



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSTGRADO

SELEX PARA LA PRODUCCIÓN DE  
APTÁMEROS A PARTIR DE PÉPTIDOS  
DE SUPERFICIE PROVENIENTES DE  
PROTEÍNAS ABUNDANTES Y  
SECRETADAS POR EL QUISTE DE  
*Taenia solium*.

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

HUANACHIN CARAHUANCO, FELIPE

**LIMA – PERÚ**  
**2018**



## **ASESORES**

Mirko Zimic Peralta, PhD

Pohl Milón Mayer, PhD

## **DEDICATORIA**

A mi familia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres porque están apoyándome constantemente en cada uno de los pasos que doy en la vida. En general, a mi familia por el gran soporte emocional.

A FONDECYT por el financiamiento de la beca completa de la maestría en Bioquímica y Biología Molecular. Al proyecto eBiophy por financiar parte de la tesis y parte de los insumos y equipos que se usaron en la tesis. A la Universidad Peruana Cayetano Heredia por brindarme los conocimientos y herramientas para convertirme en un investigador.

A mi asesor el Dr. Mirko Zimic y a la Dra. Patricia Sheen por sus consejos para el desarrollo del presente trabajo, por su apoyo en el diseño de la presente tesis.

Agradezco enormemente al Dr. Pohl Milón por brindarme el espacio en su laboratorio para trabajar y por su gran paciencia. Agradezco también a mis compañeros de trabajo Katherin Peñaranda, Diego Florián, Víctor Zegarra, José Alberto Nakamoto, Ana Sánchez y Pablo Soriano por su enorme apoyo y consejos.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

El presente proyecto fue financiado por Cienciactiva, BECA DE MAESTRIA.

Costos operativos fueron financiados por el proyecto eBiophy, bringing rapid  
diagnosis to remote locations, convenio Nr. 137-2016-FONDECYT.

Equipamiento utilizado en el proyecto fue adquirido gracias a proyectos  
financiados por INNOVATE PERU con convenios 382-PNICP-PIBA-2014 y  
297-INNOVATE PERU-EC-2016.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>5</b>
2.1. <i>Planteamiento del Problema</i> .....	5
2.2. <i>Marco Teórico</i> .....	6
2.2.1. <i>Taenia solium</i> .....	6
2.2.2. <i>Taeniasis y Cisticercosis</i> .....	8
2.2.3. <i>SELEX y aptámeros</i> .....	9
2.3. <i>Justificación del estudio</i> .....	13
2.4. <i>Hipótesis</i> .....	16
2.5. <i>Objetivos</i> .....	16
2.5.1. <i>Objetivo principal</i> .....	16
2.5.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	16
<b>III. METODOLOGÍA</b> .....	<b>18</b>
3.1. <i>Estudios Preliminares</i> .....	18
3.2. <i>Procedimientos y Técnicas</i> .....	19
3.2.1. <i>Selección de blancos para SELEX</i> .....	19
3.2.2. <i>Selección de péptidos de superficie</i> .....	20
3.2.3. <i>Metodología de SELEX por transcripción <i>in vitro</i></i> .....	22
3.2.4. <i>Metodología de SELEX por PCR emulsión</i> .....	34
3.2.5. <i>Prueba de Enriquecimiento</i> .....	38
3.2.6. <i>Secuenciamiento de bibliotecas del SELEX</i> .....	41
3.2.7. <i>Determinación de Interacción con el equipo de Stopped-Flow</i> .....	43
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
4.1. <i>Selección de Blancos para SELEX</i> . .....	49
4.2. <i>Péptidos de Superficie como blancos para SELEX</i> .....	51
4.3. <i>Producción de aptámeros contra péptidos de Ts18var1</i> .....	54
4.4. <i>Prueba de Enriquecimiento</i> .....	63
4.5. <i>Identificación de posibles aptámeros</i> . .....	66
4.6. <i>Determinación de la interacción los posibles aptámeros y el péptido pepFH_14</i> . 73	
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	<b>78</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>83</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>85</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>86</b>

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

### Figuras

Figura 1. Ciclo Infeccioso de *Taenia solium*.

Figura 2. Aptámeros vs Anticuerpos.

Figura 3. Esquema del Procedimiento SELEX.

Figura 4. Comprobación de la presencia de las 57 proteínas del metacéstode de *Taenia solium* en el genoma secuenciado por el laboratorio de Bioinformática (UPCH).

Figura 5. Esquema de los pasos para el diseño de Péptidos de Superficie.

Figura 6. Metodología SELEX por transcripción *in vitro*.

Figura 7. Esquema de la diferencia entre SELEX positivo y SELEX negativo.

Figura 8. Metodología de SELEX por PCR emulsión.

Figura 9. Prueba S1 de enriquecimiento.

Figura 10. Esquema del Análisis Bioinformático del Secuenciamiento de las rondas del SELEX por transcripción *in vitro*.

Figura 11. Diseño de Experimento para Stopped – Flow.

Figura 12. Diseño del péptido pepFH\_14 en la proteína Ts18var1

Figura 13. Metodología de SELEX por PCR emulsión.

Figura 14. Condiciones de rigurosidad para la metodología SELEX por transcripción *in vitro*.

Figura 15. Controles de proceso dentro de una ronda de SELEX por transcripción *in vitro*.

Figura 16. Rondas de SELEX por transcripción *in vitro* para rondas s1, s4, s6, s8 y s10.

Figura 17. Resultado de la Prueba S1 de Enriquecimiento en las muestras de SELEX de las rondas 10 y 11 (s.10 y s.11) para los péptidos pepFH\_11 y pepFH\_14. Gel de Agarosa 3%.

Figura 18. Secuencias únicas en las rondas del SELEX.

Figura 19. Identificación de motivos en los grupos de secuencias dentro de la biblioteca de la ronda 10 del SELEX.

Figura 20. Predicción de la estructura secundaria de los aptámeros más enriquecidos de la ronda 10 del SELEX.

Figura 21. Aptámero\_1R1.

Figura 22. Especificidad del Aptámero\_1R1.

Figura 23. Titulación del Aptámero\_1R1.

## **Tablas**

Tabla 1. Condiciones de rigurosidad para la metodología SELEX por transcripción *in vitro*.

Tabla 2. Blast local de las 57 proteínas del secretoma teórico de *Taenia solium*.

Tabla 3. Lista de péptidos de superficie de las proteínas blanco para SELEX.

Tabla 4. Lista de posibles aptámeros.

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
ssDNA	single-stranded Deoxyribonucleic acid
dsDNA	doble-stranded Deoxyribonucleic acid
EITB	Enzime-linked immunoelectrotransfer blot
ELISA	Enzime-linked ImmunoSorbent assay
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
LLGP	Lentil lectin Glycoproteins
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
M	Molar
mL	mililitro
NCC	Neurocisticercosis
nm	nanómetro
nM	nanoMolar
OMS	Organización Mundial de la Salud
pmoles	picomoles
Quencher	Molécula que absorbe fluorescencia.
ug/mL	microgramos por mililitro
uL	microlitro

## RESUMEN

La neurocisticercosis es la causa más común de epilepsia adquirida en adultos en el mundo, y una de las enfermedades zoonóticas más importantes asociadas al sistema nervioso central (SNC). La neurocisticercosis se debe al establecimiento del cisticerco de *Taenia solium* en el SNC del ser humano, actuando éste como hospedero intermediario accidental. Actualmente, se sabe que varias proteínas, usadas ampliamente en diagnóstico, son secretadas por el cisticerco al líquido cefalorraquídeo y, posteriormente, a la sangre. Varias de estas proteínas se encuentran en mayor abundancia en el secretoma del cisticerco. Aunque existen trabajos en la identificación de anticuerpos monoclonales afines a estas proteínas, existen otras metodologías que no han sido aplicadas aún en la neurocisticercosis. Una de estas tecnologías es el uso de aptámeros que se obtienen mediante la selección evolutiva de enriquecimiento de secuencias de ácidos nucleicos de hebra simple (SELEX). Los aptámeros desarrollan alta afinidad por su blanco gracias a interacciones de naturaleza no covalente como, por ejemplo, puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, hidrofóbicas y electrostáticas. En el presente trabajo se planteó adaptar una metodología de SELEX para producir aptámeros contra las proteínas abundantes del cisticerco utilizando péptidos superficiales provenientes de dichas proteínas. Se seleccionaron 14 proteínas como buenos blancos para la producción de aptámeros, siendo estos: la familia de 8KDa (Ts18, Ts14, TsRS1, TsRS2 y Ts8B2), GP50, T24, 14-3-3 (e y z), tioredoxin peroxidasa, trypsin-like protein, catepsina L, immunogenic protein Ts11 y la enolasa. De las dos metodologías de SELEX que se probaron, con la metodología SELEX por

transcripción *in vitro* se pudo producir aptámeros para péptidos superficiales de la proteína Ts18var1 en la ronda 10 del SELEX. Esta producción se evidenció satisfactoriamente con la prueba S1, mientras que con el secuenciamiento de las rondas del SELEX se confirmó el enriquecimiento y se identificaron las secuencias enriquecidas. Dentro del secuenciamiento, el aptámero 1R1 mostró un enriquecimiento de 7300 veces en la población de secuencias. Así mismo, mostró afinidad hacia el péptido pepFH\_14 proveniente de la proteína TS18var1. La afinidad fue determinada cuantitativamente mediante titulación y se determinó que fue de 0.4 uM.

Palabras Clave: *Taenia solium*, Neurocisticercosis, Aptámeros, SELEX, péptidos, Secretoma.

## ABSTRACT

Neurocysticercosis is the most common cause of epilepsy acquired in adults in the world, and one of the most important zoonotic diseases associated with the central nervous system (CNS). Neurocysticercosis is due to the establishment of the cysticercus of *Taenia solium* in the CNS of the humans, acting as an accidental intermediate host. It is now known that several proteins, widely used in diagnosis, are secreted by the cysticercus into the cerebrospinal fluid and, subsequently, into the blood. Several of these proteins are found in greater abundance in the secretome of the cysticercus. Although there are works in the identification of monoclonal antibodies related to these proteins, there are other methodologies that have not yet been applied in neurocysticercosis. One of these technologies is the use of aptamers that are obtained through the evolutionary selection or enrichment of single-stranded nucleic acid sequences (SELEX). Aptamers develop high affinity for their target through non-covalent interactions such as hydrogen bonds, ionic, hydrophobic and electrostatic interactions. In the present work, it was proposed to adapt a methodology of SELEX to produce aptamers against the abundant proteins of the cysticercus using superficial peptides from these proteins. 14 proteins were selected as good targets for the production of aptamers, these being: the family of 8KDa (Ts18, Ts14, TsRS1, TsRS2 and Ts8B2), GP50, T24, 14-3-3 (e and z), thioredoxin peroxidase, trypsin-like protein, cathepsin L, Ts11 immunogenic protein and enolase. Of the two SELEX methodologies that were tested, with the SELEX methodology by *in vitro* transcription it was possible to produce aptamers for surface peptides of the Ts18var1 protein in round 10 of the SELEX. This

production was evidenced satisfactorily with the S1 test, while with the sequencing of the SELEX rounds the enrichment was confirmed and the enriched sequences were identified. Within the sequencing, aptamer 1R1 showed an enrichment of 7300 times in the sequence population. Likewise, it showed an affinity for the pepFH\_14 peptide from the TS18var1 protein. Affinity was determined quantitatively by titration and determined to be 0.4 uM.

Key words: *Taenia solium*, Neurocysticercosis, Aptamers, SELEX, Peptide, Secretome.

## I. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis y la teniasis son enfermedades zoonóticas parasitarias causadas por *Taenia solium* en diferentes etapas del desarrollo del parásito (1). El gusano adulto solo causa teniasis en el humano, mientras que el quiste o cisticerco causa cisticercosis naturalmente en el cerdo, pero accidentalmente el cisticerco también puede instaurarse en el humano y causar cisticercosis (2). Estas enfermedades causadas por el mismo agente infeccioso han sido descuidadas a pesar del impacto significativo que tienen en la salud pública y en la economía (3). La Organización para la Agricultura y Alimentación de la Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha clasificado como la primera en la escala mundial de parásitos transmitidos por los alimentos (4).

La patogenicidad de *Taenia solium* está asociada a su ciclo de vida complejo ya que este parásito presenta dos hospederos, uno definitivo y el otro intermediario. El hospedero definitivo es el ser humano, en el cual se alberga la forma adulta y provoca la teniasis (5). La teniasis es una enfermedad asintomática en la cual el gusano se establece en la pared del intestino delgado del hospedero mediante el uso de sus ventosas y ganchos (6). Por otro lado, cuando el cerdo, criado en libertad, consume heces contaminadas con huevos de *T. solium* se convierte en el hospedero intermediario en el cual la etapa larval provoca la cisticercosis (7). La cisticercosis consiste en el establecimiento de la larva en los músculos o en el cerebro del cerdo. Para que esto ocurra el huevo debe atravesar la pared del intestino y llegar al

torrente sanguíneo desde donde viajará a cualquier parte del organismo (7). Cuando el ser humano consume carne porcina infectada y mal cocida puede ingerir los quistes viables del platelminto y, por ende, es propenso a desarrollar la teniasis cerrando el ciclo de vida de *T. solium*. Sin embargo, es posible desarrollar accidentalmente una cisticercosis humana, es decir la persona ingiere huevos del gusano por contaminación de heces provenientes de una persona teniásica (6). La oncosfera se establece en los músculos o en el sistema nervioso central, de manera similar al cerdo. Cuando la forma larval se establece en el sistema nervioso central se desarrolla la neurocisticercosis (NCC) (5).

La NCC es endémica en Latinoamérica, Indonesia, África, China y partes de la India, siendo las convulsiones una de las manifestaciones clínicas más comunes de esta enfermedad (8). Aproximadamente el 30% de los casos de convulsiones en el Perú se deben a la neurocisticercosis (2). Otra de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad es la hidrocefalia y la hipertensión intracraneal (1). El Perú es considerado un país endémico para esta enfermedad, dada su alta prevalencia e incidencia a lo largo de la sierra, costa norte y selva alta, siendo de suma importancia su diagnóstico y control (3).

El diagnóstico definitivo se alcanza mediante los datos epidemiológicos, los ensayos serológicos y el análisis por tomografía axial computarizada o una resonancia magnética. Sin embargo, estas últimas son técnicas de elevado costo para la mayor parte de los afectados, siendo las más usadas las pruebas serológicas e inmunológicas (9). La prueba inmunológica más usada es un Western blot (WB)

o EITB (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot), el cual se basa en la detección de anticuerpos anti cisticercos para glicoproteínas (10). Si bien se ha reportado que el WB posee una sensibilidad de 100% y una especificidad de 98%, estos pueden bajar hasta el 60% en pacientes con un solo quiste (11). Por otro lado, el diagnóstico clínico se dificulta por la sintomatología compartida con otros desórdenes neurológicos (12).

Las pruebas de inmunodiagnóstico que buscan detectar anticuerpos circulantes tienen el problema de que solo miden exposición o memoria de infecciones pasadas resueltas (13). Por lo tanto, son necesarias pruebas alternativas que determinen la presencia directa del parásito. Esto se puede conseguir con ensayos que detecten la presencia de antígenos del parásito en circulación (14).

Por otro lado, existen actualmente tecnologías que seleccionan moléculas de propiedades similares a los anticuerpos, pero con origen sintético: los aptámeros, oligonucleótidos seleccionados con la metodología SELEX por afinidad a un determinado blanco. El acrónimo SELEX hace referencia a ensayos sistemáticos *in vitro* de enriquecimiento de afinidad (15,16). A diferencia del Western blot, los aptámeros, así como los anticuerpos monoclonales, pueden ser útiles para detectar la presencia directa del patógeno; por lo tanto, sirven para detectar infección actual, y no tienen sesgo frente a la memoria inmunológica (17).

Actualmente, para el desarrollo de pruebas diagnósticas se busca trabajar con proteínas purificadas del patógeno que se desea detectar o, en su defecto, con

proteínas recombinantes. Sin embargo, ambas técnicas implican limitaciones de producción. La expresión y purificación de proteínas recombinantes de origen eucariota es muy costosa y ningún sistema de expresión eucariota asegura producir las mismas modificaciones de las proteínas nativas de interés (18). Una alternativa viable implica el uso de herramientas bioinformáticas para predecir péptidos de superficie a partir del secretoma del patógeno seguida de una síntesis química de los mismos (19). Dicha aproximación reduce el costo en la producción de potenciales biomarcadores para el desarrollo de pruebas diagnósticas a base de anticuerpos y/o aptámeros (20).

En este trabajo proponemos estandarizar la metodología SELEX para producir bibliotecas enriquecidas con probables aptámeros dirigidos contra péptidos de superficie elegidos por su alta especificidad en proteínas abundantes y secretadas del cisticerco de *T. solium*. Estos aptámeros podrían evaluarse en futuros estudios como potenciales herramientas diagnósticas, de investigación e incluso con fines terapéuticos, como se ha realizado para otros agentes infecciosos (21).

## II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1. Planteamiento del Problema

La Neurocisticercosis, al ser una enfermedad olvidada, tiene recursos limitados para su investigación desde el punto de vista de las ciencias básicas o desde el punto de vista aplicativo (diagnóstico, terapia, etc.). La enfermedad es endémica en países en vías de desarrollo, que paradójicamente no poseen los recursos e infraestructura para realizar una diagnosis certera (TAC, RMC). La problemática se acentúa aún más considerando que las poblaciones más afectadas son de zonas rurales, zonas de pobreza y pobreza extrema y desprotegidas por sistemas de salud. Los métodos más económicos de detección se basan en la detección de anticuerpos de la respuesta inmunológica del paciente. Sin embargo, esta detección presenta desventajas debido a la memoria de la respuesta inmune. Por lo tanto, la detección directa del quiste o de proteínas secretadas (o partes de ellas) por el quiste es una alternativa que evita las limitaciones arriba mencionadas.

El uso de los aptámeros ha mostrado bastante utilidad, tanto para el diagnóstico directo, como para el uso terapéutico (22). Los aptámeros, al igual que los anticuerpos monoclonales son tecnologías que se basan en desarrollar moléculas de alta afinidad por un blanco de interés (15,16). A diferencia de los anticuerpos monoclonales, los aptámeros presentan afinidades que llegan a rangos entre nanomolar y picomolar (23); se producen completamente *in vitro*; son altamente reproducibles y fáciles de manipular para ser implementados como biosensores. Además, los aptámeros son mucho más baratos de producir que los anticuerpos.

Esto es debido a que la producción se realiza sintéticamente en base a la secuencia del aptámero.

Finalmente, el uso de los aptámeros en reemplazo de los anticuerpos para la detección de antígenos liberados por el quiste de *Taenia solium* serviría para el diagnóstico directo de la neurocisticercosis. El diagnóstico directo sería útil en regiones endémicas como el Perú.

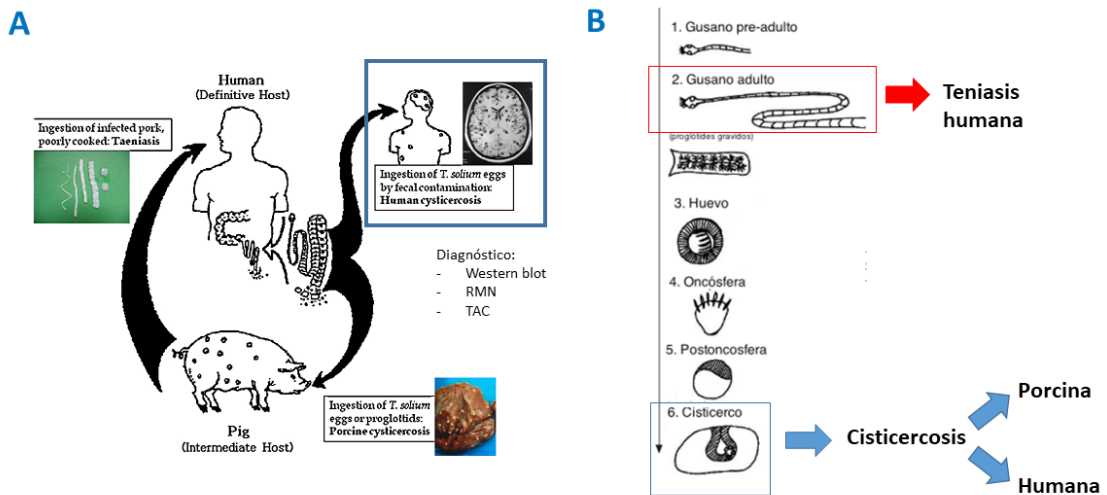
## **2.2. Marco Teórico**

### *2.2.1. Taenia solium*

*T. solium* es un gusano plano, su anatomía está conformada por un escólex y un estróbilo. El escólex tiene un grupo de ganchos y cuatro ventosas, que le sirven para adherirse a la pared interna del intestino del hospedero. El estróbilo está compuesto por varios segmentos unidos, los cuales se denominan proglótidos que se originan en el cuello del parásito, y se van desarrollando a lo largo del cuerpo. En la parte final del gusano, se encuentra el proglótido ya desarrollado y maduro que presenta órganos sexuales que pueden autofecundarse; y, además, el proglótido grávido que contiene los huevecillos que están listos para ser liberados. Debido a que este parásito carece de tracto digestivo, en la parte superficial presenta extensiones pequeñas llamadas microtricas para absorber nutrientes y secretar desechos. El huevecillo contiene a la oncósfera, la cual presenta seis ganchos, y está protegida por una estructura proteica denominada embrióforo. El cisticerco,

llamado también metacéstode, es de característica translúcida que contiene a la larva de *T. solium* (24).

En el ciclo biológico de *T. solium* (Figura 1), se tiene al cerdo como hospedero intermediario y al humano como hospedero definitivo. El humano se contagia cuando ingiere carne de cerdo infectada con larvas, las cuales llegan al tracto digestivo, son liberadas por los jugos gástricos y se adhieren a la pared intestinal. Estas crecen y desarrollan proglótidos, que pueden autofecundarse y producir huevos, y que son expulsados mediante las heces (24). Las localizaciones más comunes son el tejido subcutáneo, los músculos, el sistema nervioso central y los ojos (2); cuando se alojan en los músculos o tejido subcutáneo, muchas veces no produce sintomatología, pero cuando las oncósferas atraviesan la barrera hematoencefálica y se alojan en el sistema nervioso central, se produce la Neurocisticercosis.



