

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño *in silico* de un aptámero de ARN con
afinidad de unión a la proteína transialidasa de
Trypanosoma cruzi

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
María Gabriela Croissiert Muguercia
para optar al grado académico de Licenciada en Biotecnología Molecular

Guatemala,
2021

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño *in silico* de un aptámero de ARN con
afinidad de unión a la proteína transialidasa de
Trypanosoma cruzi

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
María Gabriela Croissiert Muguercia
para optar al grado académico de Licenciada en Biotecnología Molecular

Guatemala,
2021


Vo.Bo.:

(f) 
MSc. Augusto Franco

Tribunal Examinador:

(f) 
MSc. Augusto Franco

(f) 
PhD. Pamela Pennington

(f) 
PhD. Dalia Lutz Bonilla

Fecha de aprobación: Guatemala, 8 de diciembre de 2021.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Dios por haberme dado la oportunidad de vivir y estudiar. A mi familia y amigos por su apoyo en los momentos difíciles. También quiero agradecer al MSc. Augusto Franco y a la PhD. Pamela Pennington por su invaluable conocimiento y su guía durante el desarrollo de este proyecto. Finalmente, agradezco a los catedráticos y a la universidad por enseñarnos el valor y el poder transformador de la educación.

Muchas gracias.

Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de cuadros	ix
Resumen	x
Abstract	xi
I. Introducción	1
II. Objetivos	3
A. Objetivo general	3
B. Objetivos específicos	3
III. Justificación	4
IV. Marco teórico	5
A. Enfermedad de Chagas	5
B. <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1. Diversidad genética y filogenética	7
2. Triansialidasa: rol en el patógeno	8
C. Aptámeros	9
1. Diseño <i>in silico</i> de aptámeros	10
2. Métodos de detección de patógenos basados en aptámeros	12
3. Empleo de aptámeros en la detección de al enfermedad de Chagas	12
D. Métodos <i>in silico</i> para la predicción de regiones inmunogénicas	12
1. Modelo de predicción de epítomos lineales	13
2. Escala de inmunogenicidad de Kolaskar y Tongaonkar	13
V. Metodología	14
A. Hipótesis	14
1. Hipótesis de investigación	14
2. Hipótesis alternativa	14
3. Hipótesis nula	14
B. Variables	15
C. Viabilidad	15

D.	Materiales y métodos	15
1.	Diseño de la librería de oligonucleótidos de ARN	15
2.	Evaluación de la estructura secundaria y terciaria.	16
3.	Acomplamiento molecular y dinámica molecular	16
4.	Análisis de la afinidad de los aptámeros hacia una transialidasa de <i>T. rangeli</i>	16
5.	Identificación de los sitios de unión de los aptámeros en la proteínas para la proteína transialidasa.	16
6.	Análisis estadístico.	16
VI.	Resultados	18
VII.	Discusión	24
VIII.	Conclusiones	27
IX.	Recomendaciones	28
X.	Bibliografía	29
XI.	Anexos	33

Lista de figuras

1	Morfología de <i>Trypanosoma cruzi</i> en el torrente sanguíneo.	6
2	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
3	Función de la enzima transialidasa de <i>T. cruzi</i>	9
4	Protocolo SELEX	10
5	Probabilidad de interacción de la librería de aptámeros con TcTS según los métodos de Random Forest y Support Vector Machine	18
6	Estructura de los aptámeros candidatos seleccionados en los procesos de selección positivos y negativos	19
7	Análisis de las interacciones moleculares de las conformaciones de mayor confiabilidad en los complejos proteína-ligando generados en HADDOCK	20
8	Comparación de las regiones con potencial de epítipo según la escala de inmunogenicidad de Kolaskar y Tongaonkar y la predicción de epítipos lineales.	21
9	Visualización de las regiones epítipos consenso según la escala de inmunogenicidad de Kolaskar y Tongaonkar y la predicción de epítipos lineales en el complejo Apta3384-TcTS.	22
10	Análisis de polimorfismos en genes codificantes de la proteína transialidasa en <i>T. cruzi</i> TcI.	22
11	Predicción de epítipos en la proteína transialidasa.	35

Lista de cuadros

1	Métodos diagnóstico de la enfermedad de Chagas.	6
2	Definición conceptual y operacional de las variables	15
3	Aptámeros de ARN con mejor energía de acoplamiento hacia la proteína transialidasa según las simulaciones moleculares en HADDOCK.	21
4	Energía de acoplamiento de los aptámeros con mayor probabilidad de interacción con TcTS según modelado molecular en HDOCK	33
5	Comparación de la energía de acoplamiento de los aptámeros hacia las proteínas transialidasas de <i>T. cruzi</i> (TcTS) y <i>T. rangeli</i> (TrTS) según HDOCK.	33
6	Comparación de la energía de acoplamiento de los aptámeros candidatos hacia las proteínas transialidasas de <i>T. cruzi</i> (TcTS) y <i>T. rangeli</i> (TrTS) según HADDOCK.	34
7	Residuos de TcTS involucrados en la unión de los aptámeros	34

La enfermedad de Chagas constituye un problema sanitario en los países de América Latina ya que la población que habita en zonas de riesgo supera los 70 millones. Además, la realización de pruebas de detección masivas está limitado por la escasez de personal calificado, el costo elevado de las pruebas, el tiempo requerido para su realización o la ausencia de la infraestructura apropiada. En el presente estudio se evaluó el potencial de aptámeros de ARN diseñados *de novo* mediante un enfoque *in silico* como herramientas para la detección de la proteína transialidasa de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas. Los aptámeros se seleccionaron a partir de una librería optimizada de 5 mil oligonucleótidos de ARN. Se seleccionaron los treinta oligonucleótidos con mayor probabilidad de interacción con TcTS según el predictor de interacciones RPISeq. Se modelaron sus estructuras secundarias y terciarias y se cuantificó su energía de acoplamiento con las proteínas transialidasas de *T. cruzi* (TcTS) y *T. rangeli* (TrTS) en las plataformas HDOCK y HADDOCK. En el proceso se identificaron cinco aptámeros con energías de acoplamiento hacia TcTS inferior a -140.3 unidades, lo cual es significativamente menor a la energía de acoplamiento con TrTS. Se identificaron polimorfismos en el gen que codifica para la TcTS evaluada y las regiones inmunogénicas putativas en la proteína, con lo que se descartó la presencia de interferentes moleculares en el sitio de unión de los aptámeros. Se recomienda validar los aptámeros Apta3384M5, Apta3989 y Apta3989M3 en ensayos de afinidad *in vitro* para determinar su funcionalidad en el desarrollo de pruebas de flujo lateral que permitan la detección rápida de la enfermedad de Chagas en su fase aguda.

Chagas disease, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, is a health problem in Latin America, with over 70 million people living at risk of infection. Furthermore, massive screening for Chagas is limited by the lack of qualified personnel, infrastructure, high costs and time-consuming testing. In the present study, we evaluated the potential of *in silico*-designed RNA aptamers to detect the *T. cruzi* trans-sialidase (TcTS). The aptamers were selected from an optimized library of five thousand RNA oligonucleotides. According to RPISeq predictor, thirty oligonucleotides with the highest likelihood of interaction with TcTS were selected. Their secondary and third structures were modeled, and their docking energy with TcTS and *T. rangeli* trans-sialidase (TrTS) were quantified on the HDOCK and HADDOCK platforms. Five aptamers with TcTS binding energies below 140.3 units were identified. These TcTS-aptamer complexes showed significantly lower docking energy than the TrTS complex. Furthermore, the identified polymorphisms and putative immunogenic regions suggest the absence of interferents of this nature at the binding site of the aptamers. Overall, the results of this study suggest that Apta3989, Apta3989M3, and Apta3384M5 are potential candidates for the development of rapid tests for the diagnosis of acute Chagas disease; therefore, we recommend verifying their functionality by *in vitro* affinity assays.

La enfermedad de Chagas constituye un problema sanitario en los países de América Latina ya que se estima que 70 millones de personas viven en zonas de riesgo (Buschiazzi y cols., 2012; Lidani y cols., 2019). La reducida capacidad de diagnóstico y la necesidad de pruebas de bajo costo son unas de las principales causas del ineficiente control de la enfermedad y la detección tardía de casos positivos. Adicionalmente, las pruebas rápidas disponibles en el mercado están restringidas a estadios específicos de la enfermedad; y el estándar de oro en el diagnóstico continúa siendo la detección de *Trypanosoma cruzi* mediante microscopía. Esto conlleva el uso de instrumentos de alto costo, el desarrollo de instalaciones apropiadas y el entrenamiento de personal capacitado (Marcipar y Lagier, 2012; Zingales, 2018).

La detección de parásitos mediante pruebas de diagnóstico rápidas basadas en aptámeros constituye una alternativa prometedora en el desarrollo de métodos de diagnósticos altamente específicos, estables y accesibles. Los aptámeros son oligonucleótidos con una extensión entre 15 y 80 pares de bases (Kher, Trehan, y Misra, 2011). Presentan una estructura terciaria específica que le otorga la capacidad de interactuar con otras moléculas en una relación análoga a la de un antígeno y un anticuerpo. No obstante, se caracterizan por ser más estables, específicos y tener costo de producción menor. Se estima que síntesis de 1mg de aptámeros tiene un costo de 100 USD, diez veces menor al costo de producción de la misma cantidad de anticuerpos (Colilla y Vallet-Regí, 2017; RayBiotech, 2021). El proceso de selección *in vitro* de aptámeros se basa en la estrategia *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX, por sus siglas en inglés). Esta técnica consiste en un proceso iterativo de incubación de la molécula blanco con una librería aleatoria de oligonucleótidos, seguido por la elución de las estructuras afines, su amplificación y secuenciación (Blind y Blank, 2015). El desarrollo de herramientas bioinformáticas ha tenido un rol importante en la optimización del proceso SELEX. Con ello surge SELEX de Alto Rendimiento (HT-SELEX) en el cual es posible analizar la librería de nucleótidos, agrupar aptámeros en clústeres y predecir motivos de unión (Hamada, 2018). Con el fin de reducir el número de iteraciones en el proceso de SELEX se ha propuesto trabajar con librerías optimizadas. En estas se manipula la longitud del aptámero, las secuencias terminales, el contenido de Guanina y Citocina y la complejidad de las estructuras secundarias (X. Wang y cols., 2018). Asimismo, se han desarrollado algoritmos como MAWS y un modelo basado en redes neuronales de largo y corto plazo que permiten generar aptámeros *de novo*, como complemento al proceso SELEX (Im, Park, y Han, 2019; Team:Heidelberg, 2015).

Con el objetivo diseñar un aptámero con afinidad hacia la proteína transalidasa de *T. cruzi* se generó una librería conformada por cinco mil oligonucleótidos candidatos con un longitud de 40nt,

extremos complementarios, un %GC superior a 60 % y una región de nueve nucleótidos no apareados derivada del aptámero Apt68 (Ling, 2018; Morena, Argentati, Tortorella, Emiliani, y Martino, 2021; Nagarkatti y cols., 2012; T. Wang, Chen, Larcher, Barrero, y Veedu, 2019). El análisis de los aptámeros generados se realizó mediante un acoplamiento molecular con la proteína transialidasa de *T. cruzi*, la detección de los sitios de unión y caracterización de la naturaleza de las interacciones en los complejos aptámero-proteína (Sabri, Hamid, Hitam, y Rahim, 2019). La selectividad del aptámero se evaluó analizando su energía de acoplamiento con una enzima transialidasa de *T. rangeli*, ya que ambas proteínas comparten un 70 % de identidad (Bueren-Calabuig, Pierdominici-Sottile, y Roitberg, 2014).

A. Objetivo general

Diseñar un aptámero de ARN *in silico* con alta afinidad de unión hacia la proteína transialidasa de *Trypanosoma cruzi*

B. Objetivos específicos

- Diseñar una librería optimizada de oligonucleótidos de ARN con potencial de unión hacia la proteína transialidasa.
- Analizar las estructuras secundarias y terciarias de los aptámeros para evaluar su potencial de unión hacia la proteína TS empleando las plataformas RNAfold y RNAComposer.
- Identificar los sitios de unión de los aptámeros generados hacia la proteína TS mediante un análisis de acoplamiento molecular y dinámica molecular utilizando los programas HDOCK y HADDOCK.
- Analizar la especificidad de los aptámeros mediante la simulación del proceso de selección negativa de aptámeros empleando como blanco una proteína transialidasa de *T. rangeli*.
- Detectar la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido no sinónimos y regiones con potencial de epítomos en la proteína transialidasa.

Justificación

La enfermedad de Chagas es una enfermedad zoonótica causada por *Trypanosoma cruzi* y transmitida a humanos principalmente por insectos triatomínicos o mediante transmisión vertical. Se estima que afecta alrededor de 8 millones de personas y causa la muerte de otras 50 mil. Además, constituye uno de los principales problemas de salud pública en países de América Latina ya que 70 millones de personas viven en zonas de riesgo y solo el 1% de los afectados recibe un diagnóstico y tratamiento en las primeras etapas de la infección (Lidani y cols., 2019; Meymandi y cols., 2017; Pan American Health Organization [PAHO], 2017).

Los métodos empleados para el diagnóstico dependen del estado de la enfermedad. En la fase aguda y en los casos congénitos se prefiere la detección mediante microscopía óptica ya que los análisis serológicos indirectos carecen de sensibilidad debido al retardo natural de la respuesta inmune humoral (Marcipar y Lagier, 2012). Los métodos serológicos basados en antígenos recombinantes o antígenos secretados por el parásito son generalmente utilizados en casos crónicos. Adicionalmente, se pueden emplear métodos parasitológicos indirectos y moleculares (Balouz, Agüero, y Buscaglia, 2017). En países de bajos ingresos, el uso masivo de estas pruebas está limitado por la escasez de personal calificado, el costo elevado de las pruebas, el tiempo requerido para su realización o la ausencia de la infraestructura apropiada. Las pruebas rápidas de detección suponen una solución viable a estos problemas.

