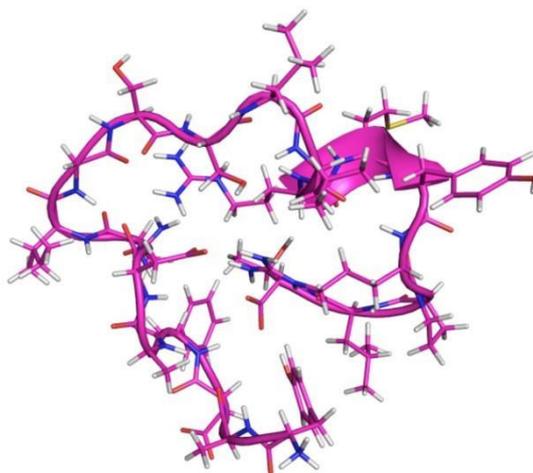
**Figura 9:** Modelamiento por homología del péptido 1, a través de PyMOL



**Figura 10:** Modelamiento por homología del péptido 2, a través de PyMOL.



**Figura 11:** Modelamiento por homología del péptido 3, a través de PyMOL

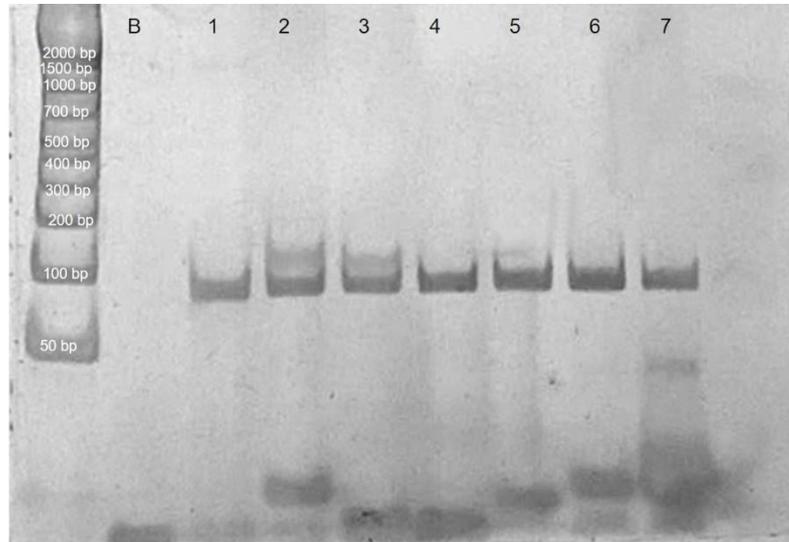


**Figura 12:** Modelamiento por homología del péptido 4, a través de PyMOL.

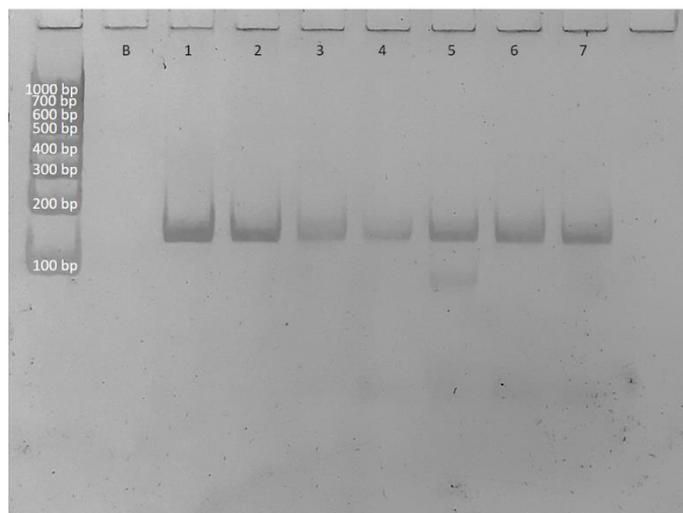
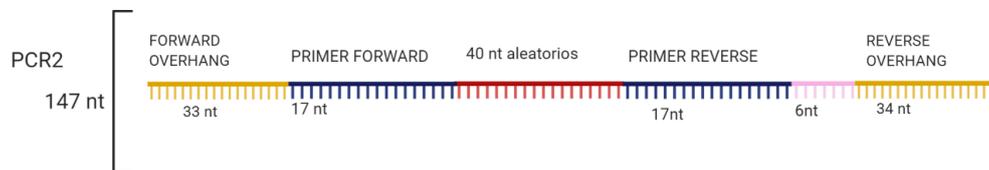
## VI.2 Amplificación de secuencias seleccionadas mediante X-Aptamers

Al determinar de manera empírica el número de ciclos de amplificación por PCR necesarios para cada condición de selección, se realizó la corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 12,5% de los productos de la primera amplificación por PCR que consiste en agregar la secuencia de 6 nucleótidos para identificar las secuencias correspondientes a cada una de las 7 condiciones de selección (Figura 13). Posteriormente se realizó el segundo PCR para agregar los adaptadores necesarios para la secuenciación de próxima generación y los productos generados fueron visualizados de la misma manera que los productos anteriores (Figura 14). Finalmente se realizó el tercer PCR para agregar los *indexes* y se visualizaron los productos mediante un gel de agarosa al 0,8% (Figura 15).

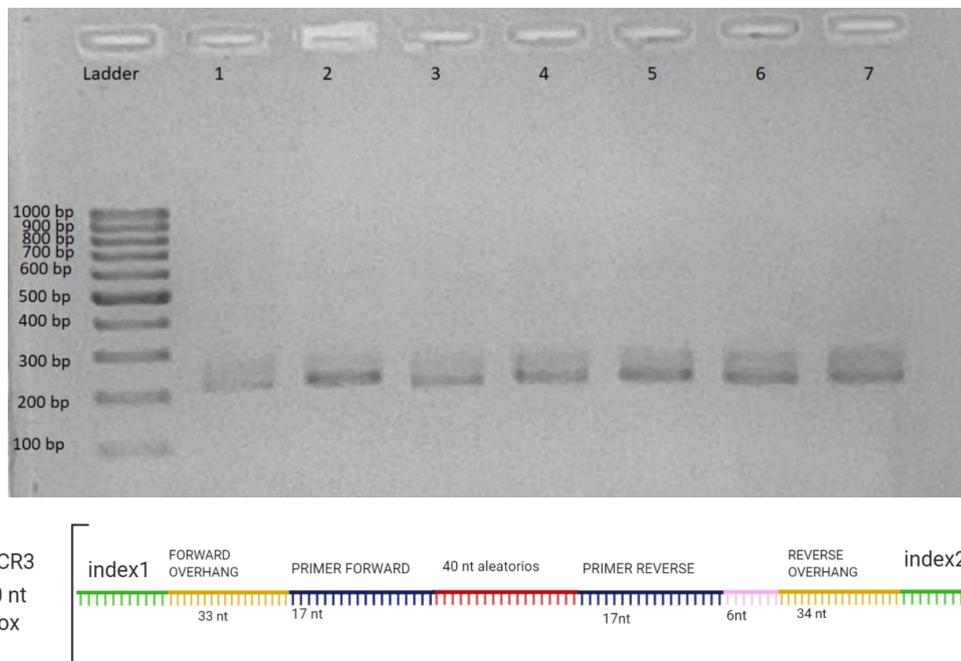
**Figura 13:** (Arriba) Estructura de las secuencias después de la primera amplificación por PCR. (Abajo) Productos de PCR#1, PAGE al 12.5%, 250V durante 15 min, teñido con baño de SYBR Gold al finalizar la corrida. De izquierda



a derecha, Ladder Amplisize, Blanco de PCR, productos de selección de X-Aptamers del tubo 1 al 7 (en el gel se cargaron 10  $\mu$ L de cada producto).



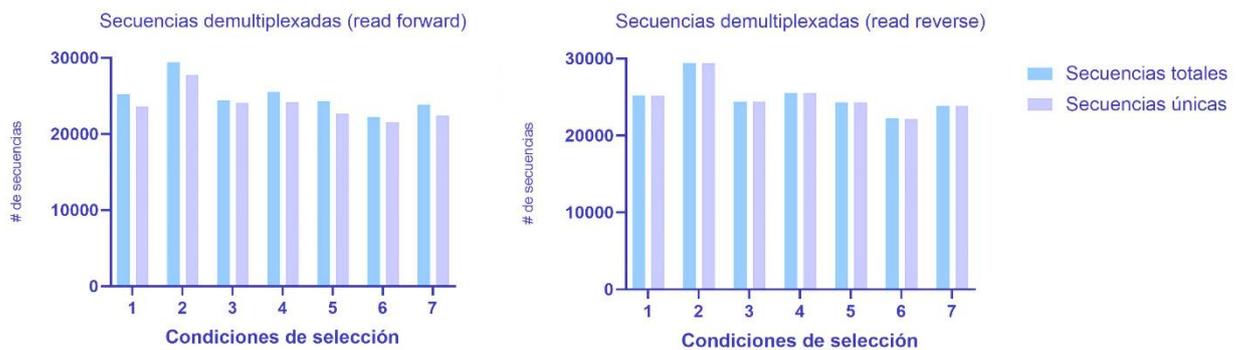
**Figura 14:**(Arriba) Estructura de las secuencias después de la segunda amplificación por PCR. (Abajo) Productos de PCR#2, PAGE al 12.5%, 250V durante 15 min, teñido con baño de SYBR Gold al finalizar la corrida. De izquierda a derecha, Ladder Amplisize, Blanco de PCR, productos de selección de X-Aptamers del tubo 1 al 7 (en el gel se cargaron 10  $\mu$ L de cada producto).