**Figura 1.** Ciclo Infeccioso de *Taenia solium*. **A)** El ser humano es el hospedero definitivo que alberga la etapa de gusano adulto desarrollando teniasis, mientras que el cerdo es el hospedero intermedio que alberga la etapa larval o cisticerco desarrollando cisticercosis. El ser humano puede convertirse en hospedero intermedio accidental desarrollando cisticercosis humana. La neurocisticercosis consiste en el establecimiento del cisticerco en el sistema nervioso central (SNC). **B)** Diagrama representativo de las diferentes etapas de desarrollo de *T. solium*. Adaptado de Mahanty S. & García HH 2009 y Singh, 2002.

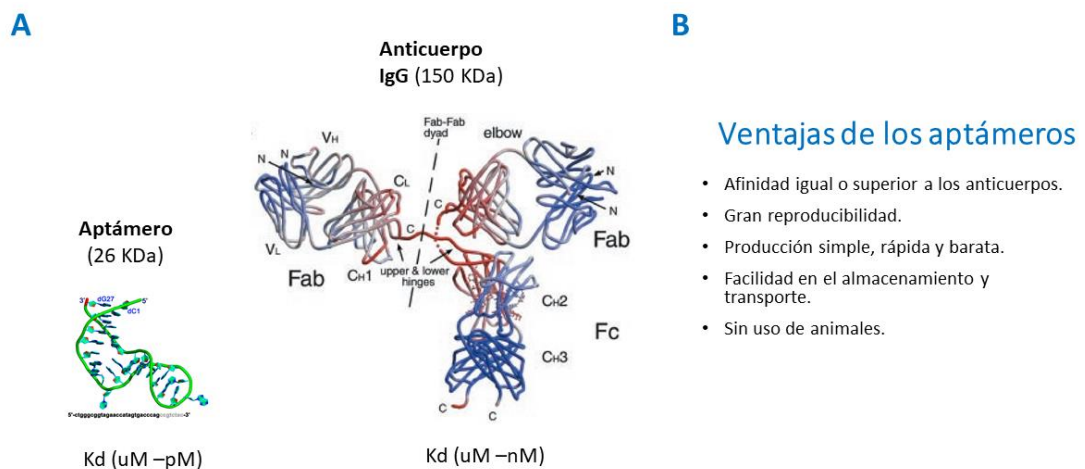
### 2.2.2. Taeniasis y Cisticercosis

La Teniasis o infección por el gusano adulto ocurre solo en el hospedero humano, causa una infección intestinal, cursa asintómicamente o produce síntomas digestivos leves e inespecíficos (24). Una vez que la larva es evaginada en el intestino delgado, la cabeza del parásito (escólex) se aferra de la mucosa y en un periodo de tiempo va formando segmentos a lo largo de su cuerpo (proglótidos). Alrededor de dos meses después de la infección, los proglótidos grávidos se separan del extremo distal y son excretados en las heces. Cada segmento contiene alrededor de cincuenta mil a sesenta mil huevos fértiles (6).

La cisticercosis es una parasitosis causada por el metacéstodo de *T. solium*, larva que tiene gran capacidad de invasión de tejidos como el músculo esquelético, tejido celular subcutáneo y músculo cardíaco (26). Los humanos adquieren la cisticercosis a través de la contaminación fecal-oral con huevos del gusano adulto; además, otro medio de infección es por medio de agua contaminada. La localización que genera mayores complicaciones, letalidad o secuelas es en el sistema nervioso central que constituye un serio problema de salud pública (27), produciendo un cuadro de neurocisticercosis cuyas manifestaciones clínicas son variadas y dependen de la ubicación, cantidad, forma de las vesículas parasitarias y la respuesta inmunitaria propia del paciente (28); generando diferentes tipos de neurocisticercosis (NCC). Como ejemplo, en el caso de la ubicación del quiste se presentan dos casos de neurocisticercosis: NCC intraparenquimal y NCC extraparenquimal (29). Estos casos tienen diferente pronóstico y diferente tratamiento, por lo que su diferenciación con el diagnóstico es muy importante.

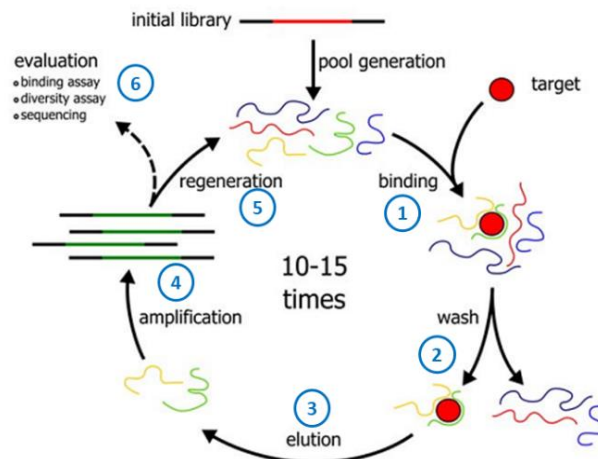
### 2.2.3. SELEX y aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos de hebra simple entre 60 a 150 nucleótidos (ssDNA o RNA) que son seleccionados de una biblioteca combinatorial sintética (16). Los aptámeros son seleccionados mediante ensayos *in vitro* de afinidad entre un conjunto general de la biblioteca y una proteína diana (15). Los aptámeros poseen una estructura tridimensional específica que depende principalmente de su secuencia. Dicha estructura le permite interactuar con la superficie de las proteínas diana de manera similar a los anticuerpos (Figura 2) (30). En los últimos años, la tecnología de los aptámeros ha sido usada en un amplio rango de técnicas de diagnóstico y aplicaciones terapéuticas (31). Como un ejemplo, cabe mencionar que estas estrategias están siendo usadas actualmente para desarrollar aptámeros específicos contra proteínas diana asociadas a la patogenicidad y virulencia de tripanosomátidos (32).



**Figura 2.** Aptámeros vs Anticuerpos. **A)** Comparación del tamaño y complejidad estructural entre el aptámero y el anticuerpo. El aptámero es un ácido nucleico de hebra simple, mientras que el anticuerpo es un complejo proteico. Los aptámeros pesan es promedio 26 KDa mientras que los anticuerpos promedian los 150 KDa. **B)** Breve resumen de las ventajas de los aptámeros sobre los anticuerpos. Los aptámeros han mostrado afinidad al blanco con valores similares o superiores a los alcanzados por los anticuerpos (Jing & Bowser 2010). Adaptado de Cheung YW *et al.* 2013 y Saphire EO *et al.* 2001

La manera de producir aptámeros es mediante un método denominado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). El método SELEX es un protocolo cíclico de presión evolutiva para selección de secuencias que cada ronda se hacen más afines a la molécula blanco que se haya elegido (Figura 3). El procedimiento SELEX está caracterizado por emplear bibliotecas aleatorizadas de oligonucleótidos de hasta  $10^{12} - 10^{15}$  moléculas diferentes de ácidos nucleicos, los cuales forman, al menos, el mismo número de estructuras secundarias y terciarias de los oligonucleótidos de cadena simple. Asimismo, las bibliotecas usadas en SELEX constan de secuencias constantes que se encuentran en los extremos 5' y 3' de la región aleatorizada central y que sirven para la amplificación por PCR ya que son el sitio de unión de los primers. El término biblioteca aleatorizada hace referencia al hecho que cada unidad del ácido nucleico de hebra simple tiene la probabilidad de ser adenina, guanina, citosina o timina (uracilo, en el caso de ARN). La metodología SELEX convencional ha sido implementada con diversas herramientas para mejorar el rendimiento. Un ejemplo de esta implementación es el uso de perlas magnéticas, llamadas beads, para la inmovilización del blanco. Esta metodología fue por primera vez publicada en 1997 (33).



**Figura 3.** Esquema del Procedimiento SELEX. En primer lugar, el SELEX comienza con la incubación de la biblioteca y el blanco (1, binding); luego se aplica un lavado para eliminar la biblioteca que se une débilmente (2, wash); paso siguiente se libera la biblioteca unida a los Beads (3, elution); seguido se amplifica la poca biblioteca unida mediante PCR (4, amplificación); y finalmente, esta biblioteca amplificada sirve para la siguiente ronda de SELEX (5, regeneration). Cuando finalmente se obtiene una biblioteca lo suficientemente enriquecida se hace el análisis de la biblioteca enriquecida (6, evaluation). Adaptado de Schutze T. *et al.* (2011).

Desde que la metodología fue implementada por primera vez, se han hecho muchas variantes que le dan versatilidad a la técnica. Por ejemplo, una variante muy utilizada es realizar un SELEX contra una célula completa o contra un tejido (34). Lo importante es utilizar los controles negativos correctos que permitan enriquecer la biblioteca hacia el objetivo que se ha planteado ya sea de diagnóstico, de terapia o simplemente de afinidad. Incluso, existen metodologías que han implementado protocolos *in silico* con softwares computacionalmente muy demandantes que permiten ahorrar pasos en las rondas de SELEX (35). Además, hay que mencionar que la era del secuenciamiento también ha impactado positivamente a la tecnología de aptámeros brindándole el conocimiento de las secuencias que van enriqueciendo con el fin de entender los principios en los que se rigen estos enriquecimientos. Una razón más para utilizar los aptámeros radica en el hecho de que estas moléculas son

de fácil manejo y pueden ser insertadas en plataformas de sensores que ha producido la era de los nanomateriales (36).

### **2.3. Justificación del estudio**

El racional que se considera en el presente trabajo para seleccionar blancos ideales para la producción de aptámeros se basa en los siguientes criterios: estos blancos deben ser proteínas secretadas por el quiste; y, además, dentro del secretoma del quiste estas proteínas, deben presentarse abundantemente. Victor B. y colaboradores (2012) llevaron a cabo un estudio proteómico semi-cuantitativo de las proteínas que liberaban los quistes aislados *in vitro*. Las proteínas altamente representadas pertenecían a la familia de las glicoproteínas de 8kDa. Así mismo, también se encontró en este secretoma teórico a la proteína T24 ampliamente utilizada en diagnóstico, pero no abundantemente expresada (37). Recientemente se ha realizado el primer estudio de proteómica cuantitativa que buscaba cambios en el perfil proteico asociado a la ubicación del quiste: músculo esquelético y sistema nervioso central (38). Este estudio evidenció que ciertas proteínas eran abundantes en el músculo esquelético, como por ejemplo la proteína GP50 que se encuentra en una de las 7 bandas de la prueba EITB. Sin embargo, se realizó el estudio proteómico de los quistes viables completos y no se enfocó en las proteínas excretadas y/o secretadas (ES). A pesar de esto, el trabajo reveló la presencia de proteínas ES relativamente más abundantes en el sistema nervioso central que en el músculo esquelético. Dentro de estas proteínas se encontraron dos representantes

de la familia de 8 kDa (E/S antigen M13 y Cysticercosis 10 kDa antigen), la proteína T24 y la proteína GP50 con una variante truncada en su estructura primaria (38).

Además, la técnica de diagnóstico ampliamente utilizada en clínica para detectar neurocisticercosis (EITB o WB) se basa en la detección de anticuerpos circulantes en muestras de suero o líquido cefalorraquídeo que sean afines a antígenos de extractos de quistes purificados mediante afinidad a lectinas de lentejas, es decir estos antígenos son glicoproteínas (10). Dentro de las proteínas que producen las 7 bandas de la prueba se encuentran solo 3 familias: la familia de 8 kDa, la proteína T24 y la GP50. Por lo anteriormente expuesto, se piensa que estas proteínas son secretadas por el quiste viable para cumplir roles inmunoregulatorios (39–41).

La familia de 8 kDa es una familia muy amplia dentro del genoma de *T. solium* habiendo muchos representantes que han sido utilizados para el diagnóstico de las infecciones de *T. solium* (42). Se ha considerado a los siguientes representantes debido a sus buenos resultados en el diagnóstico: Ts14, Ts18, TsRS1, TsRS2 y Ts8B2 (39,43–45). Ts18 recombinante mostró buenos resultados en formato ELISA con una sensibilidad de 90.4% y una especificidad de 90.3% en muestras de suero (46). Recientemente, se han producido anticuerpos monoclonales contra la proteína Ts18 recombinante (47). Así mismo, este grupo demostró, usando los anticuerpos monoclonales producidos, que Ts18 es una proteína abundantemente secretada por el metacéstode de *Taenia solium*.

Por otro lado, es importante recalcar que T24 no es una proteína afín a las lectinas de lentejas, pero aparece en las bandas del Western Blot. Hancock K. y colaboradores (2006) postulan que una porción de T24 podría estar co-purificando con las glicoproteínas afines a estas lectinas, lo que podría tener implicaciones en una posible interacción entre T24 y la familia de 8 kDa. Estas proteínas son detectadas por el Western Blot en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo. Una probable razón de este hecho podría deberse a la degradación de los quistes. Sin embargo, esto podría deberse también a que la T24, al ser una proteína de membrana, sea secretada en vesículas que interactúan con la familia de 8 kDa para modular la respuesta inmune del hospedero. Se cree que los miembros de la familia de 8 kDa son proteínas de unión a ligandos hidrofóbicos (39). Además, estas proteínas presentan similitud con la proteína AgB de *Equinococcus granulosus*, lo que en suma podría indicar un rol inmunoregulatorio (48,49).

En conclusión, la familia de 8 kDa, GP50 y la T24 son proteínas muy atractivas como blancos para producir aptámeros. Estos aptámeros tendrían utilidad no solo para el diagnóstico sino, probablemente, para uso terapéutico y, sin olvidar, los estudios de investigación básica que podrían realizarse con estas moléculas. Adicionalmente, las ventajas económicas en la producción que ofrecen los aptámeros podrían traducirse en métodos efectivos para la detección rápida y de bajo costo de la neurocisticercosis en los países endémicos. Finalmente, el presente trabajo pretende estandarizar una metodología de SELEX para la producción de aptámeros que sean útiles en el diagnóstico de la neurocisticercosis. Para esto los blancos para los aptámeros deben ser proteínas específicas, abundantes y que sean

excretadas/secretadas por el quiste. Como la familia de 8 kDa son blancos que cumplen estas premisas se pretende estandarizar la metodología SELEX con un representante de esta familia para luego, en futuros trabajos, producir más aptámeros para otros blancos como T24 y GP50.

#### **2.4. Hipótesis**

Péptidos de superficie provenientes de proteínas secretadas pertenecientes a la familia de 8 kDa del quiste de *Taenia solium* permitirían seleccionar bibliotecas enriquecidas de aptámeros mediante el método de SELEX.

#### **2.5. Objetivos**

##### 2.5.1. Objetivo principal

Implementar una metodología SELEX para la producción de aptámeros a partir de péptidos de superficie provenientes de proteínas abundantes y secretadas por el quiste de *Taenia solium*.

##### 2.5.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar blancos para producir aptámeros mediante SELEX que sean útiles para el diagnóstico de neurocisticercosis.
- Seleccionar péptidos específicos de superficie en base a los blancos seleccionados para SELEX

- Implementar una metodología de SELEX para producir bibliotecas enriquecidas contenedoras de aptámeros contra los péptidos de superficie seleccionados.
- Evidenciar la obtención de una biblioteca enriquecida mediante la prueba S1.
- Secuenciar e identificar los posibles aptámeros dentro de la biblioteca enriquecida del SELEX para el péptido pepFH\_14.
- Evidenciar experimentalmente la interacción entre el posible aptámero y el péptido blanco con el equipo de stopped-flow.

### III. METODOLOGÍA

#### 3.1. Estudios Preliminares

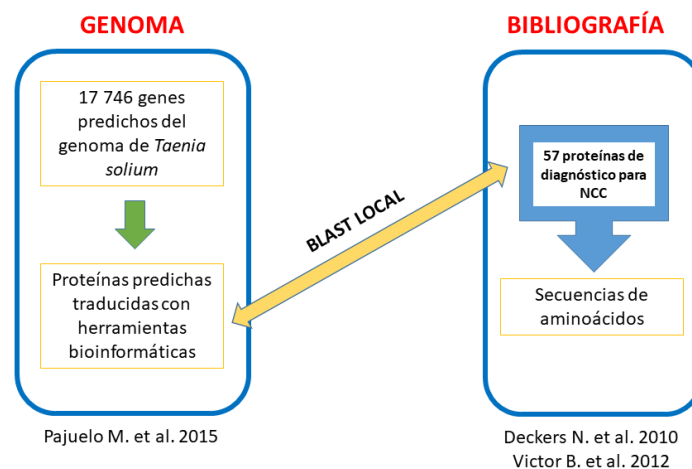
En trabajos previos el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular (UPCH) secuenció el genoma de *T. solium* para luego realizar una anotación completa. Brevemente, se obtuvieron 175 millones de *reads* a partir de quistes provenientes de cerdos infectados naturalmente; además, 76 millones de *reads* de proglótidos provenientes de pacientes infectados con teniasis. Estos genomas fueron juntados en un genoma híbrido más completo de 105 millones de *reads*, a partir del cual se obtuvieron 5003 supercontigs. A partir del genoma híbrido se predijeron 17 746 genes.

Paso siguiente, se realizó una primera búsqueda de proteínas excretoria-secretorias mediante herramientas bioinformáticas. Para esto se realizó dos tipos de predicciones: predicción de péptido señal para proteínas secretadas; y predicción de regiones transmembrana para las proteínas exportadas a la membrana plasmática. Estas dos predicciones sirven para identificar teóricamente proteínas excretoria-secretorias.

## 3.2. Procedimientos y Técnicas

### 3.2.1. Selección de blancos para SELEX

Como se mencionó en los estudios preliminares, se contaba con el genoma de *T. solium* secuenciado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). La información del proceso de secuenciamiento y la anotación de la misma han sido publicadas por el grupo de Zimic y colaboradores (50). Las proteínas pertenecientes a este genoma de *T. solium* fueron usadas como base de datos para realizar un blasteo local contra proteínas del metacéstode de *T. solium*. Para esto, en base a la bibliografía, se identificó a las proteínas que tuvieron mayor éxito en el diagnóstico de la neurocisticercosis (42) y proteínas abundantes del secretoma del metacéstode identificadas mediante un análisis proteómico semi-cuantitativo (37). En el análisis bibliográfico se recopilaron un total de 57 proteínas. Estas proteínas están confirmadas en su transcripción y traducción. Mediante un blast local se confirmó la presencia de las proteínas en el genoma peruano de *T. solium* secuenciado en la UPCH (Figura 4).



**Figura 4.** Comprobación de la presencia de las 57 proteínas del metacéstode de *Taenia solium* en el genoma secuenciado por el laboratorio de Bioinformática (UPCH).

### 3.2.2. Selección de péptidos de superficie

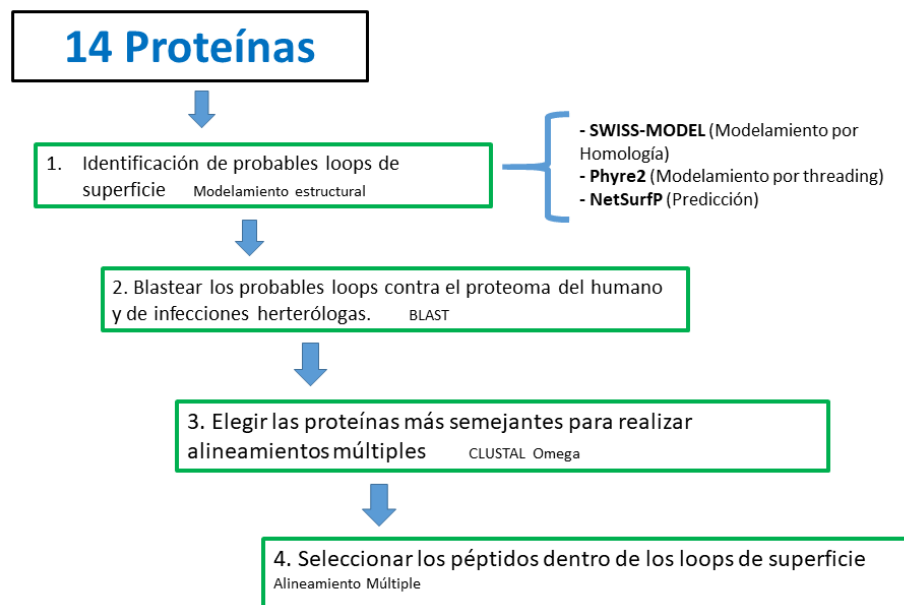
Tomando en cuenta a las proteínas seleccionadas por el análisis de abundancia como potenciales biomarcadores para diagnóstico de neurocisticercosis, se procedió a seleccionar los péptidos expuestos en la superficie de las proteínas mediante diversas herramientas bioinformáticas. Para esto se construyó un flujograma de trabajo para la selección de los péptidos de superficie (figura 5). En primera instancia, se buscó si la estructura tridimensional de la proteína había sido resuelta experimentalmente por cristalografía de rayos X, por resonancia magnética nuclear u otra técnica. En caso contrario, se modeló estructuralmente la proteína por homología usando el servidor SWISS MODEL (51). Si el predictor no encontraba un modelo adecuado para realizar el alineamiento estructural, el siguiente paso era utilizar Phyre2 para realizar modelamiento estructural por threading (52). Finalmente, como último recurso se usó NetSurfP versión 1.1 que es un servidor que predice la accesibilidad de cada aminoácido a lo largo de la secuencia proteica y, además, predice estructuras secundarias como alfas hélices y hojas beta plegada (53). Otras herramientas que ayudaron en la predicción de loops se consideraron de acuerdo con el tipo de proteína. Por ejemplo, para el caso de T24, la cual es una proteína integral de membrana, se utilizó el predictor de regiones transmembrana TMHMM versión 2.0. Para el caso de la familia de 8 kDa la información de los sitios de glicosilación fue importante en la predicción de los péptidos de superficie.