Los aptámeros son moléculas de ADN o ARN de 15 a 80 nucleótidos con una estructura tridimensional definida. Se caracterizan por presentar una alta afinidad hacia un ligando como resultado de la formación de interacciones moleculares. A diferencia de los anticuerpos monoclonales, son más estables y su producción requiere de menor tiempo y costo. Por lo tanto, los aptámeros constituyen una alternativa potencial para el desarrollo de pruebas diagnósticas (Banerjee y Nilsen-Hamilton, 2019; Ospina-Villa, Cisneros-Sarabia, Sánchez-Jiménez, y Marchat, 2020). La selección de aptámeros se realiza mediante un proceso manual de selección *in vitro* denominado SELEX, que resulta ser costoso y laborioso (Blind y Blank, 2015). En los últimos años se ha impulsado el desarrollo de plataformas para el diseño de aptámeros *in silico*. Bajo el enfoque bioinformático, en el presente trabajo se describe el diseño de un aptámero de ARN con afinidad hacia la proteína transialidasa, que es altamente expresada y conservada en *Trypanosoma cruzi*, como potenciales herramientas en el desarrollo de pruebas rápidas de detección de la enfermedad de Chagas en pacientes de fase aguda.

A. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una zoonosis compleja transmitida por insectos triatomíneos y tiene como hospedero a más de 70 géneros de mamíferos (Zingales, 2018). La ubicación geográfica del vector es predominante en América del Sur, pero como resultado de los fenómenos de migración los pacientes con Chagas se distribuyen por el globo. La transmisión entre personas se da principalmente por contacto con sangre contaminada o transmisión vertical de madre a hijo (Balouz y cols., 2017).

La enfermedad de Chagas constituye un problema de salud en los países latinoamericanos ya que los únicos medicamentos disponibles son la benznidazola y el nutrimox. Ambos requieren de un tratamiento prolongado, están acompañados de efectos secundarios y suelen ser poco efectivos en pacientes en estado crónico (Zingales, 2018). Adicionalmente, 70 millones de personas habitan en zonas de riesgos y 16 millones son afectadas en la región. La incidencia de la enfermedad es de 40 mil casos nuevos cada año (Buschiazzi y cols., 2012). Desde una perspectiva social, la enfermedad constituye la tercera enfermedad tropical más importante del mundo. Este fenómeno se refuerza con el hecho de que la migración ha provocado una dispersión de la enfermedad. En América Latina el 80% de la transmisión en el área rural se da vía vectorial, mientras que en el área rural entre el 2 y 10% se da por transmisión vertical, y otro 5 a 20% ocurre como resultado de procesos de transfusiones sanguíneas (Marcipar y Lagier, 2012). Cabe recalcar que en Guatemala la Ley de Servicios de Medicina Transfusional y Banco de Sangre exige la realización de pruebas para la detección de Chagas como parte de los requisitos referentes a la realización de transfusiones sanguíneas (Diario Centro América, 1997).

La evolución de la enfermedad de Chagas constituye un reto en el desarrollo de métodos de diagnósticos que sean sensibles en todas sus fases. Diferentes métodos de diagnósticos (Cuadro 1) se emplean dependiendo del estado de la enfermedad y la condición clínica del paciente. La fase aguda de la enfermedad se da en los primeros dos meses de la infección. En esta fase la concentración de patógenos en sangre es mayor, pero el diagnóstico se limita principalmente a los pacientes sintomáticos, pacientes inmunosuprimidos que han sido previamente diagnosticados con la enfermedad o casos de transmisión vertical. El estándar de oro en el diagnóstico en fase aguda es la detección microscópica ya que los métodos serológicos no son efectivos como resultado del retardo de la inmunidad adaptativa. En la fase crónica, los métodos de diagnósticos recaen en los de tipo serológicos ya que la concentración del parásito en sangre es baja (Marcipar y Lagier, 2012)

Cuadro 1: Métodos diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Métodos	Técnica	Fase de la enfermedad		
		Crónica	Aguda	Congénita
Parasitológicos	Microscopía óptica	-	++	++
	Hemocultivos	+	++	++
	Xenodiagnósticos	+	++	N.A.
Serológicos	Parásito completo	++	+	-
	Fracción parasitaria	++	+	-
	Antígenos recombinantes	++	+	+
Moleculares	PCR, qPCR	+	++	++
	Marcadores genotípicos	N.A.	N.A.	N.A.
	Marcadores bioquímicos	N.A.	?	?

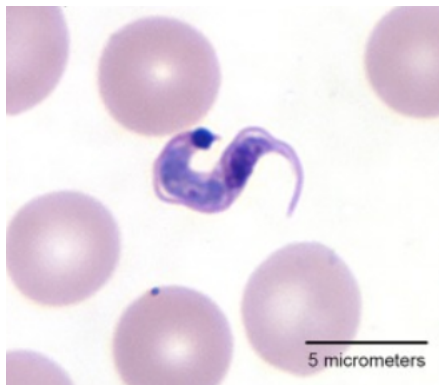
Nota: La efectividad y aplicabilidad de la técnica disminuye de (++) a (-), siendo (++) muy eficiente, y (-) poco eficiente. N.A., no aplica; ?, no se tiene suficiente información.

Modificada de: Balouz y cols. (2017)

B. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoo monoflagelado de la familia Trypanosomatidae y es el agente causante de la enfermedad de Chagas. Se pueden encontrar en la sangre de al menos 70 mamíferos, aunque son capaces de infectar organismos vertebrados y no vertebrados. Los miembros de la familia Trypanosomatidae son agentes causales de otras enfermedades importantes como es la tripanosomiasis africana humana (Robertson, 2015). *T. cruzi* se caracteriza por presentar un kinetoplasto voluminoso. Cuando se encuentra en el torrente sanguíneo tienen forma curva (Figura 1), semejante a una "S", con un extremo posterior puntiagudo (Hamilton y Stevens, 2017).

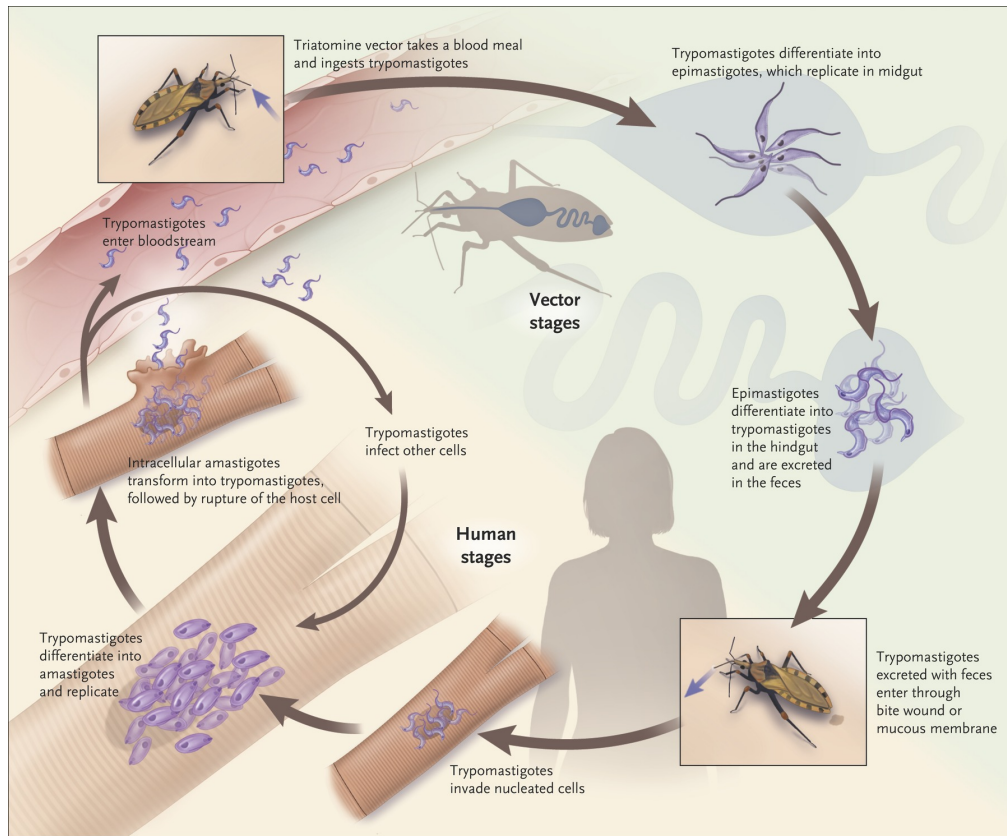
Figura 1: Morfología de *Trypanosoma cruzi* en el torrente sanguíneo.



Fuente: Bern, Messenger, Whitman, y Maguire (2019)

T. cruzi es un parásito intracelular obligatorio y presenta un ciclo de vida digenético (Figura 2). El establecimiento de la infección es vital para la supervivencia del patógeno en su hospedero. La invasión se lleva a cabo por los tripomastigotes que se localizan en el citoplasma en forma metacíclica. En este estadio *T. cruzi* presenta una forma no replicativa y es altamente infeccioso. Cuando el patógeno penetra la célula sufre un proceso de desarrollo hacia la forma de amastigotes, la cual es replicativa. La división se da en el citoplasma de la célula, en un período de cinco a seis días. Cuando al parásito ocupa la mayor parte del volumen de la célula se libera al torrente sanguíneo como resultado de la ruptura de la membrana plasmática. En la sangre se diferencia a tripomastigote e inicia la diseminación de la infección (Caradonna y Burleigh, 2011).

Figura 2: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*



Fuente: Longo y Bern (2015)

1. Diversidad genética y filogenética

Los estudios filogenéticos, basados en alineamientos de rDNA 18S y el gen gGAPDH, sugieren que existen al menos 10 clados establecidos dentro de la familia. El mapeo de los hospederos ha mostrado una alta asociación entre los clados y sus respectivos hospederos. El clado de *T. cruzi* encierra tripanosomas que son parásitos de un amplio rango de mamíferos, dentro de ellos destacan *T. cruzi* y *T. rangeli*, cuya ubicación geográfica los coloca específicamente en el continente americano. Si bien *T. rangeli* no es patógeno de humanos, la similitud morfológica entre los miembros del clado dificulta su distinción (Bayão, Cupertino, Mayers, y Siqueira-Batista, 2020; Hamilton y Stevens, 2017).

Como resultado de la diversidad genética de *T. cruzi*, este se ha organizado en siete Unidades de Tipo Discretas (DTUs) nombradas TcI-TcVI y Tcbat. Se ha estimado hasta un 40% de diversidad genética entre las cepas, siendo las nucleares las más predominantes. Se conoce que *T. cruzi* es un organismo diploide, y el genoma está distribuido en pares de cromosomas homólogos cuyo tamaño y número varía entre las cepas. Se divide por fisión binaria, por lo que produce descendientes clonales. No obstante, la acumulación de mutaciones y eventos de recombinación naturales contribuyen a incrementar la diversidad genética (Zingales, 2018).

Las DTU han sido agrupadas en clados. El clado A está conformado por TcI, el clado B por TcIII-TcVI y el clado C por TcII. Se ha establecido que las unidades TcI y TcII son linajes puros que divergieron hace un largo período de tiempo. Los TcV y TcVI tienen un origen híbrido con

TcII y TCIII; sin embargo, estas relaciones siguen en debate. El establecimiento de esta distribución ha sido importante en el monitoreo epidemiológico de la enfermedad de Chagas. En este sentido se conoce que TcI es un linaje con alta heterogeneidad genética y se encuentra disperso en el continente americano. En contraste, TcII posee una distribución geográfica más delimitada ya que hay pocos reportes de su presencia en América del Norte y América Central. Su prevalencia es mayor en las regiones este y central de Brasil. En el caso de TcIII, cuyo reservorio preferencial es el armadillo, se localiza principalmente en las regiones norte de Venezuela y Argentina. TcIV es más prevalente en el Norte y Sur de América; mientras que TcV y TcCI está asociado a países ubicados en la parte meridional de América del Sur (Zingales, 2018).