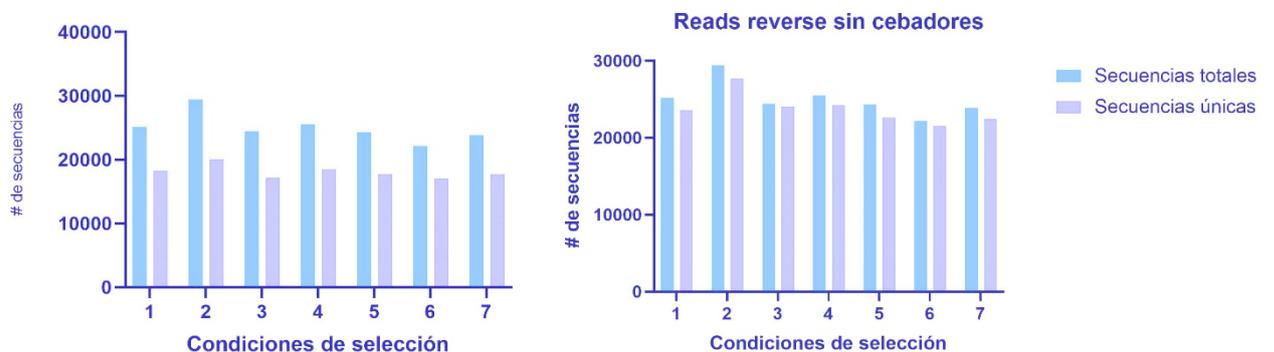
**Figura 15:** (Arriba) Estructura de las secuencias después de la tercera amplificación por PCR. (Abajo) Productos de PCR#3, gel de agarosa al 2%, 800V durante 35 min. De izquierda a derecha, Ladder, productos de selección de X-Aptamers del tubo 1 al 7 (en el gel se cargaron 3  $\mu$ L de cada producto).

### 3.4 Análisis bioinformático para la selección de las mejores secuencias candidatas a aptámeros

Se procedió a hacer la secuenciación a cargo de la empresa GenLab, proceso del cual se obtuvo data *demultiplex* de la secuenciación de próxima generación de los ácidos nucleicos seleccionados *in vitro* por SELEX. Se realizó un análisis estadístico de la diversidad de las secuencias obtenidas (Figuras 16 y 17), lo que permitió escoger con cuál data trabajar (data cruda demultiplexada, secuencias con cebadores recortados o secuencias filtradas en base a las lecturas por millón de nucleótidos).

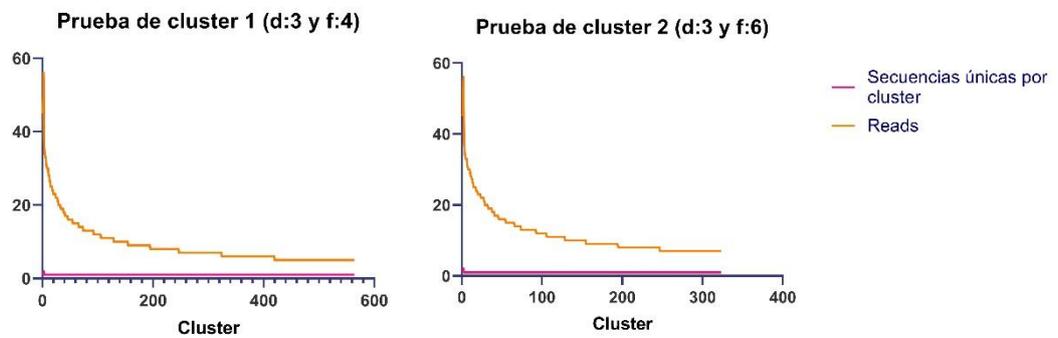


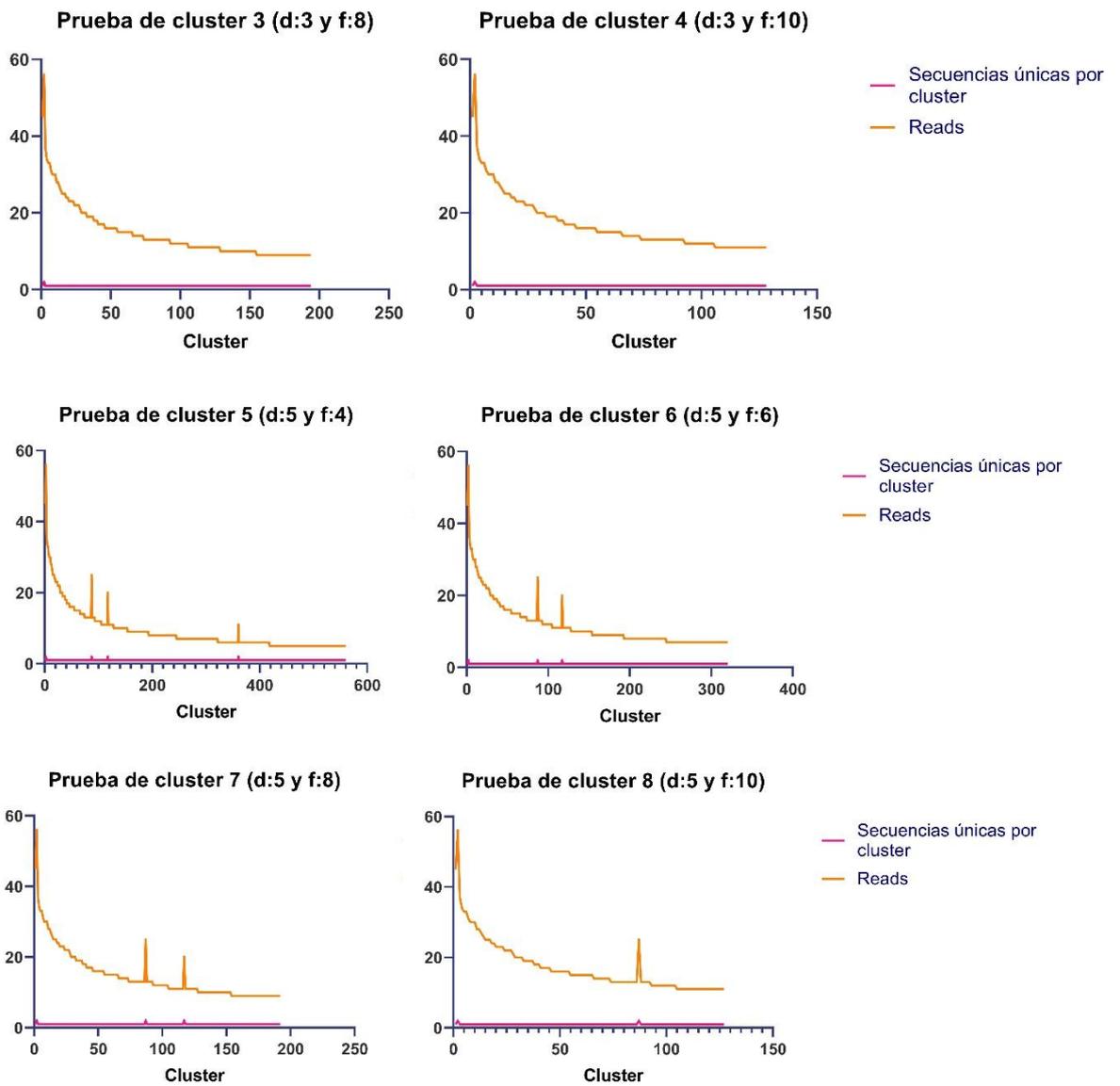
**Figura 16:** Diversidad de secuencias a partir de data demultiplexada en lecturas *forward* y *reverse*.