En general se siguieron los siguientes pasos para definir los péptidos superficiales:

- Realizar el modelamiento por homología de las proteínas elegidas a partir de la herramienta online SWISS-MODEL, Phyre2, NetSurfP v1.1, TMHMM v2.0, etc.
- Seleccionar los probables loops de superficie de las proteínas en base a la información estructural.
- Evaluar los loops de interés mediante BLAST para encontrar secuencias homólogas presentes en el proteoma humano y del cerdo (hospederos de *T. solium*).
- Evaluar los loops de interés mediante BLAST para encontrar secuencias homólogas presentes en el proteoma de agentes infecciosos que hagan reacción cruzada con *T. solium* en las pruebas de diagnóstico para neurocisticercosis (*T. saginata*, *E. multilocularis*, etc.).
- Descartar los loops que encontraron secuencias idénticas en el proteoma humano y de cerdo. Así mismo, descartar los loops que encontraron secuencias idénticas en agentes infecciosos que hagan reacción cruzada en el diagnóstico de neurocisticercosis.
- Realizar alineamientos múltiples de secuencias homólogas a la proteína de interés con proteínas del mismo *T. solium*.
- Realizar alineamientos múltiples de secuencias homólogas a la proteína de interés con proteínas de los hospederos de *T. solium* (ser humano y cerdo).
- Realizar alineamientos múltiples de secuencias homólogas a la proteína de interés con proteínas de agentes infecciosos que hagan reacción cruzada con

*T. solium* en las pruebas de diagnóstico para neurocisticercosis (*T. saginata*, *E. granulosus*, etc.).

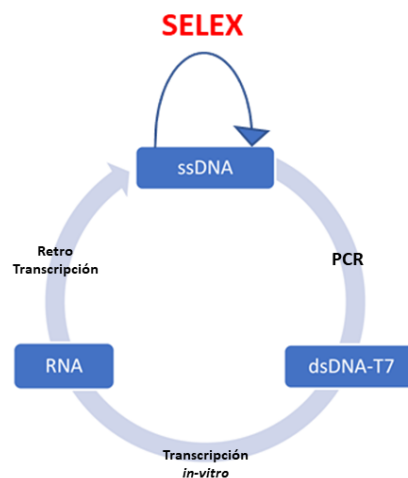
- Descartar las regiones cercanas a sitios de glicosilación.
- Usando los alineamientos múltiples, seleccionar aquellos residuos aminoacídicos que se diferencien más de las secuencias semejantes.
- Predecir los epítopes de la proteína de interés a partir de GeneScript o NetMHCII para considerar exposición. Se entiende que los epítopes deben estar expuestos para interactuar con los anticuerpos. Esta información solo es de referencia.



**Figura 5.** Esquema de los pasos para el diseño de Péptidos de Superficie. Primero se predicen los loops de superficie a partir de la secuencia de la proteína blanco (1. Modelamiento estructural). Segundo, se blastea los loops contra el proteoma humano y de infecciones heterólogas (2. BLAST). Tercero, se realiza un alineamiento múltiple con las secuencias más semejantes para, finalmente, seleccionar la posición del péptido blanco y los péptidos semejantes que sirven para SELEX negativo (3. Alineamiento múltiple). Este último paso debe considerar aspectos estructurales como sitios de glicosilación, regiones transmembrana, etc.

### 3.2.3. Metodología de SELEX por transcripción *in vitro*

Esta metodología se basa en el trabajo de Rotherhan *et al.* (2012). Se utilizaron perlas magnéticas (beads magnéticos) para fijar el péptido de superficie biotinilado y poder separar la biblioteca que presenta afinidad al blanco. Además, la biblioteca es de una sola hebra de 5' a 3' (hebra forward) y se debe asegurar que para las siguientes rondas sea esta misma hebra que interactúe con el blanco. Para lograr esto se colocó un promotor T7 en el primer reverse que permita convertir la biblioteca de ADN de doble hebra (dsDNA, por sus siglas en inglés) a ARN para luego convertirla a ADN de una sola hebra (ssDNA, por sus siglas en inglés) por retro-transcripción y mantener la misma hebra de interés para la interacción con el blanco en la siguiente ronda de SELEX (Figura 6).



**Figura 6.** Metodología SELEX por transcripción *in vitro*. Representación de los estados por los que tiene que pasar la librería antes de alcanzar la siguiente ronda de SELEX.

Si bien antes de la transcripción *in vitro* se realiza una PCR convencional de 6 – 10 ciclos, en el siguiente paso se usa el producto de la PCR que trae el promotor T7 para realizar la transcripción *in vitro*. Asimismo, este paso permite producir ARN en gran cantidad, lo que permite tener un seguro en caso se cometan fallas en

el proceso que ocasionen tener que retroceder en el SELEX. Además, la reacción catalizada por la ARN polimerasa no necesita de primers, por ende, la amplificación en este caso es directamente de la secuencia y se evita el hecho de que una secuencia funcione como primer para otra (54).

#### 3.1.3.1. Condiciones de Rigurosidad

Las condiciones de rigurosidad son las variables que se van ajustando de manera cada vez más exigente para dirigir la biblioteca a mayor afinidad por el blanco. Definir las condiciones de rigurosidad para cada ronda de SELEX antes de realizar el proceso sirve para evaluar qué condiciones son las que más han beneficiado el enriquecimiento y en qué medida. Las condiciones de rigurosidad que se han evaluado y utilizado en este protocolo son las siguientes:

- Concentración de biblioteca
- Número de lavados
- Volumen del buffer de lavado
- Tiempo de incubación de la biblioteca y el blanco

Las condiciones de rigurosidad deben ser diseñadas de menor a mayor rigurosidad. Por ejemplo, en la tabla 1 se ilustra las condiciones que se usaron para los dos blancos que se utilizaron en la metodología SELEX por transcripción *in vitro*.

**Tabla 1.** Condiciones de rigurosidad para la metodología SELEX por transcripción *in vitro*.

Péptido pepFH_14 (proteína Ts18var1) - Librería 30N					
SELEX	[péptido]	[Librería]	Incubation (min)	N°Washes	PCR cycles
1	1000 nM	5000 nM	60	0 (200ul)	12
2	1000 nM	1000 nM	60	0 (200ul)	6 + 9
3	800 nM	800 nM	60	1 (200ul)	12
4	750 nM	750 nM	45	1 (200ul)	12
5	750 nM	750 nM	45	2 (200ul)	10
6	750 nM	750 nM	30	2 (200ul)	10 + 10
7	200 nM	200 nM	30	3 (200ul)	12
8	111 nM	111 nM	20	3 (200ul)	15
9	50 nM	50 nM	10	3 (500ul)	15
10	50 nM	50 nM	5	3 (500ul)	18

La concentración de la biblioteca se determina con la cantidad de biblioteca expresado en picomoles entre el volumen de incubación expresado en microlitros,  $\mu\text{M}$ .

La cantidad de beads es una limitante para la cantidad de blanco que se desea colocar. Sin embargo, el presente trabajo no usó la capacidad del Bead como condición de rigurosidad ya que siempre se aseguraba de cubrir entre 3 a 5 veces la la capacidad máxima de unión (binding capacity) de los beads. Los beads que se usaron en este protocolo son beads magnéticos de 2.8  $\mu\text{m}$  de diámetro cubiertos con estreptavidina (DynaBeads M-280 Streptavidin de la empresa ThermoFischer Scientific).

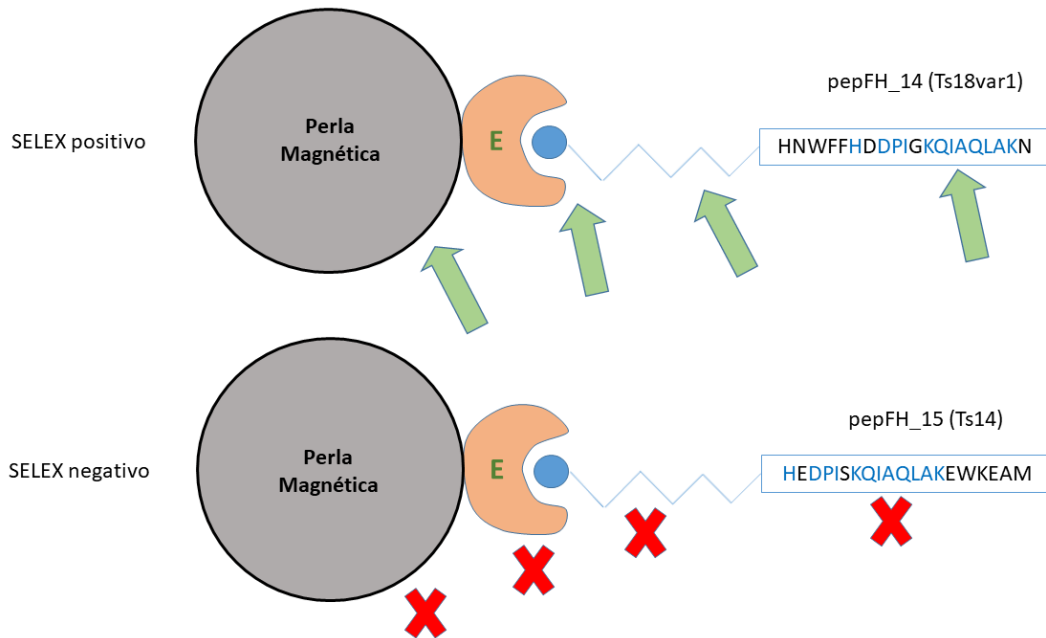
El buffer de selección es diseñado de tal manera que se adapte a las condiciones del proceso, el blanco que se va utilizar (péptido, proteína, célula, etc.) y la biblioteca que se va utilizar, sea de ADN o ARN. En este caso se utilizó el buffer que proponen en el kit de SELEX (XELEX DNA Core Kit) de la empresa

EURX que tenía la siguiente composición: 140 mM NaCl, 2 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris pH 7.4 y 0.05 % [v/v] Tween 20.

### 3.1.3.2. Controles para la metodología SELEX

Si bien la incubación de la biblioteca con el blanco en condiciones de rigurosidad que cada vez más exigentes produce aptámeros muy afines al blanco, esto no asegura que la biblioteca distinga al blanco de proteínas homólogas del hospedero o de agentes infecciosos que causan reacción cruzada en las pruebas diagnósticas. Por tal motivo, se necesita usar estrategias que permitan asegurar que se descarte la parte de la biblioteca que desarrolla afinidad para estos casos. La manera ideal de realizar este paso sería el uso del proteoma de un paciente sin la enfermedad y con el proteoma de pacientes que presenten enfermedades infecciosas de sintomatología parecida a la neurocisticercosis. Sin embargo, por limitaciones de tiempo y presupuesto se eligió usar péptidos semejantes provenientes de proteínas homólogas. Además, según las herramientas que se usen en el procedimiento será necesario descartar la parte de la biblioteca que desarrolle afinidad a los soportes y estructuras usadas para realizar la selección. Enfocando estos requerimientos en la metodología SELEX es común ciertas definiciones que

enfatan estos problemas; por eso es necesario precisar dos definiciones muy importantes en la metodología: el SELEX positivo y el SELEX negativo (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema de la diferencia entre SELEX positivo y SELEX negativo.

SELEX positivo: involucra la incubación de la biblioteca con los beads magnéticos cubiertos de estreptavidina cargados con los péptidos biotinilados (blancos para el SELEX). Para esto primero se realiza la unión de los péptidos biotinilados a los beads; a continuación, esta unión se incuba con la biblioteca en las condiciones diseñadas para cada ronda.

SELEX negativo: involucra la incubación de la biblioteca con los beads vacíos, es decir, sin péptidos biotinilados. Este paso sirve para descartar la porción de secuencias de la biblioteca que se unen a la cubierta de sefarosa y/o estreptavidina. El término SELEX negativo también hace referencia a los pasos en los cuales se usa un blanco que guarda bastante parecido con el

blanco de interés; por ejemplo, se puede usar una proteína homóloga para hacer un SELEX negativo y descartar la porción de la biblioteca que es afín a la proteína homóloga pero no a la proteína de interés.

### 3.1.3.3. Pasos de la metodología SELEX por transcripción *in vitro*

Las bibliotecas que se usaron para este protocolo se compraron de la empresa TRILINK. Se compraron bibliotecas de 20N y 30N, el término “N” quiere decir que las bibliotecas contienen en la región aleatoria central una longitud de 20 y 30 nucleótidos, respectivamente. Para el péptido pepFH\_11 se utilizó la biblioteca 20N y para el péptido pepFH\_14 se utilizó la biblioteca 30N. Por lo general, para obtener aptámeros que se utilicen en diagnóstico se recomienda usar bibliotecas pequeñas.

Los pasos para este SELEX fueron los siguientes:

- Lavar 3 veces los beads con 200 ul del buffer de SELEX 1X.
- Incubar los beads con el péptido biotinilado de tal manera que la cantidad de péptido sea 5 veces la capacidad de los beads. La incubación se realiza a 25 °C por 25 minutos con agitación de 1400 rpm para mantener los beads en suspensión.
- A continuación, lavar 3 veces los beads que tienen el péptido unido con 200 ul del buffer de SELEX 1X para eliminar el péptido biotinilado en exceso.

- Por otro lado, preparar la biblioteca en buffer de SELEX 1X y calentar a 95°C y enfriar inmediatamente en hielo por otros 5 minutos. Esto se realiza para denaturar y renaturar la biblioteca y mejorar la interacción.
- Incubar la biblioteca con el mix beads-péptido inmediatamente después de pasado el tiempo en hielo. El tiempo de incubación depende de las condiciones diseñadas para el SELEX.
- Terminado el tiempo de incubación, lavar inmediatamente con buffer de SELEX para descartar la biblioteca que es débilmente afín a los péptidos. El número de lavados y el volumen de lavado son condiciones de rigurosidad que se varían de acuerdo al diseño del SELEX.
- Una vez que se realizó el último lavado, se procede a re-suspender los beads en 50 ul de agua libre de nucleasas. Se calienta a 95°C por 5 minutos para que la biblioteca afín al péptido se separe de este. Estos 50 ul son usados para la amplificación.

#### 3.1.3.4. Etapas de la amplificación de biblioteca enriquecida

##### 3.1.3.4.1. PCR convencional

La cantidad de moléculas seleccionadas que finaliza en cada paso de SELEX es muy pequeña, por lo que una estimación de su concentración resulta difícil. Por otro lado, una sobre-amplificación de las secuencias aleatorizadas resulta en la formación de sub-productos de alto peso molecular (55). Consecuentemente, resulta importante determinar el número ideal de ciclos de PCR para obtener una amplificación de la biblioteca sin la formación de dichos sub-productos. Para resolver este punto se realiza una PCR analítica donde se colectan sucesivamente

muestras cada 2-3 ciclos para analizar el producto de PCR en geles nativos de poliacrilamida por electroforesis. A medida que se avanzan en los ciclos de PCR se observa que las bibliotecas aleatorizadas comienzan a perder representatividad hasta perderse, por lo que es importante no llegar hasta este punto en la amplificación con el PCR. Los geles nativos de poliacrilamida permiten observar hasta que ciclo es conveniente amplificar la biblioteca capturada del SELEX sin observar productos aberrantes. Dicha PCR analítica se prepara de la siguiente manera:

- Para un volumen final de reacción de 40  $\mu$ l usar la cuarta parte para el template (beads y biblioteca en suspensión calentada a 95°C por 5 minutos).
- Colocar los primers a una concentración final de 0.5  $\mu$ M.
- La enzima que se utiliza viene en un master mix 2X así que debe pasarse a 1X en la reacción. Se utiliza Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) para evitar estandarizaciones de magnesio, nucleótidos y buffer de reacción.
- Completar los 40  $\mu$ l con agua libre de nucleasas.
- Las condiciones del PCR son las siguientes: denaturación inicial de 95°C por 5 minutos, seguido del proceso cíclico compuesto por:
  - 95°C por 45 segundos,
  - anillamiento de 52°C por 45 segundos y
  - extensión de 72°C por 40 segundos;
  - una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Una vez determinado el número de ciclos adecuado se procede a preparar el PCR con volumen final de 100 ul, se verifica el tamaño de banda correcto en gel de poliacrilamida 8% con una corrida electroforética de 250V por 15 minutos y se purifica el producto con el kit Oligo Clean & Concentrador para obtener el producto dsDNA (ZymoResearch, USA). Finalmente, se realiza la cuantificación por absorbancia a 260 nm en un Nanodrop (ThermoScientific, USA).

#### 3.1.3.4.2. Transcripción *in vitro*

La transcripción *in vitro* consiste en una reacción enzimática que media el paso de ADN de doble hebra con promotor T7 (dsDNA-T7) hacia RNA. El promotor T7 debe tener la siguiente secuencia para que la transcripción se lleve a cabo:

5'-TAATACGACTCACTATAG**G**GG-3'-template

La guanina subrayada y en negrita será el primer ribonucleótido del ARN que se va unir. El template que se busca transcribir debe encontrarse corriente abajo del promotor T7. El paso de la transcripción *in vitro* se realizó con el kit de transcripción TranscriptAid T7 High Yield Transcription (Thermo Scientific, USA). Brevemente, el kit requiere colocar 1 ug de template dsDNA o cDNA para producir en general 150 ug en un protocolo que dura 2 horas a 37°C. El kit sirve tanto para moldes cortos (< 100nt) y largos, pero para moldes cortos recomienda usar 2 ug de substrato de ADN e incubar entre 4 y 8 horas a 37°C. El volumen de

reacción es de 20  $\mu$ l y el kit provee los ribonucleótidos que deben llegar a la concentración final de 10 mM.

Cuando finaliza la reacción, se procede a purificar con el kit de Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research). Durante la purificación se realiza la degradación del producto de ADN de doble hebra que sirvió de template para sintetizar ARN con la enzima DNAasa I. Para verificar y visualizar el producto purificado de la transcripción se prepara un gel denaturante de poliacrilamida al 12% con 8M de urea. Finalmente, se realiza la cuantificación por absorbancia a 260 nm en un Nanodrop (ThermoScientific, USA).

#### 3.1.3.4.3. Retrotranscripción

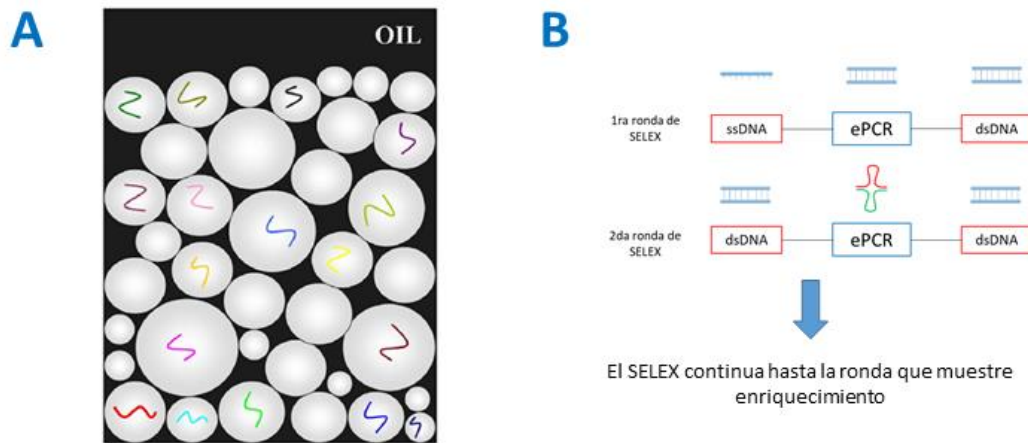
La selección de aptámeros en el presente trabajo busca obtener secuencias de ADN de hebra simple afines al péptido blanco, entonces se debe convertir el ARN de la transcripción *in vitro* a una molécula de ssDNA. Finalmente, con la molécula de ssDNA que representa la misma hebra con la que se comenzó a realizar SELEX se diseñan las condiciones de la siguiente ronda y el proceso se hace cíclico hasta encontrar un enriquecimiento en la ronda. Lo último significa que dentro de todas las secuencias con las que se partió algunas han ido aumentando en cantidad en comparación con las demás, lo cual es una disminución de la diversidad a causa de la presión de selección *in vitro*.

En el presente protocolo, la retro-transcripción se realizó con el uso del kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis de Thermo Scientific (Número de Catálogo #K1622). El kit posee un sistema completo y eficiente para la síntesis de cDNA (ssDNA) a partir de ARN mensajero o ARN total. El kit usa una transcriptasa reversa con baja actividad de RNAasa H en comparación con otras transcriptasas reversas, por lo que viene con reactivo inhibidor de RNAsas que protege el ARN de la degradación por arriba de los 55°C. El kit recomienda utilizar entre 0.1 ng hasta 5 ug de ARN como template. La estandarización de la retro-transcripción se realizó utilizando 190 pmoles de biblioteca en la etapa de ARN sin importar el tamaño de la misma (20N o 30N). Para la biblioteca 20N, 190 pmoles equivalen a 3.86 ug; para la biblioteca 30N, 190 pmoles equivalen a 4.45 ug. Para realizar la retro-transcripción se utilizó el primer forward en 200 pmoles por reacción. El volumen de cada reacción es de 20 ul y se utiliza 200 U de transcriptasa reversa.

Durante la purificación de los productos de la retro-transcripción se realiza un paso de hidrólisis alcalina que permite eliminar el ARN que se utilizó como template para sintetizar el cDNA. En este paso se utiliza NaOH 1 M y EDTA 0.5M con una incubación por 30 minutos. Este paso se corrigió como se observa en los resultados hasta 3 horas de incubación. Para verificar y visualizar el producto purificado de la transcripción se prepara un gel denaturante de poliacrilamida al 12% con 8M de urea. Finalmente, se realiza la cuantificación por absorbancia a 260 nm en un Nanodrop (ThermoScientific, USA).

#### 3.2.4. Metodología de SELEX por PCR emulsión

Una de las principales variables a evaluar en el procedimiento SELEX es el tipo de PCR. Actualmente, existen kits para producir aptámeros. El kit de Roboklon hace uso del PCR emulsión (ePCR) para resolver los problemas de formación de sub-productos. La principal ventaja del ePCR frente a un PCR convencional es el mantenimiento de la diversidad de la biblioteca que es afectada por el sesgo de un PCR convencional; además de evitar la formación de sub-productos inespecíficos. Esto se debe a que se forma una emulsión de agua en aceite que forma gotículas de agua en donde son aisladas cada secuencia de la biblioteca para su amplificación (Figura 8A). Es decir, que en cada gotícula de agua ocurre la PCR. Además, cada secuencia presenta una eficiencia de amplificación intrínseca a su secuencia que no depende de la afinidad con el blanco (50). En la metodología de SELEX por PCR emulsión la biblioteca sintética inicial es ADN de una sola hebra, pero una vez que la primera ronda termina y se ha convertido en ADN de doble hebra en las siguientes rondas se seleccionará como producto de ADN de doble hebra (Figura 8B).