2. Triansialidasa: rol en el patógeno

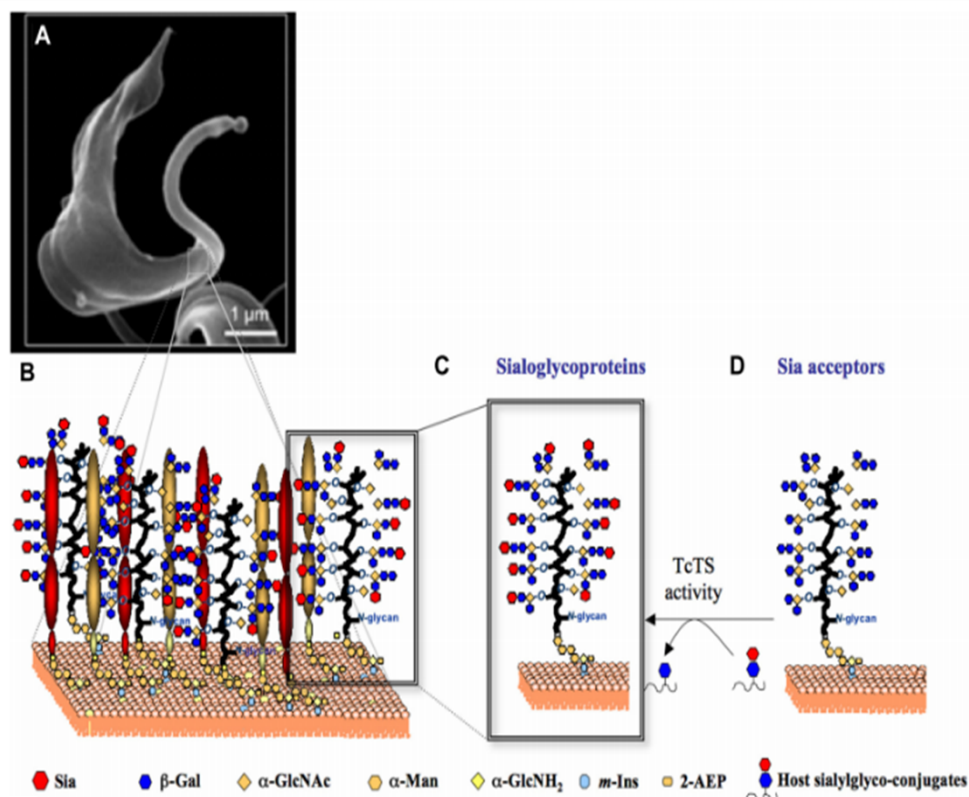
Los ácidos siálicos (Sia) son monosacáridos de nueve carbonos que se encuentran en los glucoconjugados presentes en la membrana celular o en el medio extracelular del hospedero. En los mamíferos, los Sia más comunes son el ácido N-acetilneuroamínico y el ácido N-glicolineuroamínico. En general, se encuentran en la superficie celular a una concentración local de 100mM, lo que significa que las células presentan abundantes cargas negativas, que modulan las interacciones intercelulares. *T. cruzi* no presenta la capacidad de síntesis de novo de ácidos siálicos (Buschiazzi y cols., 2012), pero en el año 1983 se descubrió que los tripomastigotes de *T. cruzi* presentan la capacidad de hidrolizar ácido siálico, derivados de glicoproteínas del hospedero, y que esta actividad es dependiente del estado de desarrollo del parásito (Pereira, 1983). A inicios de la década de los 90 se caracterizó la actividad de la enzima transialidasa de *T. cruzi*, también denominada TcTS, y se comprobó que su expresión en la superficie del parásito tiene un rol importante en la adhesión y las interacciones huésped-patógeno (Figura 3) (Freire-de Lima y cols., 2012; Rubin-de Celis, Uemura, Yoshida, y Schenkman, 2006).

Las TcTS son proteínas con un tamaño entre 80 y 200kDa. Forman parte de las glucohidrolasas CAZY, familia GH33; y a diferencia de las sialil transferasas comunes no requieren de nucleótidos de alta energía (ejemplo: citidina monofosfato) como donadores para que se lleve cabo la reacción (Agusti, Gallo-Rodríguez, y de Lederkremer, 2019). Las TcTS son uno de los componentes más expresados en el parásito ya que presentan hasta 2×10^6 copias por célula. Asimismo, es la tercera familia de genes más expresados, para un total mayor a 100 genes (Freire-de Lima y cols., 2012). Se han caracterizado al menos 15 genes que codifican para transialidasas activas (aTS) y otros 700 codificantes para las inactivas (iTS) (Nardy, Freire-de Lima, Pérez, y Morrot, 2016). En este sentido, la actividad de la enzima se ve afectada por una sustitución en el residuo 342, donde el reemplazo de una tirosina en aTS por una histidina interrumpe la actividad de transferencia, sin afectar la capacidad de la enzima para unirse a la galactosa de los glucoconjugados. Por lo tanto, las iTS funcionan como proteínas de adhesión semejantes a las lectinas (Agusti y cols., 2019; Buschiazzi y cols., 2012). Análisis genómicos indican que las Unidades Discretas TcI expresa la forma activa de la enzima, mientras que los grupos TcII a TcVIII expresan la forma inactiva (Nardy y cols., 2016).

Las TcTS se encuentran unidas a la membrana extracelular de *T. cruzi* mediante glicolípidos de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Bajo la acción de fosfatidilinositol fosfolipasas C las transialidasas son liberadas de forma dinámica al sistema circulatorio, llegando a presentar una distribución sistémica (Nardy y cols., 2016). En el torrente sanguíneo la vida media en sangre de la proteína se incrementa considerablemente por la presencia de un dominio antigénico localizado en el extremo C-terminal, denominados Antígenos Secretados de Fase Aguda (SAPA, por sus siglas en inglés) (Freire-de Lima, Fonseca, Oeltmann, Mendonça-Previato, y Previato, 2015).

La sialización ofrece ventajas adaptativas al patógeno ya que le permite sobrevivir dentro del huésped y establecer la infección. TcTS participa en el proceso de invasión del patógeno ya que facilita su entrada al citosol. La interacción de TcTS con los sialoconjugados del hospedero genera una señal de fagocitosis en las células epiteliales, las cuales bajo condiciones normales no están involucradas en la fagocitosis de parásitos. Esto propicia la internalización del parásito en células

Figura 3: Función de la enzima transialidasa de *T. cruzi*



Fuente: Freire-de Lima y cols. (2012)

no fagocíticas (Freire-de Lima y cols., 2012). Por otra parte, la rápida sialización de la superficie del parásito que se encuentra en circulación induce la ganancia de cargas negativas en su superficie, lo que resulta ventajoso en la evasión a componentes del suero. Además, los Sia presentes en los receptores de mucina del parásito tienen la capacidad de unirse a lectinas expresadas por células dendríticas. Como resultado se favorece la inmunosupresión mediada por la disminución en la producción de Interleucina 12, la cual es indispensable para la comunicación entre la respuesta del sistema inmune innata y adaptativo (Buschiazzi y cols., 2012; Nardy y cols., 2016).

En estos procesos de transferencia de Sia se desregula el número de sialoconjugados en la superficie de células del hospedero lo que provoca alteraciones inmunológicas. Por ejemplo, se ha descrito el aumento de efectos apoptóticos en timocitos y células T maduras. Asimismo, la sialización de linfocitos B CD45 mediada por TcTS induce la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-17. En resumen, el mimetismo molecular mediado por la adquisición de un sialofenotipo atípico del parásito y la manipulación de los Sia en la superficie de células inmunes contribuye a la evasión de anticuerpos, elementos del complemento y a la modulación de la comunicación parásito-hospedero con el fin de favorecer la replicación de *T. cruzi* en las células nucleadas (Freire-de Lima y cols., 2015; Nardy y cols., 2016).

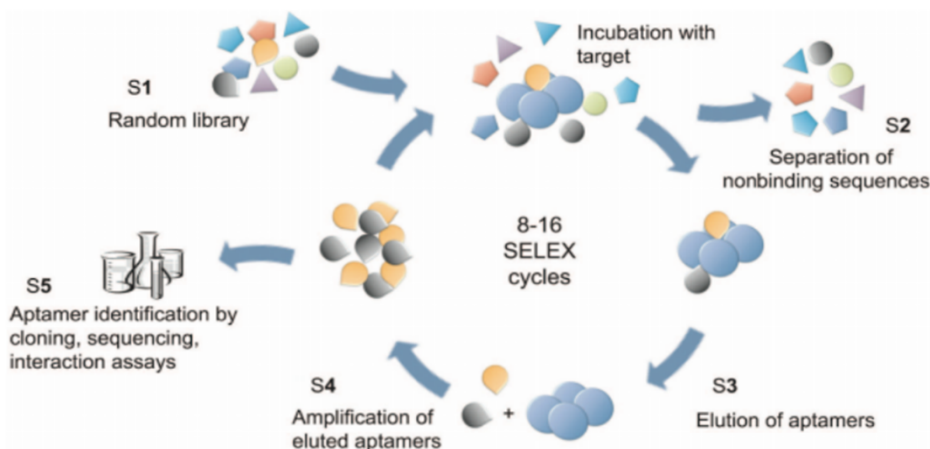
C. Aptámeros

Los aptámeros son estructuras monocatenarias cortas (15 a 80 bases) conformadas por ácidos nucleicos con una estructura terciaria y cuaternaria definida que le permite formar complejos con

proteínas, compuestos orgánicos o material genético (Aguilar, 2013; Kher y cols., 2011). Los aptámeros son funcionalmente análogos a los anticuerpos, pero presentan ventajas asociadas a su estabilidad ya que tienen una mayor resistencia a la degradación bajo condiciones fisiológicas adversas. Adicionalmente, el proceso de síntesis es más sencillo y presentan una baja inmunogenicidad (Colilla y Vallet-Regí, 2017)

Los aptámeros se seleccionan mediante un proceso de selección *in vitro* a partir de una librería de oligonucleótidos en un proceso de evolución sistemática denominado SELEX. El protocolo se desarrolló en el año 1990 y constituye una herramienta clave para el desarrollo de aptámeros en la actualidad. El protocolo (Figura 4) se basa en la selección de aptámeros a partir de una librería generada aleatoriamente como resultado de su incubación con la molécula blanco. Las secuencias que no se unen son separadas mediante métodos de filtración con nitrocelulosa o electroforesis. Posteriormente, los aptámeros con alta afinidad son eluidos, amplificados y secuenciados. El proceso de enriquecimiento se repite entre 8 y 16 veces. Los ácidos nucleicos con mayor afinidad son identificados mediante procesos de clonación y secuenciación (Blind y Blank, 2015)

Figura 4: Protocolo SELEX



Fuente: Blind y Blank (2015)

1. Diseño *in silico* de aptámeros

El desarrollo de las tecnologías de secuenciación ha permitido optimizar el proceso de selección de aptámeros basado en SELEX; sin embargo, el costo y el tiempo asociado al mismo sigue siendo alto. El enfoque de desarrollo *in silico* constituye una alternativa prometedora para los procesos de selección y optimización convencionales (Hamada, 2018). En este sentido, Im, Park y Han (2019) desarrollaron un modelo para la construcción de secuencias de ácidos nucleicos con afinidad hacia una proteína. El método se basa en el uso de redes neuronales de corta memoria para generar un modelo capaz de predecir estructuras de ADN o ARN con alta afinidad hacia una proteína blanco específica. Los resultados de la investigación sugieren que este enfoque puede ser utilizado para la construcción de grupos de aptámeros potenciales.

Paralelamente, el software MAWS ofrece una alternativa *in silico* para la simulación del proceso de SELEX. El algoritmo requiere de la molécula blanco en formato PDB, la cual sirve como referencia para posicionar los cuatro nucleótidos aleatoriamente en una distribución uniforme en el espacio. En

este paso se calcula la función de partición Z y la energía libre de Gibbs de cada conformación única. Como resultado, se selecciona la secuencia cuya conformación se posicione a una distancia mínima del blanco y presente la menor entropía. Esta conformación se utiliza como referencia en cada una de las iteraciones realizadas (Team:Heidelberg, 2015).

Según Hamada (2018), la generación de grupos de aptámeros es un paso esencial para el análisis *in silico* de aptámeros. El proceso consiste en analizar las secuencias generadas mediante el protocolo de SELEX y generar grupos en base a la abundancia de aptámeros, patrones en las secuencias y la estructura secundaria. La identificación de aptámeros candidatos se realiza mediante estudios de motivos de unión entre oligonucleótidos y la molécula blanco. Los métodos se basan principalmente en el estudio de motivos en los perfiles estructurales (estructura secundaria, bucles, bucles internos, apareo de bases, horquillas, etcétera).

Este enfoque se ha empleado en el diseño y la validación de dos aptámeros de ARN de alta afinidad hacia la molécula de adhesión de las células epiteliales (EpCAM). En el estudio se utilizó un aptámero previamente derivado de procesos SELEX. Primeramente, se realizó una simulación de la dinámica molecular con el fin de predecir la estructura de ARN secundaria y la perturbación de energía libre. Además, se realizó un análisis de acoplamiento molecular con EpCAM. Adicionalmente, se generaron dos mutantes con afinidad de unión superior al aptámero original, comprobado experimentalmente mediante una titulación calorimétrica isotérmica (Bell y cols., 2020).

Acoplamiento molecular en el diseño *in silico* de aptámeros

El acoplamiento molecular es un método computacional que se utiliza para predecir la conformación en la cual un receptor y un ligando se unen para formar un complejo estable (Pérez y Tvaroška, 2014; Roy, Kar, y Das, 2015). Mediante este procedimiento se evalúan las posibles posiciones en las que se lleva a cabo la interacción entre las moléculas y se predice la afinidad del ligando hacia el receptor (Roy y cols., 2015). Los programas de acoplamiento molecular se caracterizan por llevar a cabo dos procesos generales que incluyen el receptor y el ligando. El primero de ellos es el proceso de muestreo, en el que se estudian las posibles poses, es decir las conformaciones, traslaciones y orientaciones, que puede tomar el ligando bajo las restricciones asociadas al sitio de unión del receptor. El segundo proceso consiste en la selección y clasificación de las configuraciones con menor energía de acoplamiento según las funciones de puntuación incorporado en el programa (Buglak, Samokhvalov, Zherdev, y Dzantiev, 2020; Pérez y Tvaroška, 2014). Las funciones de puntuación generalmente incluyen variables parametrizadas (interacciones polares-apolares, la entropía, los efectos que solvatación, etcétera) que son indispensables para la formación de los complejos receptor-ligando (Pérez y Tvaroška, 2014).