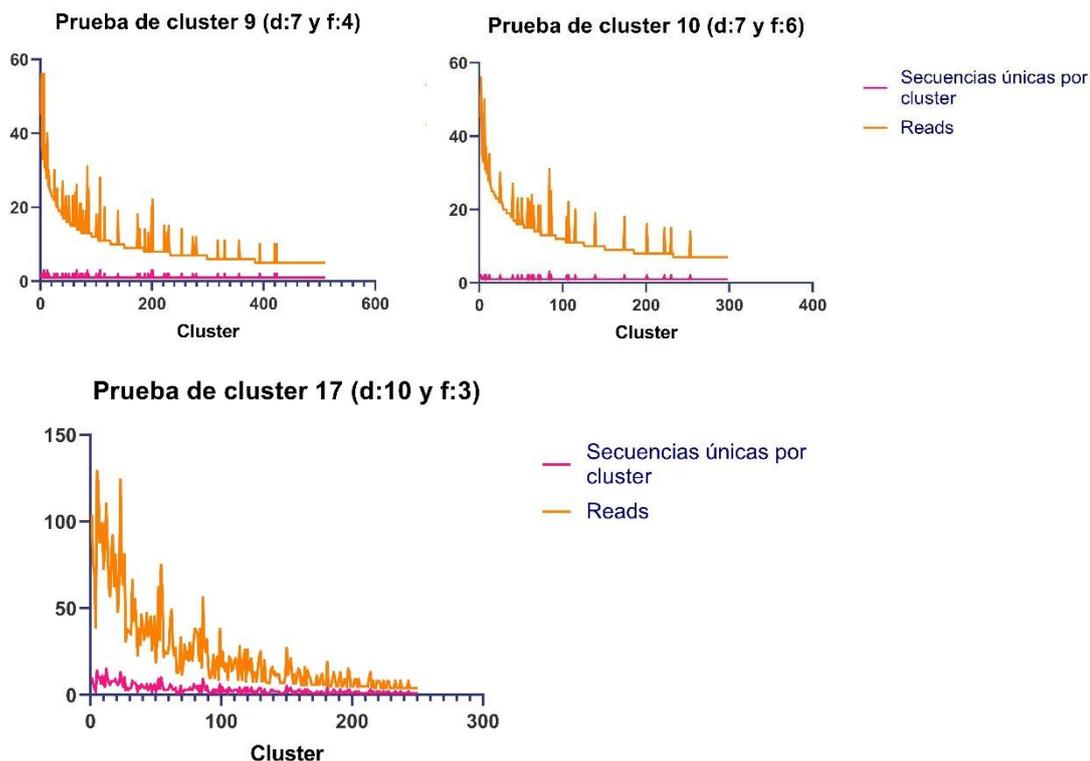


**Figura 17:** Diversidad de secuencias con cebadores recortados a partir de lecturas *forward* y *reverse*.

Se usó la data obtenida de las lecturas (*reads*) *forward* con los cebadores recortados, debido a la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ), entre el número de secuencias totales y secuencias únicas, hallada mediante un test de T de Student. A continuación, se evaluó la distancia de Leveshtein y la cantidad de lecturas por millón de nucleótidos mínima para filtrar y agrupar las secuencias en familias o *clusters*. En total se realizaron 17 pruebas con diferentes parámetros (Figura 18), con el fin de hallar las familias con secuencias más variadas, determinándose una distancia de Leveshtein de 10 pares de bases y un filtrado de aquellas secuencias que presenten menos de 3 lecturas por millón.







**Figura 18:** Análisis de diversidad de secuencias por *cluster* según valores de distancia de Leveshtein y filtrado (Pruebas de *cluster*).

Con las secuencias individuales y en familias se realizó el análisis de enriquecimiento para determinar aquellas secuencias con mayor cantidad de lecturas en presencia del péptido diana *versus* los controles de selección. Se logró identificar las cinco mejores secuencias candidatas a aptámeros por cada péptido diana usado (información no mostrada debido a que la patente está pendiente).

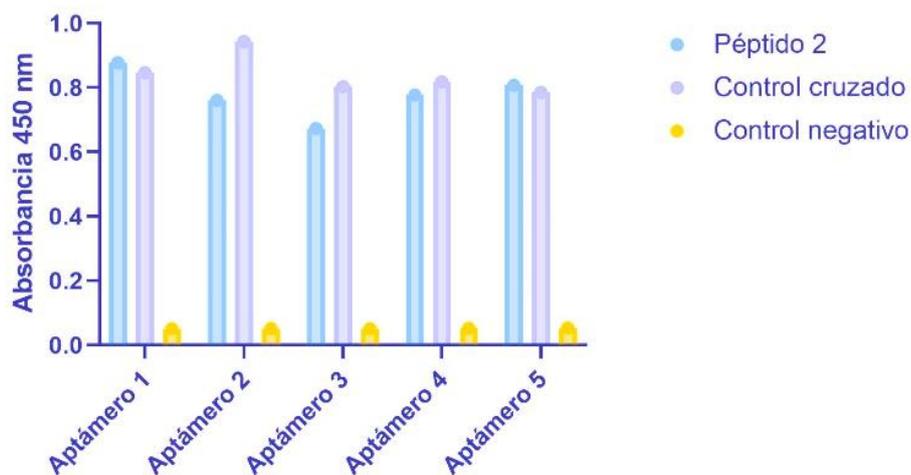
#### **6.4 Optimización de ELONA para péptidos y validación de unión entre dianas peptídicas y aptámeros**

Para la optimización de la técnica ELONA se probaron diferentes agentes bloqueantes, periodos de incubación y revelado, agentes para fijar los péptidos y controles que nos indiquen que la reacción funciona. La reducción del ruido de

fondo fue crucial para determinar cuáles aptámeros se desempeñan mejor, siendo más afines y específicos. Esto se logró mediante el doble bloqueo; el primero de ellos consiste en el bloqueo de la superficie expuesta después de la fijación de los pocillos con avidina y, el segundo, en la saturación de la avidina biodisponible después de la fijación de los péptidos diana biotinilados (Figura 19-20). Cabe resaltar que se usaron 2 controles para cada aptámero candidato:

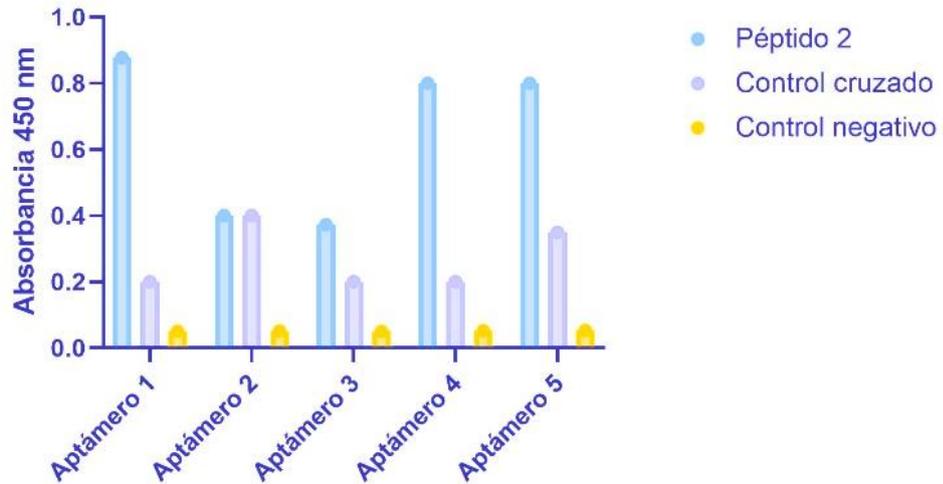
- el primer control, denominado control cruzado, consistió en usar los aptámeros candidatos para un péptido diana contra el péptido inespecífico (ejemplo: aptámeros específicos para el péptido 2 contra el péptido 3 como blanco); y
- el segundo, denominado control negativo, en el cual se incubó cada uno de los aptámeros candidatos usando el péptido 1, derivado de una proteína de membrana de *Leishmania braziliensis* (tabla en anexo), que no fue usado en la selección de aptámeros candidatos.