**Figura 8.** Metodología de SELEX por PCR emulsión. A) Representación de una emulsión de agua en aceite. Se aprecia la distribución de la librería separada en cada micela. Adaptado de Shao K. et al. 2011. B) Esquema de las rondas de metodología SELEX con PCR emulsión. La librería que termina la ronda se encuentra en dsDNA menos al inicio de la primera ronda.

El kit de Roboklon utiliza una mezcla de fase oleosa de 600 ul y una fase acuosa de 100 ul. La composición de la fase oleosa es 4.5% de Span 80, 0.4% de Tween 80, y 0.05% Triton X-100 en aceite mineral; mientras que la composición de la fase acuosa es similar a un master mix convencional de una PCR. El kit trae estos componentes, así como también la biblioteca 40N, los primers (Forward y Reverse) y una Taq polimerasa con la que se estandarizó el ePCR. La Taq polimerasa viene en una Master mix 2X que debe llegar a 1X en el volumen final. Los primers deben llegar a 4 uM. La cantidad de picomoles de biblioteca es de acuerdo al diseño de las condiciones de rigurosidad para el SELEX.

El kit hace mención de que es necesario producir 1 ug de dsDNA con la PCR emulsión. Además, el kit recomienda la utilización de Beads magnéticos de 1 um

de diámetro cubiertos con estreptavidina. Las condiciones para la primera ronda de SELEX se establecieron de la siguiente manera:

- Usar 40 ul de MicroBeads que equivalen a la capacidad máxima de unión de 800 pmoles. Recordar que se preparan dos tubos de 1.5 ml con 40 ul de MicroBeads. Uno es para el SELEX positivo y el otro es para el SELEX negativo, siendo este último el primero en realizarse.
- Para saturar los MicroBeads, incubar estos con 64 ul de péptidos biotinilados a 25 uM. Este paso se realiza solo para el tubo de SELEX positivo.
- Antes de la incubación, lavar los MicroBeads con la solución en la que se realizará el SELEX. En el caso del kit de Roboklon este viene con un buffer de SELEX. El lavado se realiza con 80 ul a 1400 rpm por 10 minutos.
- Realizar el SELEX negativo con 2140 pmoles de biblioteca (equivale 534 ul de biblioteca a 4 uM) por 90 minutos a 1400 rpm aplicando antes un replegamiento a la biblioteca. El replegamiento consta de calentar a 95°C por 5 minutos, seguido inmediatamente de enfriar en hielo por 5 minutos y, finalmente, 5 minutos a temperatura ambiente.
- Terminado el SELEX negativo separar con un fuerte imán el sobrenadante de los MicroBeads. El sobrenadante separado es la biblioteca que se utilizará para el SELEX positivo, pero antes se debe aplicar un replegamiento otra vez.

- Realizar el SELEX positivo de los MicroBead cargados con el blanco con la biblioteca pasada por replegamiento. Este procedimiento por 90 minutos a 1400 rpm.
- Terminado el SELEX positivo descartar el sobrenadante y resuspender los MicroBeads en 50 ul de agua libre de nucleasas.
- Realizar la elución de la biblioteca unida a los MicroBeads calentando a 95°C por 5 minutos y, sin separar los MicroBeads, usar los 50 ul para la PCR emulsión con las cantidades ya establecidas. Seguir las siguientes temperaturas para el PCR de emulsión: la denaturación inicial a 95°C por 2 minutos; seguido de 20 ciclos de denaturación a 95°C por 30 segundos, anillamiento a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 3 minutos; finalmente, una extensión final a 72°C por 5 minutos.
- Purificar los productos de amplificación. Para esto antes hay que romper la emulsión con 1 ml de 2-butanol y centrifugar para separar los amplicones de los demás componentes. Medir en nanodrop lo producido y correr en gel de agarosa al 3% para identificar el amplicón de 96 nts.

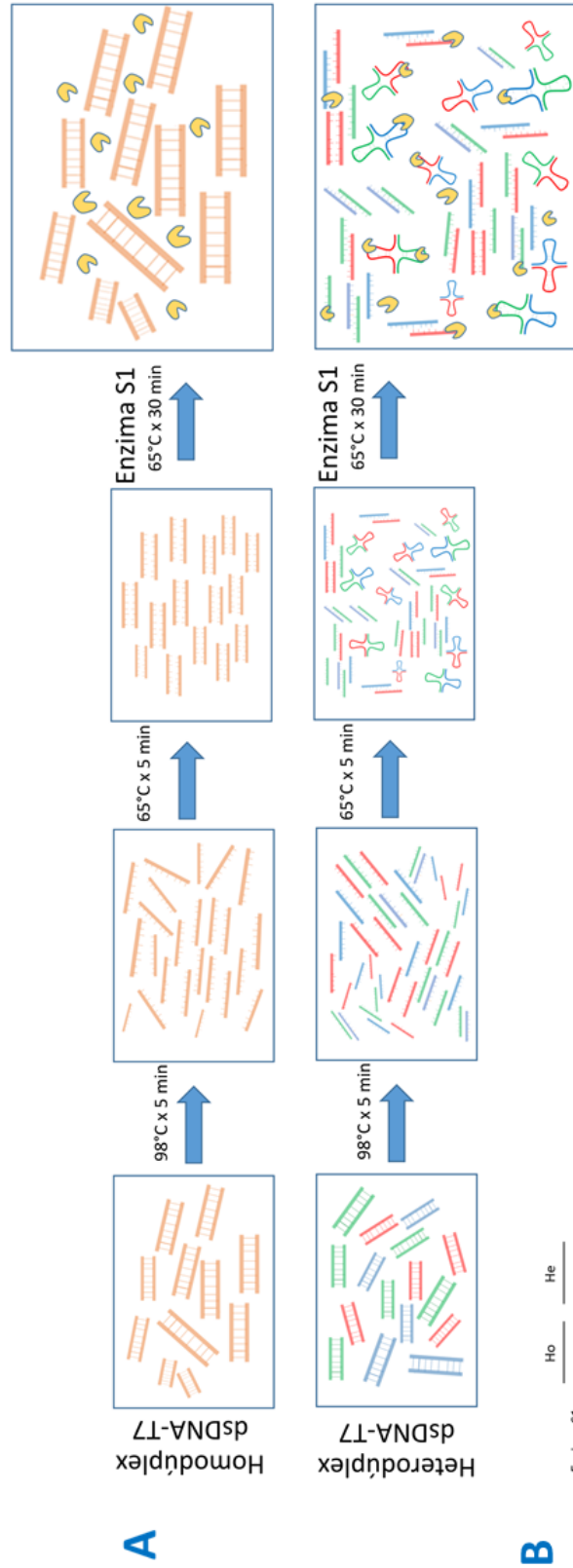
Las siguientes rondas del SELEX tienen los mismos pasos. La única diferencia es que tanto las cantidades de MicroBeads, péptidos biotinilados y biblioteca enriquecida de la primera ronda son disminuidos.

- Preparar la biblioteca enriquecida con la elución de la ronda anterior. Para esto se usó 1 ug del eluido diluyéndolo en buffer de SELEX y agua libre de nucleasas.

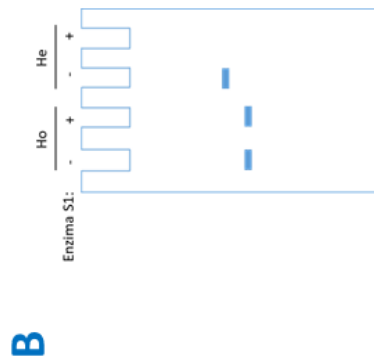
- Usar 10 ul de MicroBeads que equivalen a una BC de 200 pmoles.
- Usar 700 pmoles de péptido biotinilado que equivale a 28 ul del péptido a 25 uM.
- Variar los parámetros de SELEX de la primera ronda según el diseño o estrategia que se seguirá en el SELEX.
- Realizar el lavado de los MicroBeads para descartar lo débilmente unido. Esto mediante la incubación por 10 minutos a 1400 rpm en buffer SELEX.

#### 3.2.5. Prueba de Enriquecimiento

La prueba de enriquecimiento sirve para validar la disminución de la cantidad de secuencias diferentes en la biblioteca a medida que se realizaron las rondas de SELEX. La prueba que se utiliza en el presente trabajo se basa en el trabajo de Lim TS *et al.* (2011). Brevemente, ADN de doble hebra proveniente de las bibliotecas intermedias de SELEX se denaturan y renaturan para luego agregar la nucleasa S1 cuyo sustrato son secuencias de ADN de una sola hebra (Figura 9). El grado de degradación causado por la enzima en la biblioteca se observa en gel. Mientras más degradada se presente la muestra entonces esta se encuentra menos enriquecida.



**Figura 9.** Prueba S1 de Enriquecimiento. Esta prueba se basa en el trabajo de Lim TS et al. (2011). **A)** Esquema que muestra el principio básico de la prueba, en el cual se tiene dos controles que son los límites opuestos; por un lado una librería de una sola secuencia (Homodúplex) y, por el otro lado, una librería de muchas secuencias diferentes (Heterodúplex). La enzima S1 es una endonucleasa cuyo sustrato son secuencias de ADN de una sola hebra (ssDNA). **B)** Esquema teórico de cómo se deben ver los controles Homodúplex y Heterodúplex en la prueba de enriquecimiento.



Se prepara controles de enriquecimiento para la prueba:

Control positivo: consiste en una muestra de una sola secuencia, cuando esta muestra se somete a la prueba S1 la banda original no se degrada.

Control negativo: consiste en una muestra muy diversa de muchas secuencias diferentes. En el presente trabajo utilizamos un producto a doble hebra proveniente de la biblioteca inicial tal como fue comprada. Cuando esta muestra se somete a la enzima S1 la banda original se degrada.

Cada muestra se prepara con un duplicado que no será incubado con la enzima S1 para observar el efecto de la enzima en la muestra.

Las muestras a evaluar se preparan de la siguiente manera:

- En un volumen de 15 ul agregar 500 ng de la muestra dsDNA que se desea analizar.
- Agregar 1.5 ul de buffer 5X para que la reacción se encuentre en 0.5X
- Enrasar con agua libre de nucleasas hasta 15 ul.
- Calentar la muestra hasta 98°C por 5 minutos para denaturar el dsDNA.
- Inmediatamente incubar a 65°C por 5 minutos para permitir la hibridación de las hebras del dsDNA.
- Agregar 2 ul de la enzima S1 a 0.25 U/ul y incubar por 20 minutos a 65 grados.

- Detener la reacción agregando 2 ul de EDTA 85 mM y llevando la temperatura a 70°C por 5 minutos.
- Inmediatamente después enfriar en hielo hasta que se realice la corrida electroforética.

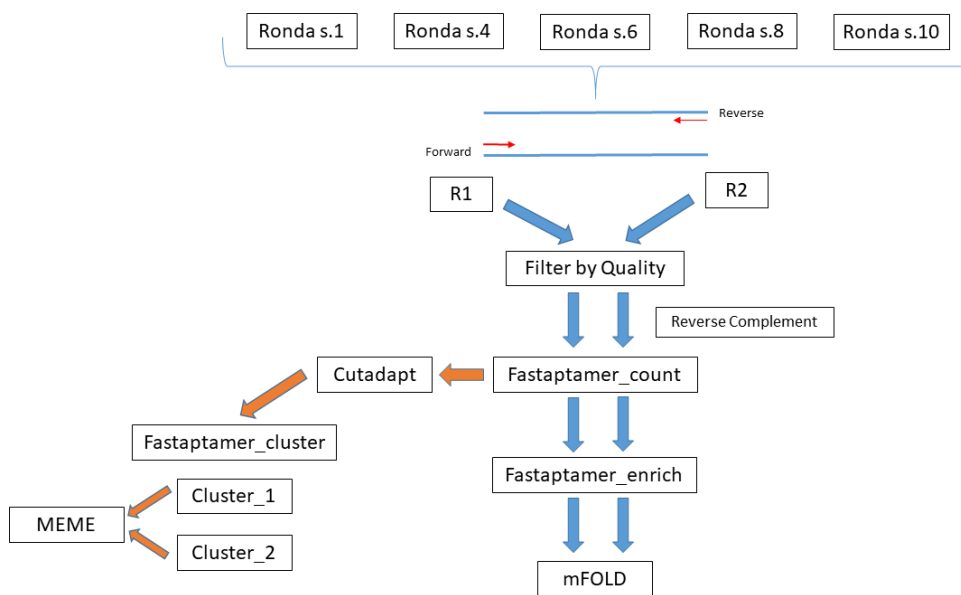
Las muestras deben permanecer en hielo hasta la corrida electroforética que se realizará en un gel de acrilamida 8% a voltaje constante de 250 V por 15 minutos.

### 3.2.6. Secuenciamiento de bibliotecas del SELEX

Dado que se evidenció enriquecimiento en la ronda 10 del SELEX para el péptido pepFH\_14 proveniente de la proteína Ts18var1 se prepararon las bibliotecas de las rondas: 1, 4, 6, 8 y 10. Estas rondas se seleccionaron de acuerdo a lo planteado en el trabajo de Thiel WH (2016) para secuenciar rondas de SELEX (56). Para todas las bibliotecas se partió de los productos de retro-transcripción y se realizó una PCR con primers convencionales (sin promotor T7). Una vez verificada la calidad de las bibliotecas, se procedió a secuenciar las bibliotecas de ADN doble hebra mediante secuenciamiento de alto rendimiento en MiSeq 2000 (Illumina, USA, CA). La preparación de los materiales y bibliotecas de secuenciamiento se realizó utilizando el Kit 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, USA, CA).

#### 3.2.6.1. Análisis Bioinformático para encontrar probables aptámeros.

Dado que el secuenciamiento se determinó para ambas hebras del ADN de doble hebra, para cada biblioteca de las rondas del SELEX se obtuvieron dos archivos de secuenciamiento fastq (R1 y R2), siendo R1 el secuenciamiento de la hebra forward y R2 el secuenciamiento de la hebra reverse. Todos los archivos fastq fueron filtrados según la calidad del secuenciamiento usando Galaxy Project (57). Los archivos fastq de R2 fueron convertidos en secuencias forward mediante Reverse Complement usando Galaxy Project. Para analizar las bibliotecas de las rondas de SELEX secuenciadas se usó el programa FASTAptamer (58), mediante el cual se pudo evidenciar aquellas secuencias que se enriquecieron a lo largo del proceso (Figura 5). Además, con la opción `fastaptamer_count` se pudo obtener cuántos reads fueron contabilizados para cada secuencia de la biblioteca. Así mismo, mediante normalización del conteo de reads se pudo comparar entre secuencias. Con el comando `fastaptamer_enrich` se pudo determinar en qué grado fue enriquecida la secuencia a lo largo de las rondas. Determinadas las secuencias enriquecidas, estas fueron analizadas mediante mFOLD para determinar las estructuras secundarias que probablemente interactúen con el péptido blanco (59). Por otro lado, usando el archivo FASTA obtenido a partir del comando `fastaptamer_count` se utilizó el programa Cutadapt para cortar de las secuencias los primers y solo quedarse con la región central (60). Con estas secuencias sin las regiones constantes se utilizó MEME para determinar los motivos que interactúan con el péptido blanco (61).



**Figura 10.** Esquema del Análisis Bioinformático del Secuenciamiento de las rondas del SELEX por transcripción *in vitro*. Las bibliotecas de cada ronda fueron analizadas con el programa Fastaptamer que cuenta todos los reads totales y únicos. El comando fastaptamer\_enrich permitió indentificar las secuencias más representativas. Estas secuencias fueron evaluadas con mFOLD para determinar su estructura secundaria. El comando fastaptamer\_cluster permitió agrupar en función a la semejanza de secuencia, con lo cual se pudo buscar motivos con el programa MEME.

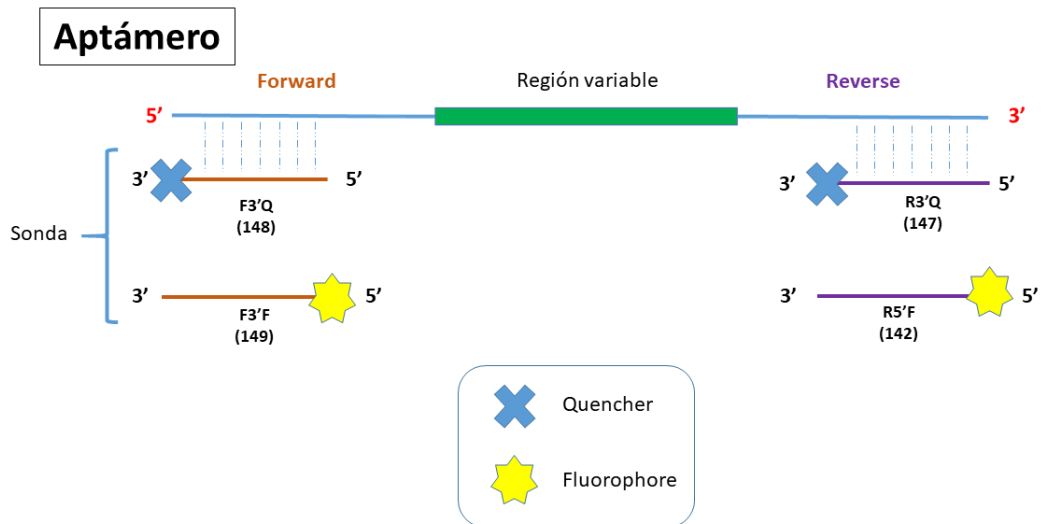
### 3.2.6.2. Síntesis de los posibles aptámeros.

Las secuencias de primers y de aptámeros fueron sintetizadas por la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur), a través de su servicio de Oligo DNA synthesis, sin ninguna modificación.

### 3.2.7. Determinación de Interacción con el equipo de Stopped-Flow

Se enviaron a sintetizar los 6 probables aptámeros (región central + región de primers) sin ninguna modificación: Aptamer\_1R1, Aptamer\_2R1, Aptamer\_3R1, Aptamer\_4R1, Aptamer\_5R1 y Aptamer\_5R2. Además, se

enviaron a sintetizar 4 sondas de 13 nucleótidos que hibridan con la región de los primers de la secuencia del aptámero (Figura 11). Estas sondas están modificadas de tal modo que algunas llevan un fluoróforo, mientras que otras llevan un quencher que absorbe fluorescencia.



**Figura 11.** Diseño de Experimento para Stopped – Flow. Las sondas 142, 147, 148 y 149 se hibridan a la región de los primers (Forward y Reverse). La interacción del aptámero y el péptido se detecta mediante la variación en la fluorescencia.

A continuación, se describen las características de las 4 sondas que se mandaron a sintetizar:

Sonda 142: Se une al Reverse (extremo 3' del aptámero) y tiene un fluoróforo (fluoresceína) en el extremo 5' de la sonda.

Sonda 147: Se une al Reverse (extremo 3' del aptámero) y tiene un quencher (BHQ1) en el extremo 3' de la sonda.

Sonda 148: Se une al Forward (extremo 5' del aptámero) y tiene un quencher (BHQ1) en el extremo 3' de la sonda.

Sonda 149: Se une al Forward (extremo 5' del aptámero) y tiene un fluoróforo (fluoresceína) en el extremo 5' de la sonda.

Se deseó probar si alguno de los 6 posibles aptámeros se unían al péptido 14 (Ts18var1) y en qué grado era tal afinidad con el péptido. Para ello se hizo interactuar el péptido sintético con el que se realizó el SELEX (aquí se asumió que ni la biotina ni el linker de 5 carbonos afectarían en las mediciones) y el aptámero pre-incubado con la sonda. Para detectar la interacción entre el péptido y el aptámero se hibridó una sonda fluorescente al aptámero antes de la interacción con el péptido. De tal manera que si hay interacción entre el aptámero y el péptido habrá un efecto diferente en la fluorescencia base. La fluorescencia base se determinó con el aptámero hibridado a la sonda que se enfrenta contra el buffer de SELEX 1X.

Los experimentos se llevaron a cabo en un equipo de Stopped-Flow. El método de Stopped-Flow fue introducido por Roughton en 1934 y enormemente mejorado por B. Chance seis años después. El aparato de Stopped-Flow se basa en una técnica de mezclado y detección rápidos. El aparato detecta cambios en la absorbancia y fluorescencia un milisegundo después de que los componentes a mezclarse fueron disparados. Cada reacción del Stopped-Flow requiere entre 100 a 400 ul de solución.

Se realizaron 4 experimentos para identificar la interacción del aptámero Aptamer\_1R1 con el péptido 14. Para tal fin, el aptámero fue diluido a 0.2 uM en Buffer SELEX 1X (Receta Roboklon pero sin Tween 20) y pre-incubado con sonda a 0.15 uM. El péptido 14 fue diluido a 1 uM con Buffer SELEX 1X. Se utilizó otro péptido a 1 uM como control de afinidad en el proceso SELEX. Para la pre-incubación, se mezcló el aptámero y la sonda en un volumen final de 800 ul. Esta mezcla fue calentada a 95°C por 5 minutos y puesto en hielo inmediatamente por otros 5 minutos para favorecer la hibridación de la sonda y el aptámero. Antes de iniciar los ensayos en el Stopped-Flow, las muestras son previamente centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos para sedimentar cualquier partícula extraña que afecte la detección en la cámara de mezclado. Además, se preparó 100 ml de Buffer SELEX 1X filtrado y desgasificado que alcanzó para probar solo un aptámero. Se preparó, también, agua ultrapura desgasificada para la limpieza del aparato de Stopped-Flow.

#### Primer experimento (Aptámeros con Sonda 149):

Se preparó la pre-incubación de cada uno de los 6 aptámeros con la Sonda 149 (fluoróforo en el FORWARD) en un volumen de 800 ul en tubitos de 1.5 ml. Cada tubito fue enfrentado con 800 ul de péptido pepFH\_14 a 2 uM en el equipo de Stopped-Flow. La concentración del aptámero fue de 0.2 uM y la concentración de la sonda fue de 0.15 uM. Estas concentraciones son en jeringa. Cuando las soluciones de cada una de las dos jeringas a enfrentarse se juntan en la cámara de mezclado la solución se diluye en un factor de 1 en 2.