Por ejemplo, el programa HADDOCK utiliza información referente a interacciones bioquímicas y biofísicas extraídas de datos experimentales para llevar a cabo los acoplamientos moleculares. Para realizar el proceso de muestreo se toman en cuenta los residuos activos, es decir aquellos que son altamente accesibles por el solvente y están involucrados en las interacciones intermoleculares. Luego del acoplamiento, las estructuras se categorizan según la energía intermolecular, que consiste principalmente en la suma de las energía electrostáticas, de van der Waals y las restricciones asociadas a dichas interacciones (Dominguez, Boelens, y Bonvin, 2003). El estudio de la naturaleza de dichas interacciones es indispensable para comprender las bases de la estabilidad de los complejos. En los complejos de aptámeros de ARN y proteínas, predominan las interacciones electrostáticas entre los grupos fosfatos de los aptámeros que están cargados negativamente y los residuos con carga positiva de la proteína. No obstante, existen casos en los que la estabilidad resulta de la abundancia de interacciones de van der Waals o la formación de enlaces de hidrógeno (Ruigrok y cols., 2012). En este sentido, se han caracterizados complejos cuya afinidad de unión depende en al menos un 80 % de la formación de enlaces de hidrógenos (Cai y cols., 2018).

2. Métodos de detección de patógenos basados en aptámeros

El tratamiento temprano de las enfermedades infecciosas viene acompañado de la disponibilidad del desarrollo de pruebas diagnósticas rápidas y sensibles. En este sentido, los aptámeros se caracterizan por tener una capacidad de discriminación alta, son capaces de distinguir entre isómeros conformacionales o proteínas altamente relacionadas. Además, se ha demostrado que poseen una sensibilidad y selectividad similar a la de los anticuerpos. Los aptámeros han demostrado ser precisos en la detección del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), el reconocimiento *Salmonella enterica*, el virus de influenza y de biomarcadores de infecciones microbianas causadas por *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthracis*, entre otras. Asimismo, se han utilizado para la identificación de parásitos como *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Toxoplasma* y *Trichomonas* (Banerjee y Nilsen-Hamilton, 2019; Ospina-Villa y cols., 2020).

3. Empleo de aptámeros en la detección de la enfermedad de Chagas

Durante la fase crónica o el establecimiento de la enfermedad de Chagas, el número de parásitos en el torrente sanguíneo tiende a ser muy bajo dificultando la detección de la enfermedad mediante microscopía o técnicas moleculares. Con el fin de optimizar la sensibilidad de ambas técnicas se desarrolló un método de aglutinación de *T. cruzi* en sangre. En el estudio se realizaron 12 rondas de selección SELEX y se determinó que uno de los aptámeros seleccionados presentaba una alta afinidad hacia la superficie extracelular del parásito en fase tripomastigote. La aglutinación se logró al unir esferas paramagnéticas al aptámero. Mediante el método lograron detectar un mínimo de 0.33 parásitos/mL. Adicionalmente, la concentración de *T. cruzi* incrementó la sensibilidad de la detección de la enfermedad mediante PCR tiempo real (Nagarkatti y cols., 2012).

En el año 2014, el grupo de investigación citado anteriormente generó un aptámero de ARN, mediante el método de SELEX, utilizando como blanco antígenos secretados por *T. cruzi* tripomastigote (TESA). La afinidad de unión de los aptámeros se determinó mediante un ensayo de aptámeros unidos a una enzima (ELA; por sus siglas en inglés). El uso de los TESA como biomarcadores de la enfermedad sugiere que estos pueden ser empleados en el diseño de pruebas diagnósticas no serológicas y no PCR (Nagarkatti, de Araujo, Gupta, y Debrabant, 2014).

D. Métodos *in silico* para la predicción de regiones inmunogénicas

Los algoritmos para la identificación de regiones inmunogénicas en moléculas de tipo proteicas se han optimizado en los últimos 40 años; de modo que en la actualidad es posible predecir con relativa exactitud el potencial inmunogénico total o regional de una proteína de interés, mediante la generación de un puntaje de inmunogenicidad (De Groot, McMurry, y Moise, 2008). Los métodos *in silico* se caracterizan por ser de alta eficiencia y tener un bajo costo, respecto a métodos *in vivo* o *in vitro*, por lo que son indispensables en el diseño racional de proteínas terapéuticas nuevas. Los primeros métodos para la detección de regiones inmunogénicas se basaban únicamente en la secuencia de la proteína y fueron reemplazados por los algoritmos de aprendizaje automático. En este sentido, los métodos basados en secuencias tienden a generar mayor sesgo en las predicciones ya que son muy sensibles a las composiciones de la base de datos con la cual fueron entrenados (Doneva, Doytchinova, y Dimitrov, 2021).

1. Modelo de predicción de epítomos lineales

Los epítomos de células B se clasifican en lineales y conformacionales. Los epítomos lineales son péptidos cortos conformado por un número específico de aminoácido posicionados secuencialmente. Esta característica permite realizar predicciones en base a las propiedades intrínsecas de los aminoácidos, como la estructura, carga, hidrofobicidad y área de exposición (Doneva y cols., 2021). El predictor de epítomos B secuenciales BepiPred-2.0 (<http://tools.immuneepitope.org>) es servidor en línea que utiliza un algoritmo de Bosque Aleatorio entrenado con regiones epítomos provenientes de estructuras de cristalografía (Jespersen, Peters, Nielsen, y Marcatili, 2017). El entrenamiento del algoritmo con estructuras terciarias incorpora la posibilidad de predecir epítomos conformacionales, es decir regiones inmunogénicas discontinuas en la secuencia primaria de la proteína, pero que se encuentran en proximidad espacial como resultado del plegamiento de la proteína. Cabe recalcar que estos epítomos pueden llegar a constituir el 90 % de los epítomos B (Doneva y cols., 2021). Adicionalmente, la herramienta realiza un refinamiento de la predicción mediante el cual se seleccionan los epítomos potenciales, es decir todos aquellos que poseen una puntuación de inmunogenicidad superior al umbral seleccionado por el usuario. Por lo tanto, BepiPred-2.0 posee poder predictivo razonable para generar predicciones de calidad (Jespersen y cols., 2017).

2. Escala de inmunogenicidad de Kolaskar y Tongaonkar

La escala de inmunogenicidad de Kolaskar y Tongaonkar (<http://tools.immuneepitope.org>) es un método predictivo de regiones inmunogénicas dado la secuencia primaria de proteína. La predicción se realiza en base a las propiedades fisicoquímicas de los residuos de la proteína y su respectiva frecuencia (Amat-ur Rasool, Saghir, y Idrees, 2015). Teniendo en cuenta que la frecuencia de un aminoácido específico puede ser alta tanto en la región inmunogénica como en la proteína total, el método considera la hidrofobicidad, accesibilidad y flexibilidad del aminoácido de referencia dentro de la estructura de la proteína. Con ello es posible predecir con un 75 % de exactitud una determinante antigénica dentro de una proteína (Kolaskar y Tongaonkar, 1990).

A. Hipótesis

1. Hipótesis de investigación

- Los aptámeros de ARN desarrollados *in silico* presentan afinidad de unión hacia la proteína transialidasa de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas.

2. Hipótesis alternativa

- Los sitios de unión del aptámero se superponen con regiones potencialmente inmunogénicas.
- Los sitios de unión del aptámero coinciden con sitios de SNPs que generan mutaciones no sinónimas.

3. Hipótesis nula

- Los aptámeros de ARN desarrollados *in silico* no presentan una especificidad de unión hacia la proteína transialidasa de *Trypanosoma cruzi*

B. Variables

Cuadro 2: Definición conceptual y operacional de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional
Aptámeros	Oligonucleótidos de ADN o ARN conformados por 20 a 60 pares de bases que toman una conformación secundaria y terciaria que le otorga la capacidad de reconocer un blanco (Kher y cols., 2011).	Evaluación de estructuras secundarias y terciarias de los aptámeros. Análisis de dinámica molecular (Sabri y cols., 2019; Zuker, 2003).
Afinidad de unión	Medida de la constante de disociación en el equilibrio. Se emplea para predecir la afinidad de un ligando a su blanco (Kastritis y Bonvin, 2013).	Realización de acoplamiento molecular e identificación de sitios de reconocimiento proteína-ligando (Sabri y cols., 2019).

C. Viabilidad

El proyecto se considera viable ya que hizo uso de servidores en línea libres que redujeron la necesidad de emplear equipos con alto poder computacional y se agilizó el proceso de generación de datos. Adicionalmente, los software empleados funcionan óptimamente en ordenadores estándares.

D. Materiales y métodos

1. Diseño de la librería de oligonucleótidos de ARN

Para la generación de aptámeros con afinidad hacia la proteína transialidasa de *T. cruzi* se generó una librería conformada por 5000 oligonucleótidos de ARN de una sola hebra (T. Wang y cols., 2019). La librería consistió en aptámeros con una longitud de 40nt, flanqueados en los extremos 5' y 3' con las secuencias "GGGGG" y "CCCCC", respectivamente; ya que la adición de extremos complementarios ricos en Citocina y Guanina incrementan la estabilidad de la estructura (Morena y cols., 2021; T. Wang y cols., 2019). Adicionalmente, se incorporó la región "GUCGUCGUCC", derivada del aptámero Apt68, el cual presenta afinidad de unión hacia la superficie de tripomastigotes de *T. cruzi* (Nagarkatti y cols., 2012). Esta región fue seleccionada a partir de un acoplamiento molecular en HDock (Yan, Zhang, Zhou, Li, y Huang, 2017) entre el aptámero previamente descrito y la proteína transialidasa extraída de *Protein Data Bank* (PDB: ID 1S0I), previamente depurada. La región variable de 20 nucleótidos se incorporó empleando el método de Secuencias Mixtas (MS, por sus siglas en inglés) del algoritmo RANDOMSEQ. Esta herramienta permite generar secuencias aleatorias con regiones constantes (Ling, 2018). Posteriormente, se evaluó el potencial de unión de la librería con la proteína blanco empleando el predictor de interacciones RNA-Proteína RPISeq. Este método computacional emplea los clasificadores *Random Forest* (RF) y *Support Vector Machine* (SVM) para predecir las interacciones entre proteínas y ARN, utilizando únicamente la estructura primaria (Muppírala, Honavar, y Dobbs, 2011). Basado en los datos generados se seleccionaron los 30 aptámeros con mayor potencial para el análisis de interacciones moleculares.

2. Evaluación de la estructura secundaria y terciaria.

La estructura secundaria se obtuvo en RNAfold (Lorenz y cols., 2011), una plataforma en línea que permite la dilucidación de estructuras secundarias de ácidos nucleótidos basados en la estructura primaria de los mismos. La estructura tridimensional se analizó en RNAComposer (Popenda y cols., 2012), un servidor que genera las posibles estructuras terciarias de moléculas de ARN mediante un proceso automatizado (Sester, McCone, Vorster, Harvey, y Hodgkiss, 2021).

3. Acoplamiento molecular y dinámica molecular

El análisis de las interacciones ARN-proteína se realizó mediante un acoplamiento molecular en los servidores en línea HDOCK (Yan y cols., 2017) y HADDOCK (Dominguez y cols., 2003). Los acoplamiento moleculares se emplearon para analizar la naturaleza de las interacciones en la herramienta web PLIP (Salentin, Schreiber, Haupt, Adasme, y Schroeder, 2015) y Pymol (Seeliger y de Groot, 2010). Los aptámeros con mayor energía de acoplamiento fueron optimizados en RANDOM-SEQ mediante la incorporación de mutaciones aleatorias en los extremos de las horquillas (Sullivan, Adams, Naik, y Milam, 2019).

4. Análisis de la afinidad de los aptámeros hacia una transialidasa de *T. rangeli*.

Se utilizó la transialidasa de *T. rangeli* (PDB: 1N1S) para evaluar la especificidad de los aptámeros, ya esta estructura presenta un 70 % de identidad con respecto a la de *T. cruzi* (Bueren-Calabuig y cols., 2014). De esta forma se simuló un proceso de selección negativo *in silico* de los aptámeros generados, mediante el cual se seleccionaron los aptámeros que presentaban menor afinidad hacia esta proteína.

5. Identificación de los sitios de unión de los aptámeros en la proteínas para la proteína transialidasa.

Se empleó la base de datos TriTryp (<https://tritrypdb.org>) para determinar la variabilidad genética del gen que codifica para la proteína transialidasa evaluada (ID: TcCLB.511183.400). Con ello se analizaron la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido [SNPs] que dan lugar a mutaciones no sinónimas. La detección de SNPs se realizó a partir de un alineamiento múltiple entre el gen que codifica para la proteína transialidasa (GenBank: L26499.1) empleada en la generación del aptámero. El resultado de este alineamiento se utilizó para predecir los SNPs en la herramienta de variantes incluida en el software DNASTar (Burland, 2000). Adicionalmente, se evaluaron las regiones con potenciales de epítomos para descartar la interferencia de posibles anticuerpos en los sitios de unión de los aptámeros. Las predicción de las regiones inmunogénicas se realizó empleando los recursos de análisis que ofrece *The Immune Epitope Database* (IEDB, por sus siglas en inglés) (<http://tools.immuneepitope.org>). Se utilizó el modelo de predicción de epítomos lineales (Jespersen y cols., 2017) y la escala de inmunogenicidad de Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar y Tongaonkar, 1990).