#### ELONA para el péptido 2 (sin bloqueo con biotina)

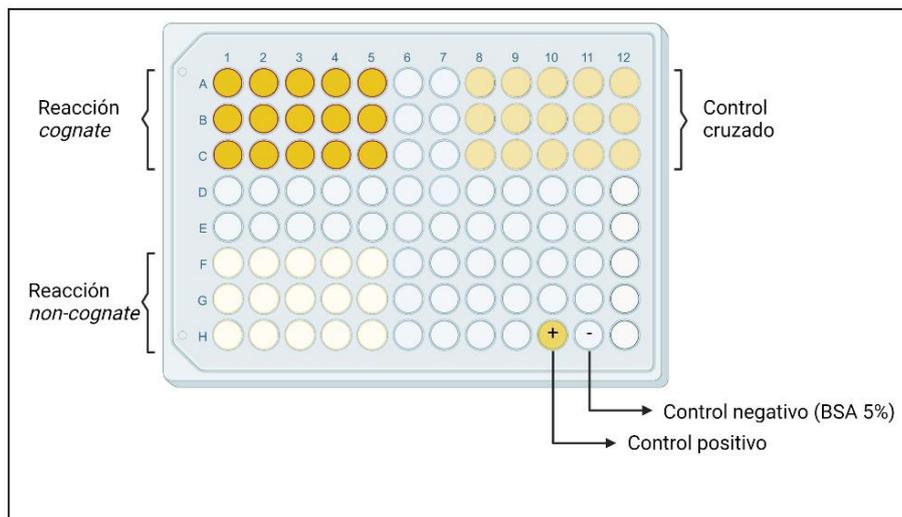


**Figura 19:** Validación de unión entre candidatos a aptámeros para el reconocimiento del péptido 2 mediante ensayos de ELONA, en condiciones de bloqueo simple con BSA al 1%

**ELONA para el péptido 2 (con bloqueo con biotina)**



**Figura 20:** Validación de unión entre candidatos a aptámeros para el reconocimiento del péptido 2 mediante ensayos de ELONA, en condiciones de doble bloqueo con BSA al 1% + biotina a 0,4  $\mu$ M (panel der.).

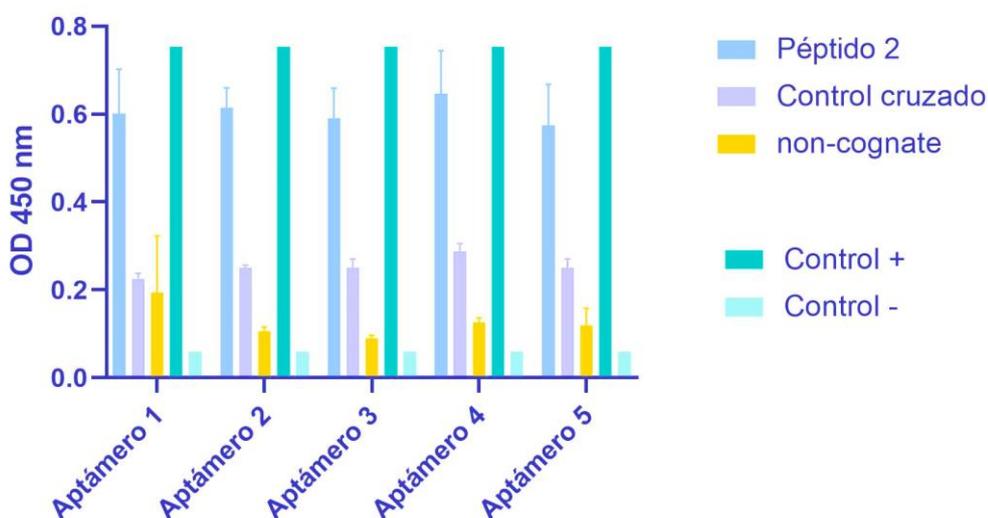


**Figura 21:** Distribución de reacciones por placa de 96 pocillos.

El control usado para corroborar que el sistema funcionaba fue un aptámero capaz de reconocer la cola de histidina presente en algunas proteínas recombinantes expresadas en *Escherichia coli*. En ese control positivo (Figura 8) del ensayo ELONA se empleó como diana la proteína recombinante IF8 de *Trypanosoma cruzi* que contiene una cola de histidina (*His tag*) (50). Los valores de absorbancia de este control positivo fluctuaron entre 0,5 y 0,75 en la mayoría de ensayos, es decir, fueron muy similares a los valores de absorbancia obtenidos con los aptámeros candidatos para el péptido 2 (Figura 22).

Realizando los experimentos por triplicado considerando los aptámeros candidatos específicos para el péptido 2, al ser los que obtuvieron mejor desempeño en la detección *in vitro* de las dianas mediante ELONA (Figura 21). Se puede observar que el desempeño de los aptámeros candidatos es similar al aptámero usado como control positivo, que reconoce la cola de histidina de IF8 (Figura 22).

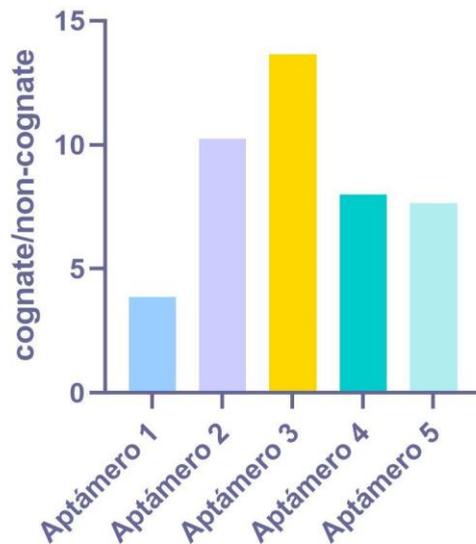
### Valores de absorbancia según tipo de unión para aptámeros del péptido 2



**Figura 22:** Valores de absorbancia mediante ensayos de ELONA para cada uno de los aptámeros candidatos seleccionados para el reconocimiento del péptido diana 2. El control cruzado corresponde a la reacción del aptámero determinado usando de diana el péptido 3 y el *non-cognate* corresponde al uso del péptido 1. Para el control positivo del ensayo se usó como diana a la proteína IF8 de *T.cruzi* con cola de histidina y para el control negativo se usó como diana a la proteína BSA al 5%.

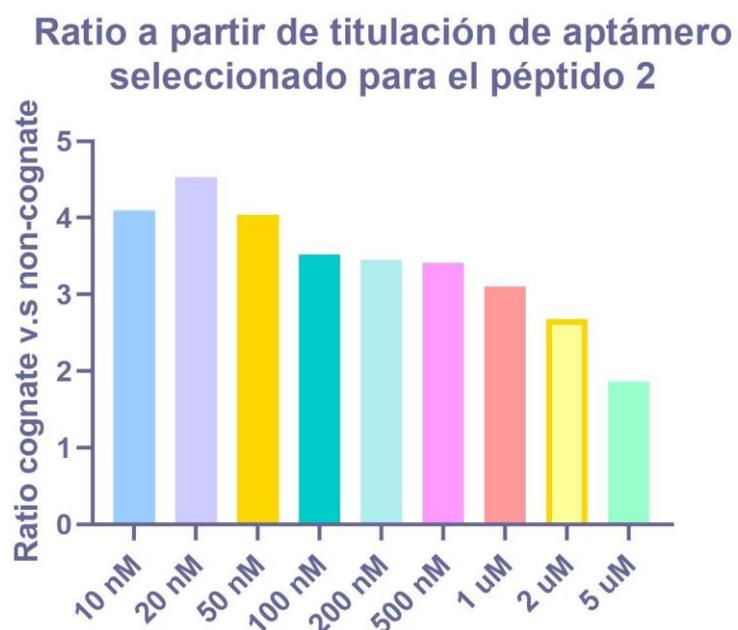
Con la optimización del sistema se pudo reconocer el mejor aptámero calculando la mayor proporción de unión específica entre uniones inespecíficas, usando los valores de ratio de absorbancia del ensayo ELONA para cada aptámero en reacciones con el péptido diana 2 (*cognate*) vs. el control negativo (péptido 1, *non-cognate*) (Figura 23).

### Proporción uniones específicas entre uniones inespecífica para aptámeros candidatos para el péptido 2



**Figura 23:** Proporción entre uniones específicas e uniones inespecíficas para la selección del mejor aptámero candidato para el péptido 2 por afinidad y especificidad. La reacción *cognate* corresponde a los aptámeros con su respectivo péptido diana (péptido 2) y la reacción *non-cognate* o control negativo corresponde a aptámeros en presencia del péptido 1. Ambas dianas se fijaron en concentraciones de 1  $\mu$ M.

En base a los resultados mostrados en la Figura 23, se realizó la titulación del aptámero 3 (mejor candidato) para el reconocimiento del péptido 2 usando como control negativo la reacción *non-cognate*. Se determinó la razón de los valores de absorbancia (reacción *cognate* con el péptido 2/reacción *non-cognate* con el péptido 1) para cada concentración de aptámero usada en el ensayo ELONA (Figura 24).



**Figura 24:** Titulación del aptámero 3 específico para el péptido 2 frente a la diana (en concentración de 1  $\mu\text{M}$ ) en la reacción *cognate* y *non-cognate* en el ensayo ELONA. Se muestra la razón de los valores de absorbancia de ambas reacciones.