Segundo experimento (Aptamer\_1R1 con Sonda 142 y Sonda 148):

Se preparó la pre-incubación del aptámero 1R1 con la Sonda 142 (fluoróforo en el REVERSE) y la Sonda 148 (quencher en el FORWARD) en un volumen de 800 ul en tubitos de 1.5 ml. Cada tubito fue tratado con 800 ul de Buffer SELEX 1X y con 800 ul de péptido pepFH\_14 a 1 uM. Por otro lado, se preparó la pre-incubación del aptámero 1R1 solo con la Sonda 142 (fluoróforo en el REVERSE) en un volumen de 800 ul en tubitos de 1.5 ml. Esta mezcla fue enfrentada con 800 ul de péptido pepFH\_14 a 1 uM en el equipo de Stopped-Flow. La concentración del aptámero fue de 0.2 uM y la concentración de la sonda fue de 0.15 uM.

Tercer experimento (Aptamer\_1R1 y la prueba de especificidad):

Se preparó la pre-incubación del aptámero 1R1 con la Sonda 142 (fluoróforo en el REVERSE) y la Sonda 148 (quencher en el FORWARD) en un volumen de 800 ul en tubitos de 1.5 ml. Cada tubito fue enfrentado con 800 ul de Buffer SELEX 1X, con 800 ul de péptido pepFH\_14 a 1 uM, con 800 ul de péptido pepFH\_15 a 1 uM y con 800 ul de péptido pepFH\_21 a 1 uM. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en el aparato Stopped-Flow. La concentración del aptámero fue de 0.2 uM y la concentración de la sonda fue de 0.15 uM.

Cuarto experimento (Aptamer\_1R1 y la titulación):

Se preparó la pre-incubación del aptámero 1R1 con la Sonda 142 (fluoróforo en el REVERSE) y la Sonda 148 (quencher en el FORWARD) en un volumen de 800 ul en tubitos de 1.5 ml. Cada tubito fue enfrentado con 800 ul de Buffer SELEX 1X y con 800 ul de péptido pepFH\_14 a diferentes concentraciones. Las concentraciones del péptido pepFH\_14 que se usaron fueron 0.4 uM, 0.6 uM, 0.8 uM y 1 uM. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en el aparato Stopped-Flow. La concentración del aptámero fue de 0.2 uM y la concentración de la sonda fue de 0.15 uM.

## **IV. RESULTADOS**

### **4.1. Selección de Blancos para SELEX.**

Una vez realizado el blast local de las 57 proteínas extraídas de la bibliografía en el genoma de *T. solium*, se observó que no todas las 57 proteínas se encontraron en el genoma (Tabla 2). Sin embargo, varias de las proteínas se encontraban dentro de la familia de 8 kDa y eran variantes de la misma proteína. Además, se debe mencionar que toda la familia de 8 kDa se encuentra representada solo por el gen 16857. Esto es curioso ya que se sabe que la familia de 8 kDa es muy amplia en la cantidad de proteínas representantes y en variantes dentro de la misma proteína (39). Otro hecho que se notó fue que los alineamientos de la familia de 8 kDa con el gen 16857 son de un bit-score muy bajo (menor a 100), lo que conlleva también a valores de e-value muy altos.

**Tabla 2. Blast local de las 57 proteínas en el Secretoma teórico de *Taenia solium***

Query	Accession Number	Gene	Score (bits)	E-value	% Identidad	SP	TM
Tripsin-like protein	ADP89566	5082	256	7.00E-79	83%	No	No
Enolase	AHB59732	12704	886	0*	99%	No	No
Diagnostic Antigen GP50a Precursor	AAP49286	11176	61	5.00E-13	57%	No	No
Diagnostic Antigen GP50b Precursor	AAP49287	11176	60	7.00E-13	57%	No	No
Diagnostic Antigen GP50c Precursor	AAP49288	11176	61	5.00E-13	57%	No	No
Cat L-cloning protein	AQQ11627	13915	432	1.00E-153	99%	Si	No
T24	AAP47268	11421	64	3.00E-14	69%	No	No
Small Heat-Shock Protein	CAD36617	14693	138	2.00E-41	100%	No	No
p27	AEF14021	13487	71	6.00E-17	82%	No	No
Paramyosin	AAT94289	7923	242	4.00E-75	87%	No	No
H17g protein, Tegumental Protein	CAE46111	3396	216	2.00E-68	97%	No	No
Antigen	AAP03079	10861	348	1.00E-114	87%	No	No
Annexin	AAF64166	1872	143	6.00E-43	100%	No	No
Antigen cC1	AAD34598	1872	143	6.00E-43	100%	No	No
Calcium Binding Protein Calreticulin Precursor	AAK52725	8484	286	4.00E-95	60%	No	No
26.5 Kda Glutathione-S-transferase	AAX19694	10374	88	3.00E-32	100%	No	No
Glutathione-S-transferase	AAM64045	10296	77	2.00E-19	100%	No	No
2-Cys Peroxiredoxin	AAV91322, ACM89281	14708	254	2.00E-87	93%	No	No
Sodium/Potassium-Transporting ATPase Subunit Alpha	Q6RWA9	15827	845	0*	99%	No	No
Glucose Transporter TGTP2	AAB05920	1619	143	8.00E-42	98%	No	Si
Immunoegenic Protein Ts76	AAF60976	8524	128	2.00E-40	100%	No	No
Immunoegenic Protein Ts21	AAF60975	7165	25	8.20E-01	39%	No	Si
Ts18var1	AF098073	16857	35	2.00E-04	35%	No	No
TsRS2	AF356344, AB044080, AF356343	16857	36	8.00E-05	36%	No	No
Ts14var1	AF356335	16857	29	3.70E-02	31%	No	No
TsRS1	AF216695, AB044083, AB044082, AF082830	16857	44	2.00E-07	37%	No	No
Low Molecular Weight Antigen 1	BAB18643	16857	36	9.00E-05	36%	No	No

Los genes que alinearon con las proteínas reportadas en la bibliografía como secretadas/excretadas no presentan el péptido señal en el secuenciamiento. Todas estas observaciones muestran que el genoma secuenciado en el laboratorio de bioinformática se encuentra incompleto y poco representativo de la evidencia encontrada hasta ahora en la bibliografía. Por ende, se optó por usar las secuencias reportadas en la bibliografía en vez de las del secuenciamiento. A continuación, se seleccionaron 10 proteínas como buenos blancos para SELEX: la familia de 8 kDa (5 proteínas), GP50, T24, tripsin-like protein, catepsina L y la enolasa del metacéstode de *T. solium*. Se decidió estandarizar la metodología SELEX con el péptido de superficie seleccionado para Ts18.

#### **4.2. Péptidos de Superficie como blancos para SELEX**

Las proteínas propuestas como blancos para diagnóstico de neurocisticercosis han sido pobremente estudiadas en su estructura. Además, actualmente, no se cuenta con estructuras tridimensionales de las proteínas pertenecientes a la familia de 8 KDa. Sin embargo, haciendo uso de diversas herramientas bioinformáticas se pudo inferir la mejor posición de los péptidos de superficie. Para la proteína Ts18var1 la información de estructura 3D se obtuvo principalmente de la predicción del NetSurfP, en el cual se observó una secuencia altamente expuesta (aminoácidos del 40 al 44) que se encuentra entre dos hélices alfa (Figura 12D). En el SWISS Model se corroboró este loop aunque no de manera significativa.



Ts18var1 como miembro de la familia de 8 kDa tiene muchas secuencias similares dentro del mismo genoma de *T. solium*. En la Figura 7A se muestra cómo la región del péptido seleccionado para la proteína Ts18var1 (pepFH\_14) se sobrepone con el péptido para la proteína Ts14 y el péptido para la proteína TsRS2. En el caso Ts18var1, las predicciones de sitios de N-glicosilación sirvieron para no seleccionar un péptido que se sobreponga en este sitio (Figura 7A, recuadro amarillo). Como se esperaba, Ts18var1 mostró muchas proteínas homólogas en especies como *T. multiceps*, *T. hydatigena* y *E. granulosus* (Figura 7B). Luego, para los hospederos de *T. solium*, Ts18var1 presentó 3 hits muy poco significativos como para considerarlos, lo que confirma la especificidad de la familia de 8 KDa para *T. solium*. Finalmente, para seleccionar la posición de los péptidos se usaron los alineamientos múltiples que se obtuvieron usando las secuencias más homólogas. Para la proteína Ts18var1 se identificaron 3 sitios de glicosilación (Figura 7C). La posición de los péptidos no debe pasar por los sitios de glicosilación. En la tabla 3 se muestra la posición del péptido de superficie (pepFH\_14) dentro de la proteína Ts18var1; asimismo, se muestran los demás blancos y los péptidos que fueron seleccionados para producir aptámeros.

**Tabla 3. Lista de Péptidos de Superficie de las Proteínas Blanco para SELEX**

N° Accesion	Proteína	Tamaño	Descripción	Referencias	Nombre	Péptido	Posición en la Proteína
AAP49287	GP50	298 aa	Proteína anclada GPI a membrana TSES	Hancock K. et al. (2004)	pepFH_10	VKDESADLRVFRGVFPRKTN	V191 - N210
AAP47268	T24	255 aa	Proteína integral de membrana	Hancock K. et al. (2006)	pepFH_11	QEAIQELQSKRLSGSDPTLK	Q117 - K136
AJ508918	Ts8B2	85 aa	Familia de 8 KDa	Ferrer E. et al. (2007)	pepFH_12	APDDDKGQEDLNIMIVMKQLG	A19 - G38
AF082830	TsRS1	82 aa	Familia de 8 KDa	Greene RM et al. (2000)	pepFH_13	EETKPEDVVKNIKKGMEVYV	E17 - Y36
AF098073	Ts18var1	83 aa	Familia de 8 KDa	Greene RM et al. (2000)	pepFH_14	HNWFFHDDPIGKQIAQLAKN	H36 - N55
AF356335	Ts14	85 aa	Familia de 8 KDa	Greene RM et al. (2000)	pepFH_15	HEDPISKQIAQLAKEWKEAM	H43 - M62
JF906193	TsRS2	85 aa	Familia de 8 KDa	Kim SH et al. (2011)	pepFH_16	KSINKWIEFVHRFFYED	K29 - D45
ADP89566	Tripsin-like protein	478 aa	Serino Proteasa presente E/S de oncósferas	Rueda A. et al. (2011)	pepFH_17	NEDYEDELGQYEPERSLYS	N161 - S180
AQQ11627	Catepsina L	211 aa	Cisteino Proteasa presente en el fluido quístico	Zimic M. et al. (2007)	pepFH_18	HEGYDDPECKGHMDDLN	H141 - N158
AHB59732	Enolasa	433 aa	Enzima de la Glicólisis	Victor B. et al. (2012)	pepFH_19	QDGKYNLDFKNPAAASSIV	Q253 - V272

### 4.3. Producción de aptámeros contra péptidos de Ts18var1

Un punto clave en la metodología SELEX es la amplificación de la biblioteca, la cual se realiza con una PCR convencional. El uso de esta técnica es la causante del problema de formación de productos secundarios (62). En el presente trabajo se optó por dos alternativas de amplificación. La primera alternativa que se intentó fue adaptar una PCR emulsión. La segunda alternativa que se evaluó fue utilizar la transcripción *in vitro* como principal paso de amplificación. Para la metodología de SELEX por PCR emulsión las condiciones de rigurosidad que se manejaron fueron el número de lavados y el tiempo de incubación (Figura 13A). Se realizaron en promedio 5 rondas de selección para los péptidos: pepFH\_10 (GP50), pepFH\_11 (T24), pepFH\_12 (Ts8B2), pepFH\_13 (TsRS1), pepFH\_14 (Ts18var1), pepFH\_17 (Trypsin-like protein) y pepFH\_18 (Cathepsina L) (tabla 3). En cada ronda de amplificación se verificó cualitativamente los productos de PCR emulsión mediante electroforesis en geles de agarosa. En ciclos iniciales los productos aparecieron predominantemente del tamaño esperado, alrededor de 76 pares de bases (Figura 13B). Sin embargo, se observó también la formación de productos difuminados de mayor tamaño (smear). Esta relación entre amplificado deseado y productos difuminados se mantuvo relativamente constante hasta el ciclo 3 de SELEX. En el cuarto ciclo de amplificación el producto de 76 pb se redujo notablemente mientras que los contaminantes se acentuaron en intensidad relativa como también en tamaño. Así mismo se observó la aparición de productos extremadamente grandes con mínima migración en 3% de agarosa. Estos últimos

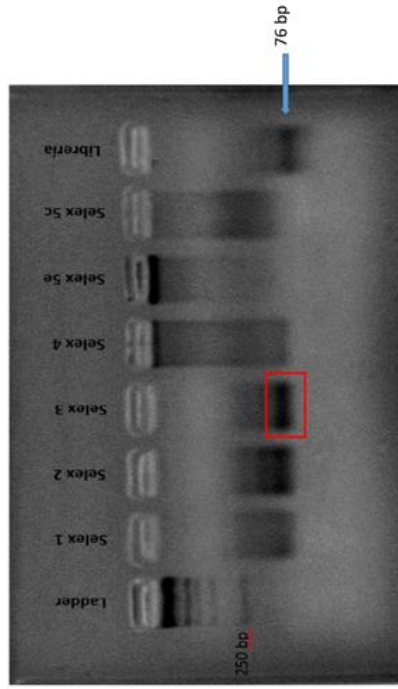
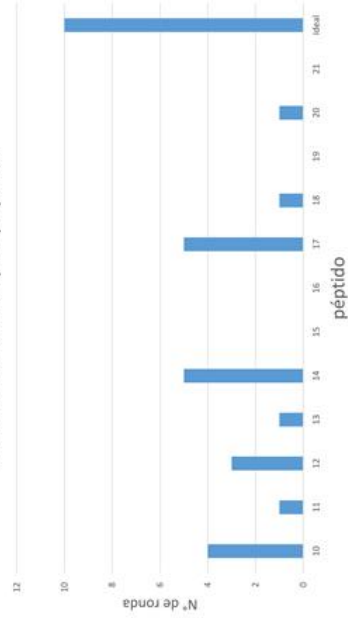
formaban una banda neta en el gel (Figura 13B, selex 4). Con el fin de determinar si las formaciones de dichos productos aberrantes eran específicos de la PCR por emulsión, se procedió a comparar la misma con una PCR convencional para una selección sucesiva. En ambos casos se observó la desaparición del producto de interés, sin embargo, la formación de productos aberrantes difirió entre aproximaciones de amplificación (Figura 13B, selex 5e y 5c). La formación de productos extremadamente grandes se observó solo para PCR emulsión mientras que productos difuminados de diversos pesos moleculares aparecieron en ambos. Otra limitación observada fue que el protocolo de SELEX por PCR emulsión requiere grandes cantidades de material para ser utilizado en el siguiente paso de selección (como mínimo 1 ug) por lo que no permitía preservar una muestra representativa de la biblioteca para casos en que hubiera que retroceder en las rondas de SELEX.

**A****Parámetros de SELEX para el péptido 17**

Tripsin-like protein péptido 17									
Round	Input DNA (µg)	sdDNA (pmol)	Bed (µg) + Target (pmol)	Time (min)	Washing Steps	Number of PCR cycles	Output	Output Yield (µg)	
1	50	2160	150 + 1800	90	0	15	0.11	0.318	0.926
2	1	21.6	40 + 700	90	1	15	0.315	1.255	
3	1	21.6	40 + 700	90	2	18	0.39	0.996	
4	1	21.6	40 + 700	60	2	20	3.19		
5	1	21.6	40 + 700	60	2	15 + 20	0.436	6.41	

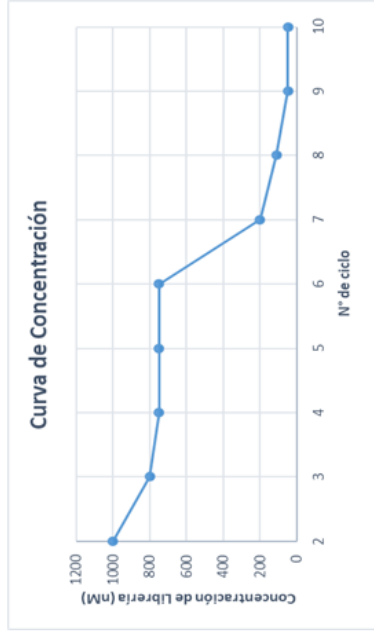
**B**

Gel de Agarosa al 3% SELEX para el péptido 17

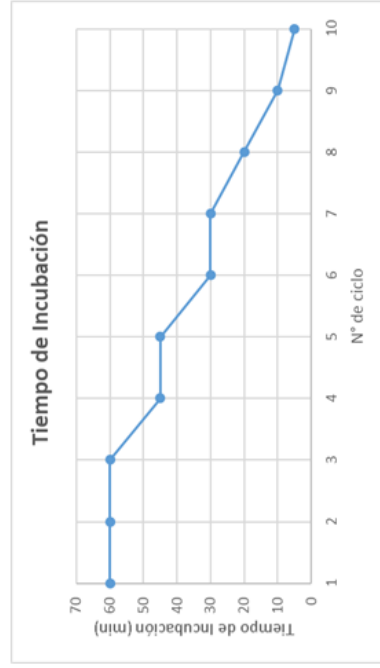
**C****Avance del SELEX por péptido**

**Figura 13.** Metodología de SELEX por PCR emulsión. A) Diseño de las condiciones de rigurosidad en las rondas SELEX para el péptido pepFH\_17 proveniente de tripsin-like protein. B) Gel de agarosa 3% para todas las rondas que se avanzaron para este péptido antes y durante la contaminación de las muestras. C) Avance que se logró para todos los SELEX con varios péptidos.

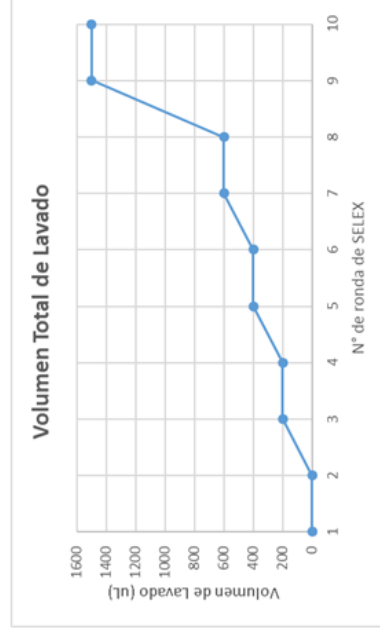
Las condiciones de rigurosidad que se usaron en la metodología de SELEX por transcripción *in vitro* fueron las siguientes: la concentración de biblioteca, el tiempo de incubación y el volumen total de lavado. A medida que se avanzó en las rondas de SELEX se tendió a disminuir la concentración de biblioteca para mejorar la sensibilidad del probable aptámero (Figura 14A). La concentración de la biblioteca comenzó con 5000 nM y finalizó, en la ronda 10, con 50 nM. Entre las rondas 6 y 7 se disminuyó la concentración de la biblioteca de 800 nM a 200 nM. La concentración de biblioteca y la concentración de blanco siempre fueron las mismas salvo en la primera ronda de SELEX en la que se buscaba asegurar atrapar biblioteca para asegurar el uso de biblioteca nueva. El tiempo de incubación fue disminuido a medida que se avanzó en las rondas de SELEX para evolucionar una cinética rápida de la interacción de la biblioteca con el péptido bajo la premisa de que a menor tiempo de interacción más rápida tenía que ser la interacción para quedar en la biblioteca enriquecida (Figura 14B). La primera ronda tuvo 60 minutos de tiempo de incubación, mientras que en la última ronda se redujo a 5 minutos. Por último, el volumen final de lavado exigía a la biblioteca pegada al blanco que resistiera las constantes diluciones que se realizaba al colocar buffer de lavado; por ende, la interacción del péptido y el probable aptámero debían ser muy fuerte, lo cual podría significar mayor afinidad (Figura 14C). El volumen de lavado fue incrementado drásticamente entre la ronda 8 y 9 durante el SELEX.



**A**



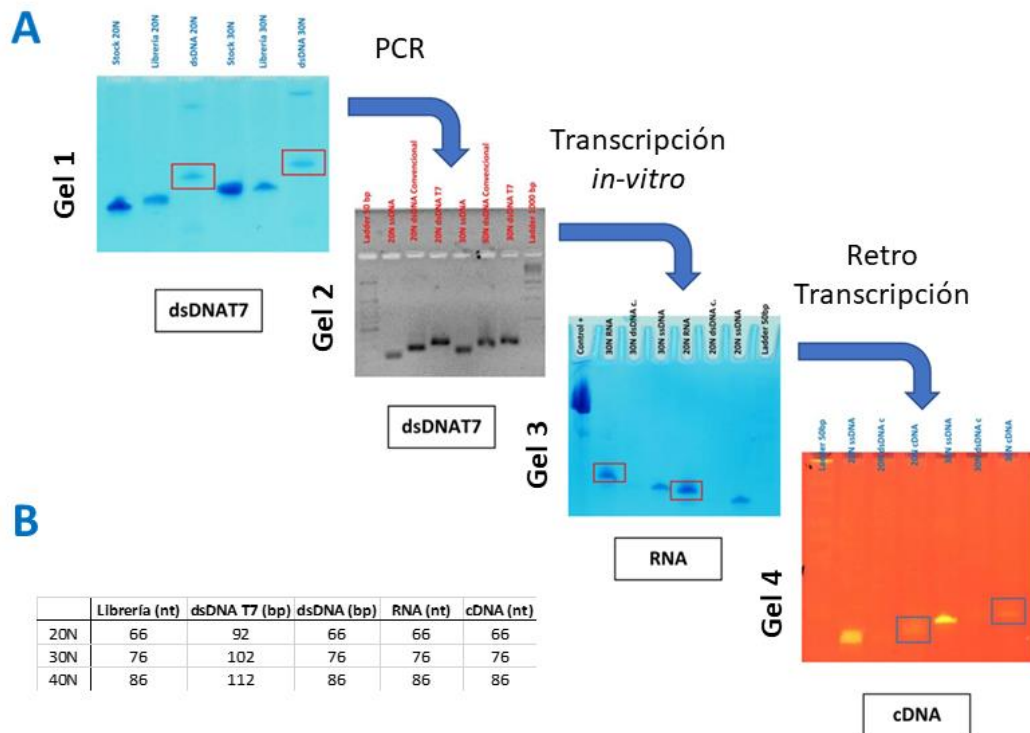
**B**



**C**

**Figura 14.** Condiciones de rigurosidad para la metodología SELEX por transcripción in vitro. A) Reducción de la concentración de biblioteca a medida que se avanza en las rondas del SELEX. B) Reducción del tiempo de incubación de la biblioteca con el péptido a medida que se avanza en las rondas de SELEX. C) Aumento en el volumen total de lavado en cada ronda del SELEX.