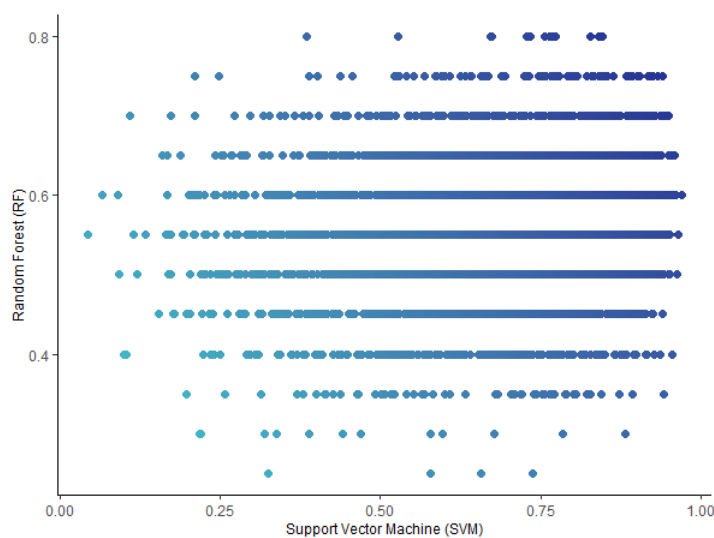
6. Análisis estadístico.

Se comparó la diferencia de medias de la energía de acoplamiento de los aptámeros respecto a las enzimas TcTS y TrTS mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Además, el efecto de

los polimorfismos sobre la energía de acoplamiento de los aptámeros con mayor afinidad hacia TcTS se analizó mediante una prueba de rango con signos de Wilcoxon. Ambas pruebas se realizaron en RStudio (RStudio Team, 2020) con un nivel de significancia del 95 %.

El diseño de aptámeros con potencial de unión hacia la proteína transialidasa de *Trypanosoma cruzi* se realizó mediante la generación de una librería de ARN de una sola hebra. Se obtuvieron cinco mil secuencias con una longitud de 40nt, incluyendo los extremos complementarios conformados por cinco nucleótidos de citocina y guanina y el motivo no pareado GUCGUCGUC. Se utilizó la herramienta RPISeq para analizar la probabilidad de unión entre la estructura primaria de los aptámeros y la proteína transialidasa (PDB: ID 1S0I). El cálculo de la probabilidad de unión se realizó mediante los clasificadores *Random Forest* (RF) y *Support Vector Machine* (SVM). Según el método RF la librería presenta una probabilidad de interacción con TcTS en un rango de 30 a 80%; sin embargo, el método de clasificación de SVM indica que existe una mayor variabilidad en la probabilidad de interacciones (Figura 5).

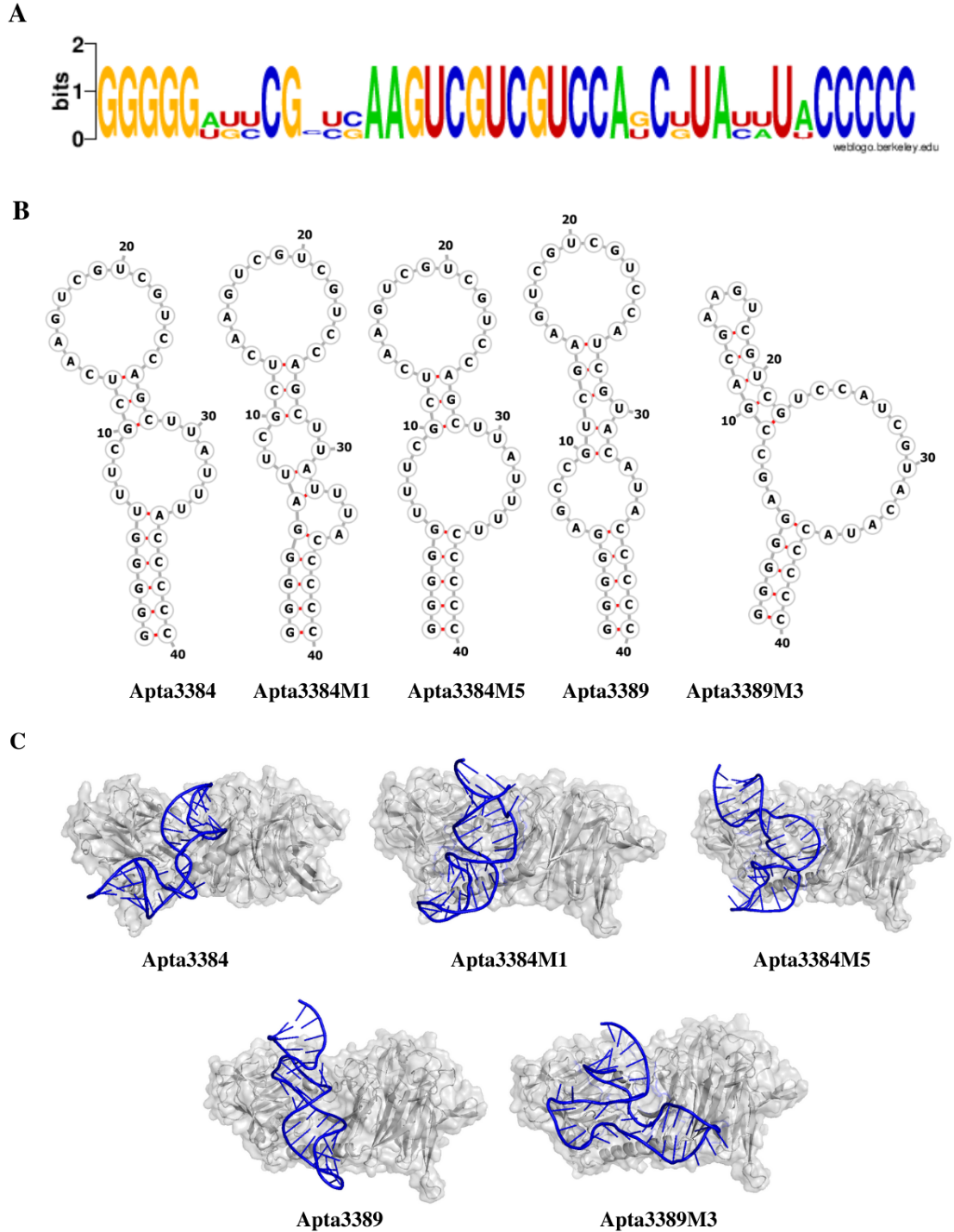
Figura 5: Probabilidad de interacción de la librería de aptámeros con TcTS según los métodos de Random Forest y Support Vector Machine



Se obtuvo la estructura secundaria y terciaria de los 30 aptámeros con mayor probabilidad de interacción con la proteína blanco. Estos se sometieron a un proceso de selección positiva con

TcTS basados en el cálculo de la energía de acoplamiento en HDOCK (Cuadro 4, Anexos). La energía de acoplamiento promedio de los complejos aptámero-proteínas generados fue de -334.4, y un

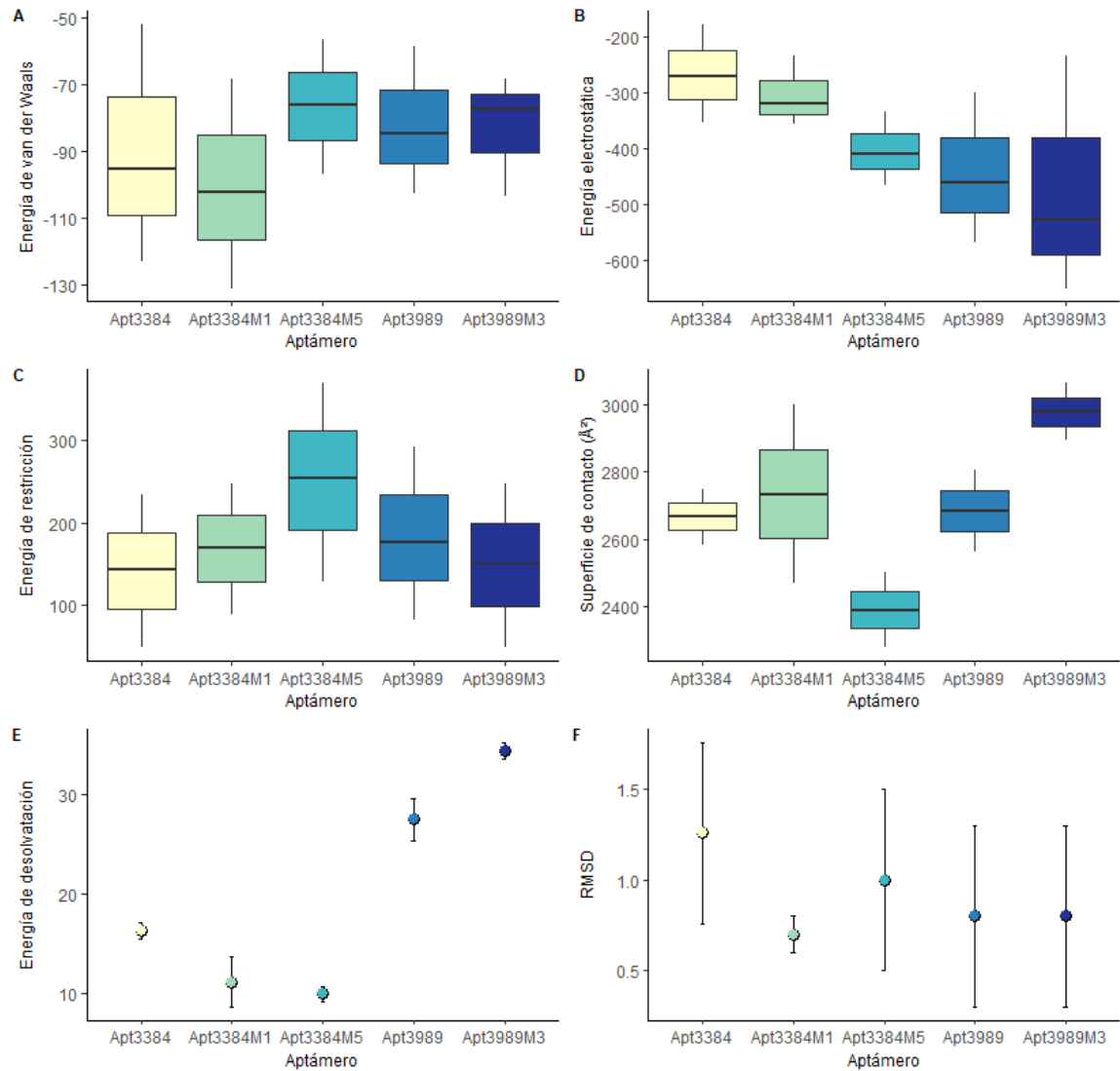
Figura 6: Estructura de los aptámeros candidatos seleccionados en los procesos de selección positivos y negativos (A) Frecuencia de residuos de los aptámeros. (B) Predicción de estructura secundaria. (C) Estructura terciaria acoplada a la proteína TcTS.



total de trece aptámeros presentaron puntuaciones superiores a la media. Estos fueron seleccionados para la realización del proceso de selección negativa con la enzima transialidasa de *Trypanosoma rangeli* (TrTS) (Cuadro 5, 6 Anexos).

En el proceso de selección negativa se identificaron los aptámeros Apta519, Apta2399, Apta3384, Apta3388 y Apta3989 como posibles candidatos. Por lo tanto, fueron empleados para realizar un segundo análisis de acoplamiento molecular en el software HADDOCK. Los resultados del modelado molecular indicaron que los aptámeros Apta3384 y Apta3989 presentaban la menor afinidad hacia la proteína TrTS. No obstante, ambas moléculas se sometieron a un proceso de optimización mediante la introducción de mutaciones puntuales en los residuos ubicados en los extremos de las horquillas (Figura 6). Los mutantes Apta3384M1 y Apta3384M5 presentaron una disminución significativa en la energía de acoplamiento hacia TrTS, respecto a Apta3383, siendo Apta3384M5 el candidato con menor afinidad.

Figura 7: Análisis de las interacciones moleculares de las conformaciones de mayor confiabilidad en los complejos proteína-ligando generados en HADDOCK



Cuadro 3: Aptámeros de ARN con mejor energía de acoplamiento hacia la proteína transalidasa según las simulaciones moleculares en HADDOCK.

ID	Selección positiva*		Selección negativa*	
	Puntuación	Enlaces H	Puntuación	Enlaces H
Apt3384	-149.8	25	-120.7	9
Apt3384M1	-155.9	26	-114.8	18
Apt3384M5	-130.3	30	-85.7	19
Apt3989	-165.2	24	-115.5	16
Apt3989M3	-176.8	29	-133.1	25

*Diferencia estadística significativa, $p = 6.104^{-5}$

Adicionalmente, se identificó a Apta3989M3 como el aptámero con mayor afinidad hacia TcTS (Cuadro 3). Las puntuaciones del acoplamiento molecular según HADDOCK son el resultado de la estimación de las energías de van del Waals, electrostáticas, de restricción y de solvatación, así como el cálculo de la superficie de contacto entre la proteína y el ligando (Figura 7 A-E). Cabe destacar que los valores presentados son representativos para el conjunto de conformaciones con mayor confiabilidad, por lo tanto se identificó la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas (RMSD) entre cada cluster seleccionado (Figura 7 F).

Se consideró la posibilidad de interferencias generadas por la unión de anticuerpos a TcTS sobre la estabilidad de las interacciones proteína-ligando; por lo tanto, se identificaron las regiones con potencial de epítomos en la proteína transalidasa según los modelos de predicción de epítomos lineales y la escala de inmunogenicidad de Kolaskar y Tongaonkar (Figura 11, Anexos). Al alinear los péptidos inmunogénicos generados con ambos modelos (Figura 8) se identificaron seis regiones consenso que

Figura 8: Comparación de las regiones con potencial de epítomo según la escala de inmunogenicidad de Kolaskar y Tongaonkar y la predicción de epítomos lineales.