## VII. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo como finalidad seleccionar, identificar y caracterizar aptámeros de ADN capaces de reconocer de manera específica a péptidos derivados de proteínas de membrana presentes en ambos estadios de *Leishmania braziliensis*. Particularmente, el estudio se centró en el péptido 2 correspondiente a la proteína de membrana transportadora de azúcar putativa (LbrM.35.2.211560:pseudogene) (anexo). El objetivo de este trabajo se logró mediante la aplicación de análisis bioinformático para la identificación de péptidos diana, el uso del kit X-Aptamers en el proceso de SELEX para la selección de secuencias candidatas a aptámeros, la secuenciación de próxima generación mediante Illumina seguida de la recopilación de las mejores secuencias candidatas mediante el programa FastAptamers y, finalmente, la caracterización y validación de unión cualitativa *in vitro* de los aptámeros al péptido diana mediante ensayos de ELONA. Los resultados con ELONA confirmaron un conjunto de 5 aptámeros prometedores contra el péptido 2.

Diversos estudios han demostrado que los análisis *in silico* realizados adecuadamente reducen en gran parte el costo y tiempo invertidos para la selección de biomarcadores con potencial para la detección de agentes patógenos y valor pronóstico (66). En el presente estudio, se evidencia cómo el oportuno uso de herramientas bioinformáticas es de gran ayuda para realizar un rápido *screening* de moléculas candidatas a ser dianas de captura. En estudios previos, se observa cómo estos análisis no sólo son clave en el proceso de selección de biomarcadores, sino también en la caracterización de aptámeros y validación de la interacción con sus respectivas moléculas dianas mediante

*docking* y dinámicas moleculares (52). Los análisis *in silico* permiten escoger la molécula diana según el uso que se le vaya a dar, ya sea, detección, captura de la célula diana (enriquecimiento), visualización, interferencia de la función proteica o *delivery* de sustancias para uso terapéutico. Asimismo, el análisis de proteínas y el uso de data de *ribosome profiling* fue crucial para escoger una diana adecuada: abundante, estable, conservada, expuesta y presente (expresada) en ambos estadios de *Leishmania braziliensis*.

Cabe resaltar que el uso de péptidos como dianas en lugar de proteínas para la selección de aptámeros ofrece ventajas a nivel de costo de producción, facilidad de manipulación, mayor estabilidad a largo plazo, además de la posibilidad de elegir en qué región se desea la interacción. Al usar una proteína como diana, la interacción se puede dar en el sitio activo de una enzima o un extremo terminal que carece de función, y el determinar el lugar específico requiere técnicas complejas como smFRET o cryoEM (67).

En cuanto a la metodología usada para la selección de secuencias candidatas a aptámeros, el proceso convencional es SELEX y éste presenta un porcentaje de éxito relativamente bajo (aproximadamente 70%). Este valor puede ser explicado a partir de los resultados de la secuenciación de cada una de las rondas de SELEX (68), que demuestran que, al momento de realizar la amplificación por PCR, en cada ciclo existe un margen de error por parte de la ADN polimerasa que genera mutaciones aleatorias en las secuencias unidas a la diana y esto reduce la probabilidad de encontrar las secuencias que originalmente se unían al *target* o diana en las primeras rondas de selección. Además, este proceso es trabajoso y demanda mucho tiempo de procesamiento

por la gran cantidad de rondas requeridas (típicamente 10-15) según la metodología convencional. Estudios donde se evalúa la evolución de las poblaciones de ácidos nucleicos conforme se van aumentando los ciclos de selección *in vitro* mediante SELEX demuestran que no es necesario realizar tantos ciclos de selección para obtener buenos ligandos candidatos (68).

Frente a esta problemática han surgido nuevas adaptaciones del SELEX convencional con el fin de facilitar la selección de aptámeros. En la presente investigación se usó el kit de selección de X-Aptamers (<https://www.genomeweb.com/resources/new-product/am-biotechnologies-x-aptamer-selection-kit>) (69), que permite la reducción del error generado por la ADN polimerasa en las múltiples amplificaciones por PCR realizadas en el SELEX convencional y la disminución del número de ciclos de selección necesarios para obtener secuencias enriquecidas. Esto se da debido a la gran cantidad de secuencias de ADN de hebra simple repetidas presentes en la superficie de cada perla magnética (*bead*) de poliestireno y la alta diversidad de secuencias por la región aleatoria de 40 nucleótidos de longitud en la biblioteca de ADN de este kit, con una complejidad teórica de  $\sim 10^8$  secuencias diferentes. La ventaja principal de la tecnología de X-aptamers es la capacidad de seleccionar secuencias candidatas a aptámeros para hasta 5 dianas diferentes simultáneamente mediante sólo dos rondas de selección. Además, la biblioteca de X-aptamers incluye nucleótidos modificados a fin de incrementar la estabilidad y especificidad de los aptámeros. De otro lado, la limitación de la tecnología de X-aptamers y, por tanto, del kit utilizado es el hecho que fue desarrollado con el fin de usar una diana proteica, con lo cual se debió adaptar

en este trabajo las concentraciones de diana peptídica usadas para saturar la superficie de las perlas magnéticas que interactúan con las perlas adheridas a secuencias que conforman la biblioteca. El presente estudio es el segundo en usar el kit X-Aptamers con péptidos diana con resultados exitosos, en lugar de emplear proteínas como diana como se especifica en el kit. El primer estudio que reporta el uso del kit de selección de X-Aptamers con dianas peptídicas seleccionó X-aptámeros contra péptidos derivados de la hormona liberadora de hormona del crecimiento (70).

El análisis de las secuencias candidatas a aptámeros, obtenidas a partir de la secuenciación de próxima generación (NGS), mediante la herramienta bioinformática FASTAptamer permitió filtrar las secuencias según sus valores de enriquecimiento bajo diferentes concentraciones de péptido diana empleadas en el método SELEX, así como valores de frecuencia por el número de lecturas obtenidas. Previamente, se ha reportado el uso de esta herramienta FASTAptamer acoplada a NGS para la selección rápida y efectiva de mejores secuencias candidatas (71).

En base a los resultados obtenidos de los ensayos de ELONA en el presente estudio, podemos concluir que esta metodología permite la caracterización primaria de aptámeros candidatos mediante la validación de la afinidad de los aptámeros por la molécula diana específica de manera cualitativa y la determinación de la especificidad usando diferentes dianas. En la presente investigación se demuestra que todas las secuencias de aptámeros candidatos presentan afinidad y especificidad por el péptido diana 2. No obstante, es necesario continuar con ensayos que permitan la determinación del valor de la

afinidad de unión (inversa a constante de disociación(Kd)) entre los aptámeros y la molécula diana, tales como el ensayo de *dot blot* y el análisis basado en la resonancia de plasmones de superficie (70). ELONA presenta diversas limitantes al usar ligandos inmovilizados a una placa, lo que evita la interacción libre entre ambos (72).

En estudios previos que usan ELONA para caracterizar a aptámeros candidatos es común el uso de la proteína BSA (albúmina de suero bovino) como control negativo. En el presente estudio se evaluó la especificidad con BSA. Sin embargo, se determinó que era necesario el uso de otro control que presente las mismas características de los péptidos diana usados. Por esta razón se decide usar el péptido 1, derivado de la proteína transportadora de cationes en *Leishmania braziliensis* (anexo), expuesto en la superficie de la membrana celular externa y presente en ambos estadíos del parásito. El péptido 1 cuenta además con la modificación de biotina en el extremo 5' para la fijación a la placa con avidina. Es decir, se buscó reproducir exactamente igual el sistema usado con los péptidos diana, para contar con un control robusto.

Cabe resaltar que el diseño *in vitro* experimental realizado en el presente estudio nos muestra el desempeño inicial de los aptámeros contra el péptido 2, con resultados prometedores que ameritan extender la evaluación usando lisados celulares (extractos de proteínas totales) de *Leishmania braziliensis*, obtenidos a partir de cultivos de la forma promastigote. Ello permitirá evaluar el desempeño de los aptámeros para el reconocimiento específico de la fracción de proteínas de membrana nativas de este parásito. En esa evaluación será importante incluir la fracción de proteínas solubles (antígeno soluble total)

obtenida durante la preparación de los extractos proteicos de *L. braziliensis*. Asimismo, se deberá verificar la especificidad usando de control negativo el lisado celular conteniendo todas las proteínas de otro microorganismo (por ejemplo, *E. coli*), tal como lo realizaron Moreno y col. (2003) cuando evaluaron los aptámeros seleccionados contra la proteína de membrana KMP-11 de *Leishmania infantum* (56). Análisis posteriores usando ensayos de inmunofluorescencia con células vivas de *L. braziliensis* y controles apropiados serán necesarios para validar la unión específica de los aptámeros seleccionados en este estudio a la proteína de membrana respectiva (a partir de la cual deriva el péptido 2 diana) en la superficie celular del parásito.