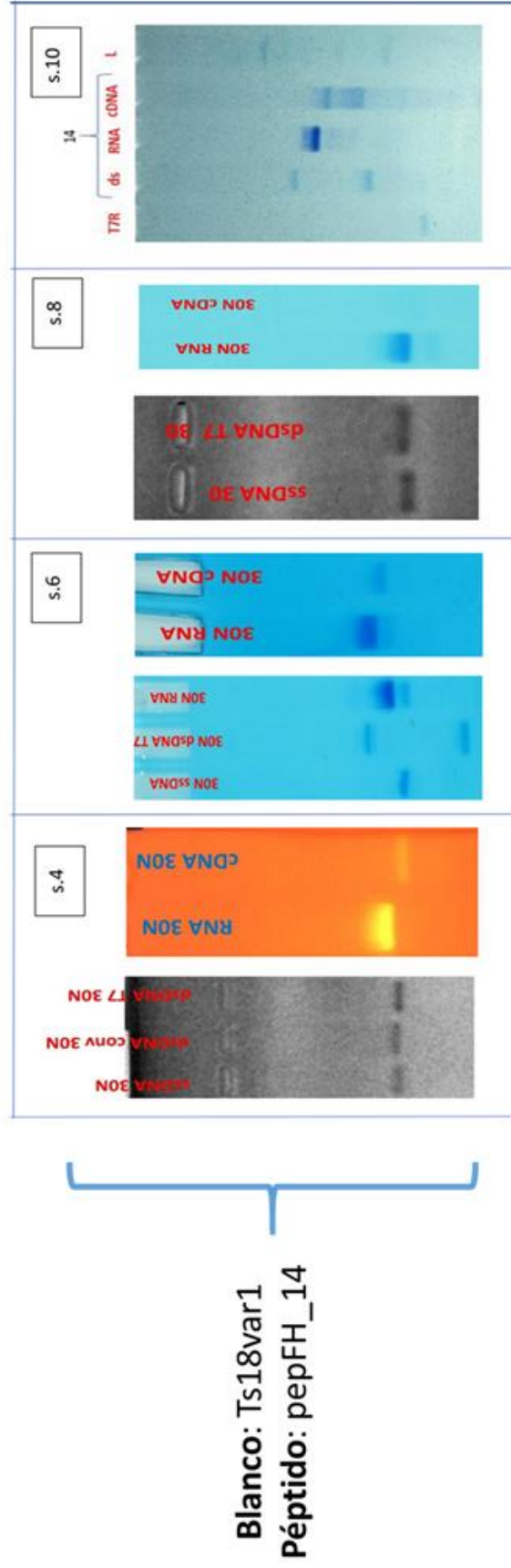
Los pasos dentro de cada ronda en la metodología de SELEX por transcripción *in vitro* fueron controlados con geles (Agarosa y Poliacrilamida) como se observa en la Figura 15A. Terminado el paso de selección era necesario comenzar la amplificación con una PCR convencional en la cual uno de los primers lleve un promotor T7 y poder realizar la transcripción *in vitro*. Por esta razón, una manera de controlar que el PCR había logrado insertar el promotor T7 era diferenciando su migración en geles. El producto de dsDNA-T7 debía ser más grande (26 pares de bases más) que un producto de PCR sin promotor T7 de la biblioteca; asimismo, el producto dsDNA sin promotor T7 debía colocarse más arriba que el ssDNA en un gel de electroforesis debido a la complejidad estructural (Figura 15A, gel 1 y gel 2). Una vez que se confirmaba estas variaciones de tamaño y calidad de banda, se realizaba la transcripción *in vitro*. Si bien la transcripción *in vitro* necesita el promotor T7 para completar el proceso, esta región no se transcribe así que el tamaño del ARN vuelve a ser el de la biblioteca inicial (Figura 15A, gel 3). Sin embargo, el ARN contiene tres guaninas más en el extremo 5' que vienen del promotor T7 lo que hace que la banda del ARN sea más grande que el cDNA (ssDNA) producto de la retro-transcripción a partir de este mismo ARN (Figura 15A, gel 4). Además, el ARN tiene un grupo hidroxilo (-OH) en el Carbono 2 de la ribosa, mientras que el ADN solo contiene un hidrógeno (-H). Esto último le proporciona al ARN mayor peso con respecto al cDNA.



**Figura 15.** Controles de proceso dentro de una ronda de SELEX por transcripción *in vitro*. **A)** La librería afín al target que se obtiene de la ronda de SELEX es una hebra de ADN (ssDNA) que entra inmediatamente a amplificarse por PCR para obtener dsDNA-T7 (gel 1 y gel 2), debido a que el reverse contiene un promotor T7 el dsDNA-T7 puede convertirse a RNA por una transcripción *in vitro* (gel 3). Finalmente, el RNA se devuelve a ssDNA mediante una Retrotranscripción (gel 4). **B)** Tabla que muestra los cambios en el tamaño de la librería (pares de bases o nucleótido según sea el caso) en los diferentes estados dentro de una ronda de SELEX.

Este proceso de la metodología SELEX por transcripción *in vitro* se repitió hasta conseguir el enriquecimiento de la biblioteca para el péptido pepFH<sub>14</sub> proveniente de la proteína Ts18var1 (Figura 16). Cabe mencionar que en la figura se muestran las rondas que finalizaron con el enriquecimiento en la ronda 10, pero para lograr esto se tuvo que evaluar que los productos no se encuentren con productos difuminados o con sub-productos; por ende, hubo rondas que tuvieron que repetirse hasta obtener un producto aceptable. Generalmente los sub-productos han aparecido en rondas avanzadas del SELEX. Una manera que se evaluó, para

resolver el problema, fue cortar la biblioteca del gel para separarla de los sub-productos, pero las bandas volvían a aparecer en ciclos posteriores y no se llegaba a enriquecer la biblioteca. Este problema provocó varias veces tener que retroceder en las rondas para eliminar la aparición de estos sub-productos o repetir la ronda. Como se observa en la figura, generalmente los productos de la retro-transcripción contenían la banda difuminada. Esto se resolvió corrigiendo el tiempo de hidrólisis alcalina. Este paso consiste en degradar el ARN que sirvió como template para producir cDNA en la retro-transcripción. Se utilizó una solución que contenía NaOH 1M y EDTA 0.5M, la cual brinda un ambiente alcalino que provoca que el grupo hidroxilo del carbono 2 de la ribosa pierda un protón y se convierta en un nucleófilo y ataque el fósforo del enlace fosfodiéster (Anexo - Figura 1).



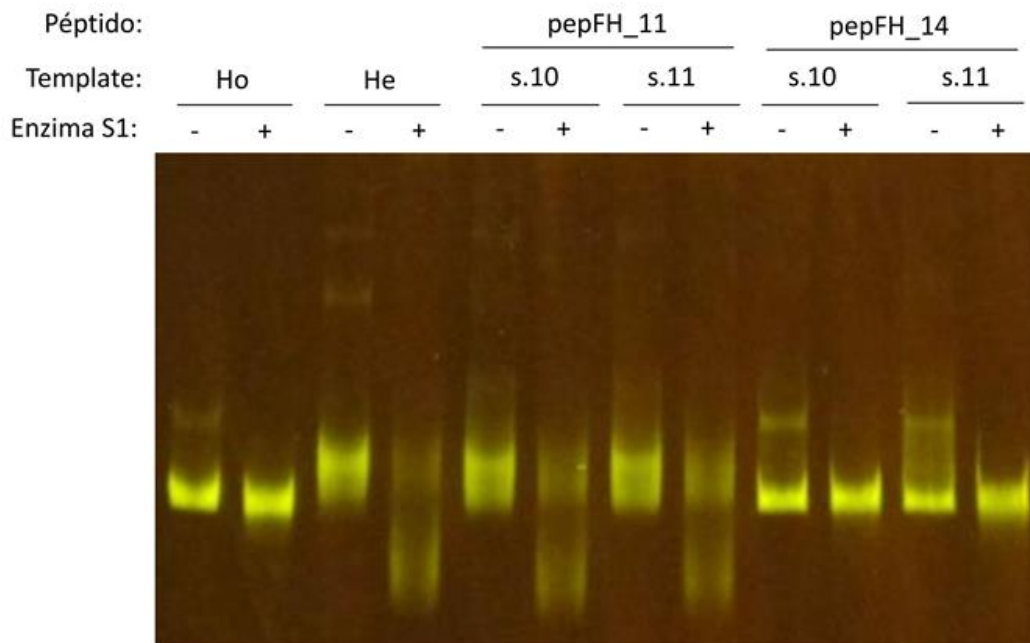
**Figura 16.** Rondas de SELEX por transcripción *in vitro* para s4, s6, s8 y s10. Se muestran los geles de verificación de producto para pasar a rondas posteriores para el péptido pepFH\_14 que proviene de la proteína Ts18var1.

#### **4.4. Prueba de Enriquecimiento.**

El SELEX es un método cíclico hasta que se obtenga enriquecimiento suficiente para asegurar que ya no es necesario realizar más rondas. Dentro de las diversas metodologías que permiten determinar el enriquecimiento se optó por el protocolo de Lim TS *et al.* (2011) la cual fue llamada prueba DiVE o prueba S1. La prueba consiste en aprovechar la diferencia en la velocidad de hibridación entre bibliotecas dsDNA poco diversas y bibliotecas dsDNA muy diversas. Como se observa en el esquema de la figura 13A este proceso consiste en calentar y enfriar inmediatamente lo que provoca efectos contrarios entre las bibliotecas según su diversidad. Las bibliotecas dsDNA muy poco diversas o como una biblioteca homodúplex (una sola secuencia) se separan al ser calentadas a 98°C pero no tienen problema en encontrar su hebra complementaria al ser enfriados. Sin embargo, las bibliotecas dsDNA muy diversas como una biblioteca heterodúplex tienden a formar hibridaciones con secuencias diferentes a las complementarias lo que deja partes de una sola hebra. Por tal razón, al usar la enzima S1 que es una endonucleasa cuyo blanco son secuencias de hebra simple, las secuencias muy diversas sufren bastante degradación en comparación con bibliotecas poco diversas.

La prueba de enriquecimiento S1 se probó a partir de la sexta ronda, pero las bibliotecas mostraron enriquecimiento recién en la décima ronda como se observa para el péptido pepFH\_14 proveniente de la proteína Ts18var1 (Figura 13 C). Sin embargo, la biblioteca para el péptido pepFH\_11 proveniente de la proteína T24 no obtuvo enriquecimiento. Un punto importante en estos ensayos fue comparar las diferencias en el procedimiento para pepFH\_11 y pepFH\_14. Ambos

son péptidos pertenecientes a regiones flexibles de sus respectivas proteínas, pero para el péptido pepFH\_14 se contaba con péptidos que sobrelapan con la secuencia de pepFH\_14 como los péptidos pepFH\_15 y pepFH\_16 (Figura 7A). Es decir que si no se hubieran usado estos péptidos durante rondas de SELEX negativo muy probablemente no se habría llegado a un enriquecimiento. Hay que recordar que los aptámeros son específicos a nivel molecular; es decir, simples cambios en un aminoácido pueden ser detectados. El péptido pepFH\_11 no tenía péptidos semejantes provenientes del mismo *Taenia solium* o de la familia Taeniidae. Además, considerando que T24 pertenece a la superfamilia de la tetraspaninas se pudo considerar utilizar péptidos provenientes de la tetraspaninas humanas o del cerdo para mejorar el proceso de SELEX. Finalmente, por más que la estrategia de utilizar péptidos sintéticos superficiales asegure el uso de regiones altamente únicas en la proteína de origen; es necesario utilizar péptidos provenientes de proteínas homólogas para obtener un enriquecimiento en el SELEX. Sin embargo, esto no asegura que el aptámero producido no detecte inespecíficamente alguna proteína del proteoma humano. Dado esto lo más recomendable habría sido realizar una ronda de SELEX negativo con el proteoma de un paciente sin neurocisticercosis, lo cual se puede sumar en una ronda posterior. El principal objetivo del presente trabajo fue poder evidenciar la obtención de bibliotecas enriquecidas para el blanco de interés.



**Figura 17.** Resultado de la Prueba S1 de Enriquecimiento en las muestras de SELEX de las rondas 10 y 11 (s.10 y s.11) para los péptidos pepFH\_11 y pepFH\_14. Gel de Agarosa 3%.

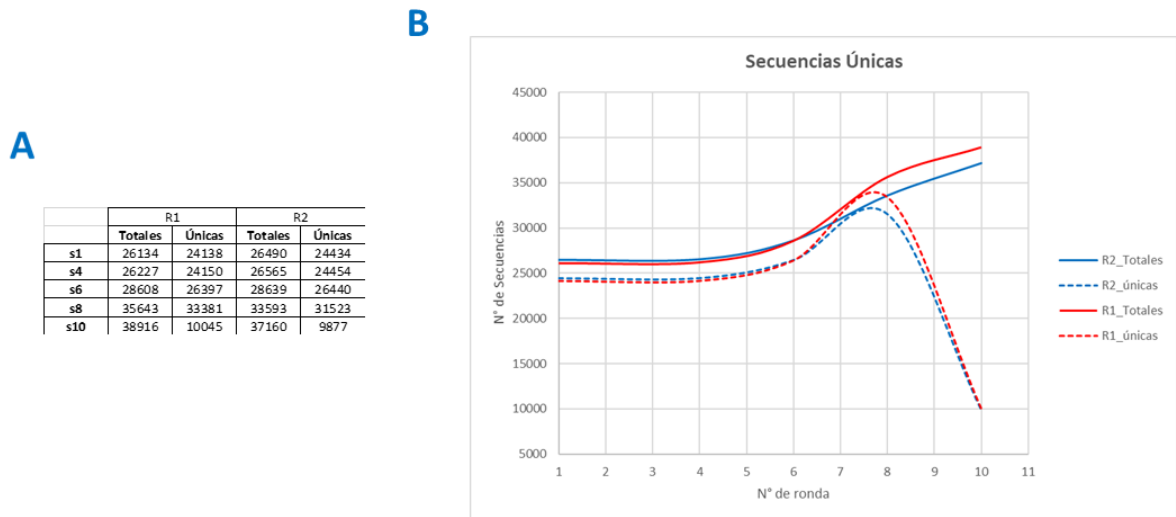
La adaptación desarrollada en este trabajo tiene ligeras modificaciones con respecto al trabajo original desarrollado por el grupo de Konthur Z. en el laboratorio de Genética Molecular del Instituto Max Planck. En dicho trabajo se utilizó las bibliotecas de Phage Display que también utilizan bibliotecas randomizadas de un tamaño de  $1.37 \times 10^8$  secuencias diferentes. La visualización de las bibliotecas digeridas por la enzima S1 se observaron en geles de agarosa 1% y con bromuro de etidio. Sin embargo, en este trabajo, se utilizaron bibliotecas para producir aptámeros que son de un tamaño de 1015 secuencias diferentes. En el caso de la visualización, se demostró que los geles nativos de poliacrilamida al 8% teñidos con RunSafe (agente no tóxico) ofrecían mejor grado de definición para evidenciar el enriquecimiento de las bibliotecas (Anexo – Figura 2). Usar geles de agarosa 3%

en nuestro caso resultó engañoso como se muestra en la figura 14, en la cual se muestra la misma prueba de enriquecimiento, pero visualizada en geles distintos.

#### **4.5. Identificación de posibles aptámeros.**

Para identificar las secuencias de los posibles aptámeros en el secuenciamiento de las bibliotecas se siguió un análisis bioinformático con la intención de determinar: abundancia dentro de cada ronda, enriquecimiento entre rondas del SELEX, los motivos dentro de grupos de secuencias semejantes en las rondas y la estructura de los posibles aptámeros. Para realizar el conteo de secuencias diferentes y la abundancia de estas se usó el comando `fastaptamer_count`, el cual es un script incluido en el programa FASTAptamer (58). Se observó que, a lo largo de las rondas, salvo la ronda 10, el número de secuencias únicas respecto del número de secuencias totales no varió, manteniéndose en un 92% de las secuencias totales (Figura 18). Sin embargo, en la ronda 10 el número de secuencias únicas disminuyó considerablemente hasta un 26% del total de secuencias. Lo cual confirma el enriquecimiento observado con la prueba S1. Este patrón se repite para el secuenciamiento R1 y R2. Por otro lado, el número de secuencias (totales y únicas) comenzaron a aumentar a partir de la ronda 6. Este incremento en el número de secuencias puede deberse a que las condiciones de rigurosidad no ejercían suficiente presión selectiva en la población de secuencias o que la metodología de SELEX por transcripción *in vitro* favorece la aparición de

más secuencias de diferentes tamaños con respecto al tamaño inicial (76 nucleótidos).



**Figura 18.** Secuencias únicas en las rondas del SELEX. A) Tabla con el número de secuencias totales y únicas en las bibliotecas secuenciadas de las rondas del SELEX para el péptido pepFH\_14. B) Curva del número de secuencias en cada ronda del SELEX. Entre la ronda 8 y 10 se notó una bajada considerable en el número de secuencias únicas que comprueba el enriquecimiento encontrado en la prueba S1.

Si bien el comando `fastaptamer_count` permitió contar las secuencias dentro de cada ronda, para determinar el enriquecimiento de cada secuencia entre rondas de SELEX se usó el comando `fastaptamer_enrich`. Se observó que el enriquecimiento en el secuenciamiento R1 y R2 presentó a la misma secuencia como la más enriquecida (Aptamer\_1R1 y Aptamer\_1R2) (Tabla 4). Esta secuencia se enriqueció 7625 veces en R1 y 14712 veces en R2. Aunque resulta inusual que el enriquecimiento se duplicara en R2 en comparación con R1, esta secuencia representa un muy probable aptámero con alta afinidad contra el péptido pepFH\_14. Además, la secuencia Aptamer\_2R1 tiene un enriquecimiento de 3500 veces en R1,

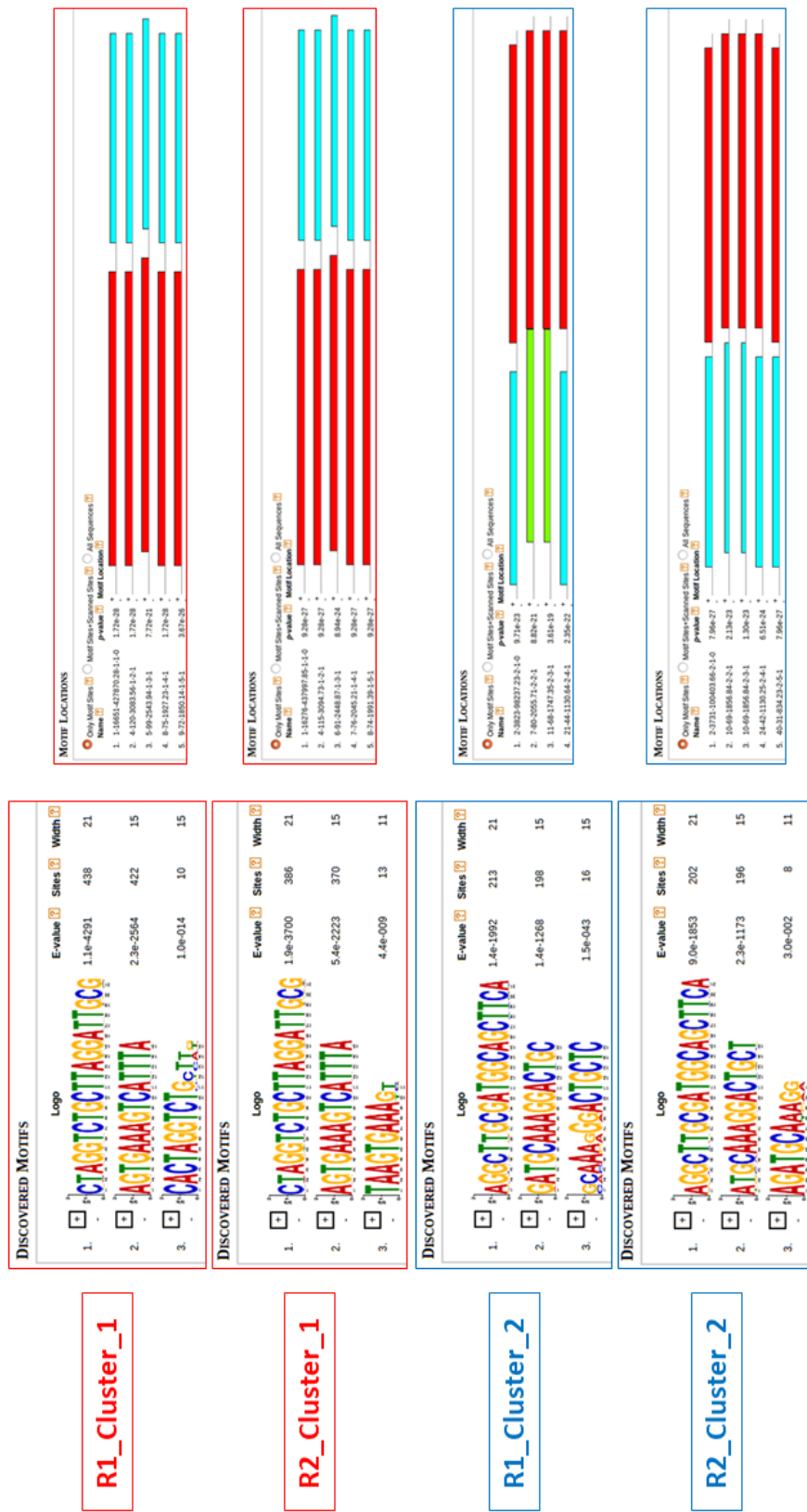
pero en R2 el enriquecimiento solo es de 4.5 veces. Lo cual significa que la hebra forward de esta secuencia se encontraba muy representada, pero la hebra reverse de la misma secuencia no estaba presente. Esto puede deberse a un problema en la preparación de las bibliotecas antes del secuenciamiento o durante el filtrado por calidad de los archivos fastq. Sin embargo, la secuencia Aptamer\_3R1 presenta valores de enriquecimiento consistentes en ambos secuenciamientos. En R1 se enriqueció 31,6 veces, mientras que en R2 se enriqueció 29 veces.