TSTc referencia	MLAPGSSRVELFKRQSSKVPFEKDGKVTERRVVHVSFRLPALVNVVDGVMVAIADARYETSND	60
Epítomos lineales	RVELFKRQSSKVPFEKDGKVTERTSND	
Escala de inmunogenicidad	VPFEKDGKVTARYETSND	
TSTc referencia	NSLIDTVAKYSVDDGETWETQIAIKNSRASSVSRVVDPTVIKGNKLYVLVGSYNSRSRY	120
Epítomos lineales	NDDGETWETQIAIKNSRASSVSSRSRY	
Escala de inmunogenicidad	DDGETWERYNSRSRY	
TSTc referencia	WTSHGDAARDWDILLA VGEVTKSTAGGKITASIKWGSPPVSLKEFFPAEMEGMHTNQFLGGA	180
Epítomos lineales	WTSHGDAARDKSTAGGKITASIKWGSPPVSLKEFFPAEMEGMH	
Escala de inmunogenicidad	W	
TSTc referencia	GVAIVASNGNLVYPVQVTNKKKQVFSKIFYSEDEGKTWFKGKGRSAFGCSEPVVALEWEGK	240
Epítomos lineales	GKTWFKGKGRSAFGCS	
Escala de inmunogenicidad	TNKKKQVSEDEGKTWK	
TSTc referencia	LIINTRVDYRRRLVYESSDMGNSWLEAVGTLSRVWGPSPKSNQPGSQSSFTAVTIEGMRV	300
Epítomos lineales	RVDYRRRLGNSWLEAVGTLSRVWGPSPKSNQPG	
Escala de inmunogenicidad	PSPKSNQPG	
TSTc referencia	MLFTHPLNFKGRWLRDRNLWLTDNQRIYNVGQVSI GDENSAYSSVLYKDDKLYCLHEIN	360
Epítomos lineales	NFKGRWLQRIYNVGQVSI G	
Escala de inmunogenicidad	RWLRDR	
TSTc referencia	SNEVYSLVFARLVGELRIIKSVLQSWKNWDSHLSSICTPADPAASSSERGCGPAVTTVGL	420
Epítomos lineales	QSWKNWDSHLSSICTPADPAASSSERGCGPAV	
Escala de inmunogenicidad		
TSTc referencia	VGFLSHSATKTEWEDAYRCVNASTANAERVPNGLKFAVGGGALWPVVSQQGQNQRVRFAN	480
Epítomos lineales	TKTEWERVPSQQGQN	
Escala de inmunogenicidad	SATKTEWEDAVSQQGQNQRVRF	
TSTc referencia	HAFTVVASVTIHEVPSVASPLLGASLDSSGGKKLLGLSYDERHQWQPIYGSTPVTPTGSW	540
Epítomos lineales	PSGSTPVTPTGSW	
Escala de inmunogenicidad	SYDERHQWQ	
TSTc referencia	EMGKRYHVLTMANKIGSEYIDGEPLEGSQTVVPDERTPDISHFYVGGYKRS DMPTISH	600
Epítomos lineales	EMGPLEGSQTVVPDERTRSDMPT	
Escala de inmunogenicidad	EMGKRYPDERTPD	
TSTc referencia	VTVNVVLLYNRQLNAEEIRTLFSLQDLIGTEAHMDSSSDTSA	642
Epítomos lineales	LNAEEIRTLFSLQDLIGTEAHMDSSS	
Escala de inmunogenicidad	YNRQLN	

Nota: En negrita se encuentran resaltados las regiones epítomos descritas por Pitcovsky y cols. (2001).

no se sobreponen al sitio de unión de los aptámeros (Figura 9).

Figura 9: Visualización de las regiones epítomos consenso según la escala de inmunogenicidad de Kolaskar y Tongaonkar y la predicción de epítomos lineales en el complejo Apta3384-TcTS.

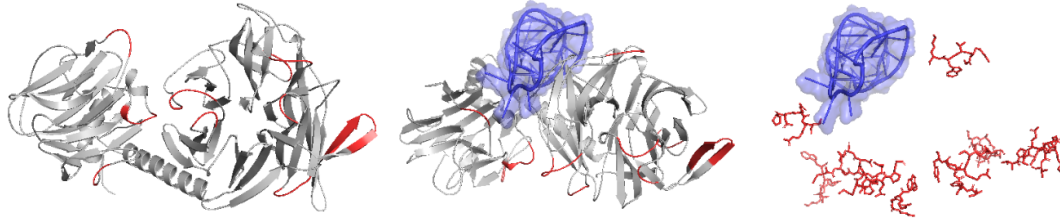
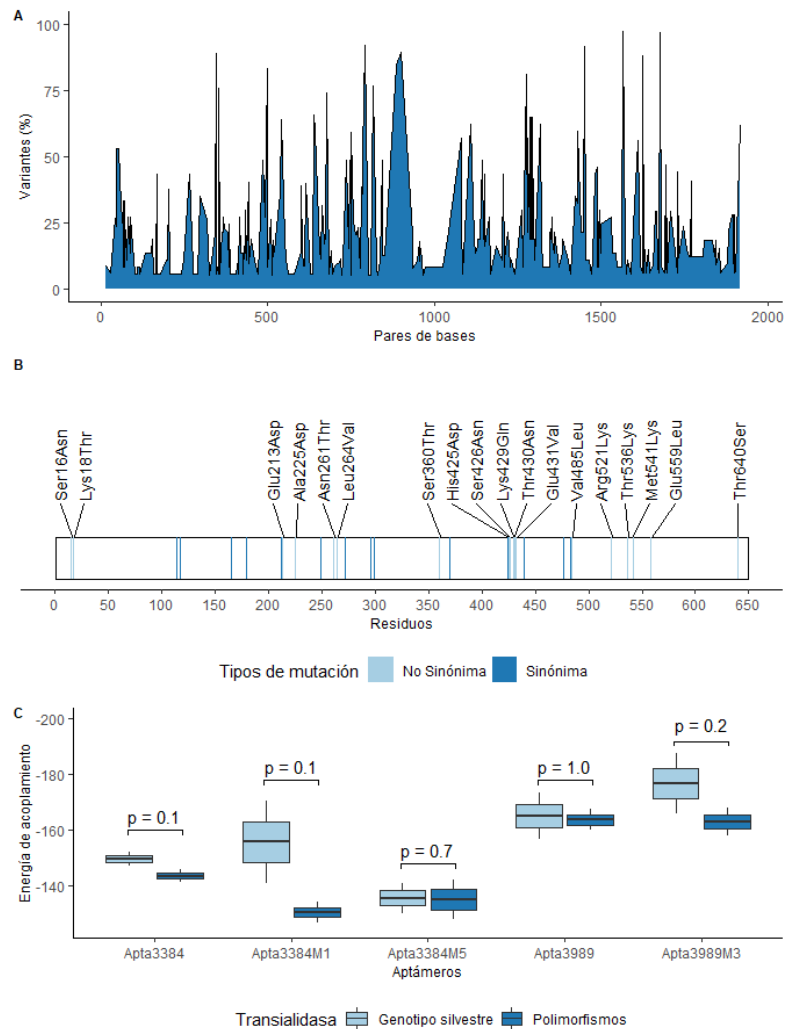


Figura 10: Análisis de polimorfismos en genes codificantes de la proteína transialidasa en *T. cruzi* TcI. (A) Frecuencia de las variantes detectadas. (B) Polimorfismos asociados a mutaciones no sinónimas. (C) Energía de acoplamiento de los complejos aptámero-proteína bajo la presencia de polimorfismos no sinónimos en TcTS. Valor -p según prueba de Wilcoxon.



Paralelamente, se realizó un análisis de variantes genéticas de la enzima transialidasa para el grupo TcI de *Trypanosoma cruzi*. Se obtuvieron 323 secuencias anotadas como transialidasa en la base de datos *Trityp* y se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias que presentaban un porcentaje de identidad superior al 75%. La cobertura del alineamiento fue en promedio superior al 80%, lo que permitió identificar la frecuencia de polimorfismos en el gen codificante para la TS (Figura 10 A). Se analizaron las variantes presentes en al menos el 50% de las secuencias y se clasificaron en mutaciones de tipo no sinónimas y sinónimas. Se identificaron un total de 18 polimorfismos que dan lugar a cambios de aminoácidos (Figura 10 B). Los SNPs detectados fueron comparados con los residuos de la TcTS involucrados en la interacción proteína-aptámero (Cuadro 7, Anexos). Al menos uno de los polimorfismos His425Asp, Ser426Asn, Lys429Gln, Thr430Asn y Glu431Val coincidieron con los motivos de unión de los aptámeros candidatos y todos estaban presentes en la interacción TcTS-Apta3484M5. No obstante, estas variaciones no afectan de forma significativa la energía de acoplamiento de los complejos aptámero-proteína (Figura 10 C).

El uso de aptámeros como herramientas para la detección de patógenos ha cobrado interés en las últimas décadas como resultado de su alta capacidad de discriminación, sensibilidad y estabilidad (Banerjee y Nilsen-Hamilton, 2019). En el presente trabajo se evaluó el potencial de aptámeros diseñados *in silico* para la detección de la proteína transialidasa de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas. El proceso de selección de aptámeros inició a partir de una librería aleatoria, conformada por cinco mil oligonucleótidos. Los aptámeros generados presentaban un longitud de 40nt y estaban flanqueados por secuencias complementarias ricas en guanina y citocina. Esta región constante le brinda estabilidad estructural y selectividad ya que los aptámeros con un contenido GC superior al 50% forman estructuras más complejas y funcionales, como es el caso de las horquillas, y se maximiza la probabilidad de unión hacia la molécula blanco (Adachi y Nakamura, 2019). Adicionalmente, la incorporación del motivo funcional GUCGUCGUC (Nagarkatti y cols., 2012) contribuyó a incrementar el número de bases libres (Fig 6B), ya que aptámeros de alrededor de 50nt deben tener al menos 10 bases no apareadas para maximizar el número total de candidatos potenciales (T. Wang y cols., 2019). Consecuentemente, 21nt fueron aleatorizados empleando el algoritmo RANDOMSEQ, dándole a cada base (G, C, A, T) igual probabilidad de selección.

El primer paso de selección de candidatos se llevó a cabo mediante el cálculo de probabilidad de unión de los aptámeros hacia TcTS, utilizando únicamente la estructura primaria (Figura 5). La clasificación de la probabilidad de las interacciones consideró la puntuación obtenida con los métodos de Random Forest (RF) y Support Vector Machine (SVM). Según la predicción de RF la librería presenta una probabilidad de interacción con el aptámero de hasta el 80% con un mínimo de 20%, lo que sugiere que la librería diseñada contiene candidatos potencialmente funcionales. En contraste, la clasificación con SVM indica que existe una mayor variabilidad en las probabilidades de las interacciones. Teniendo en cuenta que la precisión de las predicciones realizadas es superior con el método de RF (Muppírala y cols., 2011), la selección de candidatos priorizó aquellos aptámeros con SVM superior a 0.8 dado que presentaban un valor RF mayor que 0.7.

Los aptámeros seleccionados fueron sometidos a un modelado molecular en HDock, utilizando las estructuras terciarias predichas en *RNAComposer*. Se utilizó esta herramienta como primer método para el análisis de acoplamiento molecular ya que emplea un algoritmo híbrido con una capacidad de procesamiento rápida, por lo que se pueden obtener resultados de acoplamientos libres en un plazo corto de tiempo (Yan y cols., 2017). Como resultado de los procesos de selección positivos y la optimización de los candidatos con menor afinidad hacia TrTS (Cuadro 5) se identificaron los aptámeros Apta3384, Apta3384M1, Apta3384M5, Apta3389 y Apta3989M3 (Figura 6) como poten-

ciales candidatos para la detección de *T. cruzi*. Además, se realizó una simulación del proceso de selección negativo mediante acoplamiento molecular de los aptámeros candidatos con la proteína TrTS, ya que esta presenta un 70 % de identidad con TcTS. Los resultados de los acoplamientos indican que existen diferencias significativas en la afinidad de los aptámeros descritos previamente hacia las proteínas TrTS y TcTS, siendo la energía de acoplamiento menor para esta última.

A nivel de estructura primaria y secundaria se evidenciaron patrones comunes para los cinco candidatos (Figura 6 A, B) ya que se conservan al menos dos horquillas, uno de los cuales contiene fragmentos de la región no pareada GUCGUCGUC, y no se observan alteraciones en las regiones complementarias 3' y 5'. No obstante, a nivel tridimensional se observaron modificaciones en la distribución espacial del aptámero en TcTS (Figura 6C). Estos cambios conformacionales se derivan del aumento o alteraciones en la distribución de bases no pareadas, ya que estas le confieren flexibilidad al aptámero para ajustarse a la proteína (Chushak, Martin, Chávez, Kelley-Loughnane, y Stone, 2014). Coherentemente, Apta3389M3, quien presenta un motivo rico en bases que no forman pares de Watson-Crick, presenta la mayor superficie de contacto con TcTS.