Hay escasos estudios previos de selección de aptámeros contra proteínas de *Leishmania* spp. y la mayoría de ellos se han realizado con el fin de encontrar blancos terapéuticos para contrarrestar el desarrollo del parásito a nivel intracelular (estadio amastigote de relevancia clínica). En el año 2002, Bhattacharyya y col. lograron identificar secuencias de ARN (aptámeros) con afinidad, a nivel nanomolar, por la membrana mitocondrial de *Leishmania tropica*. Estas secuencias poseían la capacidad de interactuar de manera cooperativa o antagonista en la membrana mitocondrial interna y eran homólogas a dominios de múltiples ARNt responsables de la traducción mitocondrial (73). El descubrimiento de estos aptámeros permitió dilucidar mecanismos moleculares implicados en la regulación del importe de ARNt citoplasmáticos a la mitocondria (kinetoplasto), propios de la biología de *Leishmania* spp.

Como se mencionó previamente, solo unos cuantos grupos de investigación han seleccionado aptámeros contra proteínas de *Leishmania* spp. con fines diagnósticos. Ramos y col. seleccionaron una población de aptámeros de ADN de hebra simple capaces de reconocer con alta afinidad la histona H2A de *L. infantum* usando la misma metodología de caracterización usada en el presente estudio (ELONA). En dicho estudio se observa que el BSA es usado de control para determinar que la población de aptámeros es específica para la histona H2A de *L. infantum* (74). También, Moreno y col. (2003), identificaron y caracterizaron una población de aptámeros específicos para la proteína de membrana KMP-11 de *L. infantum* (56). Siendo ésta una proteína presente en todos los kinetoplastidos y en ambos estadíos, es considerada una diana potencial para diagnóstico, captura o una vacuna contra la leishmaniasis. Cabe resaltar que dicho estudio constituye el primero que reporta aptámeros contra una proteína de membrana del parásito (56).

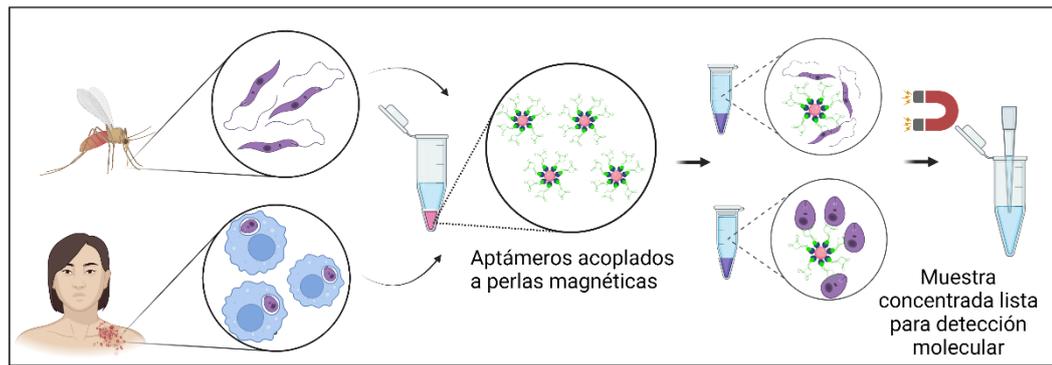
Los antecedentes de aptámeros reportados para *Leishmania* spp. se enfocan en especies prevalentes en el Viejo Mundo y no en Latinoamérica. En este contexto, es importante destacar que no existen estudios previos en los que se identifiquen aptámeros específicos para *Leishmania (Viannia) braziliensis* (principal agente causal de leishmaniasis cutánea y mucosa en Latinoamérica), por lo que el presente estudio constituiría el primero. Así como, el primero que identifica aptámeros con el fin de aplicarlos como herramienta de captura de células de *Leishmania*.

Para ello, es necesario evaluar la potencial aplicabilidad de los aptámeros identificados en el presente estudio como moléculas de alta afinidad con el

objetivo de capturar células de *L. braziliensis* y lograr así un método de enriquecimiento por células del parásito durante la preparación de muestras para fines de detección molecular (Figura 24). Debido a la baja carga parasitaria presente en lesiones de pacientes afectados por Leishmaniasis cutánea crónica y Leishmaniasis mucosa (75), se esperaría que un método de enriquecimiento celular que facilite la concentración de células de *Leishmania* a partir de distintas muestras biológicas podría aumentar la sensibilidad y especificidad de las herramientas diagnósticas para LTA. El desarrollo y optimización de dicho método de enriquecimiento celular, basado en aptámeros de captura funcionalizados (inmovilizados) a perlas magnéticas (Figura 24), deberá incluir la determinación del límite de detección en ambos estadios del ciclo de vida de *Leishmania* usando cultivos celulares de promastigotes y cultivos de macrófagos infectados con amastigotes del parásito. Seguidamente, para la validación del método se requerirá muestras de tejido de lesiones cutáneas provenientes de pacientes afectados por leishmaniasis cutánea.

Consistente con el abordaje propuesto como perspectiva futura del presente estudio, Nagarkatti y col. (2012) desarrollaron un método de concentración de parásitos basado en aptámeros para facilitar la detección molecular de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas en humanos (76). Los tripomastigotes, estadio infeccioso de este parásito, pueden detectarse en la sangre de personas infectadas por medio de métodos basados en PCR. No obstante, durante la fase inicial de la infección o durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, el número de parásitos en sangre suele ser muy bajo y, por tanto, no detectable por PCR. Nagarkatti y col. emplearon la estrategia de

'whole cell-SELEX' para seleccionar aptámeros de ARN que se unieran a tripomastigotes vivos (células enteras) de *T. cruzi*. Ellos lograron identificar aptámeros con alta afinidad de unión (Kd 8-25 nM) y alta especificidad para *T. cruzi*. El aptámero más afín (Apt68), biotinilado e inmovilizado a una fase sólida (perlas paramagnéticas conjugadas con streptavidina), fue capaz de capturar y agregar a parásitos vivos. Asimismo, Nagarkatti y col. proporcionaron la prueba de concepto para el uso de los aptámeros con la finalidad de concentrar parásitos a partir de muestras de sangre. Usando un magneto y muestras simuladas (sangre periférica conteniendo concentraciones conocidas de tripomastigotes), los agregados de parásitos unidos a las perlas magnéticas (funcionalizadas con el Apt68) pudieron ser purificados a concentraciones tan bajas como 5 parásitos en 15 ml de sangre completa, detectado por un ensayo de PCR en tiempo real. Este estudio muestra el potencial de los aptámeros como ligandos específicos de patógenos para la captura y concentración de éstos en muestras biológicas y con ello facilitar la detección molecular subsiguiente. Los resultados del estudio de Nagarkatti y col. apoyan la propuesta del uso de aptámeros biofuncionalizados a perlas magnéticas como herramienta para concentración de muestras a partir de sangre de pacientes infectados, sin embargo se considera un reto la optimización del sistema para su aplicabilidad con muestras de tejidos a partir de biopsias o raspados de pacientes afectados por LTA.



**Figura 24:** Perspectiva a futuro del uso de aptámeros funcionalizados para la captura y preconcentración (enriquecimiento) de células de *Leishmania* a partir de distintos tipos de muestras biológicas (muestras de lesiones de pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis o cultivos celulares de promastigotes), mediante el uso de perlas magnéticas.

Los aptámeros identificados en este estudio, de validarse su efectividad en futuros estudios con muestras biológicas y clínicas, podrían acoplarse a una plataforma biosensora (77, 78, 79).

A pesar de haber realizado la selección con péptidos diana propios de *L. braziliensis* en el presente estudio, se propone el uso de los aptámeros identificados para el reconocimiento de otras especies de *Leishmania* spp. causantes de LTA, tomando en cuenta la homología de la diana usada entre especies de *Leishmania*, mediante previo análisis bioinformático. Esto requiere ser confirmado experimentalmente.

Como se ha reportado previamente, las modificaciones químicas y la producción en masa, una vez comprobada la efectividad del aptámero, son de bajo costo y requieren poco tiempo, además de ser altamente adaptables a diferentes

plataformas. Asimismo, el acoplamiento de pruebas diagnósticas con herramientas de captura y concentración de muestra permite un aumento de la sensibilidad de la prueba *per se* y de la especificidad, debido a que la fase de captura constituye un paso extra de selección. Por esta razón, estudios como el presente se consideran un aporte muy valioso para el sector salud. Siendo la Leishmaniasis una de las enfermedades tropicales más desatendidas a nivel mundial y de alta prevalencia en Latinoamérica, el presente estudio pretende resaltar la importancia de la situación epidemiológica actual en Perú y contribuir a futuro con el desarrollo de nuevas tecnologías para la captura y detección de *Leishmania braziliensis* mediante herramientas moleculares.