**Tabla 4. Lista de posibles aptámeros**

Nombre	Secuencia	Enrich
Aptamer_1R1	CACTAGGTCTGCTTAGGATTGCGTAAAGTAAAAGTCATTTA	7625
Aptamer_2R1	AGATGCAAAGGACTGCTCAGGCTTGGATGGCAGCTTCAT	3500
Aptamer_3R1	ACCGACTACGTCAACCTGGGTCTGCTCGGGATTGCGGATG	31.6
Aptamer_4R1	CAAGCGTTGGTGGGAGGGTGGGTGGAAACGCGACGAATCG	27.5
Aptamer_5R1	ACCGACTACGCCAACCTGGGTCTGCTCGGGATTGCGGATG	6.4
Aptamer_1R2	CACTAGGTCTGCTTAGGATTGCGTAAAGTAAAAGTCATTTA	14712
Aptamer_2R2	ACCGACTACGTCAACCTGGGTCTGCTCGGGATTGCGGATG	29
Aptamer_3R2	CAAGCGTTGGTGGGAGGGTGGGTGGAAACGCGACGAATCG	22
Aptamer_4R2	AGATGCAAAGGACTGCTTAGGCTTGGATGGCAGCTTCAT	4.5
Aptamer_5R2	GCCGACTACGTCAACCTGGGTCTGCTCGGGATTGCGGATG	4.3

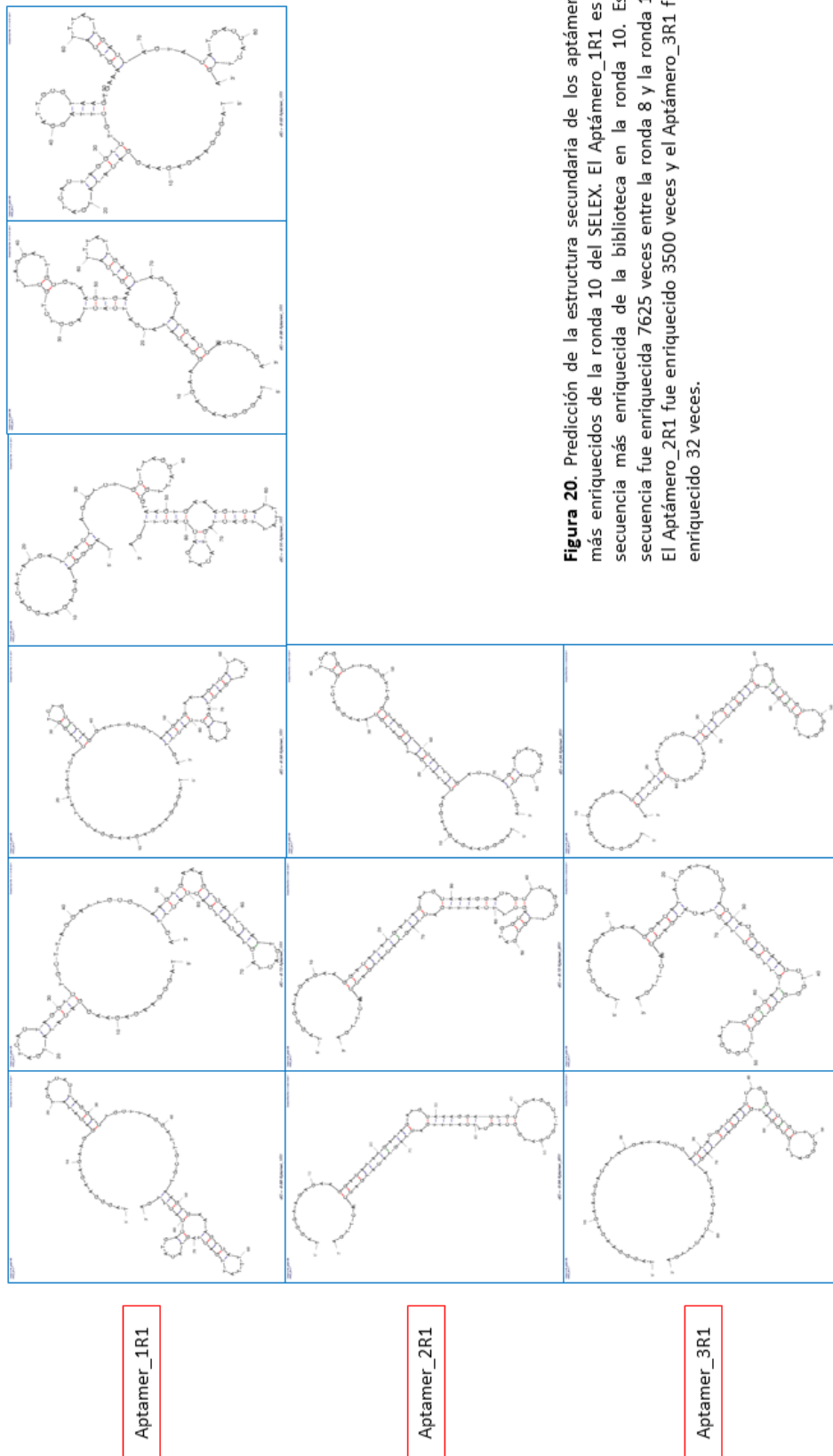
Como se mencionó anteriormente el enriquecimiento básicamente se produjo en la ronda 10 del SELEX; razón por la cual, el análisis de grupos de secuencias semejantes (Clusters) se realizó en esta ronda. Para esto se utilizó el comando fastaptamer\_cluster. Se observó que en los dos primeros grupos o clusters se encontraban las secuencias más enriquecidas, por ende, se analizó con el programa MEME los motivos más representativos en estos dos clusters (Figura 16).

Al comparar los motivos encontrados en el cluster 1 de R1 y R2 se observó que los primeros dos motivos eran exactamente idénticos y además eran los que tenían mejor e-value. El motivo\_1 (CTAGGTCTGCTTAGGATTGCG) se ubica cercano al extremo 5' (izquierda) de la secuencia Aptamer\_1R1 con un e-value de  $1.1e-4291$  en R1 y  $1.9e-3700$  en R2. El motivo\_2 (AGTGAAAGTCATTTA) se ubica cercano al extremo 3' (derecha) de la secuencia Aptamer\_1R1 con un e-value de  $2.3e-2564$  en R1 y  $5.4e-2223$  en R2. Del mismo modo, en el cluster 2 de R1 y R2 se observó que los primeros dos motivos eran idénticos y con mejor e-value.



**Figura 19.** Identificación de motivos en los grupos de secuencias dentro de la biblioteca de la ronda 10 del SELEX. El cluster 1 contiene a las secuencias más representativas dentro de la ronda 10, seguido por el cluster 2. R1 es el secuenciamiento de la hebra forward, mientras que R2 es el secuenciamiento de la hebra reverse. Esto se debe a que se secuenció ADN de hebra doble. Los motivos de color rojo son de 21 unidades y los motivos turquesa de 15.

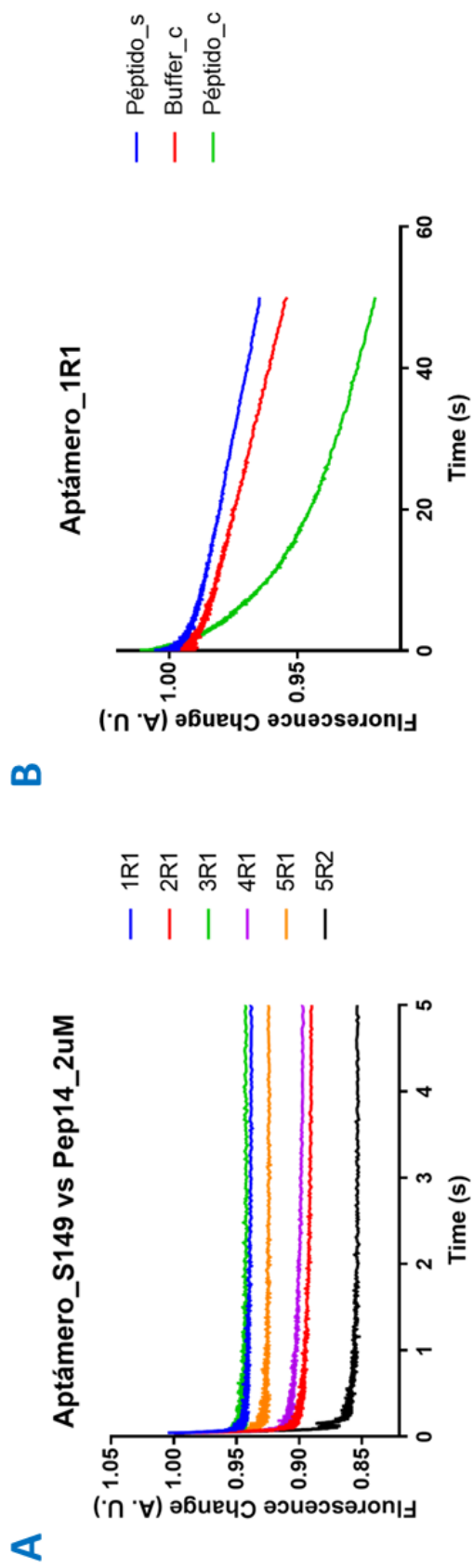
Debido a que las secuencias de Aptamer\_1R1, Aptamer\_2R1 y Aptamer\_3R1 se encuentran en clusters diferentes, se analizó la estructura secundaria de estas tres secuencias. La secuencia Aptamer\_4R1 se encuentra en el cluster 1 con la secuencia Aptamer\_1R1. Dentro de las estructuras secundarias más probables, se observó que el motivo\_2 junto con la secuencia del primer reverse forman estructuras muy estables (Figura 17). Este patrón se repite para el Aptamer\_2R1 y el Aptamer\_3R1. En conclusión, el secuenciamiento identificó a la secuencia Aptamer\_1R1 como el más probable aptámero para el péptido pepFH\_14 proveniente de la proteína Ts18var1. Con el motivo\_2 como más representativo e importante en la formación de estructuras secundarias.



**Figura 20.** Predicción de la estructura secundaria de los aptámeros más enriquecidos de la ronda 10 del SELEX. El Aptámero\_1R1 es la secuencia más enriquecida de la biblioteca en la ronda 10. Esta secuencia fue enriquecida 7625 veces entre la ronda 8 y la ronda 10. El Aptámero\_2R1 fue enriquecido 3500 veces y el Aptámero\_3R1 fue enriquecido 32 veces.

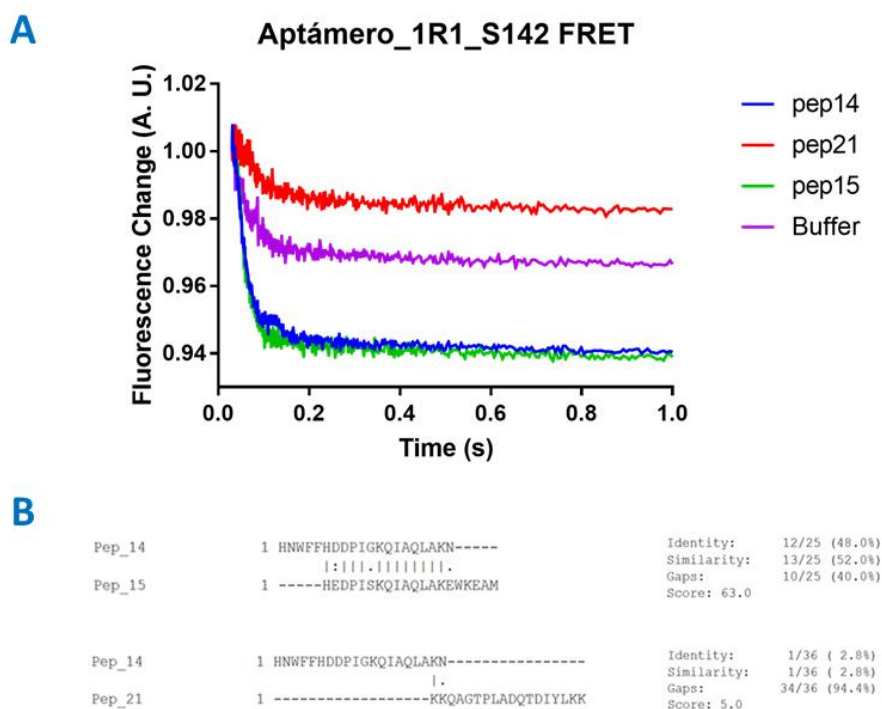
#### **4.6. Determinación de la interacción los posibles aptámeros y el péptido pepFH\_14.**

Los aptámeros que se mandaron a sintetizar mostraron en su análisis 2D que la región del primer reverse se encontraba comprometido en la estructura, razón por la cual se decidió evaluar todos los posibles aptámeros con una sonda que no hibride en la región del primer reverse sino mas bien en la región del primer forward. Para esto se hizo interactuar a todos los aptámeros con el péptido pepFH\_14 usando la sonda 149. Se pudo notar que todos los aptámeros mostraban la misma curva de interacción. Además, el aptámero 5R2 mostró la mayor variación en la fluorescencia con respecto a los demás aptámeros, mientras que el aptámero 1R1 y 3R1 mostraron una menor variación con respecto a los demás aptámeros (Figura 18A). Sin embargo, el aptámero 1R1 es la secuencia más enriquecida. Después de evaluar los aptámeros con valores extremos 1R1, 3R1 y 5R2 se pudo evidenciar la afinidad del aptámero 1R1 hacia el péptido pepFH\_14 mediante el uso de las sondas S142 y S148. Cuando el complejo formado por el aptámero 1R1 y la sonda S142 se incubaba con el péptido pepFH\_14 se observaba una variación en la fluorescencia similar al observado por el complejo del aptámero 1R1 y las sondas S142 y S148 incubada solo con buffer (Figura 18B). Sin embargo, cuando este último se enfrentaba con el péptido pepFH\_14 se observó un cambio acelerado de la fluorescencia, lo cual da evidencia del acercamiento entre el fluoróforo en la sonda S142 con el quencher en la sonda S148 como consecuencia de la interacción del aptámero con el péptido.



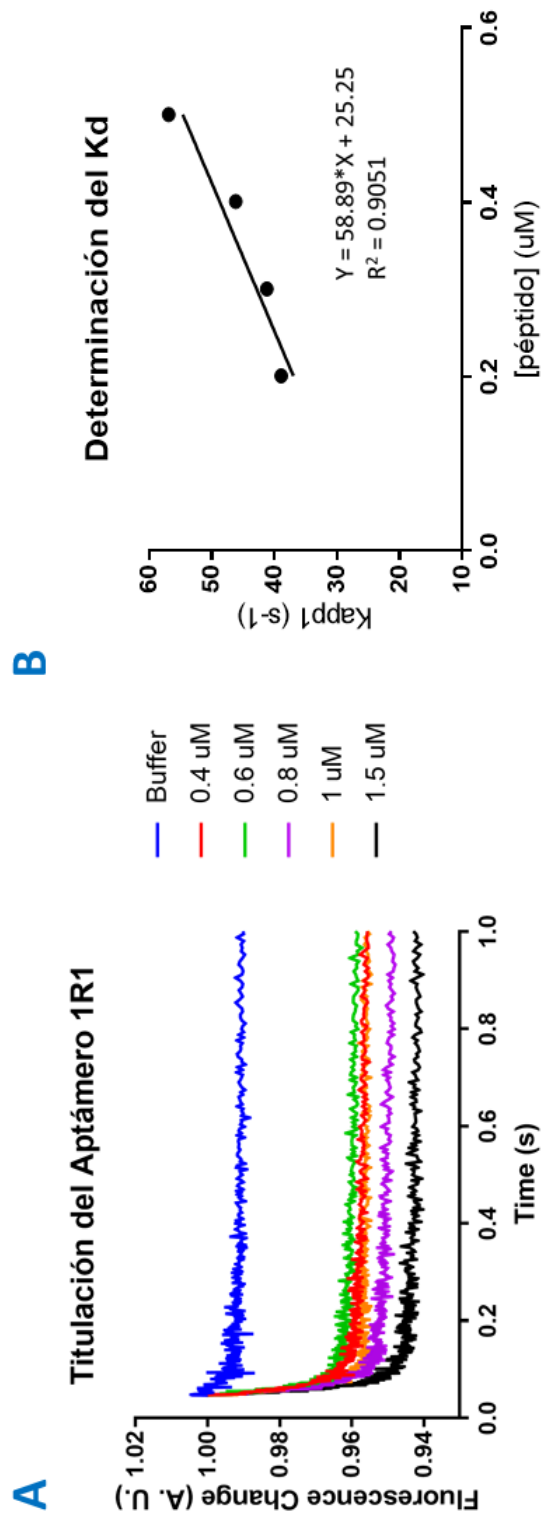
**Figura 21.** Aptámero\_1R1. A) Interacción con el péptido 14 de todos los aptámeros mandados a sintetizar. B) El Aptámero\_1R1 muestra afinidad por el péptido 14 en un sistema FRET de la sonda 142 y la sonda 148 (curva verde), mientras que el aptámero con las dos sondas en el buffer muestran un comportamiento lineal asociado al fotobleaching.

Una vez que la interacción del aptámero 1R1 y el péptido pepFH\_14 pudo evidenciarse, se debió comprobar que el aptámero 1R1 era específico solo al péptido pepFH\_14 y no a otros péptidos. Para esto se utilizaron las mismas sondas del experimento anterior (S142 y S148) con las mismas condiciones. El aptámero 1R1 se enfrentó a un péptido totalmente diferente al péptido blanco (péptido pepFH\_21) y a un péptido semejante (péptido pepFH\_15) y se observó que la variación en la fluorescencia entre los péptidos pepFH\_14 y pepFH\_15 era semejantes, mientras que la variación en la fluorescencia entre los péptidos pepFH\_14 y pepFH\_21 eran diferentes (Figura 19A). Además, la curva de interacción del aptámero 1R1 con el péptido pepFH\_21 era semejante a cuando no hay péptido presente. Las diferencias entre los péptidos se evidenciaron mediante alineamientos de las secuencias. El porcentaje de identidad entre los péptidos pepFH\_14 y pepFH\_15 fue de 48%, mientras que el porcentaje de identidad entre los péptidos pepFH\_14 y pepFH\_21 fue de 2.8% (Figura 19B).



**Figura 22.** Especificidad del Aptámero\_1R1. A) El aptámero 1R1 muestra afinidad similar al péptido 14 como al péptido 15. La afinidad del aptámero 1R1 al péptido 21 es similar a la presencia del aptámero solo en buffer. B) El péptido 14 es parecido al péptido 15 mas no se parece al péptido 21.

Por último, se determinó cuantitativamente el grado de afinidad entre el aptámero 1R1 y el péptido pepFH\_14 determinándose la constante de disociación mediante una titulación en la que se mantuvo constante la concentración del aptámero 1R1 y se varió la concentración del péptido blanco (Figura 20A). Para determinar la constante de disociación se realizó una regresión lineal entre las diferentes concentraciones y la constante aparente ( $K_{app1}$ ) que evidencia la velocidad de la reacción de interacción. Se determinó que la constante de disociación estaba cercano al valor de 0.4  $\mu$ M (Figura 20B).



**Figura 23.** Titulación del Aptámero 1R1. A) Curvas de afinidad entre el aptámero 1R1 y el péptido 14 a diferentes concentraciones del péptido. B) Regresión lineal de la relación entre la concentración del péptido 14 versus el Kapp1 de la curva de afinidad.

## V. DISCUSIÓN

El aptámero 1R1 presenta una constante de disociación con el péptido pepFH\_14 cercana a 0.4 uM. Valores cercanos a este han sido reportados para otros aptámeros que han sido útiles en el diagnóstico de diversas enfermedades. Para el diagnóstico de la tuberculosis se han producido varios aptámeros que han obtenido valores altos de sensibilidad y especificidad. Por ejemplo, usando a ESAT-6 como blanco se produjo un aptámero de ADN de una sola hebra que tenía una constante de disociación de 0.16 uM con la proteína (63). Cuando el aptámero se implementó en el diagnóstico de tuberculosis obtuvo valores de sensibilidad y especificidad de 89.6% y 94.1% respectivamente. En un trabajo posterior, el mismo grupo produjo un aptámero de ADN de una sola hebra afín a la proteína CFP-10 con una constante de disociación de 0.375 uM (64). Los valores de sensibilidad y especificidad que obtuvo este aptámero fue de 83% y 95.3% respectivamente.

Otro punto importante en el presente trabajo será el desenvolvimiento de los péptidos de superficie provenientes de Ts18var1 en comparación de la proteína nativa. Existen trabajos que reportan que no hubo diferencia en la interacción del aptámero con el péptido con la interacción del aptámero con la proteína nativa (19,20). Sin embargo, el presente trabajo no cuenta con los ensayos para aseverar esta premisa. Además, se ha tomado en cuenta para el SELEX negativo el uso de péptidos semejantes para la proteína Ts18var1 solo a nivel de proteínas homólogas dentro de *Taenia solium*, lo cual podría afectar en la especificidad que muestre el aptámero para diagnosticar la neurocisticercosis ya que no se ha usado péptidos semejantes para proteínas homólogas dentro de infecciones heterólogas. Sin

embargo, estos pasos pueden sumarse en rondas de selección posterior. Así mismo, el SELEX negativo debe recomendablemente usar el proteoma humano y del cerdo, así como el proteoma de infecciones heterólogas que muestren la misma sintomatología. Las plataformas de diagnóstico actuales utilizan no solo una proteína blanco sino muchas proteínas para alcanzar un buen desenvolvimiento, la implementación de múltiples aptámeros para múltiples péptidos/proteínas sería factible y con gran potencial para lograr una detección más sensible (38).

Las dos metodologías de SELEX que se evaluaron en este trabajo buscaron resolver el problema de la formación de sub-productos, pero ambas metodologías mostraron sus propias dificultades a medida que se avanzaba en el proceso. En el caso de la metodología de SELEX por PCR emulsión, el principal problema radica en su baja productividad. La cantidad de dsDNA formada generalmente no alcanzaba los 0.5 ug, con un requerimiento mínimo de 1 ug para empezar una siguiente ronda de SELEX. Otra limitación que se pudo notar fue la formación de sub-productos de ADN de doble hebra a partir de las primeras rondas. En especial este problema se acentuaba al incrementar el número de ciclos de PCR, solución intuitiva para mejorar la productividad de la misma. Ambas limitaciones podrían ser atenuadas incrementando el volumen de la reacción de amplificación. Sin embargo, los costos y tiempos implicados también incrementarían notablemente.