Las mutaciones puntuales en la estructura primaria de Apta3384 y Apta3389 produjeron variaciones significativas en la energía de acoplamiento de los aptámeros hacia TcTS y TrTS. Lo que resulta necesario en el diseño de aptámeros selectivos (Cuadro 3). El número de enlaces de hidrógenos entre los cinco complejos no varió acorde con la puntuación del acoplamiento en HADDOCK. Esto se debe, probablemente, a que el método de cálculo de la energía de acoplamiento considera la suma de la energía electrostática, la energía de van der Waals, las violaciones energéticas y la superficie de contacto entre la proteína y el ligando (Vangone y cols., 2017). En las relaciones aptámero-proteína es necesario enfatizar en el número de enlaces de hidrógeno entre las cadenas laterales con carga positiva de la proteína y los grupos fosfatos cargados negativamente del ARN (Cuadro 3). Estos son un indicador de la estabilidad y afinidad del complejo ya que constituyen la fuerza de unión más abundante entre ambas moléculas, llegando a constituir el 80 % de la energía de unión (Cai y cols., 2018). Por lo tanto, se puede estimar que el complejo Apta3384-TrTS presentará menor estabilidad *in vivo* que su contraparte positiva, aunque no presenta la mejor afinidad hacia TcTS, respecto a los otros aptámeros.

Las interacciones electrostáticas (Figura 7B) entre los ácidos nucleicos y las proteínas también son importantes en la unión de la proteína con su ligando. Estas interacciones son más predominantes en los complejos formados por Apt3989 y Apt3989M3, lo cual concuerda con el hecho de que sus energías de acoplamiento son superiores al resto de complejos. Cabe recalcar que la intensidad de estas interacciones puede ser modulada favorablemente mediante la concentración de sales de la reacción (Rangnekar y cols., 2012), por lo que no se descarta la importancia de estas fuerzas en los otros complejos. Las interacciones no covalentes mediadas por la energía de van der Waals (Figura 7 A) son más débiles que los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas, pero se ha demostrado que la abundancia de estas interacciones en complejos proteína-aptámero resultan indispensables para incrementar la afinidad de unión de los ligandos (Ruigrok y cols., 2012), por lo que la estabilidad en los complejos Apt3989 y Apt3989M3 está dada principalmente por este tipo de interacciones.

La incorporación de la energía de restricción (Figura 7C) en el análisis de acoplamiento sugiere que los residuos activos derivados del análisis en HDOCK no son estrictamente parte de la interfase del complejo. Los resultados energéticos positivos se interpretan como la presencia de residuos activos falsos positivos, es decir residuos que no se encuentran a una distancia inferior a 5Å (Schmitz y cols., 2012). Una predicción inadecuada de los residuos activos en Apta3384M5 está asociada al incremento de las violaciones de la energía de restricción, lo que explica el hecho de que este complejo presente una puntuación de acoplamiento inferior, aun cuando la energía de van der Waals, las interacciones electrostáticas y el número de enlaces de hidrógeno sugieren que el complejo presenta una afinidad similar a Apt3989. Finalmente, el área de la superficie de contacto para todos los complejos fue superior a 2000Å² (Figura 7 D). Con estos resultados no se puede establecer que un incremento del área se correlaciona positivamente con la afinidad de los ligandos hacia la transilidasa, ya que a

partir de los 2000 Å la densidad energética de la superficie tiende a ser constante (Chen, Sawyer, y Regan, 2013).

La evaluación de epítomos putativos mediante los métodos de predicción de epítomos lineales y la escala de inmunogenicidad reflejan una abundancia de regiones con potencial inmunogénico (Figura 8). Los resultados generados con el método de epítomos lineales fueron menos específicos en comparación con la escala de inmunogenicidad, pero las predicciones fueron más sensibles si se comparan con las regiones descritas por Pitcovsky y cols. (2001). Las diferencias de las predicciones radican en el método de cálculo empleado. La predicción de epítomos lineales le otorga a cada aminoácido un valor dentro de una escala de propensión combinado con un modelo de cadenas de Márkov, lo que se traduce a un incremento en la capacidad predictiva del método (Larsen, Lund, y Nielsen, 2006). No obstante, ambos métodos presentan limitaciones en las predicciones, por lo que se analizaron únicamente la posibilidad de interferencia de los epítomos consensos (Figura 9). Se determinó que las regiones inmunogénicas putativas no coinciden con los sitios de unión del aptámero. Esto se debe a que el aptámero se une a las cercanías de la cavidad catalítica de la enzima en el extremo N terminal, y la región inmunogénica de la proteína se ubican en el extremo C terminal, ya que de esta forma no se interfiere con la actividad de la enzima (Nardy y cols., 2016). En este sentido, estudios sugieren que el dominio inmunogénico es una estrategia evolutiva empleada por el parásito para prevenir la producción de anticuerpos neutralizantes hacia el dominio funcional (Freire-de Lima y cols., 2015).

Finalmente, en el análisis de polimorfismos en genes codificantes para transalidasa se detectaron 33 mutaciones con una frecuencia superior al 50%, de las cuales 18 dan lugar a mutaciones no sinónimas. Los SNPs His425Asp, Ser426Asn, Lys429Gln, Thr430Asn y Glu431Val están involucrados en los sitios de interacción de los aptámeros candidatos. Las transiciones de serina y treonina a asparagina no contribuyen a cambios significativos en el microambiente ya que se mantiene la polaridad y al carga de los aminoácidos; y la sustitución de histidina por ácido aspártico no se modifica la hidrofobicidad, pero la cadena lateral del aminoácido funciona como un aceptor y no como un dador de electrones (Fisher, 2001). Esto se comprobó ya que no existen diferencias significativas en la energía de acoplamiento de los aptámeros con la proteína TcTS que expresa estos polimorfismos.

La aplicación de un enfoque *in silico* para el diseño de aptámeros con potencial en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas permitió generar cinco secuencias de aptámeros candidatos. La identificación de regiones inmunogénicas putativas y el análisis de variantes sugiere que no hay interferencias mediadas por anticuerpos o cambios en la estructura de la proteína que modifiquen significativamente la energía de acoplamiento del ligando hacia TcTS. En este punto cabe recalcar que los métodos de predicción empleados para la predicción de epítomos no son altamente sensibles y por lo tanto se requiere confirmar estos resultados en experimentos *in vitro*. Asimismo, el análisis de variantes está restringido hacia la unidad discreta TcI de *T. cruzi* por lo que una posible aplicación en el diagnóstico podría estar restringida por la distribución geográfica del patógeno. Una limitación importante en el estudio es el proceso de selección negativa basado en análisis de modelado molecular ya que las puntuaciones obtenidas se encuentran en unidades arbitrarias y no es posible establecer un umbral de energía que indique el grado de especificidad del aptámero.

- El diseño funcional de una librería de ARN conformada por cinco mil oligonucleótidos maximizó el número de aptámeros con afinidad hacia TcTS.
- Se generaron las estructuras secundarias y terciarias de los oligonucleótidos con potencial de aptámeros lo que permitió cuantificar su energía de acoplamiento hacia TcTS.
- El análisis de la naturaleza de las interacciones indica que Apta3989 y Apta3989M3 forman complejos más estables con TcTS, y Apta3384M5 es potencialmente el candidato más específico.
- Como resultado de los procesos de selección positiva, negativa y optimización de la librería se identificaron cinco aptámeros con afinidad hacia TcTS y se confirmó que estos presentaban mayor energía de acoplamiento hacia TrTS, pero no es posible afirmar el nivel de especificidad de los candidatos.
- El análisis de polimorfismos y la identificación de regiones inmunogénicas sugiere la ausencia de interferentes de esta naturaleza en las regiones de unión de los aptámeros que puedan disminuir significativamente la energía de acoplamiento de los complejos.

Recomendaciones

Como siguientes pasos en la investigación se recomienda validar la afinidad de unión de Apta3384M5, Apta3989 y Apta3989M3 mediante ensayos de selección *in vitro*. En este sentido se propone la estandarización de las condiciones físicas y químicas de la reacción para incrementar la energía de unión hacia TcTS y disminuir la afinidad hacia TrTS. Así mismo, se estima la posibilidad de utilizar evolución dirigida de ligandos para incrementar la especificidad de estos candidatos. Mediante estos ensayos se podrá determinar la funcionalidad de los aptámeros en el desarrollo de pruebas de flujo lateral que permitan la detección rápida de la enfermedad de Chagas.

- Adachi, T., y Nakamura, Y. (2019). Aptamers: A review of their chemical properties and modifications for therapeutic application. *Molecules*, *24*(23), 4229.
- Aguilar, Z. P. (2013). Nanobiosensors. En *Nanomaterials for medical applications*. Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385089-8.00004-2>
- Agusti, R., Gallo-Rodriguez, C., y de Lederkremer, R. M. (2019). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. a tool for the synthesis of sialylated oligosaccharides. *Carbohydrate research*, *479*, 48–58.
- Amat-ur Rasool, H., Saghir, A., y Idrees, M. (2015). Computational prediction and analysis of envelop glycoprotein epitopes of dengv-2 and dengv-3 pakistani isolates: a first step towards dengue vaccine development. *PloS one*, *10*(3), e0119854.
- Balouz, V., Agüero, F., y Buscaglia, C. A. (2017). Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. *Advances in Parasitology*, *97*, 1–45. doi: 10.1016/BS.APAR.2016.10.001
- Banerjee, S., y Nilsen-Hamilton, M. (2019). Aptamers for Infectious Disease Diagnosis. *E. Coli Infections - Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment*. doi: 10.5772/INTECHOPEN.86945
- Bayão, T. d. S., Cupertino, M. d. C., Mayers, N. A. J., y Siqueira-Batista, R. (2020). A systematic review of the diagnostic aspects and use of *Trypanosoma rangeli* as an immunogen for *Trypanosoma cruzi* infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *53*.
- Bell, D. R., Weber, J. K., Yin, W., Huynh, T., Duan, W., y Zhou, R. (2020). *in silico* design and validation of high-affinity RNA aptamers targeting epithelial cellular adhesion molecule dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(15), 8486–8493. doi: 10.1073/PNAS.1913242117
- Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., y Maguire, J. H. (2019). Chagas disease in the united states: a public health approach. *Clinical microbiology reviews*, *33*(1), e00023–19.
- Blind, M., y Blank, M. (2015). Aptamer selection technology and recent advances. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, *4*, e223.
- Bueren-Calabuig, J. A., Pierdominici-Sottile, G., y Roitberg, A. E. (2014). Unraveling the Differences of the Hydrolytic Activity of *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase and *Trypanosoma rangeli* Sialidase: A Quantum Mechanics–Molecular Mechanics Modeling Study. *Journal of Physical Chemistry B*, *118*(22), 5807–5816. doi: 10.1021/JP412294R
- Buglak, A. A., Samokhvalov, A. V., Zherdev, A. V., y Dzantiev, B. B. (2020). Methods and applications of *in silico* aptamer design and modeling. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 8420.
- Burland, T. G. (2000). Dnastar’s lasergene sequence analysis software. En *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 71–91). Springer.

- Buschiazzo, A., Muiá, R., Larrieux, N., Pitcovsky, T., Mucci, J., y Campetella, O. (2012). *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase in Complex with a Neutralizing Antibody: Structure/Function Studies towards the Rational Design of Inhibitors. *PLoS Pathogens*, 8(1), e1002474. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1002474
- Cai, S., Yan, J., Xiong, H., Liu, Y., Peng, D., y Liu, Z. (2018). Investigations on the interface of nucleic acid aptamers and binding targets. *Analyst*, 143(22), 5317–5338.
- Caradonna, K. L., y Burleigh, B. A. (2011). Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Advances in Parasitology*, 76, 33–61. doi: 10.1016/B978-0-12-385895-5.00002-5
- Chen, J., Sawyer, N., y Regan, L. (2013). Protein–protein interactions: General trends in the relationship between binding affinity and interfacial buried surface area. *Protein Science*, 22(4), 510–515.
- Chushak, Y. G., Martin, J. A., Chávez, J. L., Kelley-Loughnane, N., y Stone, M. O. (2014). Computational design of rna libraries for in vitro selection of aptamers. En *Artificial riboswitches* (pp. 1–15). Springer.
- Colilla, M., y Vallet-Regí, M. (2017). Ordered mesoporous silica materials. *Comprehensive Biomaterials II*, 644–685. doi: 10.1016/B978-0-12-803581-8.10231-0
- De Groot, A. S., McMurry, J., y Moise, L. (2008). Prediction of immunogenicity: *in silico* paradigms, ex vivo and in vivo correlates. *Current opinion in pharmacology*, 8(5), 620–626.
- Diario Centro América. (1997). *Decreto n.º 87-97, ley de servicios de medicina transfusional y banco de sangre*.
- Dominguez, C., Boelens, R., y Bonvin, A. M. (2003). Haddock: a protein- protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7), 1731–1737.
- Doneva, N., Doytchinova, I., y Dimitrov, I. (2021). Predicting immunogenicity risk in biopharmaceuticals. *Symmetry*, 13(3), 388.
- Fisher, M. (2001). Lehninger principles of biochemistry, ; by david l. nelson and michael m. cox. *The Chemical Educator*, 6(1), 69–70.
- Freire-de Lima, L., Fonseca, L., Oeltmann, T., Mendonça-Previato, L., y Previato, J. (2015). The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: three decades of studies. *Glycobiology*, 25(11), 1142–1149.
- Freire-de Lima, L., Oliveira, I. A., Neves, J. L., Penha, L. L., Alisson-Silva, F., Dias, W. B., y Todeschini, A. R. (2012). Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Immunology*, 0(NOV), 356. doi: 10.3389/FIMMU.2012.00356
- Hamada, M. (2018). *in silico* approaches to rna aptamer design. *Biochimie*, 145, 8–14.
- Hamilton, P. B., y Stevens, J. R. (2017). Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition*, 321–344. doi: 10.1016/B978-0-12-801029-7.00015-0
- Im, J., Park, B., y Han, K. (2019). A generative model for constructing nucleic acid sequences binding to a protein. *BMC Genomics* 2019 20:13, 20(13), 1–13. doi: 10.1186/S12864-019-6299-4
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., y Marcatili, P. (2017). Bepipred-2.0: improving sequence-based b-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic acids research*, 45(W1), W24–W29.
- Kastritis, P., y Bonvin, A. (2013). On the binding affinity of macromolecular interactions: Daring to ask why proteins interact. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 10, 20120835. doi: 10.1098/rsif.2012.0835
- Kher, G., Trehan, S., y Misra, A. (2011). Antisense Oligonucleotides and RNA Interference. *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*, 325–386. doi: 10.1016/B978-0-12-384964-9.00007-4
- Kolaskar, A. S., y Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*, 276(1-2), 172–174.
- Larsen, J. E. P., Lund, O., y Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear b-cell epitopes. *Immunome research*, 2(1), 1–7.
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., y Sandri, T. L. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem.