## VIII. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se logró la identificación y caracterización de aptámeros capaces de reconocer de manera sensible y específica el péptido 2 derivado de una proteína de membrana presente en ambos estadíos de *Leishmania braziliensis*. Se resalta el enfoque bioinformático a partir de datos de niveles de expresión reportados previamente en estudios de *ribosome profiling* para determinar la diana que se propone como biomarcador de *Leishmania* spp. Según la literatura, este estudio constituye el segundo que usa péptidos como diana para la selección con el kit X-Aptamers con resultados exitosos. Finalmente, la optimización del ensayo ELONA y el análisis bioinformático fueron ambos clave en la evaluación y selección de los mejores aptámeros candidatos.

## **IX. LIMITACIONES**

La técnica ELONA funciona muy bien para realizar una caracterización de manera cualitativa. Sin embargo, ésta no permite determinar el valor de la afinidad de unión, puesto que la inmovilización de los ligandos influye y no permite que se dé una libre interacción entre éstos. Es necesario el uso de otras técnicas como termoforesis o resonancia de plasmones de superficie, previamente mencionados en otros estudios, para determinar dicho valor. La validación de unión *in vitro* no garantiza la unión en muestras provenientes de pacientes infectados por *Leishmania* spp.; por lo tanto, es necesario realizar experimentos futuros para determinar el desempeño de los aptámeros identificados.

## **X. RECOMENDACIONES**

Como perspectiva a futuro, se recomienda realizar nuevos experimentos que permitan la evaluación de la afinidad de los aptámeros con lisados celulares del parásito en ambos estadios obtenidos de cultivos *in vitro* y posteriormente con muestras clínicas, así como demostrar que no presenta falsos positivos en la detección por posibles proteínas presentes en los fluidos humanos. Una vez comprobada la afinidad de unión se propone la biofuncionalización de estos aptámeros para su uso en diversas plataformas de detección y enriquecimiento celular a partir de muestras clínicas.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Yon C. Situación epidemiológica de las leishmaniasis en el Perú, 2019. Boletín Epidemiológico del Perú. 2019; 28 (07): 195-196. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2019/08.pdf>
- (2) Sandoval-Juárez A, Minaya-Gómez G, Rojas-Palomino N, Cáceres O. Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud del Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2020;37:87-92.
- (3) Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. Expert review of anti-infective therapy. 2010;8(4):419-33.
- (4) Dunn MR, Jimenez RM, Chaput JC. Analysis of aptamer discovery and technology. Nature Reviews Chemistry. 2017;1(10):1-16.
- (5) OMS. MS Windows NT Kernel Description; 2022. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/Leishmaniasis>
- (6) Global Health DoPD, Malaria. About Leishmaniasis; 2020. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
- (7) Goto, Hiro, and José Angelo Lauletta Lindoso. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy* 8.4 (2010): 419-433.9.

- (8) Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous Leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*. 2007;7(9):581- 96.
- (9) Maudlin I, Eisler MC, Welburn SC. Neglected and endemic zoonoses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009;364(1530):2777-87.
- (10) Okwor I, Uzonna J. Social and economic burden of human Leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2016;94(3):489.
- (11) Carvalho CDP. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em municípios da Superintendência Regional de Saúde de Diamantina, Minas Gerais, Brasil. 2021.
- (12) Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends in parasitology*. 2006;22(12):552-7.
- (13) Hernandez-Bojorge SE, Blass-Alfaro GG, Rickloff MA, Gómez Guerrero MJ, Izurieta R. Epidemiology of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Nicaragua. *Parasite Epidemiology and Control*. 2020;11:e00192.
- (14) Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD. Geographic distribution and clinical description of Leishmaniasis cases in Peru. 2010.
- (15) Garrido-Jareño M, Sahuquillo-Torralba A, Chouman-Arcas R, Castro Hernández I, Molina-Moreno JM, Llavador-Ros M, et al. Cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis: experience of a Mediterranean hospital. *Parasites & vectors*. 2020;13(1):1-7.

- (16) Sunter J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology*. 2017;7(9):170165.
- (17) Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunological reviews*. 2011;240(1):286-96.
- (18) Podinovskaia M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiology*. 2015;10(1):111-29.
- (19) Brodskyn CI, de Oliveira CI. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Frontiers in immunology*. 2012;3:145.
- (20) Grimaldi Jr G, Tesh R. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews*. 1993;6(3):230-50.
- (21) Elmahallawy EK, Alkhaldi AA, Saleh AA. Host immune response against Leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;139:111671.
- (22) Martínez DY, Verdonck K, Kaye PM, Adui V, Polman K, Llanos Cuentas A, et al. Tegumentary Leishmaniasis and coinfections other than HIV. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(3):e0006125.
- (23) Zerpa O, Padrón-Nieves M, Ponte-Sucre A. American tegumentary Leishmaniasis. In: *Drug Resistance in Leishmania Parasites*. Springer; 2018. p. 177-91.
- (24) Veland N, Espinosa D, Valencia BM, Ramos AP, Calderon F, Arevalo J, et al. Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* kDNA from the urine of

Peruvian patients with cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2011;84(4):556.

(25) Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha MC, Oyafuso LK, Soler RC, Cotrim PC, et al. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of American tegumentary Leishmaniasis in a tertiary reference hospital. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2013;55:393-9.

(26) de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. Cutaneous Leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. American journal of clinical dermatology. 2015;16(2):99-109.

(27) Khan, Md Anik Ashfaq, *et al.* Development of quantitative rapid isothermal amplification assay for *Leishmania donovani*. Diagnostics 11.11 (2021): 1963.

(28) Travi, Bruno L., *et al.* Diagnostic efficacy of recombinase-polymerase-amplification coupled with lateral flow strip reading in patients with cutaneous Leishmaniasis from the Amazonas Rainforest of Peru. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 21.12 (2021): 941-947.

(29) Cossio, Alexandra, *et al.* "Diagnostic performance of a Recombinant Polymerase Amplification Test—Lateral Flow (RPA-LF) for cutaneous leishmaniasis in an endemic setting of Colombia." *PLoS neglected tropical diseases* 15.4 (2021): e0009291.

(30) Sriworarat, Chaichontat, *et al.* Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of *Leishmania* infection. Parasites & vectors 8 (2015): 1-8.

- (31) Javier SAE, Lozano JC, Carrasco IRZ. Leishmaniasis: epidemiological profile from a forgotten disease in Mexico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 2014;34(1):31-6.
- (32) Da Silva Nunes W, Araujo SR, Calheiros CML. Epidemiological profile of Leishmaniasis at a reference service in the state of Alagoas, Brazil, from January 2000 to September 2008. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(4):342-5.
- (33) Lamm R, Alves C, Perrotta G, Murphy M, Messina C, Sanchez JF, et al. Prevalence of and factors associated with negative microscopic diagnosis of cutaneous Leishmaniasis in rural Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2018;99(2):331.
- (34) Samir Cubas W, Centeno-Leguía D, Arteaga-Livias K, Depaz-López E. Revisión clínica y epidemiológica de la Leishmaniasis tegumentaria en una región central del Perú. *Revista chilena de infectología*. 2019;36(6):707- 15.
- (35) Pineda-Reyes J, Marín R, Tinageros-Zevallos A, Ramos AP, Alvarez F, Llanos-Cuentas A. Manipulación de lesiones en pacientes con Leishmaniasis cutánea: serie de casos en un hospital peruano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2020;37:265-9.
- (36) Nguyen Quang N, Bouvier C, Henriques A, Lelandais B, Ducong'e F. Time-lapse imaging of molecular evolution by high-throughput sequencing. *Nucleic acids research*. 2018;46(15):7480-94.

- (37) Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287):818-22.
- (38) Levine HA, Nilsen-Hamilton M. A mathematical analysis of SELEX. *Computational biology and chemistry*. 2007;31(1):11-35.
- (39) Carlson B. Aptamers: the new frontier in drug development? *Biotechnology healthcare*. 2007;4(2):31.
- (40) Kalra P, Dhiman A, Cho WC, Bruno JG, Sharma TK. Simple methods and rational design for enhancing aptamer sensitivity and specificity. *Frontiers in molecular biosciences*. 2018;5:41.
- (41) Martin LL, Unrau PJ, Müller UF. RNA synthesis by *in vitro* selected ribozymes for recreating an RNA world. *Life*. 2015;5(1):247-68.
- (42) Modh H, Scheper T, Walter JG. Aptamer-modified magnetic beads in biosensing. *Sensors*. 2018;18(4):1041.
- (43) Ospina-Villa JD, López-Camarillo C, Castañón-Sánchez CA, Soto Sánchez J, Ramírez-Moreno E, Marchat LA. Advances on aptamers against protozoan parasites. *Genes*. 2018;9(12):584.
- (44) Song KM, Lee S, Ban C. Aptamers and their biological applications. *Sensors*. 2012;12(1):612-31.
- (45) Dhiman A, Haldar S, Mishra SK, Sharma N, Bansal A, Ahmad Y, et al. Generation and application of DNA aptamers against HspX for accurate diagnosis of tuberculous meningitis. *Tuberculosis*. 2018;112:27-36.