La evolución aberrante de moléculas observada puede resultar por diversos motivos: técnicos, propios del kit de roboklon o también por contaminaciones cruzadas. El hecho que el mismo patrón se observó para todos los péptidos

utilizados hace presuponer que la causa es intrínseca del kit o experiencia del investigador.

Por otro lado, la metodología por transcripción *in vitro* es más ventajosa debido a que la formación de sub-productos apareció en rondas avanzadas del proceso de selección. Un posible aprovechamiento de las ventajas de ambas metodologías en un solo protocolo sería utilizar un sistema por PCR de emulsión en la primera fase de la amplificación del SELEX por transcripción *in vitro*. Adicionando un promotor T7 a la biblioteca y estandarizando la PCR emulsión, se podrían reducir aún más la formación de productos indeseados. Inmediatamente después de la PCR emulsión se realizaría la transcripción *in vitro* que aseguraría la formación de suficiente biblioteca en caso de errores en el proceso, contaminaciones u otros problemas.

Se evidenció que el uso de péptidos sintéticos que fueran semejantes al péptido blanco puede acelerar el proceso de enriquecimiento evitando realizar muchas rondas de SELEX y, en última instancia, la aparición de sub-productos. En este trabajo se optó por utilizar el péptido homólogo en rondas avanzadas y solo para el péptido pepFH\_14 proveniente de Ts18var1. Probablemente utilizar el péptido homólogo en una ronda intermedia como la ronda 5 podría haber acelerado el proceso de enriquecimiento y evitado llegar a la formación de sub-productos en rondas avanzadas del SELEX.

Otro punto a considerar es la calidad de los productos intermedios de amplificación de bibliotecas. Por ejemplo, luego de la reacción de retrotranscripción es necesario eliminar el RNA de sustrato. Esto se logra a través de hidrólisis alcalina, cuya efectividad está condicionada por el tiempo de incubación, el buffer en el cual se encuentra la muestra y la presencia de sales (Figura 1A). Luego de estandarizar el proceso se evidenció que se requieren 3 horas para limpiar el producto de ARN y solo tener el cDNA (ssDNA), tiempo que difiere al indicado por el fabricante del Kit de retrotranscripción y/o publicaciones de referencia. Este producto ssDNA es muy importante porque va a ser el material de inicio para la siguiente ronda de selección y amplificación. Contaminantes de RNA pueden perturbar o competir en el paso de selección como también interfieren en la estimación cuantitativa de la biblioteca de ssDNA, sobreestimando su concentración. Esto resulta muy importante porque podría desviar el diseño de presión evolutiva del SELEX donde un componente importante es la concentración de la biblioteca. Otro punto que podría observarse también es el control de calidad del producto de transcripción *in vitro*, ya que en la purificación del ARN se realiza una degradación del dsDNA que se usó como template con la enzima DNAsa I. Dicho paso resulta crucial por dos motivos. Primero, se quiere evitar una contaminación de ADN de doble hebra que podría ser amplificado en rondas sucesivas de SELEX. Este contaminante no necesariamente podría derivar de la unión específica del ligando al blanco. Segundo, la DNAsa I debe ser neutralizada apropiadamente o resultaría en la digestión del cDNA producido a partir del RNA.

En el presente trabajo presentamos una metodología de SELEX que funciona para producir bibliotecas enriquecidas de moléculas afines a péptidos derivados de proteínas de *T. solium*. Dicha aproximación es un avance importante como alternativa para el estudio de proteínas que ofrezcan las complicaciones en su producción o posean modificaciones post-traduccionales difíciles de lograr en sistemas de expresión recombinante como las glicosilaciones. También supondría una alternativa para desarrollar herramientas de reconocimiento para proteínas muy hidrofóbicas o muy cargadas negativamente (65). Una vez secuenciadas y analizadas las bibliotecas, se puede identificar los posibles aptámeros que se mandan a sintetizar y se prueban *in vitro* con el péptido para determinar experimentalmente si son afines y, además, determinar cuantitativamente que tan afín son al péptido. Antes de probar los aptámeros en muestras es necesario probar *in vitro* la diferencia de interacción entre el aptámero con el péptido y la interacción del aptámero con la proteína nativa. Una vez que se encuentra el mejor candidato se lo evalúa en una plataforma con muestras. Las plataformas actuales que usan nanomateriales muestran mayor sensibilidad utilizando aptámeros que utilizando anticuerpos (36). Por ejemplo, el grupo del Dr. Lobo-Castañón MJ desarrolló un biosensor basado en aptámeros que detectaba la proteína Gliadina  $\alpha 2$  con una sensibilidad 6 veces superior al inmunoensayo de referencia (20).

## VI. CONCLUSIONES

Se consiguió adaptar una metodología SELEX basada en transcripción *in vitro* para la producción de bibliotecas enriquecidas de ADN sintético de una sola hebra afines a péptidos de superficie provenientes de proteínas secretadas y abundantes del metacéstode de *Taenia solium*.

En base al flujo de búsqueda de blancos para SELEX se propuso a la familia de 8 KDa como los mejores candidatos como blancos para la producción de aptámeros. Dentro de la familia de 8 KDa se eligió a Ts18var1 como representante. La familia de 8KDa cumple con los supuestos que este trabajo ha considerado: secreción, abundancia y especificidad. Entre ellas se definieron péptidos con alto índice de exposición en superficie como blancos para SELEX.

La metodología SELEX por transcripción *in vitro* mostró ser más confiable en evitar la formación de sub-productos que la metodología SELEX por PCR emulsión. Además, la metodología SELEX por transcripción *in vitro* mostró tener mayor respaldo en caso de tener que retroceder por contaminación, fallas en la operación, etc.

La implementación de la prueba de enriquecimiento S1 o DiVE mostró muy buena correlación con los resultados de secuenciamiento con respecto al enriquecimiento de las bibliotecas.

Mediante el secuenciamiento se evidenció que el aptámero 1R1 se encontraba enriquecido en 7625 veces con respecto a la biblioteca inicial.

Los ensayos de Stopped-Flow mostraron que el aptámero 1R1 era afín al péptido pepFH\_14 con una constante de disociación cerca a 0.4  $\mu$ M. El aptámero 1R1 también mostró afinidad hacia el péptido pepFH\_15, el cual tiene un porcentaje de identidad de 48% con respecto al péptido pepFH\_14.

## VII. RECOMENDACIONES

La metodología SELEX que se desarrolló en este trabajo puede ser mejorada de tal manera que necesite menos rondas de SELEX. En este trabajo se consiguió el enriquecimiento en la ronda 10. Sin embargo, se tuvo que lidiar con formación de sub-productos. Este trabajo ha planteado y demostrado que el uso de péptidos semejantes provenientes de proteínas homólogas del hospedero o agentes infecciosos cercanos a *Taenia solium* aceleran el proceso de enriquecimiento, a pesar de que la diferencia entre los péptidos se basaba en uno hasta siete aminoácidos. Hay que recordar que los aptámeros son muy sensibles a nivel molecular (66). Además, se debe considerar el mejor diseño del SELEX negativo que puede usar el proteoma de pacientes sin neurocisticercosis y, asimismo, el proteoma de infecciones heterólogas que presenten la misma sintomatología que la neurocisticercosis. Además del uso del proteoma, el SELEX negativo puede usar también el uso de péptidos semejantes tomando ventaja de la capacidad de los aptámeros de detectar modificaciones a nivel atómico en la molécula que se use de blanco. Estas dos aproximaciones no son mutuamente excluyentes.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gripper LB, Welburn SC. Neurocysticercosis infection and disease—A review. *Acta Trop*. 2017 Feb;166:218–24.
2. Del Brutto OH, Garcia HH. Neurocysticercosis. In: *Handbook of clinical neurology*. 2013. p. 313–25.
3. Montano SM, Villaran M V., Ylquimiche L, Figueroa JJ, Rodriguez S, Bautista CT, et al. Neurocysticercosis: Association between seizures, serology, and brain CT in rural Peru. *Neurology*. 2005 Jul 26;65(2):229–33.
4. Boireau P, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites : report of a joint FAO/WHO expert meeting, 3-7 September 2012, FAO Headquarters, Rome, Italy. 302 p.
5. Coyle CM. Neurocysticercosis: An Update. *Curr Infect Dis Rep*. 2014 Nov 23;16(11):437.
6. García HH, Gonzalez AE, Evans CA, Gilman RH, Cysticercosis Working Group in Peru. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet*. 2003 Aug 16;362(9383):547–56.
7. Del Brutto OH. Neurocysticercosis. In: *Handbook of clinical neurology*. 2014. p. 1445–59.
8. Singhi P. Neurocysticercosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2011 Mar 26;4(2):67–81.
9. Saavedra H, Gonzales I, Alvarado MA, Porras MA, Vargas V, Cjuno RA, et al. DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE LA NEUROCISTICERCOSIS EN EL PERÚ. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010;27(4):586–91.

10. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis.* 1989 Jan;159(1):50–9.
11. Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB, et al. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis.* 1991 Nov;164(5):1007–9.
12. Burneo JG, Cavazos JE. Neurocysticercosis and Epilepsy. *Epilepsy Curr.* 2014 Jan;14(s2):23–8.
13. Praet N, Rodriguez-Hidalgo R, Saegerman C, Benitez-Ortiz W, Ahounou S, Barrionuevo-Samaniego M, Speybroeck N, Rodriguez-Hidalgo R, et al. Infection with versus Exposure to *Taenia solium*: What Do Serological Test Results Tell Us? *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Aug 5;83(2):413–5.
14. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Palacios LG, Jimenez I, Rodriguez S, et al. Short report: transient antibody response in *Taenia solium* infection in field conditions—a major contributor to high seroprevalence. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Jul;65(1):31–2.
15. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990 Aug 3;249(4968):505–10.
16. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990 Aug 30;346(6287):818–22.
17. Baird GS. Where Are All the Aptamers? *Am J Clin Pathol.* 2010 Oct 1;134(4):529–31.

18. Monzani PS, Adona PR, Ohashi OM, Meirelles F V., Wheeler MB. Transgenic bovine as bioreactors: Challenges and perspectives. *Bioengineered*. 2016 Apr 8;7(3):123–31.
19. Xu W, Ellington AD. Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 23;93(15):7475–80.
20. Amaya-González S, de-los-Santos-Álvarez N, Miranda-Ordieres AJ, Lobo-Castañón MJ. Aptamer Binding to Celiac Disease-Triggering Hydrophobic Proteins: A Sensitive Gluten Detection Approach. *Anal Chem*. 2014 Mar 4;86(5):2733–9.
21. Zimbres FM, Tárnok A, Ulrich H, Wrenger C, Ulrich H, Wrenger C. Aptamers: novel molecules as diagnostic markers in bacterial and viral infections? *Biomed Res Int*. 2013 Sep 5;2013:731516.
22. Ding F, Gao Y, He X. Recent progresses in biomedical applications of aptamer-functionalized systems. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017 Sep 15;27(18):4256–69.
23. Jing M, Bowser MT. Methods for measuring aptamer-protein equilibria: A review. *Anal Chim Acta*. 2011 Feb 7;686(1–2):9–18.
24. Garcia HH, Gonzalez AE, Rodriguez S, Gonzalez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang VCW, et al. [Epidemiology and control of cysticercosis in Peru]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010;27(4):592–7.
25. Rueda A, Sifuentes C, Gilman RH, Gutiérrez AH, Piña R, Chile N, et al. TsAg5, a *Taenia solium* cysticercus protein with a marginal trypsin-like activity in the diagnosis of human neurocysticercosis. *Mol Biochem*

- Parasitol. 2011 Dec;180(2):115–9.
26. Walteros D. CISTICERCOSIS: SITUACION DE LA PARASITOSIS. 2009
  27. Singhi P, Suthar R. Neurocysticercosis. *Indian J Pediatr.* 2015 Feb 10;82(2):166–71.
  28. Dorny P, Brandt J, Zoli A, Geerts S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Trop.* 2003 Jun;87(1):79–86.
  29. Mahanty S, Garcia HH, Cysticercosis Working Group in Perú. Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2010 Jun;91(2):172–84.
  30. Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem.* 1999 Sep;45(9):1628–50.
  31. Bruno J. Predicting the Uncertain Future of Aptamer-Based Diagnostics and Therapeutics. *Molecules.* 2015 Apr 16;20(4):6866–87.
  32. Moreno M, González VM. Advances on aptamers targeting Plasmodium and trypanosomatids. *Curr Med Chem.* 2011;18(32):5003–10.
  33. Bruno JG. In Vitro Selection of DNA to Chloroaromatics Using Magnetic Microbead-Based Affinity Separation and Fluorescence Detection. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 May 8;234(1):117–20.
  34. Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv.* 2015 Nov 1;33(6):1141–61.
  35. Chushak Y, Stone MO. In silico selection of RNA aptamers. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jul 1;37(12):e87–e87.

36. Hu W, Li CM. Nanomaterial-based advanced immunoassays. Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology. 2011 Mar 1;3(2):119–33.
37. Victor B, Kanobana K, Gabriël S, Polman K, Deckers N, Dorny P, et al. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion-secretion proteins. Proteomics. 2012 Jun;12(11):1860–9.
38. Navarrete-Perea J, Isasa M, Paulo JA, Corral-Corral R, Flores-Bautista J, Hernández-Téllez B, et al. Quantitative multiplexed proteomics of *Taenia solium* cysts obtained from the skeletal muscle and central nervous system of pigs. Brehm K, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Sep 25;11(9):e0005962.
39. Hancock K, Khan A, Williams FB, Yushak ML, Pattabhi S, Noh J, et al. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. J Clin Microbiol. 2003 Jun;41(6):2577–86.
40. Hancock K, Pattabhi S, Greene RM, Yushak ML, Williams F, Khan A, et al. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. Mol Biochem Parasitol. 2004 Jan;133(1):115–24.
41. Hancock K, Pattabhi S, Whitfield FW, Yushak ML, Lane WS, Garcia HH, et al. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. Mol Biochem Parasitol. 2006 May;147(1):109–17.

42. Deckers N, Dorny P. Immunodiagnosis of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis. *Trends Parasitol.* 2010 Mar;26(3):137–44.
43. Greene RM, Hancock K, Wilkins PP, Tsang VC. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. *J Parasitol.* 2000 Oct;86(5):1001–7.
44. Ferrer E, Bonay P, Foster-Cuevas M, González LM, Dávila I, Cortéz MM, et al. Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8kDa diagnostic antigen family. *Mol Biochem Parasitol.* 2007 Mar;152(1):90–100.
45. Kim S-H, Bae Y-A, Yang Y, Hong S-T, Kong Y. Paralogous proteins comprising the 150kDa hydrophobic-ligand-binding-protein complex of the *Taenia solium* metacestode have evolved non-overlapped binding affinities toward fatty acid analogs. *Int J Parasitol.* 2011 Sep;41(11):1207–15.
46. Bueno EC, Scheel CM, Vaz AJ, Machado LR, Livramento JA, Takayanagui OM, et al. Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Mar;72(3):278–83.
47. Zhang S, Luo X, Guo A, Zhu X, Cai X. Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for 18 kDa antigen from *Taenia solium* cysticerci. *Exp Parasitol.* 2016 Jul;166:75–82.
48. Shepherd JC, Aitken A, McManus DP. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol Biochem Parasitol.* 1991 Jan;44(1):81–90.
49. Rigano R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzara A, Ioppolo S, et al.

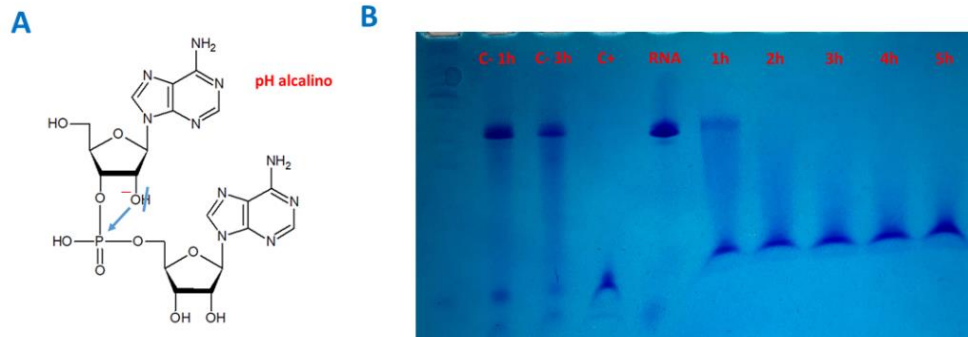
- Modulation of Human Immune Response by *Echinococcus granulosus* Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses. *Infect Immun*. 2001 Jan 1;69(1):288–96.
50. Pajuelo MJ, Eguiluz M, Dahlstrom E, Requena D, Guzmán F, Ramirez M, et al. Identification and Characterization of Microsatellite Markers Derived from the Whole Genome Analysis of *Taenia solium*. Brehm K, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Dec 23;9(12):e0004316.
51. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006 Jan 15;22(2):195–201.
52. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 2015 May 7;10(6):845–58.
53. Petersen B, Petersen T, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct Biol*. 2009 Jul 31;9(1):51.
54. Rotherham LS, Maserumule C, Dheda K, Theron J, Khati M. Selection and Application of ssDNA Aptamers to Detect Active TB from Sputum Samples. Hoshino Y, editor. *PLoS One*. 2012 Oct 4;7(10):e46862.
55. Tolle F, Wilke J, Wengel J, Mayer G. By-Product Formation in Repetitive PCR Amplification of DNA Libraries during SELEX. Isalan M, editor. *PLoS One*. 2014 Dec 9;9(12):e114693.
56. Thiel WH. Galaxy Workflows for Web-based Bioinformatics Analysis of Aptamer High-throughput Sequencing Data. *Mol Ther - Nucleic Acids*.

2016;5(August):e345.

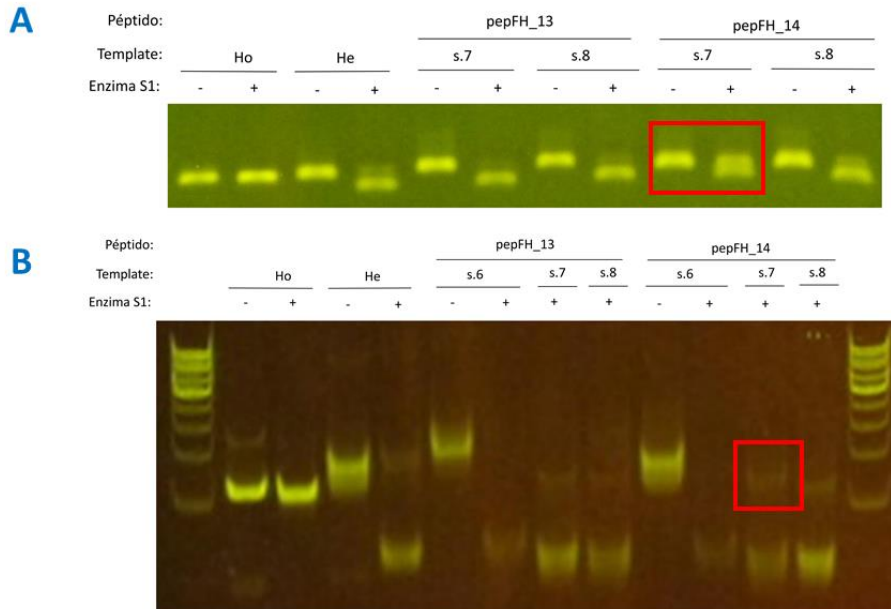
57. Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Čech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jul 8;44(W1):W3–10.
58. Alam KK, Chang JL, Burke DH. FASTAptamer: A Bioinformatic Toolkit for High-throughput Sequence Analysis of Combinatorial Selections. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2015 Mar 3;4:e230.
59. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3406–15.
60. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011 May 2;17(1):10.
61. Machanick P, Bailey TL. MEME-CHIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics.* 2011 Jun 15;27(12):1696–7.
62. Musheev MU, Krylov SN. Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Addressing the polymerase chain reaction issue. *Anal Chim Acta.* 2006 Mar 30;564(1):91–6.
63. Tang X-L, Zhou Y-X, Wu S-M, Pan Q, Xia B, Zhang X-L. CFP10 and ESAT6 aptamers as effective Mycobacterial antigen diagnostic reagents. *J Infect.* 2014 Dec;69(6):569–80.
64. Tang X-L, Wu S-M, Xie Y, Song N, Guan Q, Yuan C, et al. Generation and application of ssDNA aptamers against glycolipid antigen ManLAM of *Mycobacterium tuberculosis* for TB diagnosis. *J Infect.* 2016 May;72(5):573–86.

65. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng.* 2007 Oct;24(4):381–403.
66. Rankin CJ, Fuller EN, Hamor KH, Gabarra SA, Shields TP. A Simple Fluorescent Biosensor for Theophylline Based on its RNA Aptamer. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2006 Oct;25(12):1407–24.

## ANEXOS



**Figura 1.** Hidrólisis alcalina del producto de la retrotranscripción. **A)** Representación de la hidrólisis alcalina en el ARN. El pH alcalino favorece que el grupo hidroxilo del carbono 2 de la ribosa se encuentre cargado negativamente, lo que provoca el ataque nucleofílico de este al fósforo (P). **B)** Estandarización de las condiciones ideales de hidrólisis alcalina para degradar el ARN que se usó como template para la producción de cDNA en la Retrotranscripción. Se prepararon controles de hidrólisis alcalina. El control negativo puede degradarse por acción térmica.



**Figura 2A.** Prueba de enriquecimiento en Agarosa y Poliacrilamida. Prueba de enriquecimiento en Agarosa y Poliacrilamida. **A)** Prueba de enriquecimiento positiva para la muestra s.7 del péptido pepFH\_14 visualizada en gel de agarosa 3%. **B)** La misma prueba que en A pero repetida y visualizada en gel de poliacrilamida (nativo) 8%. La prueba de enriquecimiento es negativa para la muestra s.7 del péptido pepFH\_14.