- Frontiers in Public Health*, 0(6), 166. doi: 10.3389/FPUBH.2019.00166
- Ling, M. (2018). Randomseq: Python command-line random sequence generator. *MOJ Proteomics Bioinform*, 7(4), 206–208.
- Longo, D. L., y Bern, C. (2015). Chagas' disease. *N Engl J Med*, 373, 456–466.
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Zu Siederdisen, C. H., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., y Hofacker, I. L. (2011). Viennarna package 2.0. *Algorithms for molecular biology*, 6(1), 1–14.
- Marcipar, I. S., y Lagier, C. M. (2012). Advances in Serological Diagnosis of Chagas' Disease by Using Recombinant Proteins. *Current Topics in Tropical Medicine*. doi: 10.5772/28100
- Meymandi, S., Forsyth, C., Soverow, J., Hernandez, S., Sanchez, D., Montgomery, S., y Traina, M. (2017). Prevalence of Chagas Disease in the Latin American-born Population of Los Angeles. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 64(9), 1182–1188. doi: 10.1093/CID/CIX064
- Morena, F., Argentati, C., Tortorella, I., Emiliani, C., y Martino, S. (2021). De novo ssrna aptamers against the sars-cov-2 main protease: *in silico* design and molecular dynamics simulation. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6874.
- Muppurala, U. K., Honavar, V. G., y Dobbs, D. (2011). Predicting rna-protein interactions using only sequence information. *BMC bioinformatics*, 12(1), 1–11.
- Nagarkatti, R., Bist, V., Sun, S., Fortes de Araujo, F., Nakhasi, H. L., y Debrabant, A. (2012). Development of an aptamer-based concentration method for the detection of *Trypanosoma cruzi* in blood.
- Nagarkatti, R., de Araujo, F. F., Gupta, C., y Debrabant, A. (2014). Aptamer Based, Non-PCR, Non-Serological Detection of Chagas Disease Biomarkers in *Trypanosoma cruzi* Infected Mice. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), e2650. doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0002650
- Nardy, A. F., Freire-de Lima, C. G., Pérez, A. R., y Morrot, A. (2016). Role of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase on the escape from host immune surveillance. *Frontiers in microbiology*, 7, 348.
- Ospina-Villa, J. D., Cisneros-Sarabia, A., Sánchez-Jiménez, M. M., y Marchat, L. A. (2020). Current Advances in the Development of Diagnostic Tests Based on Aptamers in Parasitology: A Systematic Review. *Pharmaceutics* 2020, Vol. 12, Page 1046, 12(11), 1046. doi: 10.3390/PHARMACEUTICS12111046
- Pan American Health Organization [PAHO]. (2017). *Health in the Americas 2017*.
- Pereira, M. E. (1983). A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Science*, 219(4591), 1444–1446.
- Pitcovsky, T. A., Mucci, J., Alvarez, P., Leguizamón, M. S., Burrone, O., Alzari, P. M., y Campetella, O. (2001). Epitope mapping of trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* reveals the presence of several cross-reactive determinants. *Infection and immunity*, 69(3), 1869–1875.
- Popenda, M., Szachniuk, M., Antczak, M., Purzycka, K. J., Lukasiak, P., Bartol, N., . . . Adamiak, R. W. (2012). Automated 3d structure composition for large rnas. *Nucleic acids research*, 40(14), e112–e112.
- Pérez, S., y Tvaroška, I. (2014). Chapter 1 - carbohydrate-protein interactions: Molecular modeling insights. En D. Horton (Ed.), (Vol. 71, p. 9-136). Academic Press. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001288000017> doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800128-8.00001-7>
- Rangnekar, A., Zhang, A. M., Li, S. S., Bompiani, K. M., Hansen, M. N., Gothelf, K. V., . . . LaBean, T. H. (2012). Increased anticoagulant activity of thrombin-binding dna aptamers by nanoscale organization on dna nanostructures. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(5), 673–681.
- RayBiotech. (2021). *Custom aptamer services*. Descargado 2021-09-1, de <https://www.raybiotech.com/custom-aptamer-services/>
- Robertson, L. J. (2015). Introduction: Some Historical and Geographical Aspects and the Relevance of Chagas Disease Among Foodborne Infections. , 1–6. doi: 10.1007/978-3-319-23410-6_1
- Roy, K., Kar, S., y Das, R. N. (2015). *Understanding the basics of qsar for applications in pharmaceutical sciences and risk assessment*. Academic press.
- RStudio Team. (2020). Rstudio: Integrated development environment for r [Manual de software

- informático]. Boston, MA. Descargado de <http://www.rstudio.com/>
- Rubin-de Celis, S. S., Uemura, H., Yoshida, N., y Schenkman, S. (2006). Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cellular microbiology*, 8(12), 1888–1898.
- Ruigrok, V. J., Levisson, M., Hekelaar, J., Smidt, H., Dijkstra, B. W., y Van der Oost, J. (2012). Characterization of aptamer-protein complexes by x-ray crystallography and alternative approaches. *International journal of molecular sciences*, 13(8), 10537–10552.
- Sabri, M. Z., Hamid, A. A. A., Hitam, S. M. S., y Rahim, M. Z. A. (2019). *in silico* Screening of Aptamers Configuration against Hepatitis B Surface Antigen. *Advances in Bioinformatics*, 2019. doi: 10.1155/2019/6912914
- Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., y Schroeder, M. (2015). Plip: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic acids research*, 43(W1), W443–W447.
- Schmitz, C., Melquiond, A. S., de Vries, S. J., Karaca, E., van Dijk, M., Kastritis, P., y Bonvin, A. M. (2012). Protein–protein docking with haddock.
- Seeliger, D., y de Groot, B. L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with pymol and autodock/vina. *Journal of computer-aided molecular design*, 24(5), 417–422.
- Sester, C., McCone, J. A., Vorster, I., Harvey, J. E., y Hodgkiss, J. M. (2021). Unravelling the binding mode of a methamphetamine aptamer: a spectroscopic and calorimetric investigation. *bioRxiv*.
- Sullivan, R., Adams, M. C., Naik, R. R., y Milam, V. T. (2019). Analyzing secondary structure patterns in dna aptamers identified via compels. *Molecules*, 24(8), 1572.
- Team:Heidelberg. (2015). *M.A.W.S.* Descargado 2021-07-17, de <http://2015.igem.org/Team:Heidelberg/software/maws>
- Vangone, A., Rodrigues, J., Xue, L., van Zundert, G., Geng, C., Kurkcuoglu, Z., ... others (2017). Sense and simplicity in haddock scoring: Lessons from casp-capri round 1. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 85(3), 417–423.
- Wang, T., Chen, C., Larcher, L. M., Barrero, R. A., y Veedu, R. N. (2019). Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. *Biotechnology advances*, 37(1), 28–50.
- Wang, X., Yang, F., Zhao, J., Xu, Y., Mao, D., Zhu, X., ... Alvarez, P. J. (2018). Bacterial exposure to ZnO nanoparticles facilitates horizontal transfer of antibiotic resistance genes. *NanoImpact*, 10(November 2017), 61–67. doi: 10.1016/j.impact.2017.11.006
- Yan, Y., Zhang, D., Zhou, P., Li, B., y Huang, S.-Y. (2017). Hdock: a web server for protein–protein and protein–dna/rna docking based on a hybrid strategy. *Nucleic acids research*, 45(W1), W365–W373.
- Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38–52. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.017
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. doi: 10.1093/NAR/GKG595

Cuadro 4: Energía de acoplamiento de los aptámeros con mayor probabilidad de interacción con TcTS según modelado molecular en HDOCK

Aptámero	Energía	Aptámero	Energía	Aptámero	Energía
Apta2399	-383.77	Apta70	-339.58	Apta3667	-317.48
Apta2369	-382.00	Apta1254	-337.80	Apta2029	-314.79
Apta3384	-370.60	Apta519	-334.71	Apta1171	-314.07
Apta3388	-369.23	Apta3299	-333.82	Apta2443	-314.01
Apta3989	-359.33	Apta471	-333.08	Apta2342	-313.88
Apta1733	-354.85	Apta2539	-330.99	Apta3467	-312.67
Apta3763	-354.51	Apta989	-327.00	Apta2506	-311.33
Apta4322	-349.97	Apta2323	-324.71	Apta2125	-311.25
Apta4590	-345.67	Apta427	-322.67	Apta4733	-306.90
Apta2532	-344.79	Apta1967	-320.70	Apta2462	-294.83

Cuadro 5: Comparación de la energía de acoplamiento de los aptámeros hacia las proteínas transialidasas de *T. cruzi* (TcTS) y *T. rangeli* (TrTS) según HDOCK.

Aptámero	Energía de acoplamiento (TcTS)	Energía de acoplamiento (TrTS)
Apta3384	-370.60	-289.92
Apta519	-334.71	-300.70
Apta3763	-354.51	-306.29
Apta2399	-383.77	-307.86
Apta4590	-345.67	-314.70
Apta4322	-349.97	-315.23
Apta70	-339.58	-315.43
Apta3388	-369.23	-317.46
Apta3989	-359.33	-320.07
Apta2532	-344.79	-323.33
Apta1733	-354.85	-327.54
Apta1254	-337.80	-333.48

Cuadro 6: Comparación de la energía de acoplamiento de los aptámeros candidatos hacia las proteínas transalidasas de *T. cruzi* (TcTS) y *T. rangeli* (TrTS) según HADDOCK.

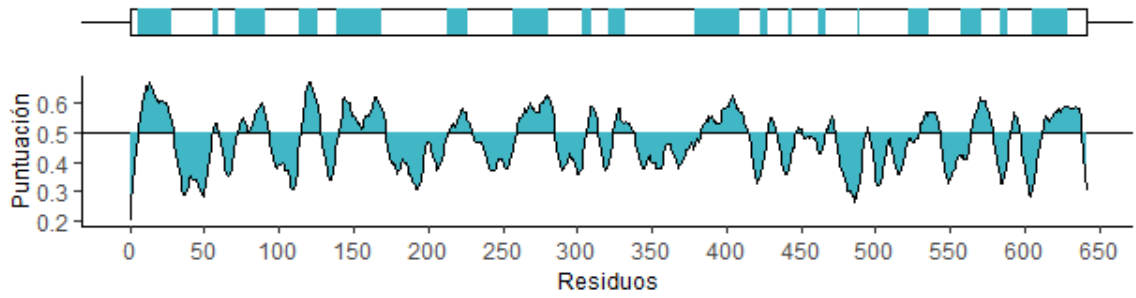
Aptámero	Acoplamiento molecular (TcTS)		Acoplamiento molecular (TrTS)	
	Energía	Enlaces H	Energía	Enlaces H
Apta519	-148.6	18	-154.9	16
Apta2399	-154.3	19	-152.8	19
Apta3384	-149.8	25	-120.7	9
Apta3388	-150	20	-137.7	18
Apta3989	-165.2	24	-115.5	16

Cuadro 7: Residuos de TcTS involucrados en la unión de los aptámeros

Apta3484	Apta3484M1	Apta3484M5	Apta3989	Apta3989M3
Arg-316	Phe-308	Arg-316	Pro-3	Gly-4
Asn-318	Arg-316	Tyr-328	Asn-318	Ser-5
Tyr-328	Asn-318	Gln-332	Tyr-328	Ser-6
Asn-329	Tyr-328	Gly-336	Asn-329	Arg-7
Arg-376	Arg-376	Arg-376	Gln-332	Glu-9
Ser-380	Ser-380	Ile-377	Ser-334	Arg-316
Ser-384	Gln-383	Ser-380	Gly-338	Tyr-328
Asn-387	Ser-384	His-425	Arg-376	Gln-332
Ser-394	Asn-387	Ser-426	Ser-380	Gly-336
Cys-396	Trp-388	The-428	Thr-430	Thr-428
His-425	Ser-394	Lys-429	Glu-431	Lys-429
Ala-427	Ser-426	Thr-430	Glu-433	Thr-430
Arg-437	Ala-427	Glu-431	Arg-437	Glu-431
Asn-440	Thr-430	Arg-437	Asn-440	Cys-438
Arg-448	Glu-431	Asn-440	Ser-442	Arg-448
Glu-630	Glu-433	Thr-443	Gln-468	Gln-468
Ala-631	Arg-437	Asn-445	Arg-474	Arg-474
His-632	Asn-440	Arg-448	Ser-507	Lys-590
	Arg-448	Lys-500	Lys-590	Arg-591
	Gln-471	Glu-630	Arg-591	Gly-593
	His-632	His-632	Ser-592	

Figura 11: Predicción de epítomos en la proteína transialidasa. **(A)** Métodos de predicción de epítomos lineales y **(B)** la escala de inmunogenicidad de Kolaskar y Tongaonkar.

A



B