- (46) Kumari P, Lavania S, Tyagi S, Dhiman A, Rath D, Anthwal D, et al. A novel aptamer-based test for the rapid and accurate diagnosis of pleural tuberculosis. *Analytical biochemistry*. 2019;564:80-7.
- (47) Bayra, C, Eyidogan F, Oktem HA. DNA aptamer-based colorimetric detection platform for *Salmonella enteritidis*. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;98:22-8.
- (48) Shin WR, Sekhon SS, Rhee SK, Ko JH, Ahn JY, Min J, et al. Aptamer based paper strip sensor for detecting *Vibrio fischeri*. *ACS Combinatorial Science*. 2018;20(5):261-8.
- (49) Li H, Li M, Yang Y, Wang F, Wang F, Li C. Aptamer linked CRISPR/Cas12a-based immunoassay. *Analytical Chemistry*. 2021;93(6):3209-16.
- (50) Peñaranda Manrique KL. Identificación de aptámeros que reconocen péptidos de *Trypanosoma cruzi*. 2018. Tesis para optar el grado de maestro en Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Disponible en: [https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/1407/Identificacion\\_PenarandaManrique\\_Katherin.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/1407/Identificacion_PenarandaManrique_Katherin.pdf?sequence=4&isAllowed=y)
- (51) Huanachin Carahuano F. SELEX para la producción de aptámeros a partir de péptidos de superficie provenientes de proteínas abundantes y secretadas por el quiste de *Taenia solium*. 2018. Tesis para optar el grado de maestro en Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Disponible en: [https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/3595/SELEX\\_HuanachinCarahuano\\_Felipe.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/3595/SELEX_HuanachinCarahuano_Felipe.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- (52) Joseph DF, Nakamoto JA, Garcia Ruiz OA, Peñaranda K, Sanchez Castro AE, Castillo PS, et al. DNA aptamers for the recognition of HMGB1 from *Plasmodium falciparum*. PloS One. 2019;14(4):e0211756.
- (53) Ramos E, Moreno M, Martin ME, Soto M, Gonzalez VM. *In vitro* selection of *Leishmania infantum* H3-binding ssDNA aptamers. Oligonucleotides. 2010;20(4):207-13.
- (54) Martín ME, García-Hernández M, Garcia-Recio EM, Gomez-Chacón GF, Sánchez-López M, González VM. DNA aptamers selectively target *Leishmania infantum* H2A protein. PLoS One. 2013;8(10):e78886.
- (55) Guerra-Pérez N, Ramos E, García-Hernandez M, Pinto C, Soto M, Martín ME, et al. Molecular and functional characterization of ssDNA aptamers that specifically bind *Leishmania infantum* PABP. PLoS One. 2015;10(10):e0140048.
- (56) Moreno M, Rincón E, Piñeiro D, Fernández G, Domingo A, Jiménez Ruiz A, et al. Selection of aptamers against KMP-11 using colloidal gold during the SELEX process. Biochemical and biophysical research communications. 2003;308(2):214-8.
- (57) Moreno M, Gonzalez V, Rincon DE, Domingo A, Dominguez E. Aptasensor based on the selective electrodeposition of protein-linked gold nanoparticles on screen-printed electrodes. Analyst. 2011;136(9):1810-5.
- (58) Bifeld E, Lorenzen S, Bartsch K, Vasquez JJ, Siegel TN, Clos J. Ribosome profiling reveals HSP90 inhibitor effects on stage-specific protein synthesis in *Leishmania donovani*. mSystems. 2018;3(6):e00214-8.

- (59) Alam KK, Chang JL, Burke DH. FASTAptamer: a bioinformatic toolkit for high-throughput sequence analysis of combinatorial selections. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2015;4:e230.
- (60) Drolet DW, Moon-McDermott L, Romig TS. An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nature biotechnology*. 1996;14(8):1021-5.
- (61) Kokpinar O, Walter J, Shoham Y, Stahl F, Scheper T. Aptamer-based downstream processing of His-tagged proteins utilizing magnetic beads. *Biotechnology and bioengineering*. 2011;108(10):2371-9.
- (62) Marchesini N, Docampo R. A plasma membrane P-type H<sup>+</sup>-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2002;119(2):225-36.
- (63) Rodriguez-Contreras D, Aslan H, Feng X, Tran K, Yates PA, Kamhawi S, et al. Regulation and biological function of a flagellar glucose transporter in *Leishmania mexicana*: a potential glucose sensor. *The FASEB Journal*. 2015;29(1):11-24.
- (64) Inbar E, Schlisselberg D, Suter Grottemeyer M, Rentsch D, Zilberstein D. A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates amino acid homeostasis and osmotic stress responses. *Biochemical journal*. 2013;449(2):555-66.
- (65) Aoki JI, Muxel SM, Zampieri RA, Acuña SM, Fernandes JCR, Van der linde RH, et al. L-arginine availability and arginase activity: characterization of amino

acid permease 3 in *Leishmania amazonensis*. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2017;11(10):e0006025.

(66) Agwa SH, Elghazaly H, Meteini MSE, Shawky SM, Ali M, Abd Elsamee AM, et al. *In Silico* Identification and Clinical Validation of a Novel Long Non-Coding RNA/mRNA/miRNA Molecular Network for Potential Biomarkers for Discriminating SARS CoV-2 Infection Severity. Cells. 2021;10(11):309

(67) Qiao Y, Luo Y, Long N, Xing Y, Tu J. Single-molecular Forster resonance energy transfer measurement on structures and interactions of biomolecules. Micromachines. 2021;12(5):492.

(68) Schutze T, Wilhelm B, Greiner N, Braun H, Peter F, Mmaniaorl M, et al. Probing the SELEX process with next-generation sequencing. PloS One. 2011;6(12):e29604.

(69) Lokesh GL, Wang H, Lam CH, Thiviyanathan V, Ward N, Gorenstein DG, et al. X-Aptamer selection and validation. In: Methods in Molecular Biology. 2017. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7138-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7138-1_10)

(70) Ayhan-Şahin B, Apaydın ZE, Obakan-Yerlikaya P, Arisan ED, Coker Gurkan A. Synthesis and characterization of novel ssDNA X-aptamers targeting Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH). Plos One. 2022;17(1):e0260144.

(71) Martínez-Roque MA, Franco-Urquijo PA, García-Velásquez VM, Choukeife M, Mayer G, Molina-Ramírez SR, et al. DNA aptamer selection for SARS-CoV-2 spike glycoprotein detection. Analytical biochemistry. 2022;645:114633.

- (72) Sypabekova M, Bekmurzayeva A, Wang R, Li Y, Nogues C, Kanayeva D. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for detection of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein MPT64. *Tuberculosis*. 2017;104:70-8.
- (73) Bhattacharyya SN, Chatterjee S, Adhya S. Mitochondrial RNA import in *Leishmania tropica*: aptamers homologous to multiple tRNA domains that interact cooperatively or antagonistically at the inner membrane. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(12):4372-82.
- (74) Ramos E, Pineiro D, Soto M, Abanades DR, Martín ME, Salinas M, et al. A DNA aptamer population specifically detects *Leishmania infantum* H2A antigen. *Laboratory investigation*. 2007;87(5):409-16.
- (75) Jara M, Adai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(6):1826-33.
- (76) 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):e43533. doi: 10.1371/journal.pone.0043533
- (77) Labib M, Berezovski MV. Electrochemical aptasensors for microbial and viral pathogens. *Biosensors based on aptamers and enzymes*. 2013:155-81.

(78) Wang Y, Wang B, Zhang Q, Xiong X, Deng S. Detection of pulmonary surfactant protein A by using an aptamer-based liquid crystal biosensor. *Analytical Methods*. 2018;10(24):2895-900.

(79) Wang Q, Yang Q, Wu W. Graphene-based steganographic aptasensor for information computing and monitoring toxins of biofilm in food. *Frontiers in microbiology*. 2020;10:3139.

## ANEXOS

	Proteínas	Código de acceso TriTrypDB
1	Transportador de cationes/ATPasa, N-terminal/E1-E2 ATPa/haloacida deshalogenasa-similar a hidrolasa, putativa	LbrM.18.2.205320
2	Transportador de azúcar y otros/ Superfamilia de Facilitador Mayor, putativa	LbrM.35.2.211560:pseudogene
3	Proteína transmembrana transportadora de aminoácidos, putativa	LbrM.10.2.000840
4	Proteína transmembrana transportadora de aminoácidos /Tryptófano/Tirosina Familia de permeasas, putativa	LbrM.22.2.207340:pseudogene

**Tabla 3:** Proteínas de *Leishmania braziliensis* a partir de las cuales derivan los péptidos diana seleccionados